5 Acumulación y metabolismo de selenio por las células de levadura (Selenium accumulation and metabolism by yeast cells) Miguel Otero

Miguel A. Otero-Rambla y Amaury Alvarez-Delgado

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)
Vía Blanca 804 y Carretera Central La Habana 11000 Cuba

Autor correspondiente: Miguel A. Otero-Rambla Email: maorambla@yahoo.es

Resumen
El presente artículo examina el proceso de bioacumulación de selenio y su metabolismo en las células de levadura. Los microorganismos en general pueden incorporar permanentemente elementos presentes en su entorno aun cuando no sean estos necesarios para su metabolismo. Las células de levadura en particular pueden enlazar Se en su estructura celular tanto en forma inorgánica como orgánica.
La bioacumulación ocurre en dos etapas: el enlace intracelular del selenio y su posterior transporte al interior de la célula. Durante este proceso el selenio sufre diferentes procesos de oxidación, reducción, metilación y sintesis de seleno proteínas que permiten la supervivencia de la célula en un entorno agresivo como es la acumulación de Se en el medio. Este mecanismo puede ayudar en reducir los efectos del estres oxidativo en las enfermedades neuro degenerativas como las enfermedad de Huntington o mal de San Vito.

Palabras clave: antioxidante inorgánico, selenoproteínas, enfermedad de Huntington, metabolismo microbiano, absorción de metales

Abstract
Present paper examines the process for bioaccumulation of selenium and its metabolism in yeast cells. Microorganisms in general can permanently bind different elements present in their environment even when they were not needed for their metabolism. Yeast cells in particular can build up Se in their structure both inorganic and organic species.
Bioaccumulation occurs in two steps: intracellular binding of selenium and its subsequent transport to citoplasm. During the process selenium undergoes different oxidation, reduction, methylation and synthesis of selenium proteins which allow the survival of cells in an aggressive environment as the Se accumulation produces. This mechanism ncan help to reduce the effects of oxidative stress in neuro degenerative diseases as Huntington or San Vitu's dance.

Key words: inorganic antioxidant, seleno proteins, Huntington's disease, microbial metabolism, metal absorption

Recibido: 18 de agosto de 2019
Aceptado: 18 de septiembre de 2019

Introduccion
La enfermedad de Huntington (HD) es un raro desorden neurovegetativo del sistema nervioso central caracterizado por movimientos espasmódicos, disturbios siquiátricos y de conducta y finalmente demencia, el conocido *mal de San Vito* (Bruyn GW, 1968). Su prevalencia en la población caucásica se estima entre 1/10,000 y 1/20,000 (Bates *et* al, 2002, Walker 2007, Warby *et al* 2011) y la edad

