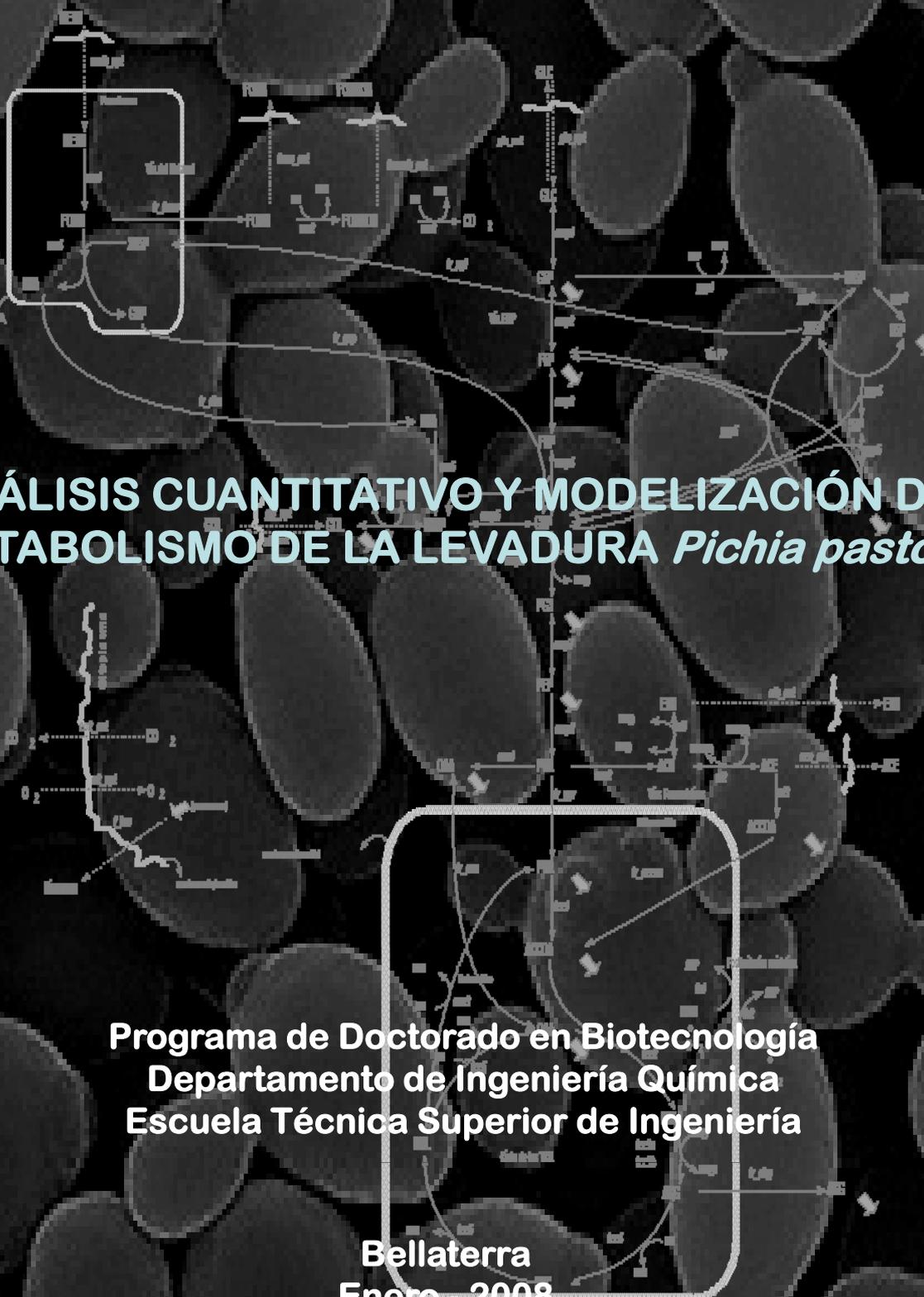


SÉRGIO SANTOS DE JESUS
Tesis Doctoral



**ANÁLISIS CUANTITATIVO Y MODELIZACIÓN DEL
METABOLISMO DE LA LEVADURA *Pichia pastoris***

Programa de Doctorado en Biotecnología
Departamento de Ingeniería Química
Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Bellaterra
Enero – 2008

ANÁLISIS CUANTITATIVO Y MODELIZACIÓN DEL METABOLISMO
DE LA LEVADURA *Pichia pastoris*

Memoria presentada por Sérgio Santos de Jesus para optar al
grado de Doctor en Biotecnología



Universidad Aut3noma de Barcelona
Bellaterra, Enero de 2008

DR. PAU FERRER I ALEGRE
INVESTIGADOR RAMÓN Y CAJAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

y

DR. JOAN ALBIOL SALA
PROFESSOR DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

CERTIFICAN:

Que Sérgio Santos de Jesus, licenciado en Química, ha finalizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona, el trabajo que lleva por título **Análisis cuantitativo y modelización del metabolismo de la levadura *Pichia pastoris***, expuesto en la presente memoria que constituye su tesis, para optar el grado de Doctor en Biotecnología.

Y para que conste a los efectos oportunos, presentamos a la Escuela de Pos-grado y a la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Barcelona el trabajo citado firmado el presente certificado.

Dr. Pau Ferrer i Alegre

Dr. Joan Albiol i Sala

Bellaterra, enero de 2008.

Índice

AGRADECIMIENTOS	ix
LISTA DE METABOLITOS	xi
RESUMEN	xv
SUMMARY	xviii
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES	01
I.1 <i>Pichia pastoris</i>	17
II.1.1 Aplicaciones industriales y en Investigación básica	19
I.2 Metabolismo Intermediario (o Central) de <i>P. pastoris</i>	24
I.2.1 Glucólisis	29
I.2.2 Gluconeogénesis	31
I.2.3 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	32
I.2.4 Ciclo del glioxilato	37
I.2.5 Vía de las pentosas fosfato	38
I.2.6 Asimilación y formación de glicerol	40
I.2.7 Metabolismo del metanol	41
I.2.7.1 Ruta disimilatoria del metanol	43
I.2.7.2 Vía asimilatoria del metanol	47
I.2.8 Fosforilación oxidativa	48
I.2.9 Biosíntesis de aminoácidos	53
I.3 Objetivos	57
II. MATERIALES Y MÉTODOS	61
II.1 Materiales	61

II.1.1 Microorganismo	61
II.2 Métodos	62
II.2.1 Métodos experimentales	62
II.2.1.1 Fermentación	62
II.2.1.2 Análisis químicos	63
II.2.1.2.1 Determinación de la masa molecular	63
II.2.1.2.2 Determinación de proteína total	64
II.2.1.2.3 Determinación de carbohidratos	64
II.2.1.2.4 Determinación de ácidos nucleicos (DNA y RNA)	65
II.2.1.2.4.1 Determinación del contenido de DNA	65
II.2.1.2.4.2 Determinación del contenido de RNA	66
II.2.1.2.5 Determinación de lípidos totales	67
II.2.1.2.6 Análisis de los aminoácidos proteinogénicos por espectrometría de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (2D-RMN)	67
II.2.1.2.7 Análisis de metabolitos intermediarios y aminoácidos libres por cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	68
II.2.1.2.8 Análisis de ¹³ CO ₂	70
II.2.2 Métodos computacionales	71
II.2.2.1 Matlab	71
III. ANÁLISIS Y RECONCILIACIÓN ESTADÍSTICA DE DATOS EXPERIMENTALES	75
III.1 Introducción	75
III.1.1 Reconciliación estadística de la composición elemental y molecular de la biomasa	77
III.1.1.1 Relación entre datos experimentales	78
III.1.2 Reconciliación estadística de datos experimentales de substratos y productos	81
III.1.2.1 Análisis del error utilizando balance del grado de reductancia ...	83
III.1.3 Análisis estadística de valores anómalos (Test Q de Dixon)	85
III.2 Análisis y reconciliación estadística de datos experimentales de la composición elemental y molecular de la biomasa	87

III.2.1 Metodología de cálculo	87
III.2.2 Resultados y Discusión	89
III.3 Análisis y reconciliación estadística de sustratos y productos	103
III.3.1 Metodología de cálculo	104
III.3.2 Resultados y Discusión	106
III.3.2.1 Reconciliación de datos experimentales por balance elemental ..	113
III.3.2.2 Reconciliación de datos experimentales por balance por grado de reductancia	115
IV. ANÁLISIS CLÁSICA DE FLUJOS METABÓLICOS	121
IV.1 Introducción	121
IV.1.1 Modelización matemática	124
IV.1.1.1 Sistemas metabólicos determinados	126
IV.1.1.2 Sistemas metabólicos sobredeterminados	128
IV.1.1.3 Sistemas metabólicos indeterminados	132
IV.1.1.4 Análisis de sensibilidad paramétrica	133
IV.1.1.4.1 Análisis de sensibilidad de los flujos metabólicos calculados	135
IV.2 Construcción del modelo de red metabólica	137
IV.2.1 Compartimentalización del piruvato	141
IV.2.2 Compartimentalización del acetil coenzima A	142
IV.2.3 Enzima málico	143
IV.2.4 Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA)	144
IV.2.5 Ciclo del glioxilato	145
IV.2.6 Ecuaciones bioquímicas	145
IV.3 Análisis de flujos metabólicos	150
IV.3.1 Metodología de cálculo	150
IV.3.2 Análisis de flujos metabólicos de <i>P. pastoris</i> creciendo en sustratos únicos o mixtos	156
IV.3.2.1 Análisis comparativo de los cuocientes de flujos metabólicos calculados con los medidos	158
V. ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS BASADOS EN DATOS OBTENIDOS A PARTIR DE EXPERIMENTOS DE MARCAJE ISOTÓPICO CON ¹³C	179

V.1 Introducción	180
V.1.1 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear	181
V.1.2 Espectrometría de Masas	188
V.1.3 Análisis de vías metabólicas mediante marcaje isotópico de carbono	192
V.1.3.1 Experimentos con marcaje isotópico de carbono	194
V.2 Análisis de flujos metabólicos con restricciones de ¹³C-RMN	200
V.2.1 Modificaciones en la red metabólica	200
V.2.2 Metodología de cálculo	203
V.2.3 Análisis de flujos metabólicos	205
V.2.3.1 Análisis de flujos metabólicos en cultivos operados con glucosa	207
V.2.3.2 Análisis de flujos metabólicos en células de <i>P. pastoris</i> creciendo en glicerol o mezclas de glicerol/metanol	211
V.2.3.2.1 Análisis de flujos metabólicos en cultivos operados con glicerol y mezclas de glicerol/metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$	211
V.2.3.2.2 Análisis de flujos metabólicos en cultivos operados con glicerol y mezclas de glicerol/metanol a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$	218
V.3 Análisis de flujos metabólicos usando datos derivados de marcaje isotópico con ¹³C y LC-MS/MS	225
V.3.1 Metodología para el análisis de flujos metabólicos basado en ¹³ C, modelización matemática	227
V.3.1.1 Notación	227
V.3.1.2 Modelización matemática	228
V.3.1.2.1 Ecuaciones de balance para el metabolito	233
V.3.1.2.2 Ecuaciones de balance para la composición isotopomérica	236
V.3.1.2.3 Determinación explícita de flujos	238
V.3.1.2.4 Reacciones de intercambio	238
V.3.1.2.5 Ecuaciones de medidas experimentales	240
V.3.1.2.6 Estimación de flujos	240
V.3.1.2.7 Análisis estadística	242
V.3.1.2.8 Simulación de experimentos con marcaje isotópico de ¹³ C	243
V.3.2 Estudio Experimental	245
V.3.2.1 Metodología computacional y construcción y modificaciones de la	

red metabólica	246
V.3.2.1.1 <i>13C-Flux</i>	246
V.3.2.1.1.1 Interfaz de la hoja de cálculo	246
V.3.2.1.1.2 Arquitectura del software	247
V.3.2.1.2 Red metabólica	250
V.3.2.1.3 Metodología de computacional	253
V.3.2.1.3.1 Creación del archivo de entrada	253
V.3.2.1.3.2 Verificación del archivo de entrada	257
V.3.2.1.3.3 Estrategia de marcaje y simulación	257
V.3.2.2 Resultados experimentales y computacional	259
V.3.2.2.1 Selección & optimización del sustrato (Estrategia de marcaje)	259
V.3.2.2.2 Cultivos en quimiostato y experimentos de marcaje	261
V.3.2.2.2.1 Toma de muestras del quimiostato y análisis de parámetros fisiológicos clásicos	262
V.3.2.2.3 Análisis por LC-MS/MS	262
V.3.2.2.3.1 Determinación de la concentración celular de cofactores	262
V.3.2.2.3.2 Determinación y cuantificación de metabolitos del metabolismo central	265
V.3.2.2.3.3 Determinación y cuantificación de aminoácidos libres	269
V.3.2.2.4 Análisis de flujos metabólicos	271
V.3.2.2.4.1 Análisis de flujos metabólicos mediante datos de espectrometría de masas	271
V.3.2.2.4.2 Análisis de flujos metabólicos mediante datos de RMN	282
VI. ANÁLISIS DE MÓDULOS ELEMENTALES	290
VI.1 Introducción	290
VI.1.1 Modelización matemática	292
VI.1.1.1 Definiciones y propiedades matemáticas de los módulos elementales	294
VI.1.2 Vías extremas	297

VI.1.2.1 Descripción matemática	301
VI.1.2.2 Comparación entre módulos elementales y vías extremas	302
VI.1.3 Cálculo de flujos en los módulos elementales	305
VI.1.4 α -spectrum	308
VI.1.4.1 Intervalo aproximado de un α -spectrum para módulos elementales	311
VI.1.4.2 Cálculo de flujos no medidos: aproximaciones del espectro de flujos (flux-spectrum)	314
VI.2 Estudio Experimental	317
VI.2.1 FluxAnalyzer	317
VI.2.2 Metodología de cálculo	318
VI.2.3 Análisis estructural	319
VI.2.4 Cálculo de flujos asociados a los módulos elementales	322
VI.2.5 Cálculo de flujos asociados a los módulos elementales incluyendo restricciones de ^{13}C	324
VI.2.5.1 Expresión de la contribución de cada módulo al vector de flujos ...	326
VI.2.5.2 Inclusión de la información de las relaciones entre flujos (cuocientes de flujos) en el cálculo de los flujos y distribución de flujos para el cultivo operado con glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$	327
VI.2.5.3 Aplicación del método de cálculo de flujos metabólicos a través de los módulos elementales a cultivos con glicerol y mezclas glicerol/metanol como fuente de carbono	339
VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	349
VII.1 Conclusiones finales	349
VII.2 Sugerencias para trabajos futuros	353
VIII. BIBLIOGRAFÍA	355
A. ANEXOS	375
A.I Datos de composición de la biomasa para <i>Pichia pastoris</i> crecida en glucosa .	375
A.II Reacciones bioquímicas	378
A.II.1 Reacciones utilizadas en la red metabólica para MFA	378
A.II.1.1 Ecuaciones de biosíntesis de aminoácidos	383
A.II.2 Reacciones utilizadas en la red metabólica para MFA con restricciones	

derivadas de ^{13}C -RMN	388
A.II.3 Reacciones utilizadas en la red metabólica para simulación y optimización de ^{13}C -MFA con el programa <i>^{13}C-Flux</i>	391
A.III Flujos metabólicos	395
A.III.1 Flujos metabólicos obtenidos por MFA clásico	395
A.III.2 Flujos metabólicos obtenidos mediante restricciones derivadas de ^{13}C -RMN	401
A.III.3 Flujos metabólicos obtenidos por simulación y optimización mediante ^{13}C -MFA	407
A.III.3.1 Usando datos experimentales obtenidos por LC-MS/MS	407
A.III.3.2 Usando datos experimentales obtenidos por ^{13}C -RMN (análisis de flujos metabólicos con restricciones derivadas de ^{13}C -RMN) .	409
A.III.4 Flujos metabólicos obtenidos mediante el análisis de módulos elementales	410
A.IV Abundancias relativas de metabolitos y aminoácidos por espectrometría de masas, para el cultivo operado con glicerol a $\mu= 0,05 \text{ h}^{-1}$	414
A.IV.1 Abundancias relativas para los metabolitos del metabolismo central	414
A.IV.2 Abundancias relativas para los aminoácidos	417
A.V Abundancias relativas de los fragmentos C2 y C3 intactos de aminoácidos proteinogénicos para el cultivo operado con glicerol a $\mu= 0,05 \text{ h}^{-1}$	418
R. RUTINAS	421
R.1 Reconciliación estadística de la composición elemental y de la biomasa	421
R.2 Reconciliación estadística de sustratos y productos por balance elemental y por grados de reductancia	422
R.3 Cálculo de flujos metabólicos utilizando la metodología clásica de MFA y cálculo de las desviaciones estándar	423
R.4 Cálculo de flujos metabólicos con restricciones de ^{13}C-RMN y cálculo de las desviaciones estándar	424
R.5 Cálculo de flujos metabólicos mediante el análisis de módulos elementales ...	429
R.6 Hoja de cálculo para simulación y optimización utilizando el software <i>^{13}C-Flux</i>	442
T. TABLAS	451

Agradecimientos

La presente tesis doctoral no hubiera podido ser realizada sin la ayuda de muchas personas, a todas ellas quiero expresarles la fortuna que he tenido de trabajar y compartir con vosotros, estoy muy agradecido por la ayuda, aprecio, amistad y solidaridad recibida.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Pau Ferrer y al Dr. Joan Albiol, quienes aceptaron ser mis directores de tesis y de quien he recibido amistad, confianza, conocimientos y toda su ayuda para llevar a feliz término esta tesis doctoral, además por la paciencia y dedicación.

También quiero agradecer a todos los compañeros del Departamento de Ingeniería Química, a mis compañeros de despacho, en especial Nilbia Ruiz, Gladys Tapia, Luis Vidal y las secretarias Natividad y Montserrat.

Hay gente que no ha estado en mi despacho, pero si que han estado en mis días, mis recuerdos y en mi vida diaria. Me refiero a toda mi familia, en especial a mi madre y mis hermanos, quienes seguro habrían contribuido más. No puedo dejar de agradecer a mis amigos que fueron fundamentales para mi durante los años de estudios en la ciudad de Barcelona, muchos que pasaran y muchos que aún hacen parte de mi vida y que siempre estarán en mi corazón, en este grupo destaco principalmente Aline, Anderson y Giva, además David, Nilbia, Gladys, Fábio, Jon, Roger, Dani, Laura, Miriam, Elvis, Kenya, Lorena y Allan.

Gustaría de agradecer también mis amigos que mismo distante me incentivarán en mis estudios y en momentos difíciles. Me refiero a todos mis amigos de Brasil, principalmente de Rio de Janeiro y São Paulo, y a muchos

profesores de las universidades UFRJ y Unicamp que aún mantengo contacto.

