



Análisis mediante modelos de cálculo computacional de la generación de metabolitos secundarios en el citocromo P450

Análise mediante modelos de cálculo computacional da xeración de metabolitos secundarios no citocromo P450

Computational modelling analysis of secondary metabolites production by cytochrome P450

Lucía González Pinto

A Coruña, febrero de 2021



Análisis mediante modelos de cálculo computacional de la generación de metabolitos secundarios en el citocromo P450

Análise mediante modelos de cálculo computacional da xeración de metabolitos secundarios no citocromo P450

Computational modelling analysis of secondary metabolites production by cytochrome P450

Autora: Lucía González Pinto

Fdo:

GONZALEZ
PINTO LUCIA -
44495472V

Firmado digitalmente por
GONZALEZ PINTO LUCIA -
44495472V
Fecha: 2021.02.05 17:29:58
+01'00'

Facultad de presentación:
Facultad de Ciencias

Instituciones de realización del Trabajo de Fin de Máster:
Global and Ecofriendly Natural Extracts (GLECEX) S.L en colaboración con el
Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (Facultad de Ciencias UDC)



El Dr. José Manuel López Vilariño y el Dr. Manuel Becerra Fernández en calidad de tutores de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña, 5 de febrero de 2021:

Vº Bº Tutor Externo:

34892783N
JOSE MANUEL
LOPEZ (R:
B32444325)

Firmado digitalmente
por 34892783N JOSE
MANUEL LOPEZ (R:
B32444325)
Fecha: 2021.02.05
18:34:33 +01'00'

Vº Bº Tutor Académico:

BECERRA
FERNANDE
Z MANUEL -
32820909R

Firmado digitalmente
por BECERRA
FERNANDEZ MANUEL
- 32820909R
Fecha: 2021.02.05
18:38:28 +01'00'

RESUMEN

La cerveza es una bebida alcohólica producida mediante la fermentación de un mosto de cereales por parte de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Durante este proceso los azúcares del mosto se transforman en etanol, produciéndose a su vez metabolitos secundarios que afectan a las propiedades y características organolépticas de la cerveza. Para mejorar las cualidades de la cerveza se investiga la formación de estos metabolitos secundarios. Su estudio es muy complejo y el empleo de modelos de cálculo computacional para predecir su formación podría facilitar etapas iniciales de esta investigación. Recientemente se han desarrollado una serie de programas que utilizan modelos de cálculo computacional para predecir el comportamiento de las enzimas del citocromo P450, presentes en *S. cerevisiae*. El objetivo principal de este trabajo es familiarizarse con los programas CypReact y GLORY para predecir la formación de metabolitos secundarios durante la fermentación del mosto cervecero. Para ello se simuló la producción de compuestos a partir de azúcares y aminoácidos del mosto cervecero. Posteriormente, se realizó una revisión bibliográfica de las propiedades de estos compuestos para comprobar si alguno tenía alguna propiedad interesante que pudiese mejorar las cualidades de la cerveza. Finalmente, se llevaron a cabo fermentaciones en el laboratorio para analizar la producción de metabolitos durante el proceso mediante técnicas analíticas avanzadas (GC-MS/MS y LC-MS/MS). La simulación mostró que, a partir de esos precursores, se formarían algunos compuestos de interés como el ácido glucurónico, la N-hidroxiguanidina y el 5-hidroxitriptófano, pero se requieren más ensayos para confirmar la formación de estos compuestos y sus propiedades. Por otra parte, es necesario estudiar las moléculas producidas mediante GC-MS/MS y LC-MS/MS y compararlas con los resultados obtenidos en las simulaciones para así poder validar la utilidad de estos programas en este campo de aplicación.

Palabras clave: cerveza, metabolismo secundario, citocromo P450, cálculo computacional.

RESUMO

A cervexa é unha bebida alcólica producida mediante a fermentación dun mosto de cereais por parte do lévedo *Saccharomyces cerevisiae*. Durante este proceso os azucres do mosto transfórmanse en etanol, producíndose á súa vez metabolitos secundarios que afectan as propiedades e características organolépticas da cervexa. Para mellorar as calidades da cervexa invéstigase a formación destes metabolitos secundarios. O seu estudo é moi complexo e o emprego de modelos de cálculo computacional para predicir a súa formación podería facilitar etapas iniciais desta investigación. Recentemente desenvolvéronse una serie de programas que predín o comportamento das enzimas do citocromo P450, presentes en *S. cerevisiae*. O obxectivo principal deste traballo é familiarizarse cos programas CypReact e GLORY para predicir a formación de metabolitos secundarios durante a fermentación do mosto cervexeiro. Polo tanto simulouse a produción de compostos a partir de azucres e aminoácidos do mosto. Posteriormente, levouse a cabo unha revisión bibliográfica das propiedades destes compostos para comprobar se algún tiña algunha propiedade interesante que puidese mellorar as calidades da cervexa. Finalmente, leváronse a cabo fermentacións no laboratorio para analizar a produción de metabolitos durante o proceso mediante técnicas analíticas avanzadas (GC-MS/MS e LC-MS/MS). A simulación mostrou que, a partir destes precursores, formaríanse algúns compostos de interese coma o ácido glucurónico, a N-hidroxiguanidina e o 5-hidroxitriptófano, pero requírense mais ensaios para confirmar a formación destes compostos e as súas propiedades. Por outra parte, é necesario estudar as moléculas producidas mediante GC-MS/MS e LC-MS/MS e comparalas cos resultados obtidos nas simulacións para tratar de validar a utilidade destes programas neste campo de aplicación.

Palabras chave: cervexa, metabolismo secundario, citocromo P450, cálculo computacional.

ABSTRACT

Beer is an alcoholic beverage produced by the fermentation of wort by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. During this process, wort sugars are transformed into ethanol, and at the same time secondary metabolites are produced that affect to the properties and the organoleptic characteristics of beer. To improve this qualities, formation of this secondary metabolites is studied. Their study is complex and using computational models to predict their formation could facilitate initial stages of the investigation. Recently various software that predict the behaviour of cytochrome P450 enzymes have been developed. These enzymes are present in *S. cerevisiae*. The main objective of this study is to get used to the programs CypReact and GLORY to predict the formation of secondary metabolites during wort fermentation. For this purpose, the generation of secondary metabolites from wort sugars and amino acids was simulated. Subsequently, a literature review of the properties of these compounds was carried out to check if any of them had any interesting properties that could improve beer qualities. Finally, fermentations were performed at the laboratory to analyse the metabolite production during the process by advanced analytical techniques (GC-MS/MS and LC-MS/MS). Simulation showed that from these precursors, they would be formed some interesting compounds such as glucuronic acid, N-hydroxyguanidine and 5-hydroxytryptophan, but more experiments are required to confirm the formation of these compounds and their properties. Moreover, it is necessary to study the molecules produced by GC-MS/MS and LC-MS/MS and compare them with the results obtained in the simulations to validate the usefulness of these programmes in this field of application.

Keywords: beer, secondary metabolites, cytochrome P450, computational models.

Índice

Introducción	1
La cerveza.....	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Modelización.....	5
Citocromo P450	6
Software de simulación	8
Objetivos	10
Material y métodos	11
Secuencias SMILES	11
CypReact.....	12
GLORY.....	13
Cepas de microorganismos utilizadas	13
Medios de cultivo	14
Procedimiento experimental	14
Análisis de los metabolitos producidos	14
Discusión de resultados	16
Resultados de la simulación.....	16
Simulación con CypReact	16
Simulación con GLORY	17
Ensayos de fermentación a escala laboratorio	26
Monitorización de la fermentación.....	26
Determinación de metabolitos secundarios por cromatografía.....	27
Conclusiones	28
Bibliografía	29
Anexos	i
<i>Anexo I: Resultados de la simulación con GLORY de la maltosa y la maltotriosa</i>	i

Introducción

La cerveza

La cerveza es una bebida de gran importancia histórica y cultural (Mellor *et al.*, 2020) consistente en una matriz química compleja que es el resultado de numerosas reacciones metabólicas y químicas (He *et al.*, 2014). Se fabrica a partir de 4 ingredientes: cebada, lúpulo, agua y levadura, y además se pueden utilizar otras fuentes de cereales, denominados cereales adjuntos, como trigo, centeno, avena, arroz o maíz (Mellor *et al.*, 2020). Los cereales adjuntos se usan como reemplazo a la malta por razones económicas y con la finalidad de modificar las características organolépticas de la cerveza (Buiatti, 2009).

Su fabricación consiste en la fermentación por parte de la levadura de los azúcares del mosto, para la obtención de etanol (fermentación alcohólica), produciendo a su vez otros compuestos, en menor proporción, que contribuyen de forma significativa a la calidad de la cerveza y a sus propiedades aromáticas (He *et al.*, 2014).

Una de las primeras etapas del proceso de preparación del mosto para la fermentación es el malteado de la cebada. En esta etapa las proteínas de la cebada se degradan a péptidos más pequeños y a aminoácidos por la acción de las peptidasas endógenas de la propia cebada o por peptidasas añadidas durante el proceso (Fărcaș *et al.*, 2017). También se hidroliza el almidón procedente de los cereales mediante enzimas producidas por la propia cebada durante la germinación del grano, o bien por enzimas añadidas durante esta operación como α -amilasas, celulasas y β -glucanasas (Buiatti, 2009; Steiner *et al.*, 2012).

El mosto estándar de cervecería contiene aproximadamente 90 g de carbohidratos por cada litro de mosto, estos son maltosa, maltotriosa, glucosa, sacarosa, fructosa y dextrinas, siendo estas últimas no fermentables por parte de la mayoría de levaduras. El perfil de azúcares del mosto dependerá de las materias primas (cebada y cereales adjuntos) usadas y de los procedimientos de preparación del mosto. Además, la levadura utiliza los azúcares en un orden secuencial, comenzando por los monosacáridos. La maltosa, el azúcar más abundante, y la maltotriosa, sólo se absorberán tras el agotamiento de los primeros, debido a una represión catabólica de las vías metabólicas implicadas en el uso de azúcares alternativos. La composición de carbohidratos del mosto y la forma en que son utilizados también influirán en el perfil organoléptico del producto final, así como las dextrinas, a pesar de no ser fermentables (He *et al.*, 2014).

En la Figura 1 se muestra la variación de la concentración de azúcares fermentables durante el proceso de fermentación usando una cepa de levadura Lager industrial, en este caso la cepa TT-21 (He *et al.*, 2014).