promedio para su debut oscila entre 30 y 50 años. En algunos casos los síntomas empiezan desde los 20 años con disturbios de comportamiento y dificultades de aprendizaje (Huntington Juvenil; JHD).
El síntoma clásico es que los movimientos involuntarios se difunden a todos los músculos y así, todos los procesos sicomotores se retardan severamente, manifestándose síntomas siquiátricos y declinación cognitiva.
HD es una enfermedad autosómica hereditaria causada por la repetición elongada de la secuencia CAG (hasta 36 veces o más) en la rama corta del cromosoma 4p16.3 en el gen correspondiente (gen Huntingtiniano) (Anon, 1993). Mientras mayor sea la repetición de la secuencia, más temprana la aparición de la enfermedad. Para los más jóvenes, la repetición con frecuencia excede las 55 veces (Trottier *et al,* 1994). La diagnosis se basa en los síntomas clínicos en individuos con progenitors con HD probada y confirmada por análisis de DNA. No existe cura para la enfermedad, solo paliativos para mejorar la calidad de vida.
A pesar de esta realidad, sin embargo, la extensión y severidad del daño oxidativo en HD son hechos bien reconocidos pero tal vez no apreciados en toda su magnitud (Johri y Beal, 2012). El daño oxidativo ocurre en los lípidos, proteínas y DNA y se ha sugerido que este último puede contribuir a la expansión del CAG durante la reparación del DNA (Kovtun *et al,* 2007). Los antioxidants son efectivos en la reducción de la progresión de la enfermedad en modelos de ratones transgénicos y se mostraron promisorios en ensayos clínicos en humanos. Los síntomas de la enfermedad son: movimientos espasmódicos o de contorsión involuntarios (corea), problemas musculares, como rigidez o contracturas musculares (distonía), movimientos oculares lentos o anormales, marcha, postura y equilibrio afectados y dificultad en la producción física del habla o para tragar.
El Selenio forma parte de un grupo de elementos traza necesarios para el adecuado funcionamiento de un organismo. Es una parte importante de las selenoproteínas y varias enzimas que funcionan como antioxidantes entre las que se encuentran la glutation peroxidasa (GPx), thioredoxin reductasa (TRxR), y iodo thyronina deiodinasa (DIO), las que protegen la célula de los efectos dañinos de los radicales libres que se generan durante los procesos de oxidación (Drutel *et al* 2013).
El Se inorgánico en forma de selenito es asimilado de manera limitada por el organismo. La incorporación del Se en macromoléculas como proteínas o aminoácidos específicos , existentes en pequeñas cantidades en nuestro organismo, presentan mayores oportunidades de neutralizar los radicales libres en los procesos oxidativos naturales (Lin, MT & Beal 2006).
Las levaduras son microorganismos eucarióticos que poseen un veloz metabolismo celular y por tanto interactúan intensamente con el entorno extracelular. Una característica intrínseca a las levaduras producidas en un medio rico en nutrientes, es su corto tiempo de generación – de 1.5 a 2.0 horas- lo que se traduce en la duplicación de la concentración celular muy rápidamente.
Muchos elementos traza, entre ellos el Se son acumulados por las células de levaduras a partir del medio (Kieliszek y Błażejak 2013; Schrauzer 2006). Las levaduras son ampliamente utilizadas tanto en la producción de alimentos como de forrajes y también en las industrias biotecnológicas y farmacéuticas. Vale la pena mencionar que el mecanismo de acumulación de Se y su conversión en estructuras intracelulares no está totalmente dilucidado.

Mecanismos de enlace externo de selenio

El enlace del Se extracelular se basa en la absorción química que involucra la formación de enlaces iónicos o el acomplejamiento de los iones de Se por algunos biopolímeros de la pared celular como los grupos activos de proteínas, fosfolípidos y/o polisacáridos.
Hay que tener en cuenta que la pared celular de las levaduras representa entre 20 y 30% del su peso seco y está compuesta mayormente por polisacáridos (aprox 85 %) y proteínas (15 %) (Klis *et al* 2006, Olas *et al* 2010, Levin & Moran 2011).
Los procesos fisico-químicos juegan un papel fundamental en el enlace extracelular del Se. La bioabsorción del selenio se debe a la presencia de grupos funcionales que exhiben carga negativa en

la superficie de la pared celular como los grupos fosfodiéster (Klis *et al* 2002) entre otros. El alcance de esta absorción depende de la hidrofobicidad de las paredes celulares de la levadura que a su vez depende de la proporción entre sus componentes (Kordialik-Bogacka 2011).
La Fig 1 muestra el modo de transporte de Se a las células de levadura