Finalmente, a la Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil) proc. 173601/9 por la beca doctoral y también la beca concedida a través del profesor Dr. Pau Ferrer referente al proyecto de investigación CTQ2004-00300 y Bio2005 -23733-E (CICyT/España).

Lista de metabolitos

<i>m</i>	<i>Abreviación</i>	<i>Metabolito</i>
1	ACCOA _{cyt}	Acetil-CoA, citosólico
2	ACCOA _{mit}	Acetil-CoA, mitocondrial
3	ACD _{cyt}	Acetaldehído, citosólico
4	ACE _{cyt}	Acetato, citosólico
5	ACE (E)	Acetato, extracelular
6	ACO	Aconitato
7	ADP	Adenosina-5' difosfato
8	AICAR	1-(5'-fosforibosil)-5-amino-4-imidazolecarboxamida
9	AKG _{cyt}	2-Cetoglutarato, citosólico
10	AKG _{mit}	2-Cetoglutarato, mitocondrial
11	aKI	α -cetoisovalerato
12	ALA	Alanina
13	AMP	Adenosina-5'-monofosfato
14	ARG	Arginina
15	ASN	Asparagina
16	ASP	Aspartato
17	ATP	Adenosina-5'trifosfato
18	BIOM	Biomasa
19	CARP	Carbamoyl fosfato
20	CHOR	Corismato
21	CMPUMP	Citidina-5'-P and Uridina-5'-P
22	CO ₂ (E)	Dióxido de carbono, extracelular
23	iCO ₂	Dióxido de carbono, intracelular
24	CIT _{mit}	Citrato, mitocondrial
25	CYS	Cisteina
26	DHA _{cyt}	Dihidroxiacetona, citosólico
27	DHA _{per}	Dihidroxiacetona, peroxisomal
28	DHAP _{cyt}	Dihidroxiacetona-phosphate, citosólico
29	E4P _{cyt}	Eritrosa-4'-P, citosólico
30	ETH _{cyt}	Etanol, citosólico
31	ETH (E)	Etanol, extracelular
32	FAD	Flavina adenina dinucleótido
33	FADH ₂	Flavina adenina dinucleótido, reducido
34	FAT	Ácidos grasos
35	F6P _{cyt}	Fructosa-6'P, citosólico
36	FBP _{cyt}	Fructosa-1,6'biP, citosólico
37	FORM _{cyt}	Formaldehído, citosólico
38	FORM _{per}	Formaldehído, peroxisomal
39	FORM (E)	Formaldehído, extracelular
40	FORMOH _{cyt}	Formato, citosólico
41	FORMOH (E)	Formato, extracelular
42	FTHF	Tetrahidrofolato
43	FUM _{mit}	Fumarato, mitocondrial
44	G6P _{cyt}	Glucosa-6'-P, citosólico
45	GAP _{cyt}	Gliceraldehído-3'-P, citosólico
46	GAP _{per}	Gliceraldehído-3'-P, peroxisomal
47	GLC _{cyt}	Glucosa, citosólico
48	GLC (E)	Glucosa, extracelular
49	GLN	Glutamina
50	GLU	Glutamato
51	GLY	Glicina

52	GMPAMP	Guanosina-5'P y Adenosina-5'-P
53	GOL _{cyt}	Glicerol, citosólico
54	GOL (E)	Glicerol, extracelular
55	H ₂ S	Sulfeto de hidrógeno
56	HCCOAc _{cyt}	Coenzima-A, citosólico
57	HCCOAm _{mit}	Coenzima-A, mitocondrial
58	HIS	Histidina
59	HSER	Homoserina
60	ICIT _{mit}	Isocitrato, mitocondrial
61	ILE	Isoleucina
62	IMP	Inosina monofosfato
63	LEU	Leucina
64	LYS	Lisina
65	MAL _{mit}	Malato, mitocondrial
66	MANNO	Manosa...
67	MET	Metionina
68	METH _{per}	Metanol, peroxisomal
69	METH (E)	Metanol, extracelular
70	METHF	Metileno tetrahidrofolato
71	MYTHF	5-metiltetrahidrofolato
72	NAD _{cyt}	Nicotinamida adenina dinucleótido, citosólico
73	NAD _{mit}	NAD, mitocondrial
74	NADH _{cyt}	NAD, reducido, citosólico
75	NADH _{mit}	NADH, mitocondrial
76	NADP _{cyt}	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, citosólico
77	NADP _{mit}	NADP, mitocondrial
78	NADPH _{cyt}	NADP, reducido, citosólico
79	NADPH _{mit}	NADPH, mitocondrial
80	NH ₄	Amonio
81	O ₂ (E)	Oxígeno, extracelular
82	iO ₂	Oxígeno, intracelular
83	OAA _{cyt}	Oxaloacetato, citosólico
84	OAA _{mit}	Oxaloacetato, mitocondrial
85	OLE	Oleato
86	PAL	Palmitoleato
87	PEP _{cyt}	Fosfoenol piruvato, citosólico
88	PG3 _{cyt}	3-Fosfoglicerato, citosólico
89	PHE	Fenilalanina
90	Pi	Fósforo inorgánico (ortofosfato)
91	PPi	Pirofosfato
92	PRO	Prolina
93	PROT	Proteína
94	PRPP	5-fosfo-alfa-D-ribosa 1-difosfato
95	PYR _{cyt}	Piruvato, citosólico
96	PYR _{mit}	Piruvato, mitocondrial
97	R5P _{cyt}	Ribosa-5'P, citosólico
98	RNA	Ribonucleico acido
99	RU5P _{cyt}	Ribulosa-5'P, citosólico
100	S7P _{cyt}	Sedoheptulosa-7'P, citosólico
101	SER	Serina
102	SO ₄	Sulfato
103	SUC _{mit}	Succinato, mitocondrial
104	SUCCoA _{mit}	Succinil coenzima A, mitocondrial
105	THF	tretrahidrofolato
106	THR	Treonina

107	TREGLY	Trealosa, glicógeno...
108	TRP	Triptófano
109	TYR	Tirosina
110	VAL	Valina
111	XU5P _{cyt}	Xilulosa-5'-P, citosólico
112	XU5P _{per}	Xilulosa-5'-P, peroxisomal

RESUMEN

El presente trabajo está centrado en el análisis y modelización del metabolismo central de la levadura *Pichia pastoris*. Concretamente, el objetivo de este trabajo consistió en analizar la distribución de flujos en las principales vías metabólicas del metabolismo central de esta levadura mediante distintas aproximaciones experimentales y matemáticas basadas en un modelo metabólico estequiométrico y compartimentalizado. Los datos experimentales fueron obtenidos en su mayor parte del trabajo de tesis de A. Solà (Solà, 2004, tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona), centrado en experimentos de marcaje isotópico con ^{13}C de cultivos de *P. pastoris* operados en quimiostato a $\mu=0,05$ y $0,16 \text{ h}^{-1}$ con diferentes fuentes de carbono (glucosa, glicerol, metanol y mezclas de glicerol/metanol). Los datos fisiológicos experimentalmente obtenidos en dicho estudio se han reconciliado a través de ecuaciones de balances elementales y por grado de reductancia; además, se ha propuesto una ecuación estequiométrica para la formación de biomasa para cada condición de cultivo estudiada. Los datos reconciliados a través de ecuaciones de balances elementales se han usado para el análisis de flujos metabólicos; en primer lugar, se ha utilizado la metodología clásica; los resultados obtenidos en esta primera aproximación se compararon con datos experimentales previamente obtenidos mediante técnicas de marcaje isotópico de ^{13}C por A. Solà. El segundo estudio ha consistido en el cálculo de flujos metabólicos introduciendo restricciones derivadas de cocientes de flujos metabólicos estimados experimentalmente mediante técnicas de ^{13}C -RMN. Dado el reducido número de restricciones derivadas de experimentos de ^{13}C -RMN que se pueden aplicar en este modelo metabólico (3 o 4), en un tercer estudio se ha realizado una primera aproximación a metodologías de simulación y optimización del diseño de

experimentos de marcaje isotópico con el objetivo de implementar un procedimiento experimental que permitiera obtener datos suficientes para determinar con más precisión los flujos a través de determinadas rutas de la red, particularmente los relacionados a la vía de las pentosas fosfato (PP). Concretamente, para explorar esta estrategia se han realizado estudios para la optimización de un experimento de marcaje para un cultivo operado en quimiostato utilizando glicerol como fuente de carbono a $\mu=0,05h^{-1}$; la estrategia de marcaje optimizada se llevó posteriormente a cabo en el laboratorio y se analizó los patrones de marcaje de los principales metabolitos (incluyendo algunos aminoácidos) y aminoácidos proteinogénicos mediante LC-MS/MS y 2D-RMN, respectivamente. Ello ha permitido comparar y combinar datos experimentales obtenidos mediante dos estrategias de análisis para la estimación de flujos metabólicos. Así, globalmente, este trabajo permite concluir que el análisis clásico de flujos metabólicos (MFA) es una herramienta de cálculo que está limitada a redes poco complejas; sin embargo cuando se aplican restricciones derivadas del análisis por ^{13}C -RMN al MFA, se observa que esta metodología de análisis presenta alta sensibilidad para la determinación de distribución de flujos metabólicos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y reacciones de transporte entre el citoplasma y la mitocondria. Por el contrario, utilizando una metodología de ^{13}C -MFA basada en datos derivados de ^{13}C -LC-MS, se observa que este método presenta poca sensibilidad en redes metabólicas compartimentalizadas, pues no permite distinguir los *pools* de metabolitos de un compartimento dado (mitocondria/citoplasma). Sin embargo, este método presenta alta sensibilidad para la determinación de flujos a través de la vía de las PP. Así pues, la combinación de distintas metodologías basadas en datos de experimentos de marcaje isotópico ha permitido mejorar la información sobre el comportamiento del sistema. Finalmente, se ha llevado a cabo un análisis estructural de la red metabólica a través de la metodología del análisis de módulos elementales, así como una primera aproximación para su combinación con el análisis de flujos metabólicos basados en datos de marcaje isotópico con el objetivo de facilitar la interpretación fisiológica de los resultados, es decir, determinar cuales son

las principales vías metabólicas activas bajo un estado fisiológico dado y cual es el flujo a través de dichas rutas.

SUMMARY

This study is focused on the analysis and modelling of the central carbon metabolism of the yeast *Pichia pastoris*. In particular, the major aim of this study was to analyze de flux distribution through the main metabolic pathways of the central metabolism of this yeast by means of different experimental and mathematical approaches, based on a stoichiometric and compartmentalized metabolic model. Experimental data was mostly obtained from previous studies from A. Solà (Solà, 2004, PhD thesis, Universitat Autònoma de Barcelona), describing isotopic labelling experiments with ^{13}C of *P. pastoris* cells growing on chemostat cultures at a growth rate of $\mu=0.05$ and 0.16 h^{-1} , on different carbon sources (glucose, glycerol, methanol and mixtures of glycerol/methanol). The experimental physiological data obtained in A. Solà's study have been reconciliated by means of elementary and grade of reductance balance equations; moreover, a stoichiometric equation for the formation of biomass has been proposed for each of the studied growth condition. The data reconciliated by elementary balance equations have been used for metabolic flux analysis.

First, the classic metabolic flux analysis methodology has been applied; the obtained results in this first approximation were compared with the experimental data previously generated from ^{13}C -labeling experiments by A. Solà.

Second, metabolic fluxes have been calculated introducing a number of restrictions derived from metabolic flux ratios experimentally estimated by ^{13}C -NMR.

Third, given the reduced number of restrictions derived from these experiments that are actually applicable to the defined metabolic model (3 or 4), we performed a first approximation to methodologies for simulation and optimisation of isotopic labeling experiments; the aim of such approach was

to implement an experimental procedure to allow for the generation of labelling data needed for the precise determination of fluxes through some pathways of the network, particularly those related to the pentose phosphate pathway (PPP). In order to explore this strategy, studies for the optimisation of a labelling experiment of cells growing on glycerol in chemostat cultures at a growth rate of 0.05 h^{-1} were performed. The optimised labelling strategy was subsequently implemented in the laboratory; the labelling patterns of the major metabolites (including some amino acids) of the central carbon metabolism and, of the proteinogenic amino acids, were analysed by LC-MS/MS and 2D-NMR, respectively. This allowed us comparing and combining experimental labelling data derived from two analytical strategies for the calculation of metabolic fluxes.

Overall, this study illustrates that classic metabolic flux analysis (MFA) is a mathematical tool limited to networks of low complexity. Nevertheless, when restrictions derived from ^{13}C -NMR analyses are introduced MFA, this methodology shows a high sensitivity for the calculation of the metabolic flux distribution in the tricarboxylic acid cycle (TCA) and transport reactions of TCA intermediates between cytoplasm and mitochondria.

In contrast, by using a ^{13}C -MFA methodology using data derived from ^{13}C -LC-MS, we observe that this method shows low sensitivity for compartmentalized metabolic networks, as it did not allow distinguishing pools of a given metabolite found in different compartments (e.g. mitochondria/cytoplasm). Nevertheless, this method shows high sensitivity for determining fluxes through the PPP.

In summary, the combination of different methodologies based on the use of data obtained from isotopic labelling experiments has allowed us to improve the information on the system's behaviour. In addition, a structural analysis of the metabolic network has been performed using the methodology of elementary modes analysis; moreover, a first approximation to its combination with metabolic flux analysis based on ^{13}C -derived data has been proposed, with the objective to facilitate the physiological interpretation of the results, i.e. to assess which are the major active

pathways under a given physiological state and to calculate the carbon fluxes through these pathways.

CAPÍTULO I

Introducción y Objetivos generales

El rápido avance de técnicas de biología molecular y, principalmente, de la tecnología del DNA recombinante, aumentó mucho el espectro de aplicaciones de varias técnicas analíticas y computacionales, con aplicación en varios sectores de la biotecnología, como por ejemplo, en el mejoramiento de organismos utilizados en la obtención de productos de interés para el ser humano.

En el inicio de la década de noventa, Bailey (1991) publicó un trabajo que introduce el término ingeniería metabólica y la define como una metodología para el mejoramiento de las actividades celulares a través de la manipulación de funciones enzimáticas, de transporte y regulación celular, utilizando la tecnología del DNA recombinante, con el objetivo de obtener un producto específico o el mejoramiento de las propiedades celulares (Gombert, 2001; Shimizu, 2002).

Stephanopoulos *et al.* (1998) definen el término ingeniería metabólica como el mejoramiento dirigido para la formación de producto o de propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o de la introducción de nuevas reacciones haciendo uso de la tecnología del DNA recombinante. La ingeniería metabólica, que comprende

el análisis y las modificaciones dirigidas de funciones celulares (vías metabólicas, etc.), tiene siempre como objetivo final un metabolismo modificado con un determinado propósito. Para que este estudio tenga éxito, es esencial realizar un análisis detallado del metabolismo, utilizando así varias herramientas analíticas y matemáticas, como por ejemplo la medida de las concentraciones de metabolitos y componentes celulares intracelulares, caracterización de proteínas y análisis de vías metabólicas, creando una interfaz entre la ingeniería metabólica y la bioinformática (Tabla I.1), (Ostergaad *et al.*, 2000).

Tabla I.1 Metodologías empleadas en ingeniería metabólica.

<i>Metodologías</i>	<i>Aplicaciones</i>
Análisis de flujos metabólicos (MFA)	Comprensión del estado fisiológico de la célula
Análisis de capacidad celular	Análisis de rendimiento celular
Análisis de flujos metabólicos <i>on-line</i>	Desarrollo de operación y control de bioprocesos
Medidas con RMN, CG-MS y LC-MS combinado con experimentos de marcaje isotópico	Determinación experimental de distribución de flujos
Análisis cinética	Análisis y cambios dinámicos de vías metabólicas
Integración de datos de bioinformática	Comprensión de un sistema celular y modificación cíclica de vías metabólicas

Referencia: Shimizu, 2002.

Para el análisis de vías metabólicas, una de las herramientas más eficientes es el Análisis de Flujos Metabólicos (MFA). El MFA nos ofrece importantes informaciones sobre el funcionamiento del metabolismo de un organismo en una determinada condición y puede ser utilizada, en conjunto con otras herramientas analíticas y matemáticas, para alcanzar los objetivos principales de la ingeniería metabólica (Nielsen, 2003).

Los primeros trabajos que hicieron uso de un modelo estequiométrico para la interpretación de datos cuantitativos para obtener informaciones sobre vías metabólicas, datan de la década de los setenta. Los investigadores de la época eran científicos del área de ingeniería bioquímica y para la elaboración de sus resultados utilizaban técnicas de diagramas de señales

de flujos. Solamente con el trabajo de Holms (1986), el MFA fue introducido como una técnica de análisis del metabolismo y más tarde con el trabajo de Vallino & Stephanopoulos (1990), esta técnica fue sistematizada a través del uso del álgebra lineal y cálculo matricial. En este trabajo, fue descrito un modelo estequiométrico para el metabolismo de la bacteria *Corynebacterium glutamicum* productora del aminoácido lisina. El modelo propuesto tuvo como objetivo calcular los flujos intracelulares a través de la cuantificación del consumo de sustrato del medio de cultivo, de la secreción de productos de la célula, y de la tasa de crecimiento celular, es decir los flujos hacia dentro y hacia fuera de las células (Gombert, 2001, Shimizu, 2002). Sin embargo, la metodología clásica del análisis estequiométrico de flujos metabólicos, desarrollada por Vallino & Stephanopoulos (1990), está intrínsecamente limitado en su capacidad para obtener nuevas conclusiones sobre la operación de la red intracelular debido a que los resultados están fuertemente basados en supuestos/hipótesis y no en datos obtenidos experimentalmente (Sauer, 2006).

Para cuantificar experimentalmente la actividad de una ruta metabólica, se requiere obtener información adicional a partir de experimentos de marcaje con isótopos estables. Usualmente, los sustratos marcados isotópicamente con átomos de ^{13}C son suministrados a una población de células en crecimiento hasta que el marcaje isotópico con ^{13}C es distribuido a lo largo de la red metabólica. En función de una distribución dada de flujos en un organismo, se presentan patrones de marcaje específicos en los metabolitos intermediarios, los cuales pueden ser cuantificados por diversas técnicas, como la RMN, CG-MS y LC-MS (Sauer, 2006). La utilización de datos provenientes del marcaje isotópico de ^{13}C presenta como principal ventaja frente al análisis clásico de flujos metabólicos la disminución de soluciones matemáticas a través del aumento de restricciones impuestas al sistema en estudio, lo que nos proporciona una descripción más exacta de la distribución de flujos de un determinado microorganismo en estudio. Además, los flujos calculados están basados directamente en datos experimentales provenientes de los datos de marcaje

de los metabolitos internos, por lo que no es necesario el conocimiento de la estequiometría de los cofactores (NADH, NADPH y ATP) en las reacciones bioquímicas en los que intervienen.