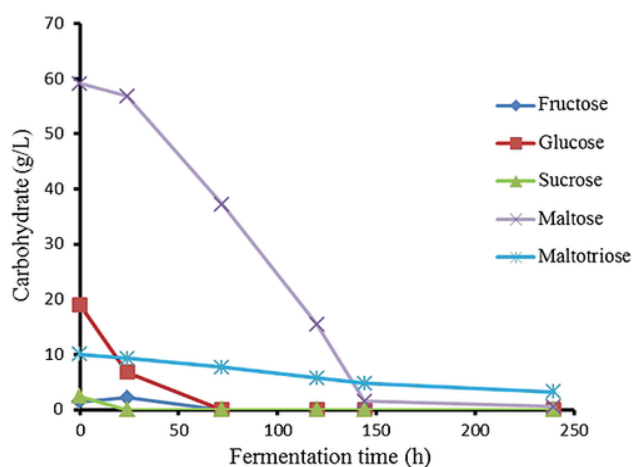


Figura 1: Cambios en la concentración de los distintos azúcares del mosto durante la fermentación con la cepa de levadura lager industrial TT-21 (He *et al.*, 2014).

Los compuestos nitrogenados disponibles para el consumo por las levaduras se conocen como nitrógeno asimilable o nitrógeno amínico libre (FAN), y están constituidos por los aminoácidos del mosto, los iones amonio y otros péptidos pequeños. Al igual que ocurría con los carbohidratos, las proporciones de unos y otros dependerán de las materias primas utilizadas y los procesos de preparación del mosto, así como de las proteasas usadas en algunas cerveceras para aumentar los niveles de FAN. El FAN es un indicador importante para predecir la fermentación de la levadura y la calidad que tendrá la cerveza, al ser el nitrógeno un nutriente necesario para el crecimiento de la levadura y esencial para la biosíntesis de los subproductos de fermentación que afectarán a su sabor y estabilidad. Las distintas fuentes de nitrógeno también se absorberán de forma secuencial por parte de la levadura (He *et al.*, 2014).

El contenido aminoacídico del mosto es variable dependiendo de las materias primas utilizadas y los procesos de preparación del mosto. En la Figura 2 se muestra el contenido aminoacídico de la cerveza Lager especial de Hijos de Rivera, obtenido en un trabajo previo en el que se trataba de comparar el perfil aminoacídico resultante tras el uso de distintas proteasas y mostos con distinta proporción de malta (Rodríguez Longarela, 2019). A partir de este trabajo se puede observar que los aminoácidos más abundantes en esta cerveza son prolina, arginina y alanina.

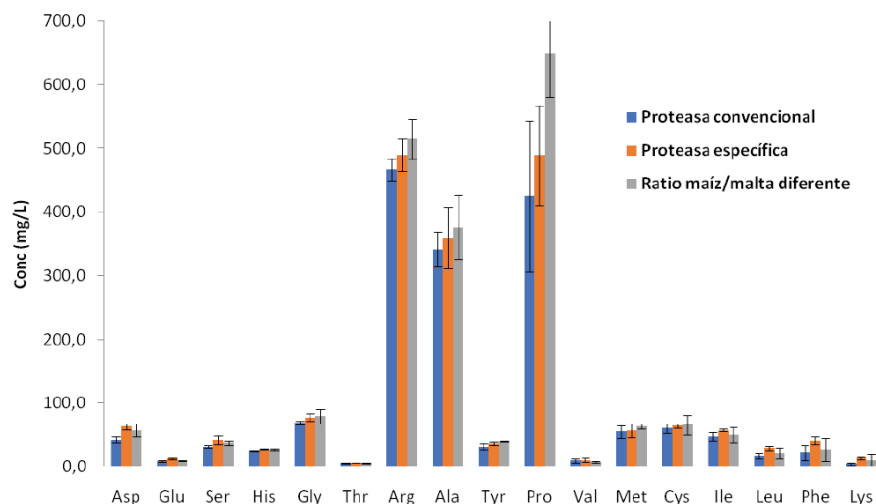


Figura 2: Concentraciones y desviaciones estándar de los aminoácidos estudiados en cervezas Lager especial de Hijos de Rivera (Rodríguez Longarela, 2019).

En el mosto también se encuentran lípidos que pueden afectar a la concentración de compuestos aromáticos en el producto final, así como vitaminas e iones inorgánicos necesarios para la proliferación y el buen rendimiento de la levadura (He *et al.*, 2014).

Recientemente, ha crecido el interés por los posibles efectos sobre la salud de las bebidas alcohólicas. Estas investigaciones se han centrado principalmente en el vino, sin embargo, la cerveza podría contener una serie de compuestos bioactivos potencialmente beneficiosos, y se requiere la investigación de los mismos. Los compuestos bioactivos de la cerveza se han asociado históricamente al lúpulo, pero la cebada y demás cereales podrían contener compuestos con efectos potencialmente beneficiosos para salud. Además, durante el proceso fermentativo la levadura también podría producir metabolitos con propiedades interesantes (Mellor *et al.*, 2020).

Saccharomyces cerevisiae

La levadura utilizada desde la antigüedad y actualmente en todas aquellas cervezas de variedad Ale o de fermentación alta es *Saccharomyces cerevisiae*, también conocida como levadura de panadería. Este hongo unicelular también se utiliza en otros procesos industriales como la producción de pan, vino y bioetanol, y además es uno de los principales organismos modelo utilizado en los laboratorios de genética. *S. cerevisiae* es una pieza clave en diversos sectores industriales al presentar características como un rápido crecimiento, fácil cultivo, y vías de señalización celular parecidas a las encontradas en células de eucariotas superiores (Ramírez-Gaona *et al.*, 2017).

Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

El metabolismo de *S. cerevisiae* comprende dos etapas: metabolismo primario y secundario. El primario es esencial para su crecimiento, división celular y la supervivencia. El secundario no es esencial para el crecimiento, pero es muy interesante ya que durante el mismo se producen pequeñas moléculas como alcoholes superiores, ésteres, carbonilos, compuestos de azufre, tioles y terpenoides (Hirst & Richter, 2016). En el caso de la fermentación del mosto cervecero, la levadura produce principalmente etanol, dióxido de carbono y glicerol. Estos metabolitos contribuyen a las propiedades de la cerveza, pero tienen poco impacto en su sabor. Son los metabolitos secundarios mencionados anteriormente los que determinan el mismo (Stewart, 2017). Además, durante el metabolismo secundario también se producirán los compuestos con un mayor interés respecto a su potencial bioactivo (Mellor *et al.*, 2020).

La producción de estos compuestos empieza generalmente tarde en el crecimiento del organismo, y varía dependiendo de las fuentes de carbono fermentable del medio de cultivo, de su composición de nitrógeno y de las condiciones y el ambiente de fermentación (temperatura, pH, oxígeno, fermentador, etc.), así como de la cepa de levadura utilizada. La modificación de todos estos parámetros podría mejorar las características de los productos finales (Calvo *et al.*, 2002; Hirst & Richter, 2016; Stewart, 2017).

El análisis de estos metabolitos secundarios a gran escala se puede llevar a cabo utilizando distintas técnicas: cromatografía de gases y la cromatografía líquida acopladas a espectrometría de masas (LC-MS y GC-MS), cromatografía capilar líquida acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (CapLC-TOFM), espectrometría de masas de transformada de Fourier (FT-ICR), espectrometría de masas por ionización por electroespray (ESI-MS), Resonancia Magnética Nuclear (NMR), entre otras (Ishii *et al.*, 2005). Todos estos métodos intentan identificar tantos metabolitos como sea posible en una muestra biológica a la vez, aunque algunos de ellos solo proporcionan datos cualitativos. Para detectar metabolitos específicos o para mejorar la identificación cuantitativa en ocasiones se emplean compuestos estándar marcados con isótopos estables (Sriyudthsak *et al.*, 2016). Actualmente los nuevos detectores de espectrometría de masas de alta resolución se han convertido en los principales métodos de detección tanto para cromatografía de gases como de líquidos, dada su versatilidad y robustez. Estas técnicas presentan una alta sensibilidad y selectividad y permiten el estudio de varias moléculas a la vez (Mozzi *et al.*, 2013).

Cuando se quieren mejorar los perfiles aromáticos u optimizar los procesos industriales de fermentación se pueden llevar a cabo enfoques “ómicos”, es decir, hacer uso de la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica. Todos los datos obtenidos se pueden integrar y modelar para predecir cómo funcionaría un sistema particular bajo un conjunto de condiciones. Así, se podrían correlacionar los datos ómicos con la producción de metabolitos secundarios y mejorar la producción de sabor en la fermentación industrial, la producción de metabolitos con propiedades bioactivas en estos mismos procesos o la producción de metabolitos de alta calidad y alto valor añadido en una gran variedad de industrias (Hirst & Richter, 2016). En este trabajo se ha considerado que los enfoques ómicos y la modelización podrían ser útiles para encontrar metabolitos secundarios o subproductos con propiedades interesantes en el proceso de producción de cerveza.

Modelización

Los enfoques ómicos producen una cantidad de datos superior a la capacidad disponible que se tiene para procesarlos. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de los modelos de simulación del metabolismo de estos microorganismos, como se mencionaba anteriormente. Esto ha sido posible gracias a los avances en la investigación del genoma de estos y el desarrollo de nuevas metodologías analíticas (Ishii *et al.*, 2005).

Un modelo matemático de un proceso consiste en un conjunto de ecuaciones que expresan las características esenciales del proceso en términos matemáticos (Ribas-García *et al.*, 2011). En este caso los modelos metabólicos deben incorporar numerosos e intrincados mecanismos intracelulares, por lo que son complicados de desarrollar. Otro inconveniente es que las metodologías analíticas desarrolladas solamente permiten analizar un número limitado de metabolitos a gran escala, debido a características como alta polaridad, no volatilidad o deficiente detectabilidad. Asimismo, sus propiedades físicas y químicas son muy similares, además de que en cada célula se pueden encontrar más de 1000 metabolitos diferentes. Todo esto dificulta mucho los análisis (Ishii *et al.*, 2005).

En la actualidad, el desarrollo y el uso de predictores del metabolismo *in silico* está adquiriendo importancia en el campo de la investigación del metabolismo de los medicamentos, en los campos de la metabolómica y la investigación en alimentación y nutrición. Se piensa que el uso de estas herramientas podrían ahorrar tiempo y dinero en muchos procesos de investigación en fases tempranas (Tian *et al.*, 2018).