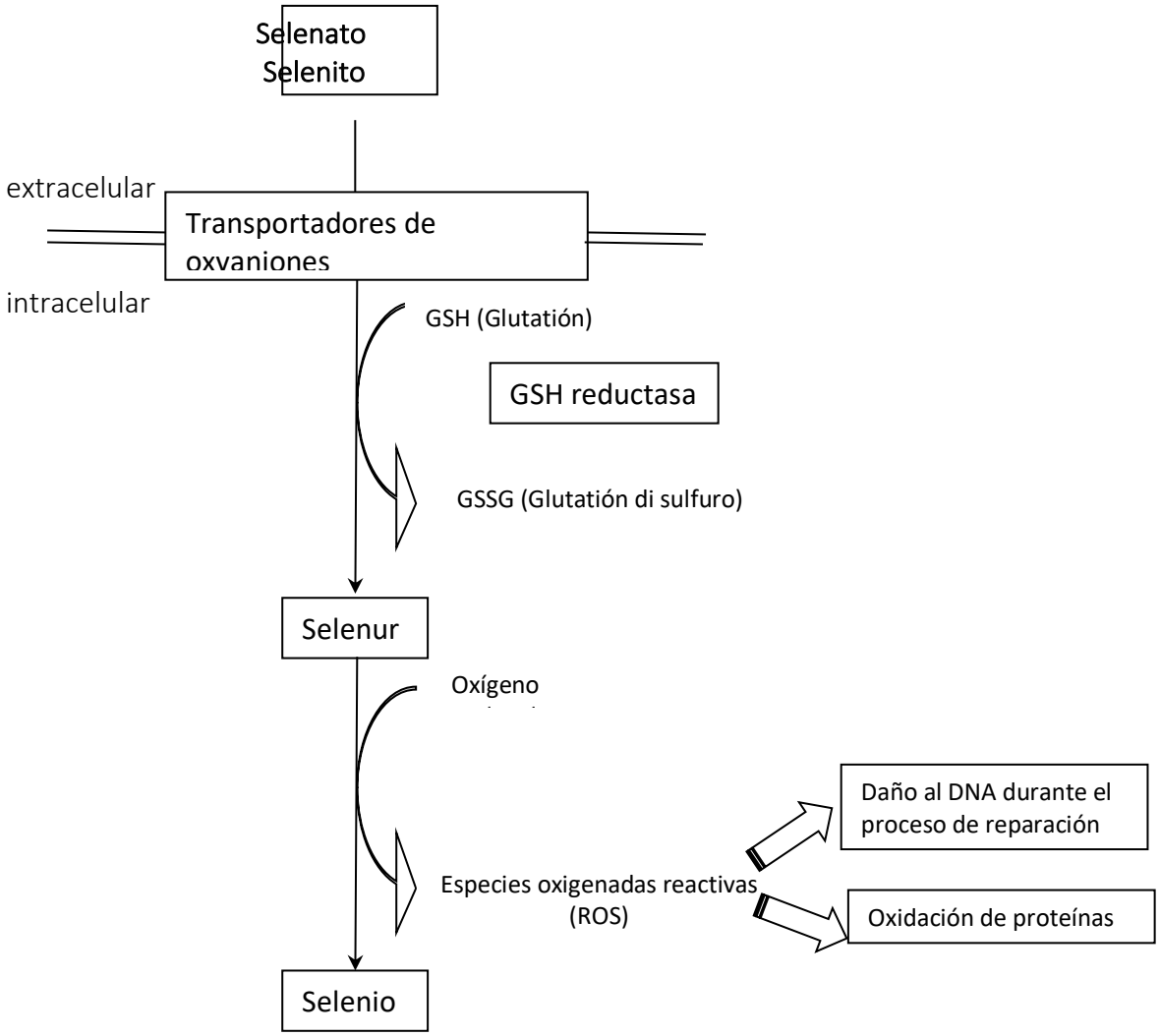

Fig 1 Transporte de selenio en forma de oxianion al interior celular (Rosen & Liu 2015)

Acumulación de Se intracelular

El proceso de acumulación de Se intracelularmente se produce por transporte activo. Para superar la barrera que supone la impermeabilidad de la membrana se require un mecanismo específico (Rosen & Liu 2009). La mayoría de los estudios se han realizado con levaduras y bacterias encontrándose que en células de levaduras cultivadas en glucosa y fructosa, alcanzaron niveles de Se de 14 y 11mg/g, respectivamente. Estos resultados sugieren que un medio rico en sacarosa puede ser apropiado para la acumulación de Se a partir de que la presencia de invertasa en las levaduras hidroliza este disacárido en glucosa y fructosa a partes iguales. Las melazas de caña por su alto contenido en sacarosa son un candidato preferente. Se ha informado igualmente y resulta por demás un dato de suma importancia que la presencia de iones sulfato y sulfito en el medio de cultivo no afecta la bioabsorción de Se por *S. cerevisiae*. Observaciones publicadas por otros autores (Golubev & Golubev 2002) confirman la tolerancia de las levaduras a la presencia de Se en el medio depende de la composición de este y la presencia de aminoácidos sulfurados. Según Demirci & Pometto (1999), una relación Se/S estimada de 4:1 en el medio es óptima para una bioacumulación eficiente de Se en forma orgánica.

Resultados informados por Marinescu *et al* (2011) demostraron que el proceso de bioacumulación de Se tiene lugar en la fase logarítmica de crecimiento. Así, la levadura *Saccharomyces uvarum*, la utilizada en la preparación de cervezas, cuando se cultivó en un medio de melazas suplementado con selenito de sodio en concentraciones desde 30 a 180 mg/L, acumuló cantidades importantes de Se que variaron entre 0.62 y 2.22 mg/g.. Ponce de León *et al* (2002) realizaron estudios en los que variaron los métodos de dosificación de Se en *S. cerevisiae*. Los estudios demostraron que la mejor manera de obtener levaduras ricas en Se en una de las formas más favorables para su absorción (L-selenomethionina) fue añadir dosis bajas de selenito sódico (de 10 a 50 mg/L) en la fase logarítmica temprana alcanzándose alrededor de 2.4 mg/L en la biomasa celular. La temperatura y el pH juegan también un rol importante en la bioabsorción de Se en *S. cerevisiae* (27-30°C, pH = 5.8-6) (Yin *et al* 2010). La Fig 2 muestra la ruta metabólica de Se en las células.