Los primeros estudios que hicieron uso de elementos marcados isotópicamente datan de los años ochenta; no obstante, en dichos estudios se utilizó ^{14}C para la determinación cuantitativa de flujos metabólicos. No fue hasta 1988 que Malloy y colaboradores (Malloy *et al.*, 1988) utilizaron la técnica de marcaje isotópico basada en ^{13}C para la investigación de la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en corazón de ratas. En este estudio sólo se cuantificó el glutamato a través de la técnica de espectrometría de resonancia magnética nuclear (^{13}C -RMN); debido a las limitaciones analíticas, este método fue considerado como rudimentario. En 1995, Zupke & Stephanopoulos (citado en Wiechert, 2001) obtuvieron la distribución de flujos metabólicos en hibridomas basados en métodos matemáticos a través del análisis de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN. Estudios llevados a cabo por Sauer (Sauer *et al.*, 1997) para la producción de riboflavina por *Bacillus subtilis*, utilizaron por la primera vez la técnica de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 2D COSY-RMN para la determinación de flujos metabólicos; sin embargo, en este trabajo no se consideró la modelización matemática del metabolismo es estudio (Wiechert, 2001). La utilización de la espectrometría de masas para la determinación y cuantificación del metabolismo celular utilizando átomos marcados isotópicamente, fue desarrollada más recientemente; en concreto, el primer trabajo data de 1999, cuando Park (Park *et al.*, 1999 citado en Wiechert, 2001) investigó la distribución de flujos metabólicos en las vías anapleróticas de *Corynebacterium glutamicum*. Cabe destacar que en este trabajo los flujos fueron determinados mediante un modelamiento no sistemático. Cabe destacar también algunos trabajos realizados a lo largo de los años noventa para la cuantificación de metabolitos del metabolismo central: los más relevantes fueron los trabajos realizados por Szyperski (1995) y Christensen & Nielsen (1999). Estos estudios se basan en la cuantificación indirecta de los patrones de marcaje de metabolitos intracelulares a través del análisis de los esqueletos de carbono de los

aminoácidos que tienen sus orígenes en los metabolitos de las vías metabólicas centrales. Cabe destacar que Szyperski (1995) utilizó la técnica de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN y Christensen & Nielsen (1999) la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-MS) para la cuantificación de patrones de marcaje en los aminoácidos proteínogénicos.

Más recientemente, el uso de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, ha mostrado su potencial para ser aplicada en la cuantificación de metabolitos del metabolismo intermediario y el posterior análisis de flujos metabólicos (de Graaf *et al.*, 2000 citado en Wiechert, 2001). Otra técnica prometedora descrita en Wittmann & Heinzle (2001) (citado en Wiechert, 2001) es la utilización del MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry); estos autores utilizaron esta técnica para la cuantificación de lisina de *C. glutamicum*.

El desarrollo de un modelo matemático que describe las propiedades dinámicas de sistemas con marcaje isotópicas fue descrito por primera vez por Wiechert & Wurzel en 2000 (citado en Wiechert, 2001); en este trabajo se desarrolló una red basada en datos de marcaje de ^{13}C , que fue resuelta a través de algoritmos computacionales. En el año de 2001, Wiechert y colaboradores (Wiechert *et al.*, 2001) desarrollaron el software *^{13}C -Flux*, el cual es capaz de simular y optimizar experimentos con átomos de carbono marcados isotópicamente a través de datos provenientes del análisis por espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear. También cabe destacar el software *FiatFlux*, desarrollado por Zamboni *et al.* (2005), el cual utiliza datos de marcaje de ^{13}C provenientes del análisis por CG-MS de aminoácidos proteínogénicos.

En síntesis, la distribución de flujo en la red metabólica puede ser determinada a través de dos metodologías distintas:

La primera metodología, desarrollada por Wiechert (Wiechert, 2001) consiste en el ajuste iterativo a través de los datos medidos; la diferencia entre los espectros de isótopos observados y simulados es minimizada, este procedimiento tiene como objetivo ajustar los parámetros, donde la relación

entre los flujos desconocidos y los datos medidos son descritos por modelos matemáticos de complejidad variada. En principio, la cuantificación de metabolitos intracelulares libres nos podría proporcionar información que nos permitiría determinar la distribución de flujos más allá del metabolismo central, así como también determinar cambios dinámicos de flujos. No obstante, actualmente, el análisis de flujos metabólicos basado en ^{13}C (^{13}C -MFA) está restringido a 50-100 reacciones del metabolismo central (Sauer, 2006) debido a las limitaciones analíticas. Las concentraciones de metabolitos son relativamente bajas, su naturaleza química diversa, y sus tasas de renovación son altas, en un rango de segundos. Sin embargo, actualmente se están desarrollando algunos métodos prometedores (van Winden *et al.*, 2005; Wiechert & Nöh, 2005; Nöh *et al.*, 2006).

Otro método de análisis, usado más frecuentemente, se basa en una interpretación directa y local de los patrones de marcaje seleccionados, por ejemplo, la distribución del piruvato o de su derivado, la alanina (Figura I.1(b)). Para este propósito, una ecuación probabilística es descrita para cuantificar la contribución relativa de las vías convergentes para la formación de un metabolito en particular (un cociente de flujo) a través de la combinación particular de RMN o patrones de masa (Szyperski, 1995; Fischer & Sauer, 2003). En los estudios del metabolismo de *P. pastoris* realizados previamente por A. Solà (Solà, 2004), se determinaron cocientes de flujos metabólicos para distintas condiciones de cultivo usando ésta metodología.

Debido a que el esqueleto formado por los átomos de carbono de los ocho intermedios dominantes se conservan en los aminoácidos, y que la proteína es estable y una fuente abundante de información de marcaje, esta metodología permite la determinación de flujos metabólicos en el metabolismo central en estado estacionario del crecimiento celular, utilizando cantidades pequeñas de células (a partir de 2 mg, en peso seco) (Szyperski, 1995; Marx *et al.*, 1996; Fischer & Sauer, 2003; Grotkjaer *et al.*, 2004, citados en Sauer, 2006).

Para la determinación de flujos metabólicos a lo largo de la red metabólica en estudio, inicialmente los datos de ^{13}C , los flujos extracelulares y los datos de biosíntesis son integrados simultáneamente en un modelo (Figura I.1(a)). Mientras que el primer método deduce indirectamente los valores absolutos de flujos a través de la red, el método de cocientes de flujos proporciona directamente la actividad relativa de una dada reacción *in vivo* (Figura I.1(a)). Sin embargo, la desventaja de este método analítico es la limitación del número de restricciones que están en la orden de 10-15 flujos preseleccionados que son sacados directamente de los datos experimentales; estas aproximaciones complementarias son aplicadas al mismo conjunto de datos de ^{13}C (Emmerling *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004 citados en Sauer, 2006).

El análisis de flujos metabólicos con restricciones derivadas de cocientes de flujos (Fischer *et al.*, 2004; Fischer & Sauer, 2005), permite obtener datos de flujos a través de patrones de marcaje proveniente de las restricciones derivadas de datos de ^{13}C obtenidas tanto a través de técnicas de RMN (Marx *et al.*, 1996; Sauer *et al.*, 1997; Portais & Delort, 2002, citados en Sauer, 2006) como de MS (Gombert *et al.*, 2001; Fischer & Sauer, 2003; Klapa *et al.*, 2003).

La Tabla I.2 presenta la gran diversidad de sistemas biológicos investigados, lo que ilustra el amplio espectro y los potenciales de aplicación del análisis de flujos metabólicos.

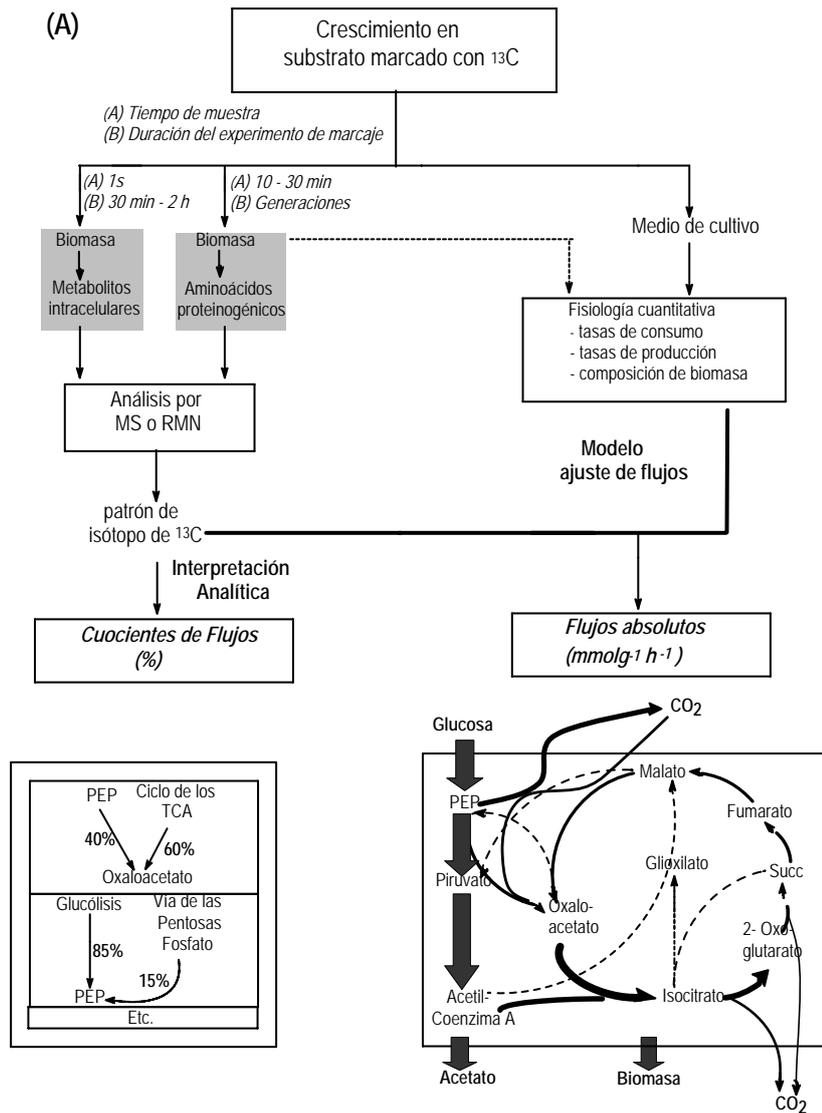


Figura I.1 (a) Diagrama esquemático de los principales pasos para la cuantificación y determinación de flujos a través de la metodología del ^{13}C -MFA. Los resultados se expresan en cocientes de flujos y flujos absolutos.

Referencia: Sauer, 2006.

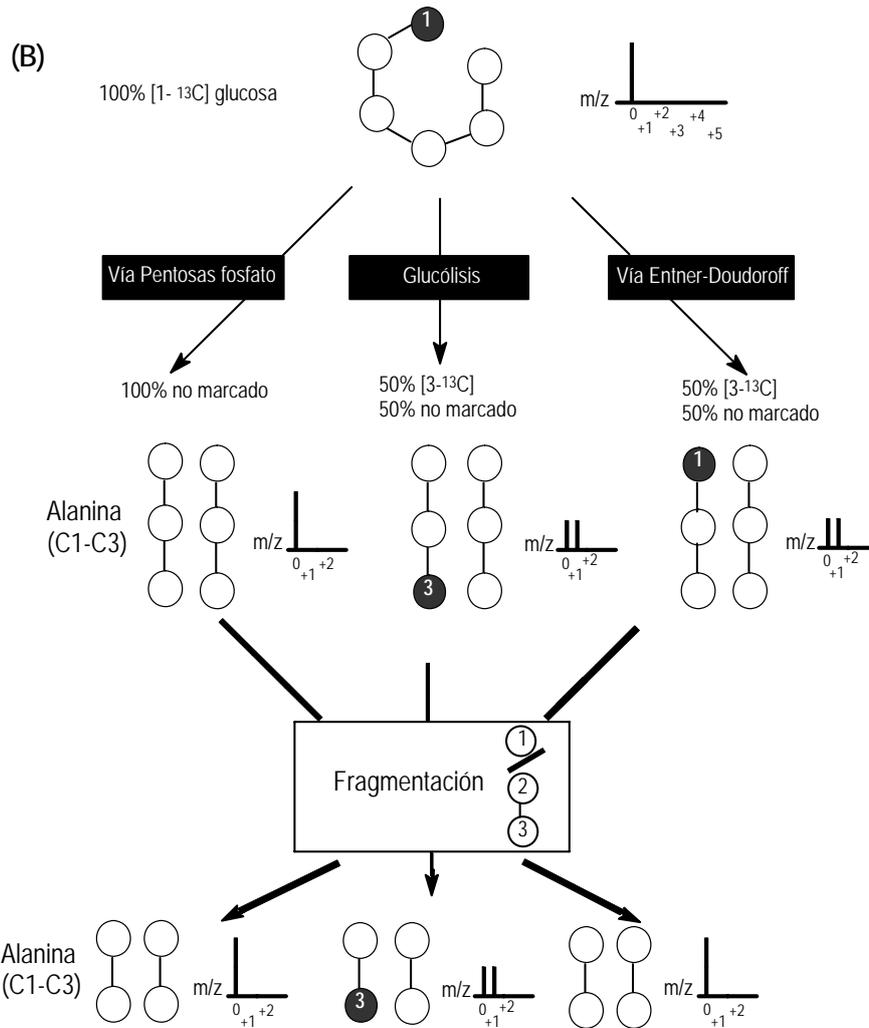


Figura I.1 (b) Ejemplo aplicado al catabolismo de la glucosa en *E. coli* a partir de datos de MS. El substrato es [1-¹³C] glucosa, y el patrón de ¹³C es determinado en la alanina. Los cocientes de flujos son determinados a través de la contribución relativa de estas vías para la formación de la alanina (que proviene del piruvato) y se calcula directamente a partir de las abundancias relativas de los diferentes isómeros de masa isotópica a través de ecuaciones probabilísticas. Los flujos absolutos son obtenidos a través del mejor ajuste de los flujos, la solución se obtiene a partir de cálculos de minimización de errores entre los flujos fijados y las tasas de consumo de substratos y producción de productos y biomasa.

Referencia: Sauer, 2006.

Tabla I.2 Ejemplos recientes de aplicaciones del Análisis de Flujos Metabólicos.

Sistema Investigado	Tipo de análisis	Principales resultados de análisis	Referencia
Producción de proteasas alcalinas por <i>Bacillus licheniformis</i> .	MFA + programación lineal	Diseño de una estrategia de transferencia de oxígeno en bioreactor para la producción de proteasas alcalinas.	Çalik <i>et al.</i> (1999)
Fermentación de <i>Zymomonas mobilis</i> salvaje y recombinante en glucosa, fructosa y xilosa.	MFA + experimentos de marcaje, análisis por $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ -RMN	Síntesis de R5P ocurre principalmente por la reacción catalizada por la enzima transcetolasa. Evidencias para la operación reversible de las enzimas R5P isomerasa, fosfoglucoisomerasa y RU5P epimerasa. Identificación de la actividad de la enzima xiluloquinasa como la etapa controladora de la velocidad de producción de etanol en <i>Z. mobilis</i> recombinante.	de Graaf <i>et al.</i> (1999)
MFA aplicado a la levadura <i>S. cerevisiae</i> y algunos mutantes interrumpidos en genes que codifican proteínas reguladoras involucradas en el fenómeno de la represión por la glucosa.	MFA + experimentos de marcaje, análisis por CG-MS	Se observó que el ciclo de los TCA opera de forma cíclica en células crecidas bajo condiciones respiratorias y de forma no cíclica en células que presentan metabolismo respiro-fermentativo. En condiciones respiratorias, la mayor parte de la glucosa consumida es desviada para la vía de las PP. La biosíntesis de la glicina es catalizada por la de la enzima treonina aldolasa. También se verificó que el enzima málico esta activa en las dos condiciones de cultivo.	Gombert <i>et al.</i> (2001)
Fermentación con la bacteria <i>C. glutamicum</i> con el objetivo de determinar la distribución de flujos en el metabolismo central para la producción de lisina.	MFA + experimentos de marcaje, análisis por MALDI-TOF-MS	Los flujos metabólicos fueron calculados a partir de datos estequiométricos y de datos de cocientes de intensidades de masas para la lisina, alanina y treonina a través de MALDI-TOF-MS utilizando [1- ^{13}C]-glucosa y mezclas de [$^{13}\text{C}_6/^{12}\text{C}_6$]-glucosa. Se verificó que durante la fase máxima de producción de lisina, un 71% de la glucosa es convertida a pentosas. La metodología propuesta en este trabajo presentó como principal ventaja la cuantificación de productos con baja masa molecular y la cantidad de muestra necesaria para los análisis es mínima.	Wittman & Heinzle (2001)
Modelización matemática de ecuaciones de balance de flujos con restricciones de ^{13}C para la distribución de flujos en el metabolismo central de <i>E. coli</i> .	MFA + experimentos de marcaje, análisis por CG-MS	Los flujos metabólicos fueron calculados a través de ecuaciones de restricciones provenientes de experimentos con [U- ^{13}C]-glucosa y [1- ^{13}C]-glucosa y a través de la rutina <i>fmincon</i> utilizando el software Matlab como herramienta computacional.	Fischer <i>et al.</i> (2004)
MFA aplicado a la producción de glicerol por <i>S. cerevisiae</i> usando glucosa como sustrato.	MFA + experimentos de marcaje, análisis por CG-MS, LC-MS y RMN	Se utilizaron dos metodologías para el análisis de flujos: balance de metabolitos y ^{13}C -MFA. El enriquecimiento isotópico para el metabolismo primario intracelular fue medido directamente por LC-MS y los aminoácidos proteínogénicos fueron medidos indirectamente por CG-MS y RMN. La combinación de los tres métodos proporcionó mayor exactitud en el cálculo de la distribución de flujos. Se demostró que el análisis por RMN nos proporciona una mayor exactitud para la estimación de la reversibilidad de la reacción de transporte de OAA a través de la membrana mitocondrial; sin embargo, el análisis de flujos a través de la vía de las PP presentó resultados más exactos cuando los metabolitos fueron analizados por LC-MS, mientras que la mejor estimación del flujo metabólico a través del <i>by-pass</i> de metilglioxal se obtuvo a partir de datos de CG-MS.	Kleijn <i>et al.</i> (2007)

Otra técnica computacional más reciente que viene siendo utilizada actualmente es la aplicación del análisis convexo. La aplicación de esta técnica matemática tiene como objetivo calcular pequeñas unidades funcionales dentro de una red metabólica, denominadas módulos elementales. Esta técnica tiene potencial aplicación dentro de la línea de trabajo sobre análisis funcional de redes metabólicas complejas.