Lo ideal sería describir la red completa de reacciones bioquímicas, tanto anabólicas como catabólicas que ocurren dentro de una célula para construir modelos matemáticos de redes metabólicas con los que poder simular los flujos metabólicos del organismo completo. Sin embargo, la obtención de estos modelos así como su interpretación y trabajar con los mismos es una tarea complicada (Heavner & Price, 2015). Como solución, existen otro tipo de modelos que, a pesar de no ser modelos intracelulares completos, se pueden acercar a la predicción del metabolismo *in silico* de conjuntos enzimáticos de un organismo en concreto.

La predicción *in silico* del metabolismo se puede dividir en tres pasos: i) predecir si una molécula interaccionará con una enzima; ii) predecir dónde ocurrirá esa interacción; iii) predecir el resultado de esta interacción. Por lo tanto, en primer lugar hay que predecir si la molécula va a reaccionar con una o más enzimas metabolizantes específicas, antes de predecir el resultado de dicha reacción enzimática (Tian *et al.*, 2018).

Citocromo P450

A finales de la década de 1940 y principios de la de 1950 se hizo evidente que las reacciones de oxidación eran realmente importantes en la eliminación de fármacos en humanos (Käppeli, 1986). A raíz de esto se descubrió el citocromo P450 (CYP), una familia de enzimas que juegan un papel muy importante en el metabolismo de los xenobióticos. De hecho, se estima que entre el 50 y el 80% de los fármacos son metabolizados por enzimas CYP (de Bruyn Kops *et al.*, 2019). Por esto, en los últimos años se han desarrollado modelos computacionales que tratan de predecir el metabolismo *in silico* del citocromo P450.

Las enzimas del citocromo P450 son una superfamilia de proteínas que contienen hemotiolato y se denominan así por el estado característico del complejo reducido, que unido a monóxido de carbono (CO), muestra una banda de absorción máxima en UV-visible a 450 nm, debido al grupo hemo que está unido a la proteína a través de una cisteína axial conservada. La “P” del nombre significa pigmento (Li *et al.*, 2020).

Desempeñan funciones cruciales en la biosíntesis de productos naturales con distintas funciones, degradación de xenobióticos, biosíntesis de hormonas esteroideas y en el metabolismo de fármacos (Li *et al.*, 2020) al catalizar muchos tipos de reacciones, siendo la más importante la catálisis de oxidaciones estereoselectivas y regioselectivas de enlaces C–H inertes en moléculas orgánicas complejas en condiciones suaves (Li *et al.*, 2020).

Estas oxidasas utilizan oxígeno molecular y electrones suministrados por NADPH o NADH a través de una flavoproteína, la citocromo P450 reductasa (Käppeli, 1986). Además, tienen un centro de unión muy flexible, por lo que pueden acomodar una amplia gama de sustratos de tamaños muy variables (de Bruyn Kops *et al.*, 2019).

Su actuación resulta en una amplia diversidad de productos de oxidación, muchos de los cuales no se podrían sintetizar mediante química orgánica sintética (Käppeli, 1986). Además, sus condiciones de funcionamiento hacen que se consideren los biocatalizadores más versátiles de la naturaleza, presentando muchas ventajas frente a los catalizadores químicos tradicionales. Todo esto los hace potencialmente útiles para la obtención de productos farmacéuticos básicos, productos químicos finos o a granel, agentes de biorremediación, sabores y fragancias (Li *et al.*, 2020).

Se detectaron por primera vez en microsomas hepáticos humanos, y posteriormente se encontraron en microorganismos eucariotas, como *S. cerevisiae* (Käppeli, 1986), el microorganismo de interés en este trabajo. Hoy en día se conoce que se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos vivos (humanos, animales, plantas, microorganismos eucariotas y procariotas) e incluso en virus (Käppeli, 1986; Li *et al.*, 2020). Esta diversidad significativa en la naturaleza hace pensar que tienen un papel metabólico importante en todos estos sistemas (Käppeli, 1986).

Por otra parte, se han comparado las secuencias de ADN de los genes que codifican las enzimas del citocromo P450 y se ha observado homología de secuencia y varias regiones conservadas, sobre todo en el alineamiento de secuencias que rodean las cisteínas conservadas, que se cree que están implicadas en la quelación del hierro del grupo hemo de estas enzimas. Además, se conoce que la NADPH-citocromo P450 reductasa de *S. cerevisiae* tiene muchas propiedades en común con la de los microsomas hepáticos (Käppeli, 1986).

El citocromo P450 principal de la levadura *S. cerevisiae* es la lanosterol 14 α -desmetilasa (ERG11) y cataliza una reacción esencial en la biosíntesis de ergosterol, el esteroide predominante de la levadura. Su ortólogo mamífero cataliza exactamente la misma reacción durante la biosíntesis de colesterol. Además, se conoce que los niveles de esta enzima aumentan en condiciones de crecimiento limitantes de oxígeno y en presencia de glucosa, como podría ser durante la fermentación de mosto cervecero (Turi & Loper, 1992).

Software de simulación

En los últimos años se han desarrollado numerosos software de simulación que tratan de predecir *in silico* el metabolismo del citocromo P450 humano, debido a su importancia, sobre todo, en la degradación oxidativa de fármacos.

Al encontrarse estas enzimas del citocromo P450 ampliamente distribuidas en los seres vivos y concretamente, en *S. cerevisiae*, y al conocer que existe conservación de funciones y de estructura entre las enzimas de distintas especies, se pensó que los programas de modelización desarrollados para predecir la actividad metabólica de las enzimas CYP humanas podrían ser útiles para predecir el metabolismo de las enzimas CYP en *S. cerevisiae*, en un ambiente como es la fermentación del mosto de cereales para la producción de cerveza.

Además, como las enzimas CYP presentan una amplia versatilidad en cuanto a los sustratos que pueden aceptar, se vio la posibilidad de predecir si se podrían producir metabolitos con características interesantes a partir de los componentes principales del mosto cervecero, que son azúcares y aminoácidos. Por lo tanto, la finalidad de este trabajo fue tratar de comprobar la validez de estos programas para la predicción metabólica de las enzimas CYP presentes en *S. cerevisiae*.

El primero de los software utilizados en este trabajo fue la herramienta computacional CypReact, que es capaz de llevar a cabo la primera parte de la predicción *in silico*, es decir, de predecir si una molécula específica es susceptible de reaccionar con alguna o algunas de las 9 enzimas más importantes del citocromo P450 humano, que son CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 (Tian *et al.*, 2018).

Como se comentaba anteriormente, otro aspecto importante en la predicción computacional del metabolismo xenobiótico es la identificación de las posiciones de las moléculas que son metabólicamente lábiles, también conocidas como sitios de metabolismo (SoM). Saber en qué átomos de la molécula es más probable que ocurra una reacción de metabolización serviría para calcular la estructura del metabolito resultante (de Bruyn Kops *et al.*, 2019).

Aquí es donde entra el software gratuito GLORY. GLORY utiliza unas reglas de reacción basadas en la literatura científica (de esta forma el programa no se encuentra sesgado por un conjunto de datos metabólicos en particular, como ocurre en otros software de características similares) para convertir moléculas parentales en sus posibles metabolitos derivados. Previamente, usa las probabilidades de SoM predichas por el software FAME 2 para cada átomo pesado de la molécula parental para reducir la cantidad de metabolitos generales y la tasa de predicción de falsos positivos. Además, ordena los metabolitos por prioridad de aparición en función de las probabilidades SoM pronosticadas (de Bruyn Kops *et al.*, 2019).

Finalmente, estos metabolitos predichos por los software de simulación del citocromo P450 humano se trataron de detectar en una fermentación a pequeña escala utilizando como material de partida mosto cervecero. Para lograr este cometido, el medio de cultivo fue analizado mediante las técnicas de alta resolución cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de líquidos (LC-MS/MS). A su vez, se realizaron los mismos ensayos utilizando como medio de cultivo YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*), un medio completo muy utilizado para el cultivo de *S. cerevisiae* («YPD Media», 2010), para estudiar las diferencias entre la producción de compuestos en ambos medios. Posteriormente, se realizó una comparación cualitativa entre los métodos *in silico* e *in vivo* para comprobar si estos programas de reciente creación podrían tener utilidad en este campo de aplicación.

Objetivos

El principal objetivo del trabajo que se presenta es familiarizarse con el funcionamiento de los programas CypReact y GLORY, que utilizan modelos de cálculo computacional de enzimas del citocromo P450, con la finalidad de predecir la formación de metabolitos secundarios durante la fermentación del mosto cervecero por parte de *Saccharomyces cerevisiae*. Con ese fin se establecen los siguientes objetivos técnicos:

- Simular mediante cálculo computacional las moléculas que se producen durante el proceso fermentativo de *S. cerevisiae* a partir de diferentes azúcares y aminoácidos presentes en el mosto cervecero.
- Realizar un estudio bibliográfico de los metabolitos obtenidos en la simulación para comprobar cuáles de estos tienen alguna propiedad interesante que pudiese mejorar las cualidades de la cerveza.
- Comprobar la producción de los metabolitos predichos mediante la fermentación a escala de laboratorio de un mosto de cereales y un medio sintético, y el análisis de la producción de metabolitos secundarios empleando técnicas de alta resolución (GC-MS/MS y LC-MS/MS).

Material y métodos

Secuencias SMILES

SMILES (*Simplifies Molecular Input Line Entry System*) es un sistema de notación química diseñado para el procesamiento moderno de información química. Esta notación permite especificar la estructura de una molécula de forma muy rigurosa pero también muy sencilla. Desde su descripción inicial por (Weininger, 1988) ha permitido el diseño de aplicaciones informáticas químicas eficientes, como pueden ser aplicaciones para la búsqueda de subestructuras, modelos de predicción de propiedades, entre otras. Los programas de modelización utilizados en el presente trabajo reciben como formato de entrada moléculas en notación SMILES, por lo tanto, ha sido necesario la recopilación de las secuencias SMILES de cada una de las moléculas ensayadas. Dichas secuencias se extrajeron de la base de datos PubChem (Kim *et al.*, 2019).

Los azúcares más comunes en la cerveza, como se mencionaba en la introducción son: maltosa, maltotriosa, glucosa, sacarosa y fructosa (He *et al.*, 2014). En la Tabla 1 se muestran las secuencias SMILES de estos azúcares.

Tabla 1: Secuencias SMILES de los principales azúcares presentes en el mosto cervecero.