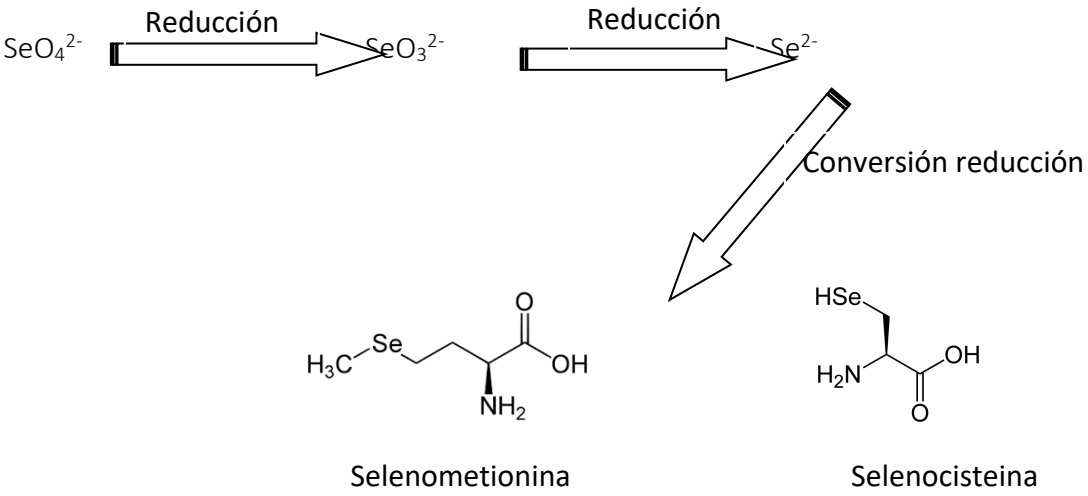

Fig 2 Reducción de selenio inorgánico en la célula

Toxicidad del selenio

El selenio es tóxico cuando se ingiere en concentraciones superiores a 300 µg/dia (Fairweather-Tait *et al* 2011). Sus efectos tóxicos se conocen desde hace mucho tiempo y depende de factores como la forma quimica, la concentración y las posibles transformaciones que puedan sufrir en su interacción con el medio.

Las formas orgànicas de los elementos suelen considerarse màs tóxicas que las especies inorgànicas, por su naturaleza lipofílica, y asi poseer mayor facilidad para difundir ràpidamente a travès de las membranas celulares. Sin embargo, muchas especies orgànicas de selenio son esenciales y forman parte de las proteinas (SeMet, SMC y SeCys2), por lo que su toxicidad potencial es nula. Dentro de las formas inorgànicas, el selenio elemental parece ser el menos tóxico por ser el màs insoluble y por tanto difícilmente asimilable por los organismos. Las especies selenito y seleniato presentan toxicidad semejante, otorgándoseles propiedades mutagénicas.

El selenio puede ser transportado en la cadena alimenticia hacia niveles superiores. Por ejemplo en los sistemas acuáticos, la biomagnificación de selenio oscila entre 2 y 6 órdenes de magnitud desde el productor primario (fitoplancton, algas) hasta llegar a los animales y vertebrados .

En el hombre se desconocen los niveles exactos para producir la intoxicación crónica, pero se ha observado que cantidades del orden de 2-8 mg/ kg son capaces de producir graves lesiones. Se han registrado varios casos de envenenamiento por selenio con un consumo dietètico de 5 a 27 mg/ kg, o por exposición industrial a seleniuros, dióxidos de selenio y oxicloruro de selenio. Los sintomas de selenosis por inhalación son mareos e irritación de las membranas mucosas.

Cuando la exposición es elevada produce acumulación de líquido en los pulmones, bronquitis, neumonía, fiebre, dolor de garganta, conjuntivitis, vómitos, dolores abdominales, diarrea y expansión del hígado. Cuando es ingerido puede producir pelo quebradizo y ufias deformadas, sarpullidos, calor, hinchamiento de la piel, dolores agudos.