La teoría y desarrollo del análisis de módulos elementales (*elementary modes*) empezó hace poco más de 20 años. Los primeros trabajos referentes a esta metodología fueron atribuidos a Schuster (Schuster & Schuster, 1993); anteriormente, D. Fell en 1992 ya había desarrollado y implementado el concepto de vectores en el espacio nulo para componentes de vías metabólicas. El primer software para el análisis de módulos elementales no fue desarrollado hasta la mitad de la década de los años 90. En 1996, Shuster (Shuster *et al.*, 1996) desarrolló un programa computacional con el nombre de *Empath*; posteriormente Pfeiffer (Pfeiffer *et al.*, 1999) desarrolló otro software denominado *Metatool*. El ambiente de trabajo de ambos software es la plataforma Solaris; más recientemente, en 2003, con una versión más reciente del software *FluxAnalyzer*, los cálculos de módulos elementales han podido ser realizados en la plataforma Windows (Poolman *et al.*, 2001; Klamt *et al.*, 2003).

Otra contribución importante en el concepto de módulos elementales fue la introducción del concepto de la metodología de las vías extremas por Schilling (Schilling *et al.*, 2000). Esta nueva metodología tiene la finalidad de restringir el espacio de soluciones a aquellas con significado bioquímico, es decir, disminuir el número de módulos elementales de una red metabólica, presentando aquellas de mayor importancia fisiológica. Recientemente Wiback (Wiback *et al.*, 2003) desarrolló una metodología llamada “ *α -spectrum*” que corresponde a un rango posible de valores para una actividad para un modo elemental o vía extrema. Este método consiste en restringir la solución en una región, que tiene un conjunto de rangos con un valor máximo y mínimo. El *α -spectrum* puede ser utilizado con datos de flujos experimentales en conjunto con una plataforma analítica establecida.

Sin embargo, algunos problemas tienen que ser superados como (Llaneras & Picó, 2007): *(a)* la poca exactitud de los flujos debido a la carencia de medidas exactas, *(b)* no todos los flujos son con frecuencia mesurables y *(c)* las medidas intracelulares son difíciles y costosas de obtener.

La Tabla I.3 presenta la evolución y algunas de las principales aplicaciones de los módulos elementales y vías extremas en redes metabólicas.

Tabla I.3 Evolución y aplicaciones de módulos elementales.

<i>Sistema Investigado</i>	<i>Referencia</i>
Desarrollo de un concepto de implementación de vectores en espacio nulo con componentes de vías metabólicas	Fell, 1992
Primera aplicación del análisis convexo en redes metabólicas	Shuster & Shuster, 1993
Introducción de un único conjunto de módulos elementales	Shuster <i>et al.</i> , 1994
Desarrollo de un algoritmo para calcular subconjuntos de enzimas	Pfeiffer <i>et al.</i> , 1999
Utilización de módulos elementales para el análisis comparativo de genomas	Dandekar <i>et al.</i> , 1999
Surgen las vías extremas, con el concepto del único y irreducible conjunto de módulos elementales, son desarrolladas y aplicadas para el estudio en grande escala de vías metabólicas	Schilling <i>et al.</i> , 2000
Vías extremas son calculadas para el genoma de redes metabólicas, el estudio de redundancia de vías en dichas redes y el análisis de las propiedades de sistemas	Papin <i>et al.</i> , 2002 Price <i>et al.</i> , 2002
Determinación de módulos elementales de una cepa de levadura recombinante	Carlson <i>et al.</i> , 2002
La lógica regulatoria es incorporada dentro del análisis de vías extremas	Covert & Palsson, 2002
Utilización de módulos elementales para predecir un modelo para la expresión de un gen del metabolismo central de <i>E. coli</i>	Stelling <i>et al.</i> , 2002
Utilización de la descomposición de valores singulares en matrices de vías extremas usando estudios de regulación de redes metabólicas	Price <i>et al.</i> , 2003
Análisis de distribución de flujos utilizando la metodología del α -spectrum, para la bacteria <i>E. coli</i> . El resultado obtenido (α -spectrum) fue utilizado para crear una matriz que fue analizada usando la metodología de descomposición de valores singulares (SVD).	Wiback <i>et al.</i> , 2003
Utilización de módulos elementales para el cálculo de reducción mínima de conjuntos (pequeños conjuntos de reacciones con la ventaja de eliminar algunas redes sin actividad)	Klamt & Gilles, 2004

Referencia: Adaptado de Papin *et al.*, 2004.

Para el análisis completo del metabolismo de un microorganismo en estudio, la combinación de análisis experimentales y computacionales son de gran importancia, pues nos suministra una gran cantidad de informaciones sobre el metabolismo celular y los principales fenómenos bioquímicos que no son observables experimentalmente.

La metodología para el desarrollo y análisis de una red metabólica puede ser resumida y esquematizada como ilustra la Figura I.2.

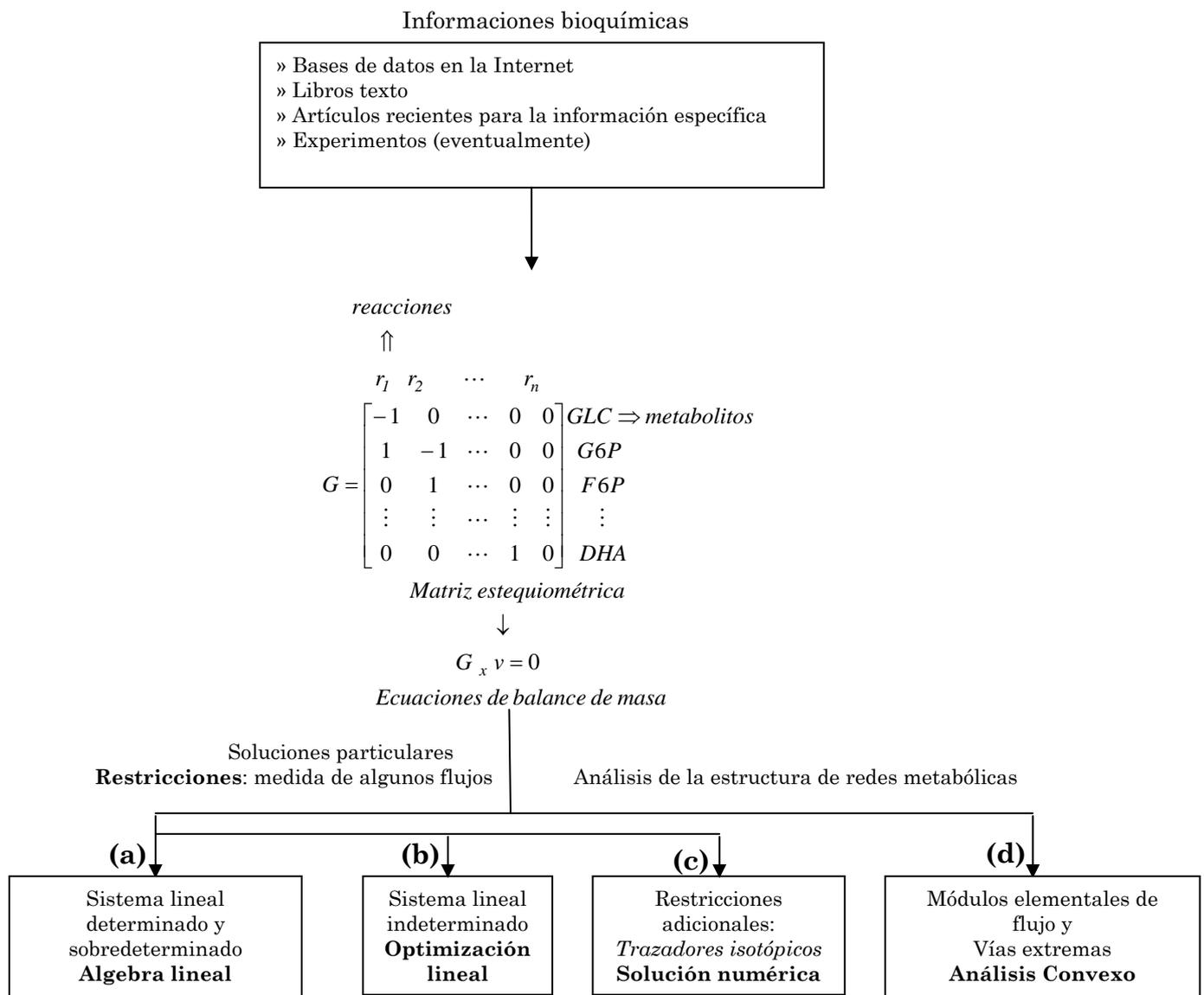


Figura I.2 Principio de la modelización estequiométrica de una red metabólica y sus análisis.

La matriz estequiométrica es definida en función de la red metabólica en estudio; después, la matriz estequiométrica es multiplicada por el vector de flujos, definiendo la ecuación del balance de masa. Finalmente, se puede manipular la matriz estequiométrica de diferentes formas, dependiendo del objetivo del análisis. **(a)** Es posible imponer restricciones midiendo algunos flujos, de forma que el sistema se haga determinado o sobredeterminado y la resolución será a través de técnicas de álgebra lineal simple; **(b)** Si el número de restricciones no son suficientes para tornar el sistema determinado, es decir si disponemos de pocas medidas experimentales tendremos un sistema indeterminado, el cálculos de flujos metabólicos solo será posible a través de técnicas de optimización lineal para encontrar el máximo o mínimo de una función objetivo; **(c)** Si las restricciones adicionales son impuestas a través de medidas de marcación de algunos metabolitos con balances de isótopos y el sistema obtenido será resuelto numéricamente. En este caso, mejores estimaciones de flujos son normalmente obtenidas; **(d)** Análisis estructural de redes metabólicas a través de cálculo de módulos elementales y vías extremas. A través del análisis estructural se puede también calcular flujos asociados a estos módulos. Para estos cálculos debe utilizarse la metodología matemática de análisis convexa.

Referencia: Adaptado de Gombert, 2001.

Actualmente muchos grupos de investigación están centrando esfuerzos con el objetivo de mejorar y desarrollar nuevas técnicas y metodologías que pueden suministrar mejores conocimientos del metabolismo de los microorganismos y predecir algunas propiedades útiles para su producción a nivel industrial o de alguno producto de interés farmacológico o medicinal. Creando así una interfaz entre la investigación y la industria.

En general los trabajos de investigación utilizan microorganismos modelos como bacterias o la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pues sus fisiologías y sus metabolismos en general están muy bien definidos, habiendo la necesidad de estudios de otros microorganismos que son importantes no sólo a nivel industrial más también a nivel académico. Uno de estos microorganismos que merece destacarse es la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*; su importancia está relacionada con su capacidad de expresar proteínas recombinantes en cantidades del orden de miligramo a gramo, tanto para aplicaciones en investigación básica como para uso industrial. Sin embargo, el conocimiento de su fisiología y su metabolismo son prácticamente inexistentes, no hay estudios sistemáticos sobre las respuestas fisiológicas y metabólicas a la expresión y secreción de proteínas heterólogas o sobre la distribución de flujos metabólicos intracelulares. Los primeros estudios llevados a cabo sobre el metabolismo de ésta levadura fueron realizados por A. Solà (Solà, 2004; Solà *et al.*, 2004 y 2007), que sin embargo limitó solamente en estudios experimentales de caracterización del metabolismo central del carbono utilizando marcaje isotópico de ^{13}C , siendo necesario una complementación a nivel de modelización para su interpretación fisiológica, es decir diseñar una red metabólica compartimentalizada que permita describir cuantitativamente el flujo de carbono a través de la red y sus implicaciones fisiológicas dependiendo de las condiciones de cultivo.

1.1 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica anaeróbica facultativa que fue primeramente descrita por Guilliermond en 1919. El género *Pichia* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*, orden *Saccharomycetales*, clase *Saccharomycetes*, filo *Ascomycota*, reino *Fungi* (Kurtzman, 1984; Sreerishna & Kropp, 1996).

Su morfología es muy variable, pudiendo presentar células en las formas esféricas u ovales, solas o unidas en pares. Sin embargo, las células pueden variar su forma de acuerdo con las condiciones de cultivo; frecuentemente, en condiciones propicias de crecimiento, tienen forma oval, en ningún caso se presentan pseudo hifas o hifas. En medio sólido forma colonias no filamentosas de color blanco o color crema. Al microscopio se pueden observar múltiples yemas (Kurtzman, 1984).

P. pastoris presenta esporas en forma de sombrero, reproduciéndose de forma sexuada con producción de ascosporas, que puede variar de uno a cuatro esporas por ascas, con baja viabilidad. El aislamiento de una ascopora de las cuatro presentes reveló que esta especie es homotálica y su dotación genómica permanece haploide, a menos que sea sometida las condiciones limitantes de nitrógeno (Kurtzman, 1984; Lin Cereghino & Cregg, 2000).

Una de las principales características de *P. pastoris* es su capacidad de crecer en medio mínimo o definido conteniendo metanol como única fuente de carbono. Esta observación fue descrita primera vez por Ogata *et al.* en 1969. El metanol presente en la célula es inicialmente metabolizado por una vía metabólica que involucra las enzimas alcohol oxidasa, catalasa y formaldehído deshidrogenasa, entre otras (Harder & Veenhuis, 1989). Además de *Pichia*, sólo se han descrito otros tres géneros de levaduras metilotróficas: *Hansenula*, *Torulopsis* y *Candida* (Harder & Veenhuis, 1989).

Cabe resaltar también que *P. pastoris* es un microorganismo perteneciente al subgrupo de las levaduras respiratorias. Este grupo tiene como característica principal que el catabolismo de la glucosa es lento, situándose entre 10-40 $\mu\text{moles de glucosa} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, siendo considerados como fermentadores débiles, es decir, que durante su crecimiento aerobio una proporción menor del 30% de glucosa es fermentada, y presentan una velocidad de respiración muy alta, con una tasa comprendida entre 150-250 $\mu\text{moles de O}_2 \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Gancedo & Serrano, 1989) Esta propiedad permite cultivar a levaduras como *P. pastoris* hasta densidades celulares del orden de 100 gL^{-1} de peso seco, pues no hay formación significativa de subproductos del metabolismo fermentativo indeseables como el etanol, el cual en otros tipos de cultivos de levaduras como por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, que a altas densidades celulares puede alcanzar rápidamente niveles tóxicos (Torres & Moraes, 2000)

El crecimiento de *P. pastoris* en presencia de metanol como única fuente de carbono y energía trae como consecuencia la biogénesis de los peroxisomas. Cuando células crecidas en metanol son transferidas a medios de cultivos que contienen fuentes de carbonos diferentes como glucosa o etanol, los peroxisomas desaparecen rápidamente como consecuencia de una degradación activa, que involucra la degradación proteolítica de los peroxisomas (Murray *et al.*, 1990).

Estudios realizados por Murray *et al.* (1990), demostraron que la desaparición de los peroxisomas en *P. pastoris* después de 24h de bioconversión de etanol a acetaldehído confirma la inactivación por catabolito de la alcohol oxidasa; de la misma manera confirmaron, que la pérdida de los peroxisomas en células incubadas durante 48h en tampón fosfato en presencia de acetaldehído y O_2 , es causada por el acetaldehído. Se cree que la presencia del acetaldehído genera la necesidad de un metabolismo aeróbico. En *P. pastoris* la inactivación por catabolito se completa alrededor de 21h después de que aparece la primera molécula libre de acetaldehído como resultado de la bioconversión de etanol (Murray *et al.*, 1990).

Inan & Meagher (2001), estudiaron el comportamiento en el crecimiento de *P. pastoris* al adicionar etanol y acetato durante la fase de inducción. En este estudio se demostró que *P. pastoris* es capaz de crecer en glicerol, metanol y etanol como únicas fuentes de carbono y energía; además, se demostró el crecimiento diáuxico cuando dos o tres de estas fuentes de carbonos se encontraban presentes en forma simultánea, especialmente en las mezclas etanol-metanol y etanol-glicerol. De esta manera se pudo establecer la prioridad de utilización de las diferentes fuentes de carbono, glicerol > etanol > metanol. En el caso de la mezcla glicerol-metanol no fue posible observar un comportamiento diáuxico evidente, a pesar de que el glicerol es consumido más rápidamente. En esta mezcla el consumo de metanol comienza antes que el consumo de glicerol termine, lo que indica que ciertos niveles de glicerol no reprimen la expresión del alcohol oxidasa.

El glicerol es una fuente de carbono no fermentable y *P. pastoris* no es considerada una levadura fermentativa; sin embargo, el etanol se acumula durante el cultivo cuando se emplea una tasa alta de alimentación de glicerol (Inan & Meagher, 2001). Este fenómeno ha sido reportado en varias ocasiones pero el mecanismo aún no ha sido explicado. Algunos autores han considerado que el etanol es metabolizado a acetaldehído y luego a acetato, el cual es asimilado como acetyl-CoA; proceso que ha sido descrito para *Pichia augusta* (también conocida como *Hansenula polymorpha*) y para *Pichia methanolica* (Inan & Meagher, 2001).

1.1.1 Aplicaciones industriales y en Investigación básica

En los años cincuenta, surgió la idea de utilizar microorganismos como fuente de proteína, la cuál fue denominada *single cell protein* (SCP). Durante años, se realizaron diversos trabajos de investigación dirigidos al uso de estos microorganismos como fuente alternativa de alimento o como complemento de los piensos para el consumo animal, con objetivo de disminuir el coste final del precio de la carne. Además, para asegurar la

rentabilidad del proceso, la tecnología desarrollada era proveniente de la reutilización de productos residuales generados en procesos químicos industriales. Uno de los subproductos de mayor abundancia generado por la industria química era el metano, del cual se obtenía el metanol (Cregg *et al.*, 1993).

En el inicio de la década de setenta, después del descubrimiento de las levaduras metilotróficas, hubo el interés de la empresa norteamericana Phillips Petroleum Company en utilizar estos organismos como SCP. El objetivo era obtener una fuente de proteína para consumo animal. Sus principales ventajas estaban sobre todo en su tamaño, relativamente mayor que de las bacterias metilotróficas, además de poseer un menor contenido de ácidos nucleicos y ser ricas en vitaminas, lípidos, carbohidratos y en aminoácidos esenciales como lisina, triptófano y metionina. Otra importante característica estaba relacionada con el pH de crecimiento, el cual es relativamente bajo, situándose entre 3,0 a 5,0; esta propiedad es de interés industrial, ya que dificulta la posibilidad de contaminación del cultivo (Wegner, 1983; Cregg *et al.*, 1993).

A través de estudios realizados por la Phillips Petroleum Co. fueron establecidos los protocolos adecuados al medio de cultivo utilizando metanol como fuente de carbono, así como las condiciones operacionales para el cultivo a gran escala de *P. pastoris*. También fueron determinados el tipo y la configuración necesaria de los bioreactores utilizados para su cultivo y la cantidad de oxígeno adecuada. El producto final obtenido fue denominado *Proveesten*. Fueron alcanzados de 120 a 150 g de peso seco de biomasa por litro de cultivo, con contenido proteico del 60%. Con la crisis económica del petróleo, hubo un considerable aumento en el precio del metano y la producción de *P. pastoris* como SCP pasó a ser económicamente inviable (Wegner, 1983).