Azúcar	Secuencia SMILES
Maltosa	<chem>C(C1C(C(C(C(O1)OC2C(OC(C(C2O)O)O)CO)O)O)O)O</chem>
Maltotriosa	<chem>C(C1C(C(C(C(O1)OC2C(OC(C(C2O)O)OC3C(OC(C(C3O)O)O)CO)CO)O)O)O)O</chem>
Glucosa	<chem>C(C1C(C(C(C(O1)O)O)O)O)O</chem>
Sacarosa	<chem>C(C1C(C(C(C(O1)OC2(C(C(C(O2)CO)O)O)CO)O)O)O)O</chem>
Fructosa	<chem>C(C1C(C(C(O1)(CO)O)O)O)O</chem>

Los aminoácidos presentes en el mosto cervecero común (Garza-Ulloa *et al.*, 1986; Rodríguez Longarela, 2019), y sus secuencias SMILES correspondientes, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias SMILES de los aminoácidos presentes en el mosto cervecero.

Aminoácido	Secuencia SMILES
Ácido aspártico	<chem>C(C(C(=O)O)N)C(=O)O</chem>
Ácido glutámico	<chem>C(CC(=O)O)C(C(=O)O)N</chem>
Serina	<chem>C(C(C(=O)O)N)O</chem>
Histidina	<chem>C1=C(NC=N1)CC(C(=O)O)N</chem>
Glicina	<chem>C(C(=O)O)N</chem>
Treonina	<chem>CC(C(C(=O)O)N)O</chem>
Arginina	<chem>C(CC(C(=O)O)N)CN=C(N)N</chem>
Alanina	<chem>CC(C(=O)O)N</chem>
Tirosina	<chem>C1=CC(=CC=C1CC(C(=O)O)N)O</chem>
Prolina	<chem>C1CC(NC1)C(=O)O</chem>
Valina	<chem>CC(C)C(C(=O)O)N</chem>
Metionina	<chem>CSCCC(C(=O)O)N</chem>
Cisteína	<chem>C(C(C(=O)O)N)S</chem>
Isoleucina	<chem>CCC(C)C(C(=O)O)N</chem>
Leucina	<chem>CC(C)CC(C(=O)O)N</chem>
Fenilalanina	<chem>C1=CC=C(C=C1)CC(C(=O)O)N</chem>
Lisina	<chem>C(CCN)CC(C(=O)O)N</chem>
Asparagina	<chem>C(C(C(=O)O)N)C(=O)N</chem>
Triptófano	<chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)CC(C(=O)O)N</chem>
Glutamina	<chem>C(CC(=O)N)C(C(=O)O)N</chem>

CypReact

El software CypReact (Tian *et al.*, 2018), gratuito, se utilizó para predecir si los azúcares y aminoácidos del mosto eran susceptibles de reaccionar con alguna de las enzimas más comunes del citocromo P450 humano. Este software se puede descargar desde la siguiente página web: https://bitbucket.org/Leon_Ti/CypReact. Se descarga un archivo denominado CypReact Bundle1.2.zip, que se debe extraer. El paquete incluye un archivo .jar ejecutable con Java y los archivos de soporte .model y supportfile.csv.

La ejecución de CypReact se realiza desde la consola de Windows 10, el comando tiene los siguientes argumentos, separados por un espacio:

-> java -jar "Ruta del ejecutable .jar" "Ruta a las moléculas de entrada" "Ruta del archivo de salida" "CYP/CYPs para el análisis"

La ruta a las moléculas de entrada puede ser un archivo .sdf, -scv. o una cadena SMILES, un tipo de notación de moléculas. En este último caso se deberá escribir de la siguiente forma:

“SMILES=cadena”

En este último caso se recomienda el uso de comillas. No debe haber un espacio a la izquierda ni a la derecha de “=”.

Además, los CYPs se deben separar por comas. No debe haber un espacio a la izquierda ni a la derecha de la coma.

En este trabajo se ensayó cada uno de los azúcares y aminoácidos del mosto con todos los citocromos disponibles en este programa: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4.

GLORY

El software GLORY (de Bruyn Kops *et al.*, 2019) se utilizó para predecir a qué metabolitos secundarios daría lugar la reacción de los azúcares y aminoácidos del mosto con alguna de las enzimas del citocromo P450 humano. Este software se ejecuta directamente desde la página web: <https://nerdd.zbh.uni-hamburg.de/glory/>. En este caso se introduce la molécula a analizar en formato SMILES (ver Recopilación de secuencias SMILES en la Tabla 1 y la Tabla 2). El programa se ejecutó en el modo MaxCoverage, el recomendado por los autores en (de Bruyn Kops *et al.*, 2019) debido a su alto porcentaje de recuperación de metabolitos predichos. Además, para la obtención de un mayor número de datos, se ejecutó otra vez el programa a partir de algunos de los metabolitos secundarios predichos para algunos de los azúcares o aminoácidos de origen.

Cepas de microorganismos utilizadas

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en este trabajo fue la cepa comercial BJ3505 [*pep4:HIS3, prb-Δ1.6R HIS3, lys2-208, trp1-Δ101, ura 3-52, gal2, can1*] (Eastman Kodak Company).

Medios de cultivo

Se utilizó medio YPD (*Yest Extract, Peptone, Dextrose*) líquido y con agar. La composición de este medio de cultivo es la siguiente: peptona (20 g/L) extracto de levadura (10 g/L) y glucosa (20 g/L). Para el medio de cultivo sólido se añadió agar (15 g/L) («YPD Media», 2010). Por otra parte, el mosto cervecero fue suministrado por la fábrica de cervezas Hijos de Rivera S.A.U.

Procedimiento experimental

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 se sembró en una placa de medio YPD, que se incubó durante 24 horas a 30 °C. A partir de esta placa y directamente con un asa de siembra, se sembraron 10 mL de medio YPD, y se creció a 30 °C durante 24 horas. 1 mL de este preinóculo se utilizó para sembrar cada uno de los medios de cultivo, para obtener una densidad celular inicial de $1,5 \cdot 10^6$ células/mL en cada cultivo.

Los medios de cultivo que se inocularon fueron:

- 250 mL de medio YPD previamente esterilizado.
- 250 mL de mosto sin esterilizar procedente de la fábrica de cervezas Hijos de Rivera S.A.U.

Estos cultivos se incubaron a 30 °C, con agitación constante de 250 rpm durante dos semanas. El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nanómetros (OD_{600}). Se estimó que 1 unidad de OD_{600} es equivalente a $3 \cdot 10^7$ células/mL (Day *et al.*, 2004).

Análisis de los metabolitos producidos

A lo largo del proceso fermentativo se tomaron muestras a distintos tiempos para el análisis de los metabolitos producidos durante el mismo. La extracción de metabolitos se realizó a partir de una modificación de protocolos llevados a cabo por otros autores (Al-Jassani *et al.*, 2016; Rodríguez Longarela, 2019). 10 mL de cada muestra fueron sometidos a sonicación a máxima amplitud con un sonicador Vibra-Cell™ (Sonics) con pulsos de 30 segundos durante 2 minutos, con un descanso de 30 segundos entre cada pulso, para eliminar el gas de la muestra. Posteriormente, se le añadieron a cada muestra 15 mL de metanol y se

conservaron a -20 °C durante aproximadamente 20 horas. 5 mL de cada muestra se almacenaron directamente para su análisis; otros 5 mL fueron evaporados en un sistema *SpeedVac*, y resuspendidos mecánicamente en 5 mL de metanol. Por otra parte, las muestras sin extracción fueron analizadas directamente (Heuberger *et al.*, 2016). Antes de su análisis, todas las muestras, incluidas las no tratadas, fueron filtradas a través de un filtro de PVDF hidrofílico (Filter-Lab ®) de 0,22 µm. Los viales con las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

El análisis de las muestras mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS) y mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) se encargó a los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña.

Discusión de resultados

Resultados de la simulación

Simulación con CypReact

Los resultados de la predicción de si los azúcares y aminoácidos del mosto reaccionarían o no con los citocromos contemplados por el programa CypReact se muestran en la Tabla 3 (azúcares) y en la Tabla 4 (aminoácidos), donde N significa que no reaccionaría y R significa que sí reaccionaría.

Tabla 3: Resultados del análisis con CypReact de los azúcares del mosto cervecero.

Azúcar/CYP	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
Maltosa	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Maltotriosa	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Glucosa	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sacarosa	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fructosa	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: no reacciona.

Tabla 4: Resultados de análisis con CypReact de los aminoácidos del mosto cervecero.

Azúcar/CYP	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
Ácido aspártico	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ácido glutámico	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Serina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Histidina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Glicina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Treonina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Arginina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Alanina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Tirosina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Prolina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Valina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Metionina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cisteína	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Isoleucina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Leucina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fenilalanina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lisina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Asparagina	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Triptófano	N	N	N	N	R	N	N	N	N
Glutamina	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: no reacciona; R: reacciona.

Vistos los datos resultantes, se llegó a la conclusión de que ninguno de los azúcares más abundantes del mosto es susceptible de ser oxidado por las enzimas del citocromo P450 modelizadas por el programa CypReact. Además, solamente el aminoácido triptófano reaccionaría con una enzima del citocromo P450, la CYP2C9, según el modelo propuesto por el programa CypReact. Esto podría significar que el triptófano sí sería una molécula susceptible de reaccionar con las enzimas de interés de este trabajo.

Simulación con GLORY

La simulación con GLORY, al ser más compleja de analizar, se realizó solamente con los azúcares y aminoácidos más abundantes del mosto cervecero. Los azúcares más abundantes son maltosa, maltotriosa y glucosa (He *et al.*, 2014), y los aminoácidos más abundantes son arginina, alanina y prolina (Rodríguez Longarela, 2019). Los metabolitos secundarios resultantes de la simulación se buscaron en la base de datos PubChem (Kim *et al.*, 2019) para comprobar si existía bibliografía previa que describiese propiedades interesantes de los compuestos o su importancia.