El hecho de que el selenio pueda comportarse como elemento tóxico o esencial en la bioquímica de los seres vivos, dependiendo de su concentración y sobre todo de su forma química, hace que sea muy importante su estudio y control, con el fin de evitar desórdenes biológicos procedentes de la administración de un exceso o deficiencia en este elemento. En primer lugar, debido a que el selenio se presenta en muestras biológicas y medioambientales a niveles traza, es necesario el empleo de técnicas de análisis de elevada sensibilidad.

Por ello se ha estudiado su determinación por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), a través de diferentes sistemas de introducción de muestra: nebulización neumática convencional (CN) y generación de hidruros (HG), en ambos casos, se ha estudiado la introducción de muestra en continuo y por inyección en flujo.

Métodos de propagación de microorganismos

La producción de selenio levaduras puede ser llevada a cabo por medio de diferentes arreglos tecnológicos y de operación de los biorreactores.

Batch

La fermentación por lotes (Batch) es ampliamente usada en las industrias biológicas incluyendo la propagación microbiana, metabolismo celular y la producción de numerosos productos. En general puede usarse para construir los modelos cinéticos de diferentes microorganismos y estudiar las condiciones de producción óptimas y de control de proceso (Fengxue & Min 2019). Si el producto en estudio está directamente asociado al crecimiento como es el caso de la producción de biomasa microbiana, proteínas unicelulares etc, se debe elongar la fase de crecimiento logarítmica lo más posible para incrementar la concentración del producto de interés, de tratarse de un metabolito secundario lo contrario es lo aconsejable.

En el caso de la acumulación de Se en las células, no se trata de ninguno de éstos y el modelo resulta útil para el estudio de la cinética de incorporación del Se y el análisis de la influencia de las diferentes condiciones de de fermentación sobre la inhibición del crecimiento entre otros aspectos. Para su empleo como tecnología de producción, no parece aconsejable especialmente cuando de un producto tóxico se trata pues el modelo se basa en preparación del medio de cultivo con la totalidad de los nutrientes necesarios para el desarrollo del proceso completo: propagación del cultivo y acumulación del producto de interés.

La Fig 3 muestra el modelo de crecimiento de un proceso batch típico

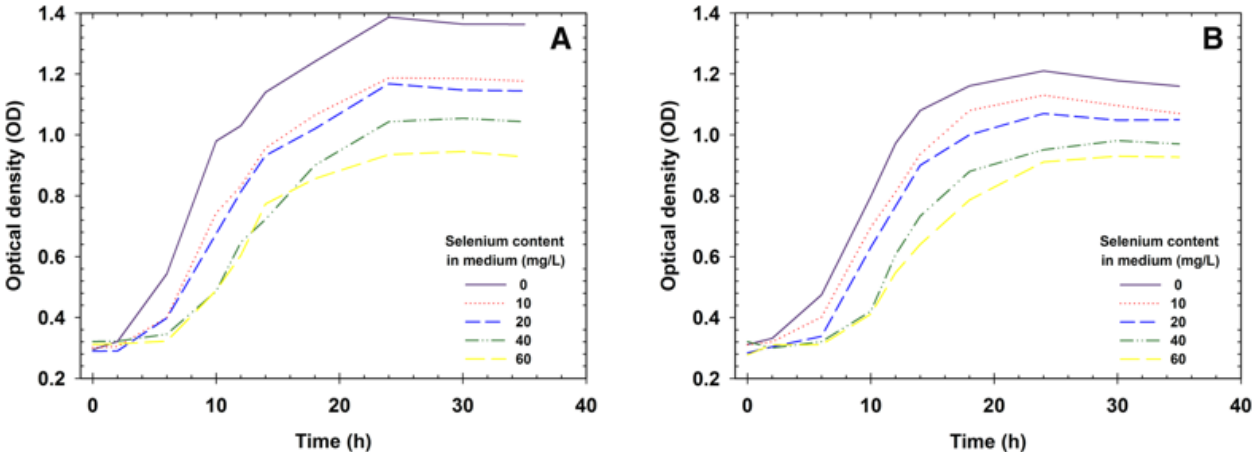

Fig 3 Cinética típica del modelo de fermentación por lotes. A *Candida utilis;* B *Saccharomyces cerevisiae* (Kieliszek *et al* 2019)

Fed-Batch

El modo de propagación fed-batch es operado generalmente con la adición de nutrientes en dosis pequeñas lo que provoca un incremento constante en el volumen de cultivo. El cultivo por lote conserva un volumen constante y se ha empleado para simular el crecimiento de microorganismos. En este último, la totalidad de los nutrientes han de ser cargados en el medio de cultivo desde el inicio y así la posible inhibición por sustrato está siempre latente.