No obstante, debido a su capacidad de crecer a elevadas densidades celulares en medio mínimo contiendo metanol como única fuente de carbono, *P. pastoris* fue objeto de estudio como sistema de producción de proteínas heterólogas, junto con otra levadura metilotrófica *P. augusta* (Gellissen,

2000). Así pues, en la década de noventa fueron realizados exhaustivos trabajos sobre expresión genética en *P. pastoris*, con el objetivo de producir proteínas heterólogas de interés para la salud humana y diversas aplicaciones industriales. Fueron desarrollados vectores, cepas y protocolos de manipulación genética en este microorganismo. En el año 1993 la Phillips Petroleum Co. cedió la patente sobre *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas a la *Research Corporation Technologies* y licenció la compañía *Invitrogen Corporation* para comercializar los componentes del sistema para uso no comercial (Wegner, 1983; Lin Cereghino & Cregg, 2000).

La principal aplicación de *P. pastoris* está relacionada con su excelente capacidad de actuar como célula huésped para la producción de proteínas foráneas. Numerosas proteínas de diferente origen ya han sido expresadas con éxito bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa (AOX1), (Tabla I.4). Entre las proteínas producidas en *P. pastoris*, se destaca la albúmina sérica humana, que ya está en ensayos clínicos para su uso como producto de sustitución del plasma y el antígeno de superficie de la hepatitis B, que fue aprobado para hacerse una vacuna contra dicho virus (Torres & Moraes, 2000).

El sistema de expresión recombinante de proteínas en *P. pastoris* también ha logrado establecerse en el campo de la investigación básica, por ejemplo en muchos programas de genómica estructural (Yokoyama, 2003; Prinz *et al.*, 2004).

La enzima alcohol oxidasa también tiene gran aplicación comercial, siendo utilizada en procesos de diagnóstico clínico para determinación de niveles de alcohol. Además esta enzima también tiene utilidad como aditivo en detergentes y lejías (UNILEVER, 1987).

P. pastoris también tiene gran aplicación como sistema modelo para la investigación de enfermedades de origen genético que conllevan defectos en los peroxisomas de las células humanas, conocidos como Síndrome de Zellweger. La secuencia de genes peroxisomales de *P. pastoris* (PEX) se ha utilizado para identificar los genes homólogos humanos de diversos genes

PEX, muchos mutantes de los cuales han resultado ser genes afectados en pacientes con el síndrome de Zellweger (Waterham *et al.*, 1996).

Tabla I.4 Ejemplos de proteínas heterólogas expresadas en *P. pastoris*.

Origen de la proteína	Proteína	Tipo de expresión	Cantidad
Bacterias			
<i>Clostridium tetani</i>	Fragmento C de la toxina del tétanos	I	12 g/L
<i>Staphylococcus aureus</i>	Estafiloquinasa	S	50 mg/L
<i>Streptomyces viridosporus</i>	T7A endoglucanasa	S	2,47 g/L
Hongos			
<i>Candida antarctica</i>	Lipasa B	S	25 mg/L
<i>Geotrichum candidum</i>	Isoenzimas lipolíticos	S	60 mg/L
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipasa	S	60 mg/L
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa	S	2,5 g/L
Protistas			
<i>Actinia equina</i>	Eqüistatina (anémoma del mar)	S	25 mg/L
<i>Plasmodium vivax</i>	Antígeno I de la membrana apical	S	50 mg/L
Plantas			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NADH nitrato reductasa	I	18 mg/L
Grano de café	α -galactosidasa	S	400 mg/L
Invertebrados			
<i>Hirudo medicinalis</i>	Hirudina	S	1,5 g/L
Veneno de serpiente	α -bungarotoxina	S	2 mg/L
Vertebrados (no humanos)			
Buey	β -caseína	I	1 g/L
Raia (pez)	Proteína anticongelante II	S	30 mg/L
Humano	α -amilasa pancreática	S	20 mg/L
	Factor α TNF de necrosis tumoral	I	10 mg/L
	Factor de crecimiento vascular endotelial	S	40 mg/L
	UDG-galactosa-4-epimerasa	I	800 mg/L
Virus			
<i>Virus Hepatitis B</i>	Antígeno de superficie de la hepatitis B	I	400 mg/L
<i>HIV-1</i>	Glicoproteína, gp120 (ENV)	S	20 mg/L
<i>Influenza</i>	RNA polimerasa	I	2 mg/L

donde: I = intracelular (con localización subcelular); S = secretada

Referencia: adaptado de Cregg (1999) y <http://faculty.kgi.edu/cregg/index.htm>.

I.2 Metabolismo intermediario (o central) de *P. pastoris*

El metabolismo puede ser definido como la suma de todas las reacciones enzimáticas que ocurren en una célula o microorganismo (Lehninger, 1993).

De acuerdo con Lehninger (1993), las funciones específicas del metabolismo celular son:

- Obtención de energía química de moléculas combustibles o de luz solar absorbida;
- Conversión de los principios nutritivos exógenos o precursores de los componentes macromoleculares de la célula;
- Sintetizar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes celulares;
- Degradación de biomoléculas necesarias para el mantenimiento celular.

El metabolismo intermediario o central representa la suma de todos los cambios químicos que convierten los nutrientes, los materiales de partida utilizables por los organismos, en energía y de los productos celulares químicamente complejos. El metabolismo intermediario consiste literalmente en cientos de reacciones enzimáticas organizadas en rutas características. Estas rutas proceden paso a paso dentro de una serie de reacciones, transformando substratos en productos a través de la formación de innumerables intermediarios.

Según Gancedo & Serrano (1989) y Flores *et al.* (2000), la mayoría de las levaduras, aproximadamente 400 especies descritas, utilizan azúcares (por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa) como una de las principales fuentes de energía y carbono para su metabolismo. Según estos autores todas las levaduras tienen en común el metabolismo de conversión de la glucosa 6-fosfato o fructosa 6-fosfato en piruvato a través de la vía glucolítica; sin embargo, el destino del piruvato depende de la especie de la levadura y de

las condiciones de cultivo (Figura I.3). En la mayoría de los casos, en condiciones aerobias, el piruvato es oxidado a CO_2 a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). De acuerdo con estos autores, la vía glucolítica y el ciclo de los TCA son puntos cruciales del metabolismo celular y que las dos principales funciones son la producción de energía y la reducción de equivalentes en la forma de ATP, NADH o NADPH, además la producción de metabolitos precursores para la síntesis de otras biomoléculas.

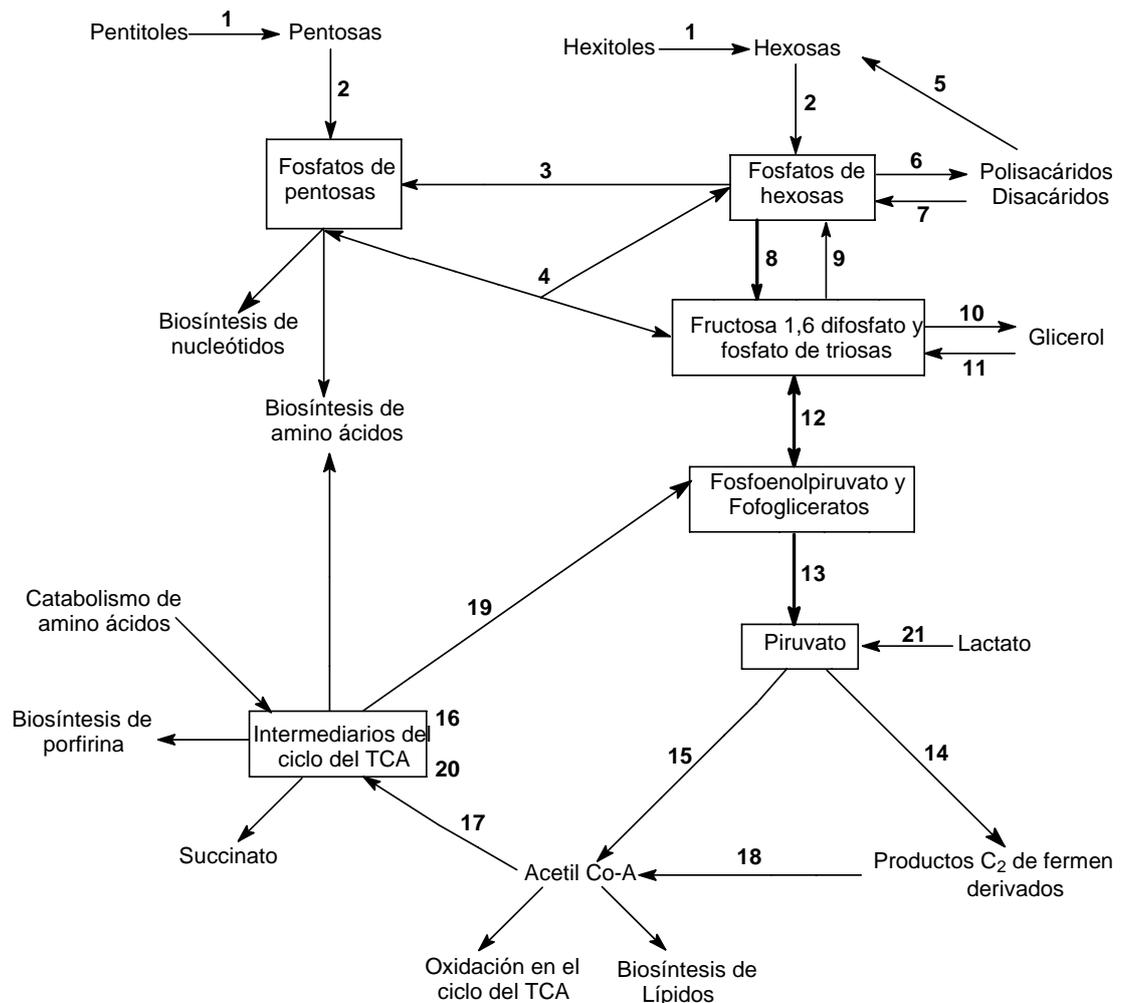


Figura I.3 Esquema general del metabolismo del carbono en levaduras. Las líneas en negrita indican la vía glucolítica más común. Las notaciones de enzimas y vías son las siguientes: 1) alditol dehidrogenasa; 2) quinasas; 3) vía oxidativa (irreversible) de las pentosas; 4) vía no oxidativa (reversible) del ciclo de las pentosas; 5) glucosidasas; 6) biosíntesis de polisacáridos; 7) glicógeno fosforilasa; 8) fosfofructoquinasa; 9) fructosa 1,6-bifosfatasa; 10) glicerol fosfato deshidrogenasa y glicerol fosfato fosfatasa; 11) glicerol quinasa y glicerol fosfato ubiquinona oxidoreductasa; 12) gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa y fosfoglicerato quinasa; 13) piruvato quinasa, 14) piruvato decarboxilasa seguida de oxidoreducciones y condensaciones; 15) piruvato deshidrogenasa; 16) piruvato carboxilasa; 17) ciclo del glioxilato; 18) acetato tioquinasa; 19) fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; 20) enzima málica; 21) lactato dehidrogenasa (citocromo b₂).

Referencia: Gancedo & Serrano (1989).

De acuerdo con Gancedo & Serrano (1989) y Flores *et al.* (2000), los azúcares no pueden atravesar libremente las membranas lipídicas. Es por tal motivo que el primer paso del catabolismo de estos carbohidratos tiene como objetivo el transporte de tales compuestos a través de la membrana plasmática. Este transporte es catalizado por sistemas específicos que son denominados permeasas. Se han caracterizado diferentes permeasas en levaduras, existiendo diferencias en sus propiedades para diferentes tipos de azúcares (Gancedo & Serrano, 1989). Algunos disacáridos como la sucrosa y melibiosa no son transportados por permeasas al interior de la célula; estos azúcares son hidrolizados fuera de la membrana plasmática (Gancedo & Serrano, 1989 y Flores *et al.* 2000). Según Flores *et al.* (2000), la capacidad de hidrolizar tales compuestos depende de la especie de la levadura y de la naturaleza del azúcar. La hidrólisis de estos disacáridos es realizada en el espacio periplasmático o dentro de la célula después de su transporte (Figura I.4).

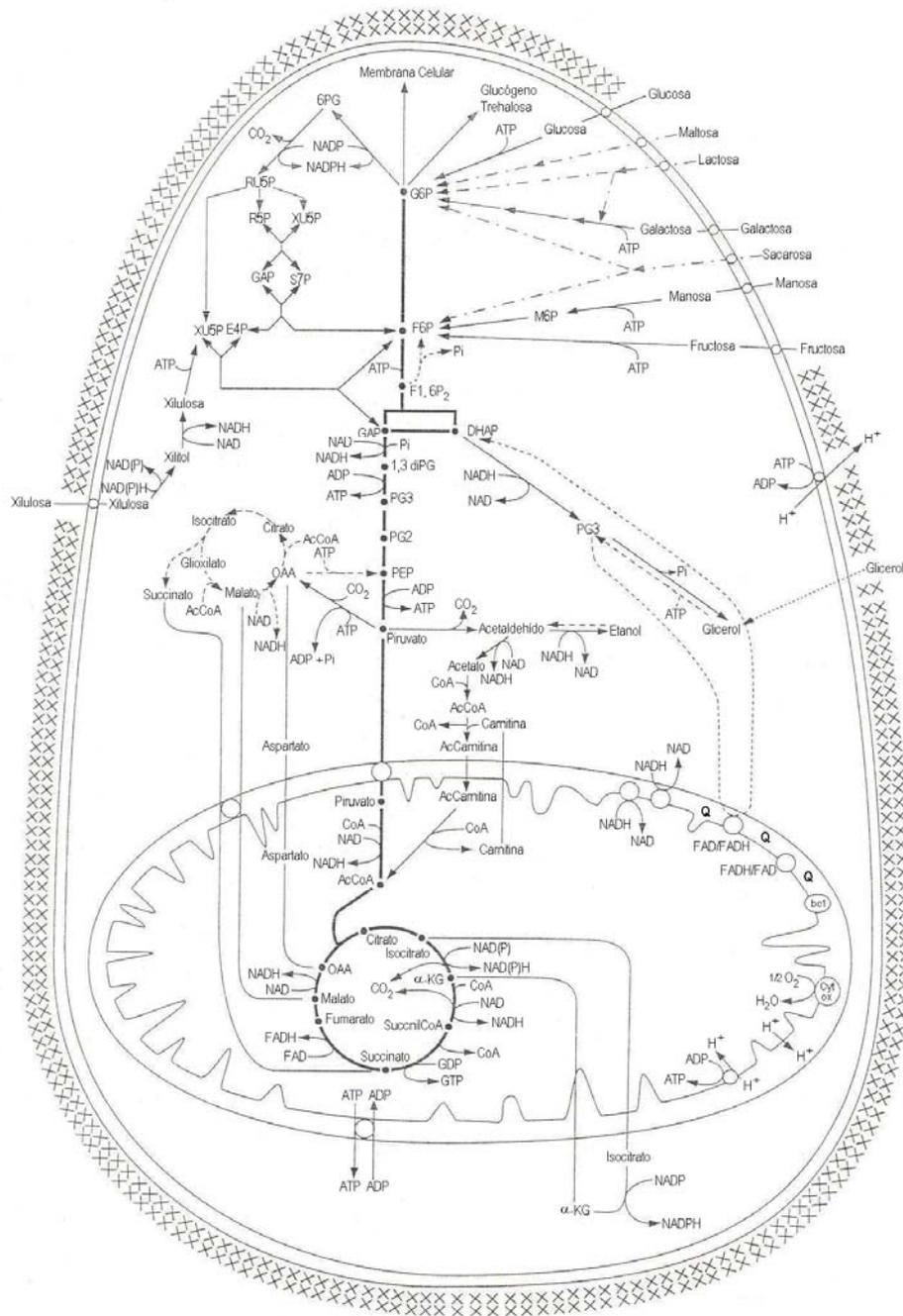


Figura I.4 Esquema de diferentes vías metabólicas en levaduras. La línea negra representa la vía glucolítica común y el ciclo de los TCA. Las líneas discontinuas representan reacciones que son utilizadas durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. La línea con punto y trazo depende del género de la levadura, algunos disacáridos pueden ser hidrolizados en el exterior de la célula o serán transportados a su interior e hidrolizados en el citoplasma. Los círculos en la membrana indican el sistema de transporte o proteínas localizadas en tales estructuras. Las líneas que pasan a través de la membrana mitocondrial no necesariamente implican que el correspondiente metabolito cruza libremente. El enzima málico no está representado. Los otros organelos celulares no están representados. Las abreviaturas representan: 6PG – 6-fosfogliconato; RU5P – ribulosa 5-fosfato; R5P – ribosa 5-fosfato; XU5P – xilulosa 5-fosfato; S7P – sedoheptulosa 7-fosfato; E4P – eritrosa 4-fosfato; PG3 – glicerol 3-fosfato; Pi – fosfato inorgánico; OAA – oxaloacetato; Q – ubiquinona; bc1 – citocromos; Cyt ox. – citocromo oxidasa.

Referencia: Flores *et al.* (2000).

1.2.1 Glucólisis

Según Lehninger (1993), la vía glucolítica o Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) es una ruta metabólica central donde una molécula de glucosa es degradada a través de una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente originando dos moléculas de piruvato. Durante el catabolismo de la glucosa la energía libre generada se conserva en forma de ATP. Se trata de la ruta metabólica muy conocida, desempeñando un papel clave en el metabolismo energético al proporcionar una parte importante de la energía utilizada por la mayoría de los organismos. Sirve en su función principal para preparar la glucosa y otros carbohidratos para su posterior degradación oxidativa.

De acuerdo con Flores *et al.* (2000) las moléculas de glucosa, fructosa y manosa son inicialmente fosforiladas por hexoquinasas y que el aparato enzimático que participa en la fosforilación depende del tipo de la levadura.

Después de la etapa de fosforilación, la glucosa 6-fosfato es convertida en fructosa 6-fosfato, a través de la enzima fosfoglucosa isomerasa; después de esta fase la fructosa 6-fosfato es fosforilada a través de la enzima fosfofructoquinasa, originando la fructosa 1,6-bifosfato. La transformación de esta molécula en triosas es realizada a través de la enzima fructosa 1,6-bifosfato aldolasa; el corte de esta molécula de seis carbonos resulta en una molécula de dihidroxiacetona fosfato y una de gliceraldehído 3-fosfato. A través de la enzima triosa fosfato isomerasa, la molécula de dihidroxiacetona fosfato se isomeriza originando otra molécula de gliceraldehído 3-fosfato (Lehninger 1993 y Flores *et al.*, 2000). Después de esta etapa, las dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato son oxidadas y fosforiladas por fosfato inorgánico, formando 1,3-bifosfoglicerato, a través de la enzima gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa. Esta es una de las etapas más importantes de la vía glicolítica, pues la oxidación de la molécula de aldehído resulta en una molécula con un enlace acil fosfato que es rico en energía (Flores *et al.*, 2000). Según Lin Cereghino & Cregg (2000), en *P.*

pastoris, el promotor del gen *GAP* puede ser utilizado como una alternativa para la producción de proteínas foráneas en esta levadura.