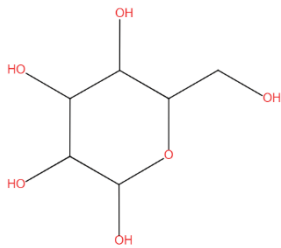
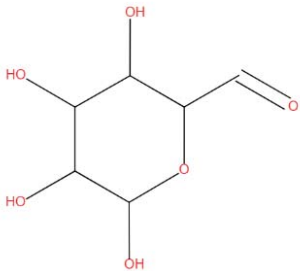
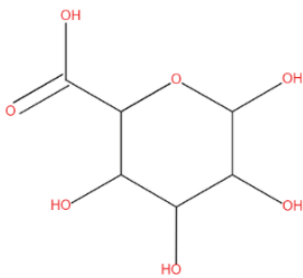
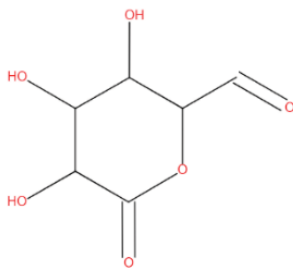
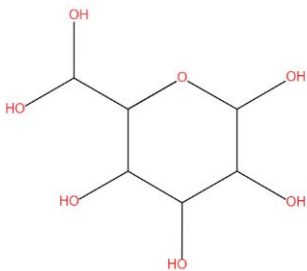
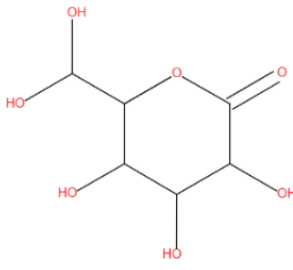
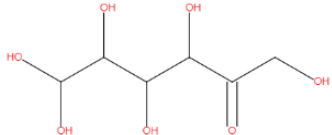
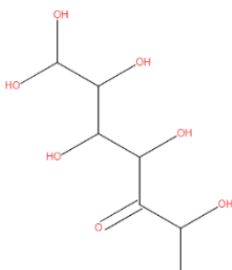
Cabe destacar que el programa GLORY no tiene en cuenta la estereoisomería de las moléculas analizadas. Por lo tanto, para todos los resultados se asumió que la estereoisomería de las moléculas derivadas coincidía con la del precursor. En el caso de que la reacción diese lugar a algún carbono quiral, se tuvieron en cuenta todos los isómeros del compuesto resultante para la consulta bibliográfica.

En la simulación con GLORY de los azúcares maltosa y maltotriosa se obtuvieron varios compuestos como metabolitos derivados. Sin embargo, en la bibliografía no se encontró que ninguno de ellos tenga propiedades interesantes. Los resultados de la simulación de la maltosa, donde se muestran los derivados primarios y secundarios predichos se pueden consultar en el Anexo I, en la Tabla 10. De la misma forma, los resultados de la simulación con GLORY de la maltotriosa se pueden consultar en el Anexo I, en la Tabla 11.

En el caso de la **glucosa**, los resultados de la simulación con GLORY se muestran en la Tabla 5. El metabolito con más propiedades interesantes derivado de la glucosa fue el ácido 3,4,5,6-tetrahidroxioxano-2-carboxílico, o **ácido glucurónico**.

En los seres humanos, el **ácido glucurónico** es el metabolito que participa en las reacciones de glucuronidación, en donde una enzima UDP-glucuronosiltransferasa cataliza la conjugación de ácido glucurónico con otra estructura metabólica, comúnmente para facilitar su eliminación del organismo (Fabregat *et al.*, 2013). Además, se encuentra presente en la bebida fermentada kombucha, y es producido por el consorcio de microorganismos que participan en el proceso fermentativo (Martínez-Leal *et al.*, 2020). Se le han asociado efectos beneficiosos como propiedades y antibacterianas (Ansari *et al.*, 2019) y hepatoprotectoras (Martínez-Leal *et al.*, 2020).

Tabla 5: Metabolitos derivados, primarios y secundarios, de la glucosa, según los datos obtenidos en la simulación realizada mediante el programa GLORY.

PRECURSOR	DERIVADOS PRIMARIOS	DERIVADOS SECUNDARIOS
 <p style="text-align: center;">Glucosa</p>	 <p style="text-align: center;">3,4,5,6-tetrahydroxioxano-2-carbaldehído</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido 3,4,5,6-tetrahydroxioxano-2-carboxílico / Ácido glucurónico</p>
		 <p style="text-align: center;">3,4,5-trihidroxi-6-oxooxano-2-carbaldehído</p>
	 <p style="text-align: center;">6-(dihidroxi metil)-2,3,4,5-tetrahydroxioxano</p>	 <p style="text-align: center;">6-(dihidroxi metil)-4,5-trihidroxi oxano-2-carbaldehído</p>
	 <p style="text-align: center;">1,3,4,5,6,6-hexahidroxi-2-hexona</p>	 <p style="text-align: center;">1,1,3,4,5,6,6-heptahidroxi-2-hexona</p>

En el caso de la **arginina**, los resultados de la simulación con GLORY se muestran en la Tabla 6. Los metabolitos con propiedades interesantes derivados de la arginina que se encontraron fueron **N-omega-hidroxiarginina** (NOHA), **guanidina**, **N-hidroxi guanidina** y ácido 2-aminopentanoico, también conocido como **ácido glutámico**.

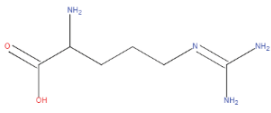
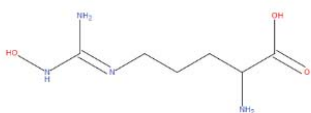
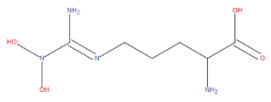
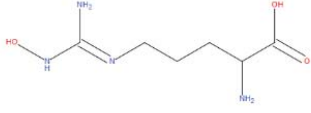
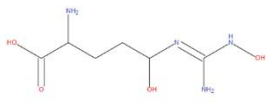
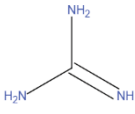
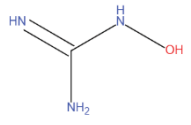
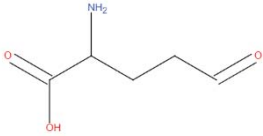
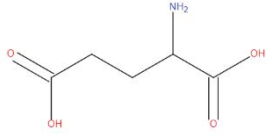
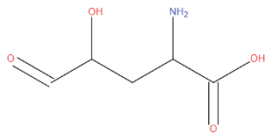
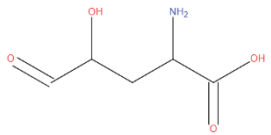
NOHA es un producto intermediario estable en el ciclo de la urea, intermediario de la biosíntesis del óxido nítrico (NO) a partir de la arginina por acción de las óxido nítrico sintasas (NOS). El óxido nítrico está involucrado en muchos procesos fisiológicos importantes. NOHA es un intermediario termolábil e inestable a temperatura ambiente (Abu-Soud *et al.*, 1997; Arral *et al.*, 2020; Schade *et al.*, 2011).

La **guanidina** es un metabolito que se encuentra en la orina como producto del metabolismo de las proteínas. Principalmente se utiliza para la reducción de los síntomas de debilidad muscular y fatiga asociados al síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Nakano & Tyler, 1972; Oh *et al.*, 1997), y aparentemente actúa aumentando la liberación de acetilcolina tras un impulso nervioso, además de ralentizar las tasas de despolarización y repolarización de las membranas de las células musculares (National Library of Medicine [NLM], 2020).

A la **N-hidroxi guanidina** se le asocian propiedades antivirales y antineoplásicas (Tai *et al.*, 1984). Por otra parte, en un experimento con ratas, un derivado de la N-hidroxi guanidina mostró actividad cardioprotectora (Veveris *et al.*, 1999). También se puede obtener óxido nítrico a partir de este compuesto (Xiang *et al.*, 2016).

Finalmente, el **ácido glutámico** es un aminoácido no esencial que se encuentra en el mosto cervecero antes de la fermentación (Garza-Ulloa *et al.*, 1986; Rodríguez Longarela, 2019). Es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, así como el precursor metabólico del ácido γ -aminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC (Brosnan & Brosnan, 2013). Es uno de los aminoácidos más abundantes en las proteínas, y responsable del sabor umami. Se adiciona en forma de sales de sodio, potasio, calcio o magnesio a algunos alimentos para mejorar su sabor y palatabilidad (Tomé, 2018).

Tabla 6: Metabolitos derivados, primarios y secundarios, de la arginina, según los datos obtenidos en la simulación realizada mediante el programa GLORY.

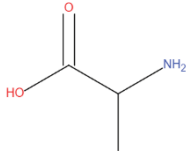
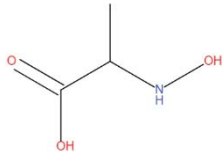
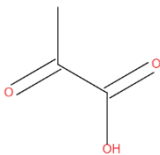
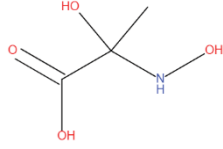
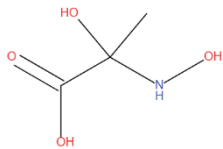
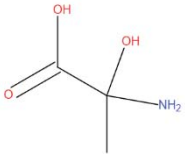
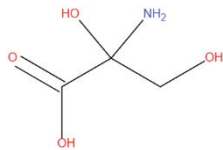
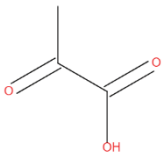
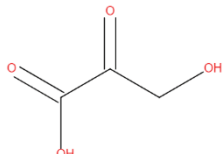
PRECURSOR	DERIVADOS PRIMARIOS	DERIVADOS SECUNDARIOS
 <p>Arginina</p>	 <p>N,N-omega-dihidroxiarginina</p>	 <p>N,N-omega-dihidroxiarginina</p>
	 <p>N-omega-hidroxiarginina</p>	 <p>N-omega-5-dihidroxiarginina</p>
	 <p>Guanidina</p>	 <p>N-hidroxi guanidina</p>
	 <p>Ácido 2-amino-5-oxopentanoico</p>	 <p>Ácido 2-aminopentanoico / Ácido glutámico</p>
	 <p>Ácido 2-amino-4-hidroxi-5-oxopentanoico</p>	 <p>Ácido 2-amino-4-hidroxi-5-oxopentanoico</p>

En el caso de la **alanina**, los resultados de la simulación con GLORY se muestran en la Tabla 7. Los metabolitos con propiedades interesantes derivados de la alanina que se encontraron fueron ácido 2-oxopropanoico, más conocido como **ácido pirúvico** y ácido 3-hidroxi-2-oxopropanoico o **ácido 3-hidroxipirúvico**.