En el caso de la incorporación de Se en levaduras, el proceso de propagación fed-batch parece ser el más apropiado (Nisamedtinov 2007) pues permite la dosificación controlada del Se inorgánico por debajo del umbral de toxicidad para las células. Este modelo permite el control de todas las variables del proceso, a saber: tasa de crecimento (μ) y adición de medio, pH, temperatura y control Redox, dentro de los límites permisibles sin comprometer la propagación celular (Yoshinaga *et al* 2018, Wang *et al* 2018). La Fig 4 muestra una comparación típica entre los sistemas batch y batch incrementado

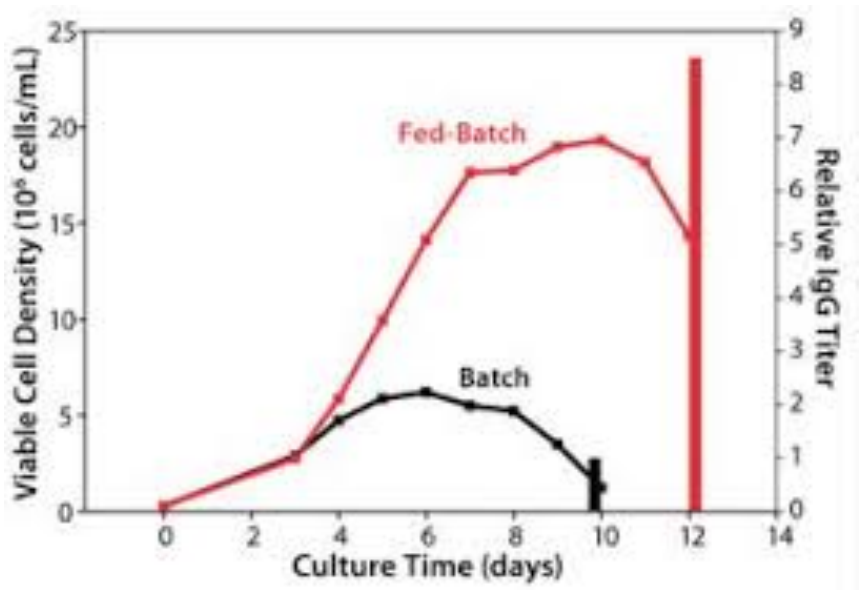

Fig 4 Sistemas batch y batch incrementado de fermentación

Cultivo continuo

Tanto el cultivo *batch* como el *fed batch* son cultivos cerrados; el cultivo abierto por antonomasia es el **quimiostato**. Este es un cultivo en el que:

- el medio fresco es introducido continuamente a un flujo constante

- el volumen de medio se mantiene constante a través de la extracción del medio fermentado al mismo flujo
- en este el suministro de un nutriente simple controla la tasa de crecimiento

Los cultivos en estado estacionario permiten un control preciso del crecimiento y el entorno celular. Estos cultivos pueden extenderse por semanas e incluso meses dentro de estos entornos controlados lo que lo hacen un sistema ideal para la obtención de numerosos productos de interés industrial.

En este sistema, una vez alcanzado por cultivo batch una concentración de células elevada, se comienza a alimentar el sistema con los nutrientes necesarios para mantener constante el cultivo y la composición del producto. La ventaja de este sistema es la alta productividad horaria que presenta, sin embargo cuando se trata de la incorporación de un elemento ajeno al metabolismo celular como es el caso del selenio, no parece ser el sistema idoneo. La inhibición del crecimiento por la alimentación de compuestos selenados en el medio tiene un impacto negativo sobre la propagación celular al ser éste un elemento tóxico. Como por definición el cultivo continuo es un proceso abierto en el que se presupone una tasa de crecimiento (μ) determinada para un flujo de alimentación de nutrientes dado, se corre el peligro que la concentración celular decrezca continuadamente en el tiempo y el sistema entre en el proceso de *wash out* (concentración celular = 0).