Según Lehninger (1993), la próxima fase de la glucólisis representa la etapa de beneficios, pues hay liberación de energía. De acuerdo con este autor, cada molécula de 1,3-bifosfoglicerato formado en la reacción anterior es transformada en 3-fosfoglicerato a través de la enzima 3-fosfoglicerato quinasa. En esta etapa, el acil fosfato de la molécula 1,3-bifosfoglicerato es cortado originando una molécula de ATP. A través de la catálisis enzimática realizada por la fosfoglicerato mutasa el 3-fosfoglicerato es convertido en 2-fosfoglicerato. Después de esta etapa, el producto anteriormente formado es convertido en fosfoenolpiruvato a través de la enzima enolasa, y conlleva una deshidratación. La última etapa de la glucólisis es la transformación de las dos moléculas de fosfoenolpiruvato en piruvato. Esta reacción es catalizada a través de la enzima piruvato quinasa. En esta etapa el acil fosfato conectado a la cadena carbónica es cortada originando una molécula de ATP (Figura I.4).

Según Lehninger (1993) y Flores *et al.* (2000), el piruvato formado puede seguir tres rutas catabólicas alternativas, en condiciones aerobias la glucólisis constituye el primer paso para la degradación completa de la glucosa, el piruvato es oxidado a CO₂ a través del ciclo de los TCA. En condiciones anaerobias el piruvato puede ser convertido en etanol, o puede ser reducido a lactato a través de la fermentación del ácido láctico (Figura I.5).

La ecuación global de la glucólisis es la siguiente:



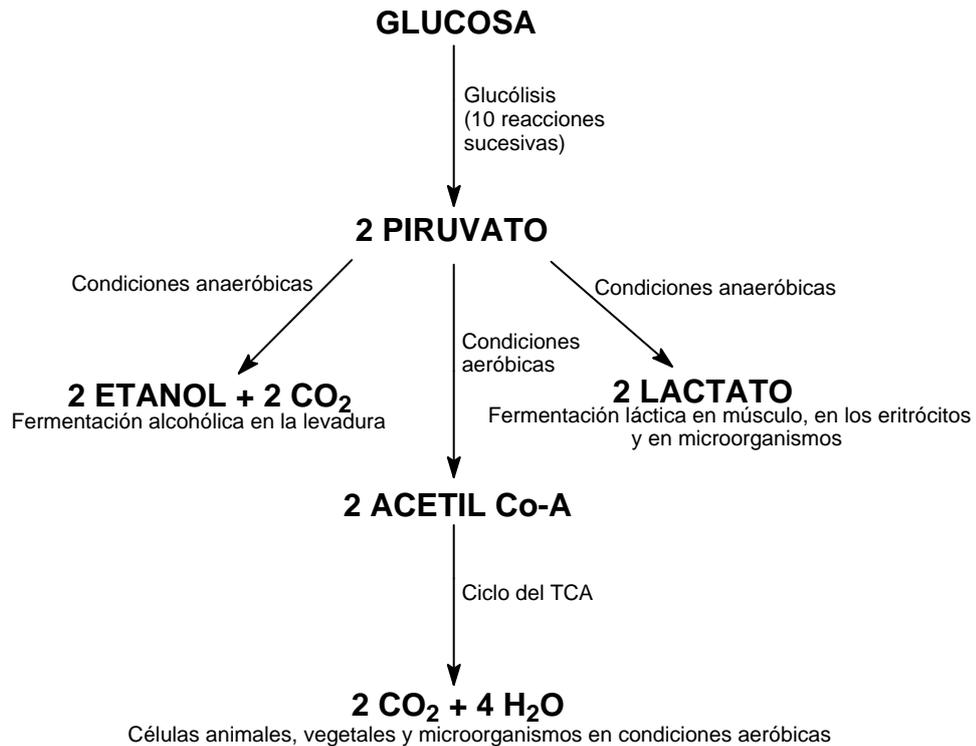


Figura I.5 Los tres posibles destinos catabólicos del piruvato formado a través de la glucólisis. El piruvato también sirve como precursor en muchas reacciones anabólicas, que aquí no están representados.

Referencia: Lehninger (1993).

1.2.2 Gluconeogénesis

Si la degradación de glucosa hasta piruvato constituye la ruta central de oxidación de glúcidos en la mayoría de las células, el proceso inverso, conocido como gluconeogénesis, representa la conversión de piruvato en glucosa-6-fosfato, siendo esa una ruta anabólica central para la síntesis de carbohidratos. Sobre esta ruta convergen otras que parten de precursores no glúcidos. Una de estas rutas colaterales importante es la transformación de intermediarios del ciclo de los TCA en precursores de la glucosa (Lehninger1993).

Debido a la capacidad de las levaduras de crecer en diferentes fuentes de carbono y que requieran el uso de azúcares fosfatados para la síntesis de varios compuestos celulares, la etapa de la vía glucolítica

comprendida entre la fructosa 1,6-bifosfato y fosfoenolpiruvato presenta todas las reacciones reversibles (Gancedo & Serrano 1989; Flores *et al.*, 2000). Las dos etapas fisiológicamente irreversibles ocurren debido a la baja concentración de sustrato encontrado en la célula. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas fosfofrutoquinasa y piruvato quinasa. Sin embargo, dos enzimas adicionales son necesarias para el retorno de estas reacciones, estas enzimas son la fructosa 1,6-bifosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Gancedo & Serrano 1989). Para obtener una dirección adecuada del flujo, estas enzimas no son activadas durante la glucólisis, así como las enzimas fosfofrutoquinasa y piruvato quinasa no son activadas durante la gluconeogénesis. Diferentes mecanismos son utilizados para obtener el flujo metabólico deseado, las enzimas utilizadas en la gluconeogénesis son inhibidas e inactivadas por la glucosa y otros azúcares (Gancedo & Serrano 1989).

Según Flores *et al.* (2000), las enzimas fosfofrutoquinasa y piruvato quinasa pueden ser simultáneamente y parcialmente activadas, lo que ocasiona un ciclo de sustrato. Este ciclo es importante para regular la velocidad y dirección del flujo entre la glucólisis y la gluconeogénesis.

De acuerdo con estos autores, la enzima fructosa 1,6-bifosfatasa cataliza la hidrólisis de la fructosa 1,6-bifosfato a la fructosa 6-fosfato. Esta reacción corresponde a la etapa final de la gluconeogénesis (Figura I.4).

1.2.3 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

El Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) también llamado Ciclo de Krebs, constituye una de las principales vías metabólicas, siendo muchas veces considerado como el centro del metabolismo (Zagoya & Gomez, 1995). En las levaduras, este ciclo tiene lugar en la mitocondria. Es la vía de oxidación de la mayor parte de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos y genera numerosos metabolitos intermediarios de otras rutas metabólicas. Es, por lo tanto, un ciclo *anfibólico*, es decir, opera catabólica y

anabólicamente. Estos compuestos son catabolizados en la matriz mitocondrial en seres eucariotas y en el citoplasma en los procariotas, originando el radical acetilo activado, en forma de acetil-CoA, este metabolito es oxidado a través de un complejo multienzimático liberando energía en forma de ATP (Lehninger, 1993 y Zagoya & Gomez, 1995).

Para entrar en el ciclo del TCA, el piruvato sufre inicialmente una descarboxilación oxidativa a través de la enzima piruvato dehidrogenasa, un complejo multienzimático mitocondrial formado por tres diferentes enzimas: piruvato dehidrogenasa (E1), dihidrolipomida acetil transferasa (E2) y dihidrolipoamida dehidrogenasa (E3). La enzima E1 consiste en dos subunidades E1 α y E1 β (Flores *et al.*, 2000).

El acetil-CoA también es formado en el citoplasma a través del llamado “atajo del piruvato” (*pyruvate-bypass*); este comprende la síntesis del acetil-CoA a través de la acción sucesiva de la enzima piruvato decarboxilasa, acetaldehído dehidrogenasa y acetil-CoA sintasa. El acetil-CoA es transportado al interior de la mitocondria, mediante el transportador carnitina, completando así el *bypass* de la reacción catalizada por la piruvato dehidrogenasa (Flores *et al.*, 2000), (Figura I.6).

El acetil-CoA, formado a través de la enzima piruvato dehidrogenasa y/o por el *pyruvate bypass*, es la conexión entre la glucólisis y el ciclo del TCA (Flores *et al.*, 2000).

A través de la enzima citrato sintasa, el acetil-CoA es convertido en citrato; después de esta etapa, ocurre la conversión del citrato en isocitrato a través de la enzima aconitasa. El isocitrato formado sufre una descarboxilación oxidativa a través de la catálisis enzimática de la isocitrato dehidrogenasa, formando el 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato), que es un importante precursor para la biosíntesis de aminoácidos. En *S. cerevisiae* fue constatado que existe dos tipos de isocitrato dehidrogenasa, una es dependiente de NAD⁺, formada por dos subunidades codificadas por los genes *IDH1* e *IDH2*, y la otra, dependiente de NADP⁺, que es formada por tres subunidades codificadas por los genes *IPD1*, *IPD2* e *IPD3*, siendo que

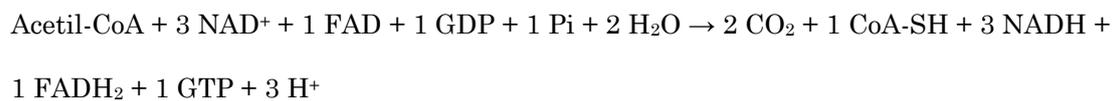
algunos de esos genes son importantes en la producción de NADPH (Flores *et al.*, 2000).

El ciclo continúa con la reacción de una molécula de acetyl-CoA y una de α -cetoglutarato que es convertido a succinil-CoA a través de la enzima 2-oxoglutarato dehidrogenasa. La próxima etapa constituye en la formación de succinato, con la liberación de un mol de ATP; esta reacción es catalizada por la enzima succinil-CoA sintasa. El succinato formado es convertido a fumarato a través de la enzima succinato ubiquinona oxidoreductasa; a través de la catálisis realizada por la fumarasa el fumarato es convertido a malato. El malato formado puede tener dos distintas finalidades, la primera es a través de la malato dehidrogenasa ser convertido en oxaloacetato, con la producción de NADH o NADPH. Existen tres diferentes isozimas de malato dehidrogenasa dependiente de NAD^+ , codificadas respectivamente por los genes *MDH1*, *MDH2* y *MDH3*; el isoenzima MDH1 se encuentra en la mitocondria y es el responsable de la conversión de malato a oxaloacetato, cerrando el ciclo de los TCA; los isoenzimas MDH2 y MDH3 son citosólicas; la isoforma 2 participa en la conversión de malato a oxaloacetato en el ciclo del glioxilato, mientras que, el isoenzima MDH3 participa en las reacciones del ciclo del glioxilato y en la gluconeogénesis (Steffan & McAlister-Henn, 1992). Tal como se ha mencionado anteriormente, el malato también puede ser convertido a piruvato mediante la acción del enzima málico.

Existen mecanismos capaces de reponer los metabolitos intermedios a partir de otros precursores, lo que ayuda a mejorar el rendimiento del ciclo sobre todo en situaciones catabólicas. Las reacciones correspondientes se llaman anapleróticas o reacciones de relleno y entre las mismas pueden citarse las catalizadas por la piruvato carboxilasa, que cataliza la conversión del piruvato con CO_2 a oxaloacetato, y la catalizada por la enzima málica, que transforma el malato en piruvato y produce también NADH o NADPH (El piruvato proviene de la glucólisis), (Figura I.6). A pesar de hacer parte del metabolismo central de las levaduras, el papel fisiológico de la enzima málica todavía no ha sido totalmente establecido (Moreira dos Santos *et al.*, 2003).

Según Boles *et al.* (1998) el enzima málico ha sido caracterizado en las siguientes especies de levaduras: *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula glutinis*, *Zygosaccharomyces bailii* y *S. cerevisiae*. En *S. pombe* la enzima málica es dependiente sólo de NAD⁺, sin embargo en *S. cerevisiae* están presentes los aceptores de electrones NAD⁺ y NADP⁺. Según estos autores, en *S. cerevisiae* la constante de afinidad (K_m) de esta enzima por malato es quince veces mayor que en *S. pombe*. Boles *et al.* (1998) reportaron también que en cultivos operando en quimiostato y en condiciones aeróbicas, la actividad enzimática del enzima málico en *S. cerevisiae* es mayor en cultivos utilizando glucosa que en cultivos creciendo con etanol o acetato como fuente de carbono.

La estequiometría general del ciclo de TCA es la siguiente:



El balance energético de las oxidaciones del ciclo se conserva con eficiencia en coenzimas reducidas y 1 GTP. Cada vuelta del ciclo, según la ecuación estequiométrica resulta en:

1 NADH en la mitocondria produce:	3 ATP × 3 en el ciclo = 9 ATP
1 FADH ₂ en la mitocondria produce:	2 ATP × 1 en el ciclo = 2 ATP
1 GTP es análogo a:	1 ATP × 1 en el ciclo = 1 ATP
Total por cada vuelta del ciclo	12 ATP

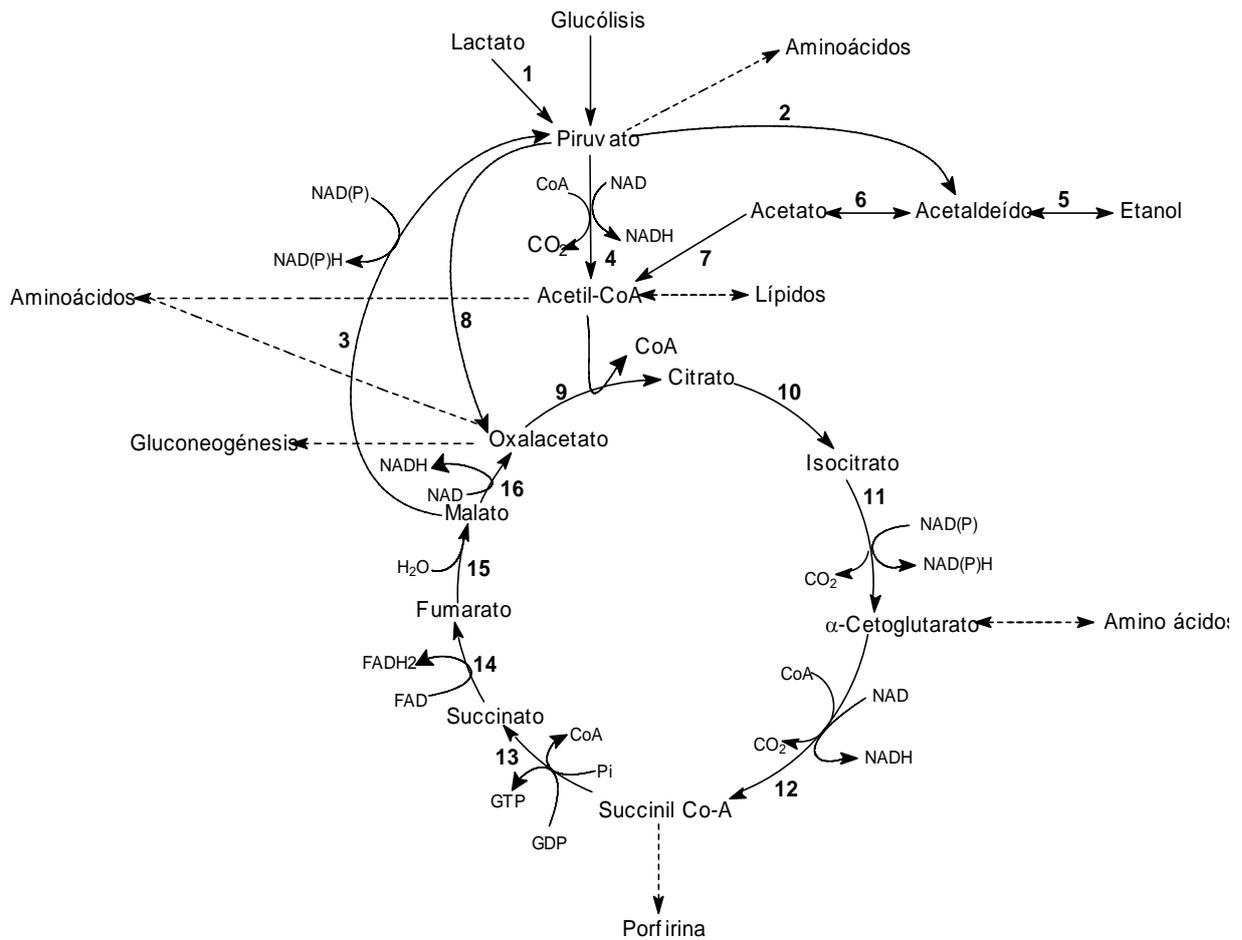


Figura I.6 Esquema para el ciclo de los TCA y vías relacionadas. Las flechas en negrita indican reacciones del ciclo del TCA.

Notación de las enzimas involucradas: 1) lactato dehidrogenasa (citocromo b_2); 2) piruvato decarboxilasa; 3) enzima málico; 4) complejo piruvato dehidrogenasa; 5) alcohol dehidrogenasa; 6) acetaldeído dehidrogenasa; 7) acetil-CoAsintetasa; 8) piruvato carboxilasa; 9) citrato sintasa; 10) aconitasa; 11) isocitrato dehidrogenasa; 12) 2 - oxoglutarato dehidrogenasa; 13) succinil Co-A sintasa; 14) succinato: ubiquinona oxirreductasa; 15) fumarasa; 16) malato dehidrogenasa.

Nota: El ciclo del glioxilato no está representado.

Referencia: Adaptado de Gancedo & Serrano (1989).

1.2.4 Ciclo del glioxilato

Con el objetivo de obtener cuatro unidades de carbono para que sean utilizados en la biosíntesis de macromoléculas, en levaduras el ciclo del glioxilato típicamente ocurre cuando éstas crecen en fuentes de carbono de 2C como el etanol, acetato o ácidos grasos como única fuente de carbono (Kunze *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae* este proceso consiste en cinco enzimas, siendo que la isocitrato liasa y la malato sintetasa representan las enzimas clave, las otras tres enzimas involucradas en este ciclo están presentes tanto en el citoplasma como en la mitocondria, formando parte del ciclo de los TCA.