El **ácido pirúvico** es uno de los metabolitos intermediarios de la fermentación alcohólica en las levaduras y se encuentra ampliamente extendido en los seres vivos. Se produce durante glucólisis, proceso donde una molécula de glucosa se oxida a dos de ácido

pirúvico (Alba-Lois & Segal-Kischinevzky, 2010). También participa en vías metabólicas de formación de otros compuestos, como en la formación de alcoholes superiores a partir de aminoácidos, de ésteres a partir de ácidos orgánicos o en la producción de acetaldehído (Stewart, 2017). Por otra parte, el **ácido 3-hidroxi-2-oxopirúvico** es un metabolito intermediario envuelto en el metabolismo de la glicina y la serina (Wang *et al.*, 2013).

Tabla 7: Metabolitos derivados, primarios y secundarios, de la alanina, según los datos obtenidos en la simulación realizada mediante el programa GLORY.

PRECURSOR	DERIVADOS PRIMARIOS	DERIVADOS SECUNDARIOS	
 <p>Alanina</p>	 <p>Ácido 2-(hidroxiamino)propanoico</p>	 <p>Ácido 2-oxopropanoico / Ácido pirúvico</p>	
		 <p>Ácido 2-(hidroxiamino)-2-hidroxi-propanoico</p>	
		 <p>Ácido 2-(hidroxiamino)-2-hidroxi-propanoico</p>	
		 <p>Ácido 2-amino-2-hidroxi-propanoico</p>	 <p>Serol / Ácido 2-amino-2,3-dihidroxi-propanoico</p>
		 <p>Ácido 2-oxopropanoico / Ácido pirúvico</p>	 <p>Ácido 3-hidroxi-2-oxopropanoico / Ácido 3-hidroxi-pirúvico</p>

En el caso de la **prolina**, los resultados de la simulación con GLORY se muestran en la Tabla 8. El único metabolito con propiedades interesantes derivado de la prolina fue el **ácido glutámico**, como en el caso de la arginina.

Tabla 8: Metabolitos derivados, primarios y secundarios, de la prolina, según los datos obtenidos en la simulación realizada mediante el programa GLORY.

PRECURSOR	DERIVADOS PRIMARIOS	DERIVADOS SECUNDARIOS
<p>Prolina</p>	<p>Ácido 5-hidroxipirrolidin-2-carboxílico</p>	<p>Ácido 2-aminopentaodioico / Ácido glutámico</p>
		<p>Ácido 1,5-dihidroxipirrolidin-2-carboxílico</p>
	<p>Ácido 1-hidroxipirrolidin-2-carboxílico / N-hidroxiprolina</p>	<p>Ácido 1,5-dihidroxipirrolidin-2-carboxílico</p>
		<p>Ácido 2-(hidroxiamino)pentaodioico</p>
	<p>Ácido 2-amino-5-oxopentanoico</p>	<p>Ácido glutámico</p>
		<p>Ácido 2-amino-4-hidroxi-5-oxopentanoico</p>

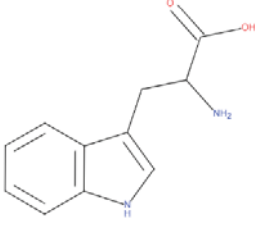
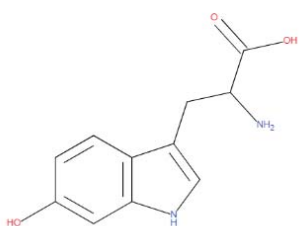
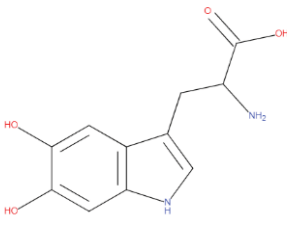
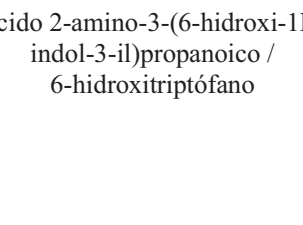
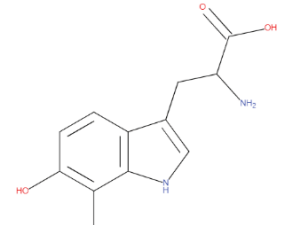

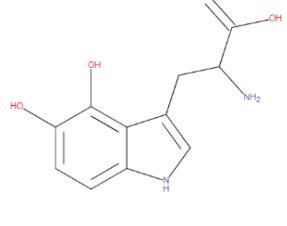
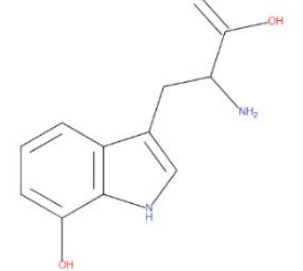
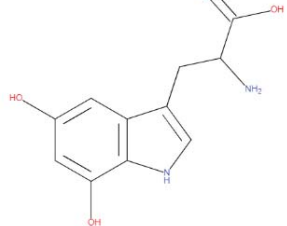
En los resultados del programa CypReact se obtuvo que el aminoácido **triptófano** era susceptible de reaccionar con una de las enzimas del citocromo P450, la CYP2C9. Por este motivo, se ejecutó el programa GLORY para dicho aminoácido con los mismos parámetros que en los casos anteriores. Posteriormente, se consultó bibliografía con la finalidad de encontrar si alguno de sus metabolitos secundarios predichos tenía descrita alguna propiedad interesante.

Los resultados de la simulación con GLORY del **triptófano** se muestran en la Tabla 9. Los metabolitos con propiedades interesantes derivados de la prolina que se encontraron fueron el ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico o **5-hidroxitriptófano** y el ácido 2-amino-3-(7-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico o **7-hidroxitriptófano**.

El **5-hidroxitriptófano** es un intermediario en la producción de serotonina o 5-hidroxitriptamina, un neurotransmisor involucrado en la modulación del estado de ánimo, la cognición, la recompensa y el aprendizaje, entre otros procesos fisiológicos, y este a su vez se transforma en melatonina, la hormona que principalmente regula el ciclo sueño-vigilia (Maffei, 2020). Se utiliza en suplementos dietéticos y en algunos fármacos para el tratamiento de depresión, fibromialgia, atracones asociados con la obesidad, dolores de cabeza crónicos e insomnio (Birdsall, 1998).

Por otra parte, a la serotonina se le han atribuido efectos mitógenos en algunas líneas celulares de carcinomas. Como solución se probó el suministrar **7-hidroxitriptófano**, que sería competidor del triptófano para una de las enzimas que participa en la biosíntesis de serotonina a partir de este aminoácido. En el interior celular, el 7-hidroxitriptófano se transformaría en 5,7-dihidroxitriptamina, una molécula altamente citotóxica en el citosol. Los resultados de este ensayo mostraron que esta podría ser una vía de tratamiento de estos carcinomas (Walther *et al.*, 2002).

Tabla 9: Metabolitos derivados, primarios y secundarios, del triptófano, según los datos obtenidos en la simulación realizada mediante el programa GLORY.

PRECURSOR	DERIVADOS PRIMARIOS	DERIVADOS SECUNDARIOS
 <p data-bbox="343 1227 454 1258">Triptófano</p>	 <p data-bbox="571 734 928 833">Ácido 2-amino-3-(5,6-dihidroxi-1H-indol-3-il)propanoico / 5,6-dihidroxitriptófano</p>	 <p data-bbox="970 600 1369 698">Ácido 2-amino-3-(5,6-dihidroxi-1H-indol-3-il)propanoico / 5,6-dihidroxitriptófano</p>
	 <p data-bbox="571 743 928 842">Ácido 2-amino-3-(6-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico / 6-hidroxitriptófano</p>	 <p data-bbox="970 958 1369 1057">Ácido 2-amino-3-(6,7-dihidroxi-1H-indol-3-il)propanoico / 6,7-dihidroxitriptófano</p>
	 <p data-bbox="571 1361 928 1460">Ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico / 5-hidroxitriptófano</p>	 <p data-bbox="970 1339 1369 1438">Ácido 2-amino-3-(4,5-dihidroxi-1H-indol-3-il)propanoico / 4,5-dihidroxitriptófano</p>
	 <p data-bbox="571 1796 928 1895">Ácido 2-amino-3-(7-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico / 7-hidroxitriptófano</p>	 <p data-bbox="970 1765 1369 1863">Ácido 2-amino-3-(5,7-dihidroxi-1H-indol-3-il)propanoico / 5,7-dihidroxitriptófano</p>

En comparación con el programa CypReact, el programa GLORY fue mucho menos estricto en cuanto a las condiciones de predicción. Por lo tanto, los resultados de estos programas fueron contradictorios entre sí. Esto fue debido a que los programas son novedosos y están en fases recientes de desarrollo. Los datos que ofrecen pueden ser muy interesantes, pero deben ser interpretados de una forma cuidadosa y consciente.

La simulación con GLORY predijo una gran cantidad de metabolitos secundarios derivados para cada una de las moléculas precursoras. Sin embargo, tras la búsqueda bibliográfica se comprobó que pocos de ellos tienen asociados en la bibliografía alguna propiedad de interés para este trabajo.

Algunas de las limitaciones de GLORY se explican a continuación. En primer lugar, GLORY no tuvo en cuenta la estereoisomería de los compuestos ni la estereoselectividad de las enzimas del citocromo P450. Esto fue debido a que el sistema de notación SMILES mediante el cual se introducen las moléculas en el simulador no recoge esta información de las moléculas. En segundo lugar, estos programas de reciente creación están enfocados de momento a la predicción de productos del metabolismo de xenobióticos en el ser humano. Por ello, su extrapolación al metabolismo secundario de *Saccharomyces cerevisiae*, como se realizó en este trabajo, debe hacerse teniendo en cuenta estas limitaciones.

Entre todos los compuestos analizados en la simulación con GLORY se descartaron directamente el **ácido glutámico** y el **ácido pirúvico** ya que se encontraban presentes en el mosto antes de ser fermentado, como fue el caso del ácido glutámico, o se formaron durante el proceso de fermentación, como fue el caso del ácido pirúvico.

Los compuestos **ácido 3-hidroxi pirúvico**, **5-amino-2-oxopentanoico**, **N-omega-hidroxiarginina**, **guanidina** y **7-hidroxitriptófano**, a pesar de que presentan alguna función en el organismo y alguna propiedad de interés en la bibliografía, no se consideraron como metabolitos que pudiesen tener una mayor relevancia en este estudio.