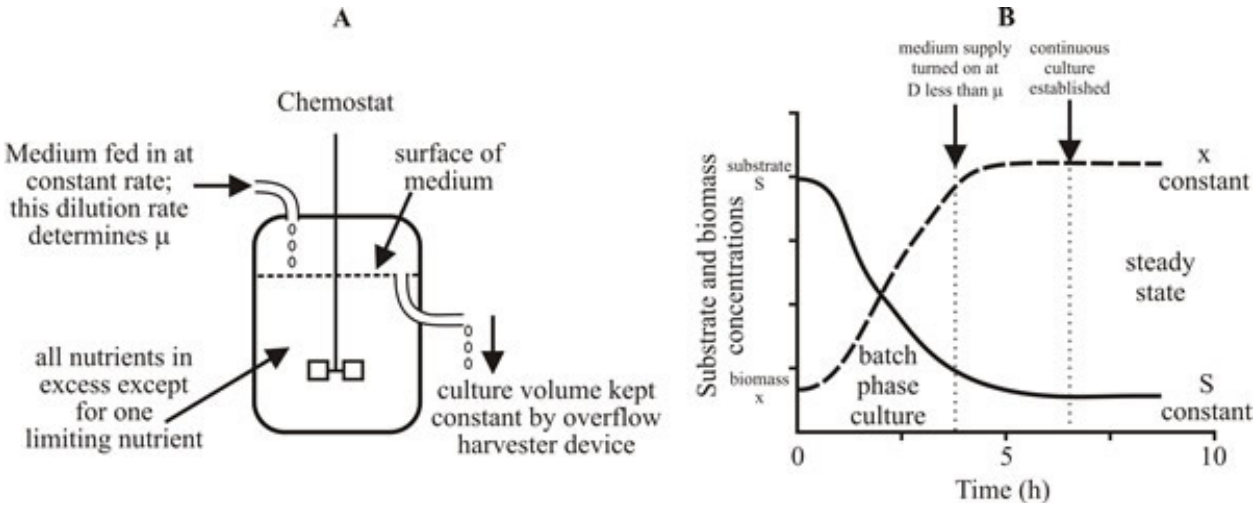

Fig 5 Cultivo Continuo en Quimiostato (*Moore D, Robson DG, Trinci AP. 21st Century Guidebook to Fungi, 2nd Ed. 2018)*

De acuerdo con las características de los sistemas de fermentación disponibles, el batch incrementado (fed batch) parece ser el modelo idóneo para la obtención de levaduras enriquecidas en Se.

Determinación de selenio

Se han empleado diversas técnicas de detección para la determinación del contenido total de selenio. Entre ellas se pueden citar:

- HGAAS (Espectroscopía de Absorción Atómica por Generación de Hidruros) este es un tipo de espectroscopía de fluorescencia atomica para metales como As, Sb y Se en el que estos elementos se vaporizan en hidruros volátiles. Este método ha sido empleado para la determinación de Se en fórmulas infantiles y leche con buenos resultados (Pistón *et al* 2009)
- El ICP-MS (Espectrometría de Masa acoplada Inductivamente) es un tipo de espectrometría de masa capaz de detectar metales y varios no metales en concentraciones tan bajas como $1/10^{15}$ (parte por cuadrillón, ppq). Se alcanza esta sensibilidad ionizando la muestra por medio de plasma acoplado inductivamente y usando después un espectrómetro de masas para separar los

iones y cuantificarlos. Es más rápida, sensible y precisa que la AAS clásica pero introduce muchas especies que interfieren como el argón del plasma, componentes gaseosos del aire etc.

Aun asi, es la técnica de detección más empleada para el análisis de elementos inorgánicos en alimentos por su elevada sensibilidady selectividad (Amman AA 2007).

La producción de levadura enriquecida en selenio puede llevarse a cabo a partir de numerosos sustratos azucarados entre ellos el lactosuero producido durante la fabricación de quesos por lo que este sustrato puede ser un elemento de importancia en la lucha contra esta enfermedad.

Conclusiones

El metabolismo del selenio en las células de levadura es un proceso extremadamente complejo. Es preciso un análisis más exhaustivo de las formas y las transformaciones de los compuestos selenados para una mejor comprensión de su acumulación. El camino de éstos en la célula transita por la reducción continuada hasta llegar a selenuro que es el punto de partida para su incorporación en las proteínas en forma de selenometionina y selenocisteína. La formación de éstos dependerá de la demanda para ser empleado o de lo contrario existe la posibilidad que parte se elimine por medio de formas metiladas.