El ciclo del glioxilato tiene inicio cuando una molécula de acetil-CoA se condensa con una molécula de oxaloacetato formando una de citrato que es convertido a isocitrato a través de la enzima aconitasa. El isocitrato formado es cortado transformándose en succinato y glioxilato, a través de la enzima isocitrato liasa (Kunze *et al.*, 2002). A través de la catálisis enzimática realizada por la malato sintetasa ocurre la condensación de una molécula de glioxilato con una de acetil-CoA, formando una molécula de malato. El malato por su parte, se oxida formando oxaloacetato, que puede condensarse de nuevo con una molécula de acetil-CoA e iniciar otro vuelta del ciclo (Gancedo & Serrano, 1989), (Figura I.7).

Estudios realizados con *S. cerevisiae* revelaron que las enzimas clave del ciclo del glioxilato, la isocitrato liasa (Icl1p) y la Malato sintasa, son probablemente citosólicos (Gancedo & Serrano, 1989), sin embargo, en levaduras metilotróficas como *P. pastoris* estas enzimas están localizados en los peroxisomas (Bruinenberg *et al.*, 1989).

La ecuación general del ciclo del glioxilato es la siguiente:



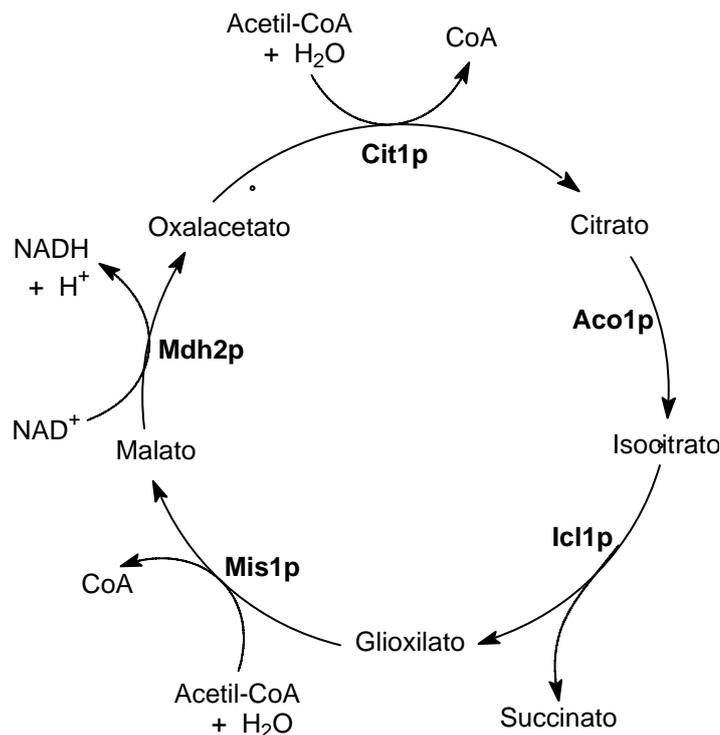


Figura I.7 Ciclo del glioxilato en células de levaduras.

donde: Cit1p, Aco1p, Icl1p, Mis1p, Mdh2p representan isoenzimas de las siguientes enzimas respectivamente: Citrato sintasa; Aconitasa; Isocitrato liasa; Malato sintasa y Malato dehidrogenasa.

Referencia: Kunze *et al.* (2002).

1.2.5 Via de las pentosas fosfato

La vía de las pentosas fosfato es una importante ruta metabólica que implica en la producción de NADPH para reacciones de biosíntesis y de ribosa 5-fosfato que son utilizados para la síntesis de ácidos nucleicos y cofactores nucleótidos. Otro producto importante es la eritrosa 4-fosfato, que es utilizada en la síntesis de aminoácidos aromáticos (Flores *et al.*, 2000).

Según Flores *et al.* (2000) el uso de una fuente de nitrógeno en el medio influencia directamente en la cantidad de azúcar utilizada en la vía de las pentosas. Por ejemplo, de acuerdo con estos autores, con el uso de nitrato hay un aumento en el flujo de carbono y de la producción de NADPH,

comparado con el uso de amonio como fuente de nitrógeno. Las condiciones de cultivo también tienen un efecto determinante sobre la contribución de la ruta de las pentosas al catabolismo de la glucosa, es decir, a la síntesis de triosas. Mientras que en cultivos en erlenmeyer (metabolismo repirofermentativo) la contribución de la ruta de las pentosas es mínima (Maaheimo *et al.*, 2001) sin embargo, en cultivos en quimiostato (metabolismo respirativo) esta ruta es importante (Fiaux *et al.*, 2003; Gombert *et al.*, 2001).

La vía de las pentosas puede ser dividida en dos etapas complementarias. La primera corresponde las reacciones oxidativas que son fisiológicamente irreversibles en que ocurre la conversión de la glucosa 6-fosfato en pentosa fosfato produciendo también NADPH. La otra reacción comprende la fase no-oxidativa y reversible que involucra la conversión de la pentosa fosfato en hexosa fosfato y triosa fosfato (Gancedo & Serrano 1989; Flores *et al.*, 2000).

En la fase oxidativa la glucosa 6-fosfato sufre la pérdida de un carbono produciendo 6-fosfo- δ -gluconolactona y NADPH. Esta reacción está catalizada por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. La hidrólisis de 6-fosfo- δ -gluconolactona a la 6-fosfogluconato ocurre espontáneamente a pH neutro y a una tasa muy lenta (Zagoya & Gomez 1995; Flores *et al.*, 2000). A través de la 6-fosfogluconato dehidrogenasa ocurre la descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato en ribulosa 5-fosfato, siendo este posteriormente isomerizado en ribosa 5-fosfato o epimerizada a xilulosa 5-fosfato. La primera reacción es catalizada por la ribosa 5-fosfato isomerasa y la segunda reacción por la ribulosa 5-fosfato epimerasa (Flores *et al.*, 2000). A través de la reacción entre la xilulosa 5-fosfato y ribosa 5-fosfato ocurre la formación del gliceraldehído 3-fosfato y sedoheptulosa 7-fosfato. Esta reacción es catalizada a través de la enzima transcetolasa. Posteriormente a través de las enzimas sedoheptulosa 7-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato transaldolasa hay una transferencia de los carbonos 1, 2 y 3 de la sedoheptulosa 7-fosfato al gliceraldehído 3-fosfato formando los productos fructosa 6-fosfato y eritrosa 4-fosfato (Zagoya & Gomez 1995; Flores *et al.*,

2000). Según Flores *et al.* (2000), en levaduras metilotróficas, la acción combinada de las enzimas transcetolasa y dihidroxiacetona sintasa son las responsables por la formación de la dihidroxiacetona y gliceraldehído 3-fosfato a través de la xilulosa 5-fosfato y formaldehído.

A través de reacciones sucesivas hay la formación de la fructosa 6-fosfato, gliceraldehído 3-fosfato y glucosa 6-fosfato, siendo que estos productos también pueden ser regenerados a través de la catálisis enzimática, formando un ciclo (Zagoza & Gomez 1995), (Figura I.4).

1.2.6 Asimilación y formación de glicerol

La producción de glicerol bajo condiciones anaerobias es una vía metabólica muy importante para la regeneración de NAD⁺ bajo estas condiciones. Además, el glicerol puede ser utilizado como fuente de carbono bajo condiciones aerobias. La producción de glicerol también tiene gran importancia en levaduras, principalmente cuando son expuestas a tensiones osmóticas (Flores *et al.*, 2000).

La formación de glicerol empieza con la reducción de la dihidroxiacetona fosfato a través de la catálisis realizada por una NADH glicerolfosfato dehidrogenasa. Esta reducción regenera el NAD⁺ y produce glicerolfosfato, que después es convertido a glicerol a través de la enzima glicerolfosfatasa (Gancedo & Serrado, 1989), (Figura I.4).

Según Gancedo & Serrado (1989) la fermentación de glucosa en *S. cerevisiae* genera siempre una cierta cantidad de glicerol, acetato y succinato. La producción de acetato y succinato resultan en una producción neta de NADH. La formación de glicerol es el camino para regenerar el NAD⁺ en condiciones anaeróbicas.

Oura (1977), citado en Gancedo & Serrado (1989), expuso una ecuación empírica relatando la dependencia de la producción de glicerol, sobre la producción de acetato y de succinato en procesos fermentativos

industriales, donde el crecimiento celular es despreciable. Según este autor la producción de glicerol puede ser expresado como:

$$(\text{moles de glicerol}) = 2 (\text{moles de acetato}) + 5 (\text{moles de succinato}) \quad (\text{I.1})$$

El glicerol también es utilizado como fuente de carbono bajo condiciones aerobias por muchas especies de levaduras. La vía catabólica comprende la difusión pasiva a través la membrana plasmática, fosforilación por la enzima glicerol quinasa y oxidación a través de la enzima mitocondrial glicerol fosfato-ubiquinona oxirreductasa.

1.2.7 Metabolismo del metanol

Las levaduras metilotróficas contienen en su metabolismo una vía capaz de utilizar metanol como única fuente de carbono en condiciones aerobias. La oxidación completa del metanol a CO₂ y H₂O engloba tanto vías disimilatorias como asimilatorias (Figura I.8) (Harder & Veenhuis, 1989).

Según Harder & Veenhuis (1989) el metabolismo del metanol en las levaduras difiere, respecto al de las bacterias metilotróficas, en tres aspectos principales:

- *La naturaleza de las enzimas involucradas* – La oxidación inicial del metanol a formaldehído ocurre en la presencia de la enzima alcohol oxidasa, mientras que en bacterias esa oxidación es catalizada por la metanol dehidrogenasa;
- *La compartimentalización del proceso* – En las levaduras, parte de la oxidación del metanol ocurre en el interior de peroxisomas. De acuerdo con estos autores, durante el crecimiento celular en presencia de metanol, los peroxisomas pueden llegar a ocupar el 90% del volumen celular, mientras que en presencia de otras fuentes de carbono, como glucosa o el glicerol, su volumen, es inapreciable;

- *La vía de generación de energía* – En las bacterias la oxidación del metanol está acoplada a la cadena de transporte de electrones, mientras que en las levaduras se genera poder reductor en forma de NADH en reacciones posteriores a la oxidación del metanol en formaldehído, sea en su oxidación directa a CO₂ (ruta disimilatoria) o vía formación de triosas (ruta asimilatoria) y su posterior oxidación en el ciclo de los TCA. El NADH se produce en el citoplasma y se oxida a través de la enzima NADH deshidrogenasa, siendo después transportado hacia el interior de mitocondria (Figura I.8).

La regulación genética del metabolismo del metanol ha sido recientemente revisada por Hartner & Glieder (2006).

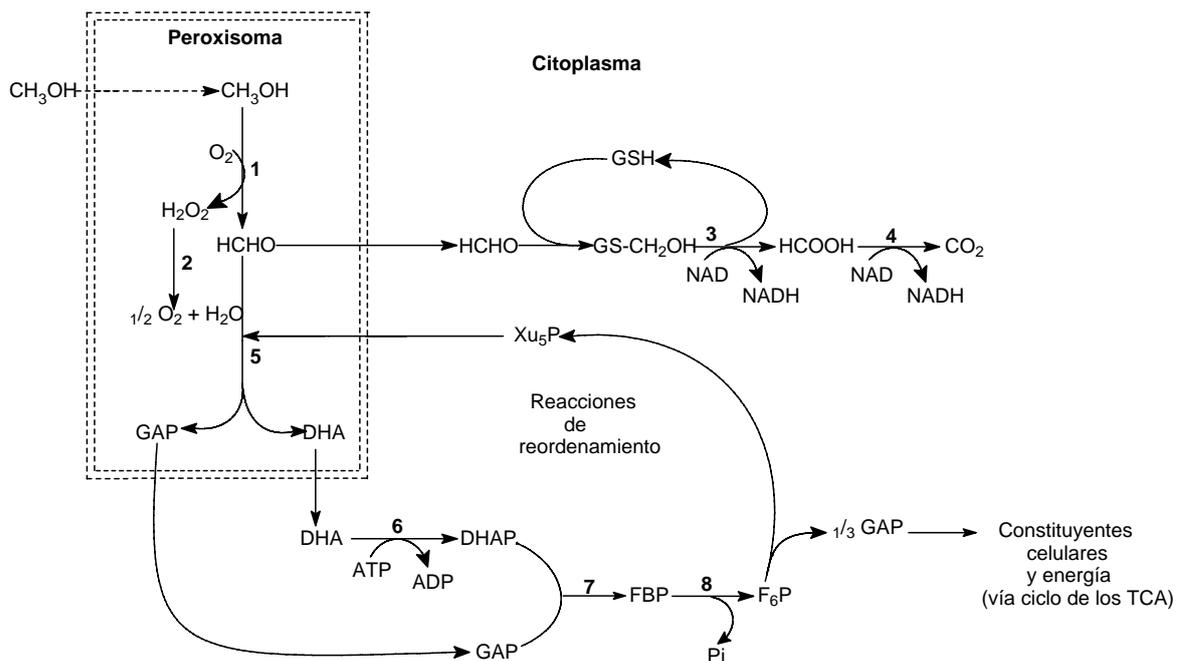


Figura I.8 Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas.

Notaciones de las enzimas involucradas: 1) alcohol oxidasa; 2) catalasa; 3) formaldehído dehidrogenasa; 4) formato dehidrogenasa; 5) dihidroxiacetona sintasa; 6) dihidroxiacetona quinasa; 7) fructosa 1,6 bifosfato aldolasa; 8) fructosa 1,6 bifosfatasa.

Referencia: Lin Cereghino & Cregg (2000).

1.2.7.1 Ruta disimilatoria del metanol

El metabolismo energético de las levaduras metilotróficas cuando crecen bajo metanol comienza inicialmente en el interior de los peroxisomas con la oxidación del metanol a formaldehído, produciendo también peróxido de hidrógeno, como subproducto de la reacción. Esta oxidación es realizada mediante de oxígeno molecular, que activa como aceptor final de electrones, y está catalizada por la enzima alcohol oxidasa (Harder & Veenhuis, 1989).

De acuerdo con van Dijken *et al.* (1976), citado en Harder & Veenhuis (1989), la enzima alcohol oxidasa funcional (AOX), es un homo-octámero agrupadas en dos tetrámeros, en la cual cada subunidad (masa molar total

de aproximadamente 74 kDa) contiene un enlace no covalente con nucleótidos de flavina (FAD⁺) como grupo prostético. Esta enzima codificada por el gen *AOX1*, presenta baja afinidad por el O₂; siendo la tasa de oxidación de metanol en suspensiones celulares linealmente proporcional a concentración de oxígeno disuelto en el medio (Harder & Veenhuis, 1989). La actividad catalítica de esta enzima está por debajo de sus condiciones óptimas, por lo que el organismo lo compensa con un aumento de su tasa de síntesis, con la finalidad de obtener elevadas concentraciones de la enzima. Este hecho es muy importante en la expresión de proteínas heterólogas que se hallan bajo el control del promotor del gen que codifica esta enzima (Cregg & Madden, 1989). Estudios posteriores mostraron la existencia de un segundo gen funcional de alcohol oxidasa en *P. pastoris*, (*AOX2*), el cual tiene 90% de homología en la región codificante con *AOX1*. Sin embargo esta enzima *AOX2* es sólo una pequeña parte de la *AOX* producida por esta levadura. La enzima *AOX* es una enzima clave para la asimilación del metanol, ya que el crecimiento de las células en medio conteniendo este substrato depende estrictamente de la presencia de esta enzima. La expresión de este gen está fuertemente regulada, cuando la levadura crece en medio conteniendo glucosa, etanol o glicerol, la producción de alcohol oxidasa no es detectable, sin embargo, cuando el medio contiene metanol los niveles de esta enzima pueden alcanzar hasta un 30% del valor correspondiente a de las proteínas solubles totales de la célula (Harder & Veenhuis, 1989).

La oxidación del metanol a formaldehído también resulta en la producción de peróxido de hidrógeno. Este subproducto es tóxico a nivel celular, por lo que sintetizan elevadas cantidades de la enzima catalasa, la cual degrada el peróxido a agua y oxígeno. Otra posible acción de esta enzima es como peroxidasa, oxidando el metanol, el formaldehído o el formato y usando peróxido de hidrógeno como agente oxidante (Harder & Veenhuis, 1989), (Tabla I.5).

Cabe destacar que la oxidación inicial del metanol a formaldehído no da lugar a ningún tipo de energía metabólica (sea en forma de poder

reductor, NADH, o en forma de ATP), afectando profundamente (negativamente) al rendimiento del crecimiento de éstos microorganismos respecto al metanol y oxígeno.

Tabla I.5 Posibles reacciones catalizadas por la catalasa durante el metabolismo del metanol en levaduras.

Modo de acción de la catalasa	Reacción catalizada
<i>Catalítica</i>	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
<i>Peroxidática</i>	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{HCHO} + 2 \text{H}_2\text{O}$
	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HCHO} \rightarrow \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O}$
	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HCOOH} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

Referencia: Harder & Veenhuis (1989).

La oxidación posterior del formaldehído hasta CO_2 ocurre en el citoplasma, y se realiza a través de dos enzimas dependientes de NAD^+ , estas enzimas son la formaldehído y formato dehidrogenasa (FLD y FMD, respectivamente).

La enzima formaldehído dehidrogenasa, solo es activa en presencia de glutatióna (GSH), un tiol tripéptido que forma parte de los sistemas de protección celular frente a determinadas condiciones de estrés nutricional, como la acumulación de elevadas cantidades de metanol o formaldehído (Penninckx, 2000); su sustrato no puede ser el formaldehído en la forma libre generado en la reacción posterior: para que la catálisis ocurra tiene lugar la formación de un tiohemiacetal, generado espontáneamente a través de la reducción de la glutatióna y del formaldehído, el producto de esa reacción es la S-hidroximetilglutatióna (Harder & Veenhuis, 1989).

La oxidación del producto obtenido en la reacción anterior es realizada a través de la enzima formaldehído dehidrogenasa, obteniendo como productos la glutatióna y el formato, además de una molécula de NADH. A continuación tiene lugar la oxidación del formato en CO_2 realizada

por la enzima formato deshidrogenasa. Esta reacción también resulta en la generación de poder reductor en forma de NADH. Este poder reductor es generado en el citoplasma de las células mediante la acción de la formaldehído y formato deshidrogenadas, en contraposición al NADH generado en la mitocondria a través del Ciclo de los TCA. No está claro el mecanismo mediante el cual las levaduras metilotróficas oxidan el NADH citosólico. De acuerdo con Moore & Rich (1980) citado por Harder & Veenhuis (1989), la oxidación del NADH citosólico formado a través de la ruta disimilatoria del metanol podría realizarse a través de una NADH dehidrogenasa localizada en la parte externa de la membrana mitocondrial interna que incorporaría los equivalentes reductores a la cadena respiratoria a nivel de ubiquinona (ver sección I.2.8), mientras que durante el crecimiento celular aeróbico en presencia de otras fuentes de carbono, la generación de energía depende de la enzima NADH dehidrogenasa situada en la cara interna de la membrana mitocondrial, la cual tiene la función de oxidar el NADH producido en el Ciclo de los TCA. En este último caso, se generan más moles de ATP a partir de un mol de NADH, lo que implicaría consecuencias energéticas importantes durante el crecimiento sobre metanol respecto a otras fuentes de carbono. En concreto, de acuerdo con Harder & Veenhuis (1989), durante el crecimiento anaerobio de las levaduras con fuente de más de un carbono, el rendimiento máximo teórico es de 3 moles de ATP formado para cada mol de NADH oxidado (porque la mayor parte de NADH siempre se genera en la matriz de la mitocondria), mientras que durante el crecimiento en presencia de metanol como fuente de carbono la producción de ATP a través de NADH sería de apenas 2 moles (ya que los equivalentes reductores se incorporan a nivel de la ubiquinona). No obstante, tal y como se expone a continuación, el metanol también puede ser asimilado vía Ciclo de los TCA, generando también NADH en la matriz de la mitocondria.