Se pensó que los compuestos que podrían tener mayores beneficios y que requerirían un estudio más profundo de su presencia en el ambiente de fermentación, así como de su concentración y sus beneficios debido a las propiedades encontradas en la bibliografía eran los siguientes: i) **ácido glucurónico**: sus propiedades hepatoprotectoras y antibacterianas son interesantes. Además, está presente en otra bebida fermentada, la kombucha, a la cual se le asocian una gran cantidad de efectos beneficiosos precisamente por la presencia de este compuesto. Se consideró que debido a este hecho podría ser de interés averiguar si se

produce durante la fermentación de mosto cervecero, al no haberse encontrado ninguna relación entre este ácido orgánico y la cerveza en la bibliografía; ii) **N-hidroxi guanidina**: sus propiedades antivirales y antineoplásicas podrían tener alguna aplicación en el presente ámbito de estudio; iii) **5-hidroxitriptófano**: su uso en suplementos dietéticos y en fármacos para el tratamiento de algunas patologías podría tener alguna aplicación en el presente ámbito de estudio.

Ensayos de fermentación a escala laboratorio

Monitorización de la fermentación

En la Figura 3 se representa la evolución de la concentración celular de los cultivos de YPD y mosto a lo largo de la fermentación.

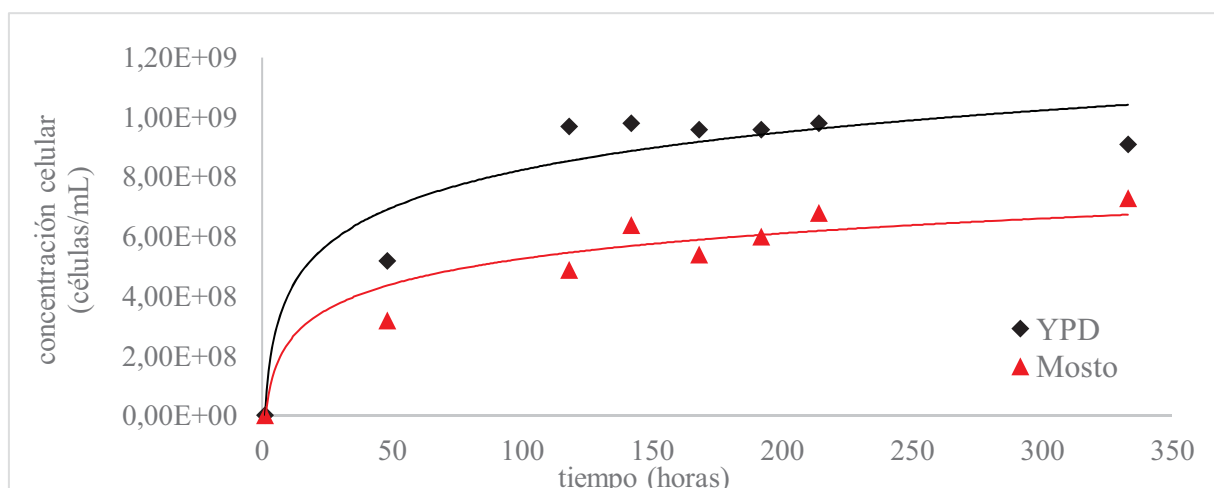


Figura 3: Representación de la concentración celular (células/mL) a distintos tiempos (horas) en las fermentaciones de YPD y mosto.

El crecimiento celular fue mayor en el medio de cultivo YPD que en el mosto cervecero. El preinóculo de *S. cerevisiae* se realizó en medio YPD, y cuando se inoculó el mosto con este preinóculo, las levaduras recibieron un fuerte choque osmótico debido al alto contenido de azúcares del mosto, y se tuvieron que adaptar a las nuevas condiciones, retardándose así el crecimiento celular. Además, el alto contenido de azúcares del medio favoreció el efecto Crabtree que supone que, a pesar de que en el medio de cultivo haya un ambiente aerobio, las levaduras vayan a fermentar los azúcares a etanol (Morcillo Parra, 2019). Esto en el medio YPD no sucedió, y, por lo tanto, hubo un mayor crecimiento de biomasa en este cultivo.

Determinación de metabolitos secundarios por cromatografía

Los resultados de los análisis mediante GC-MS/MS y LC-MS/MS no se recibieron antes de finalizar el plazo de presentación del trabajo. Por esta razón, no ha sido posible llevar a cabo el análisis de los metabolitos formados durante el proceso fermentativo por *Saccharomyces cerevisiae* tanto en el mosto cervecero como en el medio YPD. Asimismo, tampoco se pudieron comparar los resultados de la simulación con los resultados de las fermentaciones llevadas a cabo en el laboratorio.

Conclusiones

- Se llevó a cabo la simulación mediante modelos de cálculo computacional utilizando los programas CypReact y GLORY. Ambos mostraron resultados contradictorios:
 - CypReact fue más estricto en las condiciones de simulación e indicó que ninguno de los azúcares o aminoácidos del mosto era susceptible de reaccionar con alguna de las enzimas del citocromo P450, a excepción del triptófano, que interaccionaría únicamente con la CYP2C9.
 - GLORY, por su parte, predijo numerosos metabolitos secundarios a partir de las moléculas de interés. Se llegó a la conclusión de que los metabolitos predichos ácido glucurónico, N-hidroxiguanidina y 5-hidroxitriptófano requerían más estudios sobre su formación durante la fermentación del mosto cervecero y de las propiedades beneficiosas que se le relacionaron tras la búsqueda bibliográfica.
- Las fermentaciones en el laboratorio se llevaron a cabo de forma exitosa, produciéndose un mayor crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio YPD que en el mosto debido al alto contenido de azúcares de este último. Los resultados del análisis mediante GC-MS/MS y LC-MS/MS de las moléculas producidas no se pudieron analizar por no disponer de ellos a tiempo. Se requiere llevar a cabo el estudio de estos compuestos para compararlos con los resultados obtenidos mediante la simulación, y así poder validar la utilidad de estos programas de reciente desarrollo en este campo de aplicación.

Bibliografía

- Abu-Soud, H. M., Presta, A., Mayer, B., & Stuehr, D. J. (1997). Analysis of neuronal NO synthase under single-turnover conditions: Conversion of Nomega-hydroxyarginine to nitric oxide and citrulline. *Biochemistry*, 36(36), 10811-10816. <https://doi.org/10.1021/bi971414g>
- Alba-Lois, L., & Segal-Kischinevzky, C. (2010). Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine. *nature education*, 3, 17.
- Al-Jassani, M. J., Mohammed, G. J., & Hameed, I. H. (2016). *Secondary Metabolites Analysis of Saccharomyces cerevisiae and Evaluation of Antibacterial Activity*. 8(5), 12.
- Ansari, F., Pourjafar, H., Kangari, A., & Homayouni, A. (2019). Evaluation of the Glucuronic Acid Production and Antibacterial Properties of Kombucha Black Tea. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20(11), 985-990. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190717100958>
- Arral, M. L., Tooley, C., Ziino, E., & Halpern, J. M. (2020). Elucidating the Electrochemical Mechanism of NG-Hydroxy-L-arginine. *Journal of the Electrochemical Society*, 167(2). <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ab643a>
- Birdsall, T. C. (1998). 5-Hydroxytryptophan: A clinically-effective serotonin precursor. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 3(4), 271-280.
- Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E. (2013). Glutamate: A truly functional amino acid. *Amino Acids*, 45(3), 413-418. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1280-4>
- Buiatti, S. (2009). Beer Composition: An Overview. En *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 213-225). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00020-1>
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002>
- Day, A., Schneider, C., & Schneider, B. L. (2004). Yeast cell synchronization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 241, 55-76. <https://doi.org/10.1385/1-59259-646-0:55>
- de Bruyn Kops, C., Stork, C., Šicho, M., Kochev, N., Svozil, D., Jeliaskova, N., & Kirchmair, J. (2019). GLORY: Generator of the Structures of Likely Cytochrome P450 Metabolites Based on Predicted Sites of Metabolism. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00402>

- Fabregat, A., Pozo, O. J., Marcos, J., Segura, J., & Ventura, R. (2013). Use of LC-MS/MS for the open detection of steroid metabolites conjugated with glucuronic acid. *Analytical Chemistry*, *85*(10), 5005-5014. <https://doi.org/10.1021/ac4001749>
- Fărcaș, A. C., Socaci, S. A., Mudura, E., Dulf, F. V., Vodnar, D. C., Tofană, M., & Salanță, L. C. (2017). Exploitation of Brewing Industry Wastes to Produce Functional Ingredients. *Brewing Technology*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69231>
- Garza-Ulloa, H., Cantú, R. G., & Gajá, A. M. C. (1986). Determination of Amino Acids in Wort and Beer by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *44*(2), 47-51. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-44-0047>
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J., & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. *Journal of the Institute of Brewing*, *120*(3), 157-163. <https://doi.org/10.1002/jib.145>
- Heavner, B. D., & Price, N. D. (2015). Comparative Analysis of Yeast Metabolic Network Models Highlights Progress, Opportunities for Metabolic Reconstruction. *PLOS Computational Biology*, *11*(11), e1004530. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004530>
- Heuberger, A. L., Broeckling, C. D., Sedin, D., Holbrook, C., Barr, L., Kirkpatrick, K., & Prenni, J. E. (2016). Evaluation of non-volatile metabolites in beer stored at high temperature and utility as an accelerated method to predict flavour stability. *Food Chemistry*, *200*, 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.022>
- Hirst, M. B., & Richter, C. L. (2016). Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, *67*(4), 361-370. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.15098>
- Ishii, N., Soga, T., Nishioka, T., & Tomita, M. (2005). Metabolome analysis and metabolic simulation. *Metabolomics*, *1*(1), 29-37. <https://doi.org/10.1007/s11306-005-1105-5>
- Käppeli, O. (1986). Cytochromes P-450 of yeasts. *Microbiological Reviews*, *50*(3), 244-258.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2019). PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D1102-D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>