No obstante, la obtención de levaduras enriquecidas en selenio para usarlas tal cual o en la producción de materiales proteínicos y minerales para ser suplementados en la dieta y superar deficiencias metabólicas de éste elemento esencial.

Referencias

1. Ammann AA. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *J. Mass Spectrom* 2007. 42: 419 – 427
2. Bruyn GW: Huntington's chorea: historical, clinical and laboratory synopsis. In *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 6. Edited by: Vinken PJ, Bruyn GW. Elsevier Amsterdam; 1968:298-378.
3. Demirci A, Pometto AL 3rd, Cox DJ: Enhanced organically bound selenium yeast production by fed-batch fermentation *J Agric Food Chem.*1999, 47(6):2496-500.
4. Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE. Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Sign* 2011; 14: 1337-83.
5. Fengxue X, Min J Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 2019 207-232
6. Huntington's disease collaborative research group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993, 72:971-983.
7. Ingledew, WM: Yeasts for production of fuel ethanol In, *The Yeasts*, 2nd ed., vol. 5, A. H. Rose and J. S. Harrison, Eds. pp. 245–291. London: Academic Press *1993*.
8. Johri A, Beal MF. Antioxidants in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May1822 (5):664-74.
9. Kieliszek M, Blazejak S, Wrobel AB. Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells. *Mol Biol Report* 2019, 46:1797-1008
10. Klis, FM, Mol, P, Hellingwerf, K, Brul, S: Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae FEMS Microbiol Reviews* 2002, 26 (3), 239–256
11. Kordialik-Bogacka, E: Surface properties of yeast cells during heavy metal biosorption *Central Eur J Chem* 2011, 9 (2):348-351
12. Kovtun, IV, Liu, Y, Bjoras, M, Klungland, A, Wilson, SH, McMurray, CT: OGG1 initiate age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* 2007, 447:447-452
13. Levin, HL, Moran, JV: Dynamics interactions between transposable elements and their hosts: *Nature Rev Genetics* 2011 DOI:10.1038/nrg3030
14. Lin, MT and Beal, MF Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases *Nature* 2006 443, 787–795

15. Marinescu G, Teodofoff T, Stoicescu AG: Industrial nutrient medium use for yeast selenium preparation *Food Technology* 2011, 35 (1) 45-53
16. Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions Molecules 2013, 18: 3292-3311
17. Moore D, Robson DG, Trinci AP. 21st Century Guidebook to Fungi, 2nd Ed. 2018
18. Nisamedtinov I: Selenium yeast production: a fully controlled fermentation process Lallemand's International Selenium Yeast seminar (Grenaa, Denmark, 2007)
19. Olas B, Saluk-Juszczak J, Pawlaczyk I, Nowak P, Kolodziejczyk J, Gancarz R, Wachowicz B: Antioxidant and antiaggregatory effects of an extract from *Conyza canadensis* on blood platelets in vitro. *Platelets* 2006 17(6):354-60.
20. Pistón M, Silva J, Pérez-Zambra R, Knochen M. Determination of total selenium by multicommutated-flowhydride generation atomic absorption spectrometry. Application to cow's milk and infant formulae. *Anal. Methods*, 2009, 1: 139-143
21. Ponce de León CA, Bayón MM, Paquin C, Caruso JAJ: Selenium incorporation into *S. cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods *Appl Microbiol* 2002, 92(4):602-10.
22. Rosen BP, Liu Z: Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview *Environ Int.* 2009, 35(3):512-5.
23. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental, 2007. Santa Fe. Cengage Learning (6ª ED.).
24. Walker, FO: Huntington's disease, *The Lancet* 2007, 369 (9557), 218–228,.
25. Wang Z, Zhang L, Tan T: High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GS2 for selenium-enriched yeast production *Korean Journal of Chemical Engineering* 2010, 27 (6): 1836–1840
26. Warby, SC, Visscher, H, Collins, JA: HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *Eur J Human Genetics* 2011, 19 (5); 561–566
27. Yin Y, Wang RR, Wang Y, Wang JJ, Xu GX: Preparation of Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* and its effect on tumor growth and immune function of tumor-bearing mice *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014, 15 (3681-86), 2014
28. Xin F, Jiang M. Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering *Current Dev Biotechnol Bioeng*, 2019:207-232
29. Yoshinaga M, How S, Blanco D, Murdoch IS, Grudny M, Powers SL, Molina N, Rosen BP, Welch AZ: Directed evolution of *S. cerevisiae* for increased selenium accumulation *Microorganisms* 2018, 6, 81