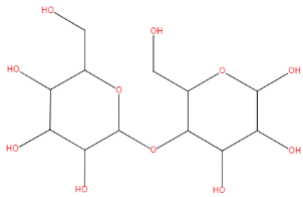
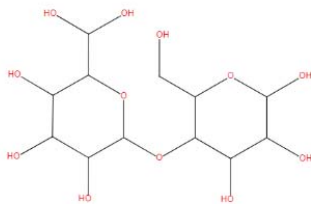
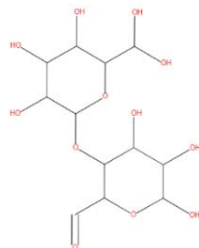
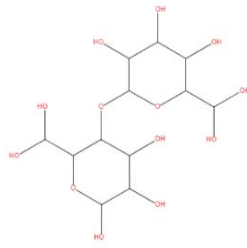
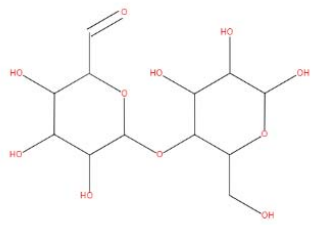
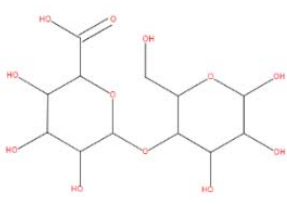
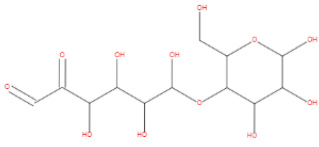
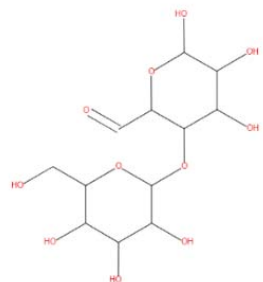
- Li, Z., Jiang, Y., Guengerich, F. P., Ma, L., Li, S., & Zhang, W. (2020). Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(3), 833-849. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008758>
- Maffei, M. E. (2020). 5-Hydroxytryptophan (5-HTP): Natural Occurrence, Analysis, Biosynthesis, Biotechnology, Physiology and Toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/ijms22010181>
- Martínez-Leal, J., Ponce-García, N., & Escalante-Aburto, A. (2020). Recent Evidence of the Beneficial Effects Associated with Glucuronic Acid Contained in Kombucha Beverages. *Current Nutrition Reports*, 9(3), 163-170. <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00312-6>
- Mellor, D. D., Hanna-Khalil, B., & Carson, R. (2020). A Review of the Potential Health Benefits of Low Alcohol and Alcohol-Free Beer: Effects of Ingredients and Craft Brewing Processes on Potentially Bioactive Metabolites. *Beverages*, 6(2), 25. <https://doi.org/10.3390/beverages6020025>
- Mestichelli, L. J., Gupta, R. N., & Spenser, I. D. (1979). The biosynthetic route from ornithine to proline. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(3), 640-647.
- Morcillo Parra, M. de los Á. (2019). Melatonin metabolism in yeast cells during alcoholic fermentation [Ph.D. Thesis, Universitat Rovira i Virgili]. En *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/667681>
- Mozzi, F., Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., De Vuyst, L., & Pescuma, M. (2013). Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Research International*, 54(1), 1152-1161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.010>
- Nakano, K. K., & Tyler, H. R. (1972). Cardiovascular complications of guanidine hydrochloride. *Annals of Internal Medicine*, 77(4), 658. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-77-4-658>
- National Library of Medicine [NLM]. (2020). *DailyMed—Guanidine Hydrochloride*. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=903fbd33-e5d9-41fb-9414-7bd6f42a8593>
- Oh, S. J., Kim, D. S., Head, T. C., & Claussen, G. C. (1997). Low-dose guanidine and pyridostigmine: Relatively safe and effective long-term symptomatic therapy in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle & Nerve*, 20(9), 1146-1152. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199709\)20:9<1146::aid-mus9>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199709)20:9<1146::aid-mus9>3.0.co;2-8)

- Ramirez-Gaona, M., Marcu, A., Pon, A., Guo, A. C., Sajed, T., Wishart, N. A., Karu, N., Djoumbou Feunang, Y., Arndt, D., & Wishart, D. S. (2017). YMDB 2.0: A significantly expanded version of the yeast metabolome database. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D440-D445. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1058>
- Ribas-García, M., Hurtado-Vargas, R., Garrido-Carralero, N., Domenech-López, F., & Sabadí-Díaz, R. (2011). Metodología para la modelación matemática de procesos. Caso de estudio, fermentación alcohólica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 45(1), 37-47.
- Rodríguez Longarela, N. (2019). *Estudio mediante HPLC-PDA de la influencia en el contenido de aminoácidos libres de las distintas etapas del proceso de producción de la cerveza.*
- Schade, D., Kotthaus, J., Klein, N., Kotthaus, J., & Clement, B. (2011). Prodrug design for the potent cardiovascular agent N ω -hydroxy-L-arginine (NOHA): Synthetic approaches and physicochemical characterization. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 9(14), 5249-5259. <https://doi.org/10.1039/C0OB01117G>
- Sriyudthsak, K., Shiraiishi, F., & Hirai, M. Y. (2016). Mathematical Modeling and Dynamic Simulation of Metabolic Reaction Systems Using Metabolome Time Series Data. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00015>
- Steiner, E., Auer, A., Becker, T., & Gastl, M. (2012). Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 803-813. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4651>
- Stewart, G. (2017). The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. *Fermentation*, 3(4), 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>
- Tai, A. W., Lien, E. J., Lai, M. M., & Khwaja, T. A. (1984). Novel N-hydroxyguanidine derivatives as anticancer and antiviral agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 27(2), 236-238. <https://doi.org/10.1021/jm00368a024>
- Tian, S., Djoumbou-Feunang, Y., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2018). CypReact: A Software Tool for in Silico Reactant Prediction for Human Cytochrome P450 Enzymes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(6), 1282-1291. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00035>
- Tomé, D. (2018). The Roles of Dietary Glutamate in the Intestine. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 73(5), 15-20. <https://doi.org/10.1159/000494777>

- Turi, T. G., & Loper, J. C. (1992). Multiple regulatory elements control expression of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome P450, lanosterol 14 alpha-demethylase (ERG11). *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 2046-2056.
- Veveris, M., Dambrova, M., Cirule, H., Meirena, D., Kalvinsh, I., & Wikberg, J. E. (1999). Cardioprotective effects of N-hydroxyguanidine PR5 in myocardial ischaemia and reperfusion in rats. *British Journal of Pharmacology*, 128(5), 1089-1097. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702887>
- Walther, D. J., Peter, J.-U., & Bader, M. (2002). 7-Hydroxytryptophan, a novel, specific, cytotoxic agent for carcinoids and other serotonin-producing tumors. *Cancer*, 94(12), 3135-3140. <https://doi.org/10.1002/cncr.10592>
- Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., & Wu, G. (2013). Glycine metabolism in animals and humans: Implications for nutrition and health. *Amino Acids*, 45(3), 463-477. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1493-1>
- Weininger, D. (1988). SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 28(1), 31-36. <https://doi.org/10.1021/ci00057a005>
- Xiang, J., Wang, Q., Yiu, S.-M., Man, W.-L., Kwong, H.-K., & Lau, T.-C. (2016). Aerobic Oxidation of an Osmium(III) N-Hydroxyguanidine Complex To Give Nitric Oxide. *Inorganic Chemistry*, 55(10), 5056-5061. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b00652>
- YPD media. (2010). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(9), pdb.rec12315. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec12315>

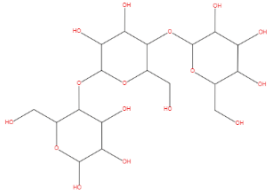
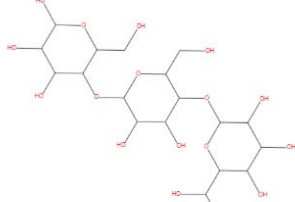
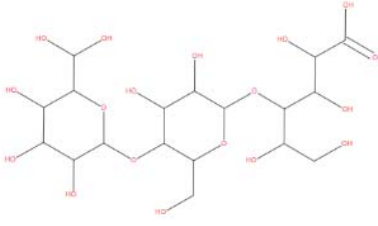
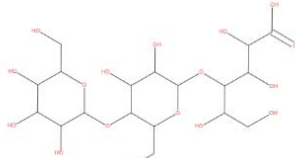
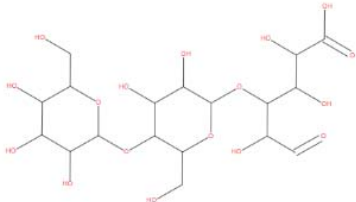
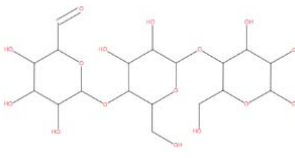
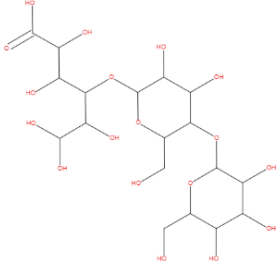
Anexos**Anexo I: Resultados de la simulación con GLORY de la maltosa y la maltotriosa**

Tabla 10: Metabolitos derivados, primarios y secundarios, de la maltosa, según los datos obtenidos en la simulación realizada mediante el programa GLORY.

PRECURSOR	DERIVADOS PRIMARIOS	DERIVADOS SECUNDARIOS	
 <p>Maltosa</p>	 <p>Compuesto 1*</p>	 <p>Compuesto 1.1*</p>	
		 <p>Compuesto 1.2*</p>	
		 <p>Compuesto 2</p>	 <p>Compuesto 2.1*</p>
			 <p>Compuesto 2.2*</p>
		 <p>Compuesto 3*</p>	

* En estos casos, al tener los metabolitos secundarios derivados una nomenclatura IUPAC compleja, se etiquetaron como "Compuesto X", siendo X un ordinal, y como "Compuesto X.Y", siendo Y un ordinal, para los derivados de estos primeros.

Tabla 11: Metabolitos derivados, primarios y secundarios, de la maltotriosa, según los datos obtenidos en la simulación realizada mediante el programa GLORY.

PRECURSOR	DERIVADOS PRIMARIOS	DERIVADOS SECUNDARIOS
 <p data-bbox="325 1182 448 1211">Maltotriosa</p>	 <p data-bbox="663 741 815 770">Compuesto 4*</p>	 <p data-bbox="1078 573 1257 602">Compuesto 4.1*</p>
	 <p data-bbox="663 1308 815 1337">Compuesto 5*</p>	 <p data-bbox="1078 1167 1257 1196">Compuesto 5.1*</p>
	 <p data-bbox="663 1778 815 1807">Compuesto 6*</p>	 <p data-bbox="1078 1503 1257 1532">Compuesto 5.2*</p>

* En estos casos, al tener los metabolitos secundarios derivados una nomenclatura IUPAC compleja, se etiquetaron como "Compuesto X", siendo X un ordinal, y como "Compuesto X.Y", siendo Y un ordinal, para los derivados de estos primeros.