1.2.7.2 Vía asimilatoria del metanol

Uno de los principales problemas de las levaduras creciendo en la presencia de metanol como única fuente de carbono es la síntesis de enlaces carbono-carbono requerida como constituyente del material celular (Harder & Veenhuis, 1989).

Estudios llevados a cabo con levaduras metilotróficas revelaron la existencia de una ruta metabólica para la fijación del formaldehído y la realización de la síntesis de enlaces carbono-carbono para la generación de material celular a través de metanol, esta ruta es usualmente llamada de vía xilulosa monofosfato. Esta ruta se inicia en el interior de los peroxisomas y finaliza en el citoplasma (Harder & Veenhuis, 1989), (Figura I.8).

La reacción clave de este ciclo ocurre a través de la enzima transquetolasa, también llamada de dihidroxiacetona sintasa, esta enzima está presente en altas concentraciones celulares cuando el medio de cultivo contiene metanol, sin embargo, cuando se utiliza otra fuente de carbono esta no es detectable (Lin Cereghino & Cregg, 2000). El objetivo de esta enzima es la transferencia del grupo glicolaldehído de la xilulosa 5-fosfato (XU5P) al formaldehído, formando gliceraldehído fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona (DHA). Seguidamente la DHA es fosforilada a través de la enzima tioquinasa, siendo también llamada de dihidroxiacetona quinasa, resultando en la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). A continuación, ocurre la condensación del DHAP con GAP formando una molécula de fructosa 1,6 bifosfato (FBP). Esta condensación es realizada a través de la enzima fructosa 1,6 bifosfato aldolasa. Posteriormente, a través de la catálisis realizada por la enzima fructosa 1,6 bifosfatasa ocurre la formación de una molécula de fructosa 6-fosfato (F6P). Dos moléculas de F6P y una molécula de DHAP sufren un reordenamiento para formar tres moléculas de XU5P a través de la catálisis realizada por las enzimas transaldolasa, transquetolasa, pentosa fosfato isomerasa y epimerasa, el resultado de este ciclo es la formación de un mol de triosa fosfato para cada tres moles de

formaldehído y un gasto de tres moles de ATP (Harder & Veenhuis, 1989). Estudios realizados por Solà (2004) y Solà *et al.* (2007), a través de experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C en células de *P. pastoris*, revelaron que la triosa fosfato formada a partir de metanol puede ser utilizada tanto anabólicamente (síntesis de componentes celulares) como catabólicamente (obtención de energía vía ciclo de los TCA).

1.2.8 Fosforilación oxidativa

La respiración celular y la fosforilación oxidativa tienen lugar en las mitocondrias de los eucariotas, cuya membrana interna es impermeable a la mayoría de las pequeñas moléculas e iones, incluyendo los protones. En los procariotas, los cuales carecen de mitocondrias, las proteínas de la cadena de transporte electrónico de la respiración se encuentran en la membrana plasmática (Lehninger, 1993).

Los 12 pares de electrones involucrados en la oxidación de la glucosa no pasan directamente al oxígeno, sino que se transfieren a las coenzimas NAD^+ y FAD^+ , formándose un total de 10 NADH y 2 FADH_2 . Los electrones pasan entonces a la cadena de transporte electrónico donde participan (por la reoxidación mitocondrial del NADH y FADH_2) en un proceso de oxidación-reducción secuencial de determinados centros redox antes de reducir el oxígeno a agua. En este proceso, los protones son expulsados de la mitocondria, y la energía libre almacenada en el gradiente de pH resultante impulsa la síntesis de ATP, a partir de ADP y P_i , a través de la fosforilación oxidativa (Lehninger, 1993).

La reoxidación de cada NADH da lugar a la síntesis de 3 ATP y la de un FADH_2 a 2 ATP. El total por molécula de glucosa oxidada es pues de 38 ATP, 30 proceden de los 10 NADH , 4 de los 2 FADH_2 . Además en la glucólisis se producen 2 ATP por mol de glucosa y en el Ciclo de los TCA 2 GTP (= 2 ATP) por cada 2 de piruvato que entra en el ciclo.

La obtención de ATP a partir de la oxidación de NADH y FADH₂ se realiza mediante la fosforilación oxidativa. El primer paso es la entrada de los electrones en la cadena respiratoria. La mayoría de los electrones provienen de la acción de deshidrogenasas que recogen los electrones de los distintos procesos catabólicos y los canalizan hacia los aceptores universales de electrones (NAD⁺, NADP⁺, FMN o FAD). Entonces los electrones son transferidos a una serie de transportadores asociados a membrana. Estos transportadores son de naturaleza proteica y tiene grupos prostéticos capaces de aceptar/donar electrones. El movimiento de electrones por los transportadores se produce desde potenciales estándar de reducción bajos a otros más elevados. En la cadena respiratoria intervienen tres tipos de moléculas capaces de transportar electrones: la Ubiquinona o coenzima Q, los citocromos y las proteínas con agrupaciones sulfo-férricas (Lehninger, 1993).

El complejo I, también llamado NADH: ubiquinona oxidoreductasa transporta los electrones del NADH a la ubiquinona (Figura I.9 [a]).

El complejo II, es la succinato dehidrogenasa, única enzima del ciclo de los TCA unida a membrana, que pasa los electrones del FADH₂ a la Ubiquinona (Figura I.9 [b]).

El complejo III, también llamado citocromo bc₁ o complejo ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa, acopla la transferencia de electrones desde la ubiquinona al citocromo c (Figura I.9 [c]).

El complejo IV, también llamado citocromo oxidasa, es la última etapa de la cadena de transporte electrónico de la respiración y conduce los electrones desde el citocromo c hasta el último aceptor de los electrones, el oxígeno que se reduce a agua (Figura I.9 [d]).

La síntesis de ATP a partir de ADP y Pi en las mitocondrias está catalizada por la ATP sintasa (complejo V), y está impulsada mediante el proceso de transporte electrónico anterior. Para ello, la energía liberada durante el transporte debe conservarse en una forma que pueda ser usada por la ATP-sintasa. Esto se conoce como *acoplamiento de energía* o

transducción de energía. Para explicar tal acoplamiento, existen distintas hipótesis. La teoría más aceptada es la de Mitchell, que propone que los transportadores de electrones además de transportar electrones bombean protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana en contra de gradiente, para ser llevado a cabo este proceso endergónico es acoplado a la energía producida por el transporte de electrones a favor de gradiente, de modo que se crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna. El potencial electroquímico de este gradiente es aprovechado por la ATP sintasa para sintetizar ATP. La ATP sintasa transporta los protones a la matriz mitocondrial a favor de gradiente y acopla este proceso exergónico a síntesis de ATP (Zagoya & Gomez 1995; Flores *et al.*, 2000).

De esta forma, el transporte electrónico provoca que los complejos I, III y IV transporten protones a través de la membrana mitocondrial interna desde la matriz (una región de baja concentración de protones y potencial eléctrico negativo), al espacio intermembranal (una región de elevada concentración de protones y potencial eléctrico positivo). La energía libre secuestrada por el gradiente electroquímico resultante impulsa la síntesis de ATP por la acción de la ATP-sintasa.

La ATP sintasa translocadora de protones es la estructura más compleja de la membrana mitocondrial, contiene dos subestructuras principales (F_0 y F_1) cada una con una función determinada, F_0 es una proteína submembranal insoluble en agua y que contiene un canal para la translocación de los protones. F_1 es una proteína periférica de membrana, soluble en agua, que participa directamente en la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i (Lehninger, 1993).

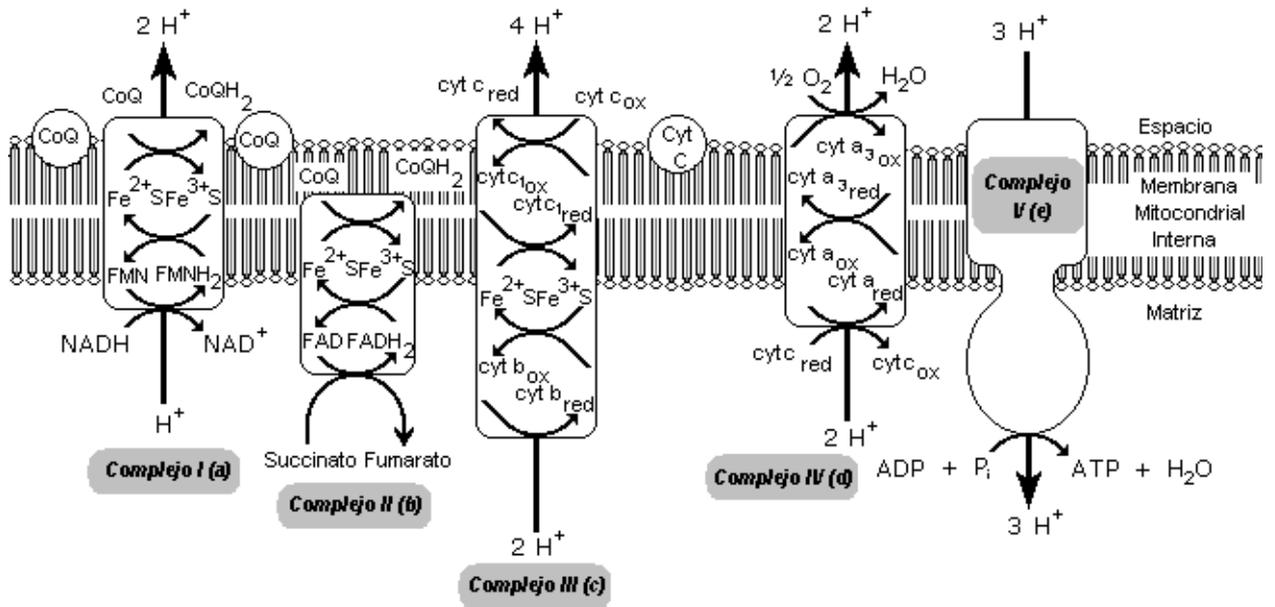


Figura I.9 Esquema general de la fosforilación oxidativa con los cinco complejos implicados en el proceso.

Las cajas en blanco representan las reacciones de oxidación-reducción que ocurre en cada complejo, estos compuestos son electrones móviles. Las notaciones utilizadas son: FMN: flavina mononucleótido; Fe²⁺S: centro sulfo-férricas reducido; cyt: citocromo; CoQ: coenzima Q.

Referencia: Adaptado de www.gwu.edu/~mpb

Un importante parámetro en cultivos aeróbicos y relacionado con la producción de biomasa, es el coeficiente de eficiencia de fosforilación/oxidación (P/O-medio). Los primeros estudios llevados a cabo sobre el P/O-medio en mitocondrias de levaduras datan de los años sesenta y setenta. Estudios realizados por Lloyd (1974) y citado por Verduyn (1991) constató que el valor del P/O-medio de *S. cerevisiae* es menor que en *Candida utilis* y en células de mamíferos, debido a la falta de translocación de protones en el complejo I, es decir, el complejo no está operativo; además, los equivalentes de reducción son incapaces de atravesar la membrana mitocondrial interna. Por lo tanto, el *pool* de equivalentes de reducción citosólico es separado del *pool* mitocondrial, es decir, los equivalentes de reducción que están situados en el citoplasma no pueden atravesar la membrana mitocondrial. En un artículo de revisión publicado por Vries &

Marres (1987) y citado por Verduyn (1991), relataron que existe tanto en el citoplasma como en la mitocondria el enzima NADH dehidrogenasa que es responsable de la catálisis de la oxidación del NADH. La oxidación del NADH citosólico es siempre realizada por un *by-pass* de translocación de protones del complejo I. Según Verduyn (1991), estudios llevados a cabo con mitocondrias de ratones, sugieren que el P/O-medio para la oxidación del NADH mitocondrial está entre 1,5 y 2,5, con la translocación de dos o tres protones por complejo. Ouhabi *et al.* (1989) citado por Verduyn (1991) reportaron que para la oxidación de etanol, a través de la enzima alcohol dehidrogenasa en *S. cerevisiae*, el P/O-medio obtenido fue de 1,5, mientras que para la oxidación del NADH citosólico o glicerol fosfato el P/O-medio fue de 1,25. Según Verduyn (1991), la levadura *S. cerevisiae* presenta una cadena de transporte de electrones simétrica, siendo que el P/O-medio no depende de la localización de los equivalentes de reducción, de la fuente de carbono y de energía. Sin embargo, en *C. utilis* la relación del P/O-medio y la fuente de carbono y energía es muy compleja, pues la cadena de transporte de electrones no es simétrica.

Otra observación importante es que la estequiometría de translocación de protones no es constante, experimentos llevados a cabo con mitocondrias de ratones y de levaduras sugieren que la estequiometría entre H^+/e^- es variable. En mitocondrias de ratones, el cambio de la estequiometría de H^+/e^- está localizada a nivel del citocromo c oxidasa, y aumenta con la disminución de la fuerza protón motriz; en cambio, en mitocondria de *S. cerevisiae*, el P/O-medio presenta un aumento en virtud de la fuerza protón motriz.

Estudios realizados por van Gulik & Heijnen (1995) con la levadura *S. cerevisiae*, obtuvieron un P/O-medio de 1,20 (mol de ATP/mol de O). En un otro estudio realizado por Vanrolleghem *et al.* (1996), el P/O-medio obtenido para *S. cerevisiae* fue de 1,09 (mol de ATP/mol de O). Según estos autores las ecuaciones generales para la fosforilación oxidativa en relación al P/O-medio puede ser expresada como:



1.2.9 Biosíntesis de aminoácidos

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que presentan un radical carboxilo (-COOH), amino (-NH₂), hidrógeno (-H) y cadena lateral (R), todos ellos unidos al carbono α. Los aminoácidos son distintos entre sí por las diferencias que poseen en la cadena R. El primer grupo están los aminoácidos con cadena R neutra (apolares, hidrofóbicos), el segundo grupo, el de los aminoácidos polares, se subdivide en neutros (hidrofílicos) y ácidos (Zagoya & Gomez, 1995).

Cerca de la mitad de los 20 aminoácidos que se hallan en la estructura de las proteínas (también llamados de proteinogénicos) son sintetizadas a través de reacciones simples, a partir de intermediarios de las vías metabólicas centrales, ciclo de los TCA, EMP y ruta de las PP. Microorganismos como *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. pastoris* poseen las enzimas necesarias a la síntesis de todos los 20 aminoácidos (Szyperski, 1995; Maaheimo *et al.*, 2001; Solà *et al.*, 2004). Recientemente, Solà *et al.* (2004) demostraron que las rutas de biosíntesis de aminoácidos de *P. pastoris* son esencialmente idénticas a las descritas para levadura *S. cerevisiae*. La biosíntesis de los aminoácidos en levaduras ocurre en el citoplasma y en la mitocondria, además son provenientes de los siguientes precursores metabólicos del metabolismo central de las levaduras, (Figura I.10):

- 1) α-cetoglutarato y piruvato mitocondriales, intermediarios del ciclo de los TCA;
- 2) 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, intermediarios de la vía EMP;

- 3) eritrosa-4-fosfato y ribosa-5-fosfato, intermediarios de la vía de las PP;
- 4) acetil-CoA (citoplasmático y mitocondrial) y oxaloacetato (citoplasmático).

Existe, por lo tanto, una correspondencia entre cada átomo de carbono de éstos compuestos y los átomos de carbonos de los aminoácidos a los cuales dan lugar (Figura I.10). De acuerdo con Zagoya & Gomez (1995), en la síntesis de los aminoácidos es posible considerar tres aspectos esenciales:

- a) La formación del grupo α -amino.* Implica la incorporación de amonio para formar el grupo α -amino del glutamato y posteriormente su transferencia para originar el grupo α -amino de los otros aminoácidos. Este proceso reviste especial interés, ya que conduce a la incorporación de nitrógeno inorgánico a compuestos orgánicos.
- b) La formación del esqueleto de carbono.* El esqueleto de carbono de los aminoácidos se deriva por lo general de compuestos intermediarios de la glucólisis, ciclo de los TCA o de la vía de las pentosas; a partir de estas vías metabólicas se derivan varias ramas que conducen a la síntesis de los diversos aminoácidos. Los aminoácidos se han agrupado en familias según su origen biosintético (Tabla I.6).
- c) La formación de los grupos funcionales de la cadena lateral.* En este aspecto destacan la incorporación de azufre inorgánico en la formación del grupo sulfhidrilo de la cisteína y la formación de los grupos guanidino, imidazol, indol, hidroxilo y amida, característicos de diversos aminoácidos.

Las reacciones de biosíntesis (estequiometría) de los 20 aminoácidos se encuentran descritas en la sección de anexos, apartado A.II.1.1.

Tabla I.6 Familias de aminoácidos según su síntesis a partir de un precursor común.

<i>Familia</i>	<i>Aminoácido que la constituyen</i>	<i>Precursor común (vía metabólica)</i>
<i>Glutamato</i>	Glutamato Glutamina Prolina Arginina Lisina	α -cetoglutarato (ciclo de los TCA)
<i>Serina</i>	Serina Glicina Cisteína	3-fosfoglicerato (vía EMP)
<i>Aspartato</i>	Aspartato Asparagina Lisina Metionina Treonina Isoleucina	Oxaloacetato citosólico Acetil-CoA (para la Lisina)
<i>Piruvato</i>	Alanina Isoleucina Valina Leucina	Piruvato (vía EMP) Acetil-CoA (ciclo de los TCA, para la Leucina)
<i>Aminoácidos aromáticos</i>	Fenilalanina Tirosina Triptófano	Eritrosa-4-fosfato (vía de las PP) Fosfoenolpruvato (vía EMP)
<i>Histidina</i>	Histidina	Ribosa-5-fosfato (vía de las PP)

Referencia: Adaptado de Zagoya & Gomez (1995).

La síntesis de aminoácidos está sujeta a distintos mecanismos reguladores, dado que se requieren proporciones precisas de estas moléculas que aseguren una óptima síntesis de proteínas; su estudio ha ayudado a comprender los mecanismos que regulan tanto la expresión genética como la actividad enzimática (Zagoya & Gomez, 1995).

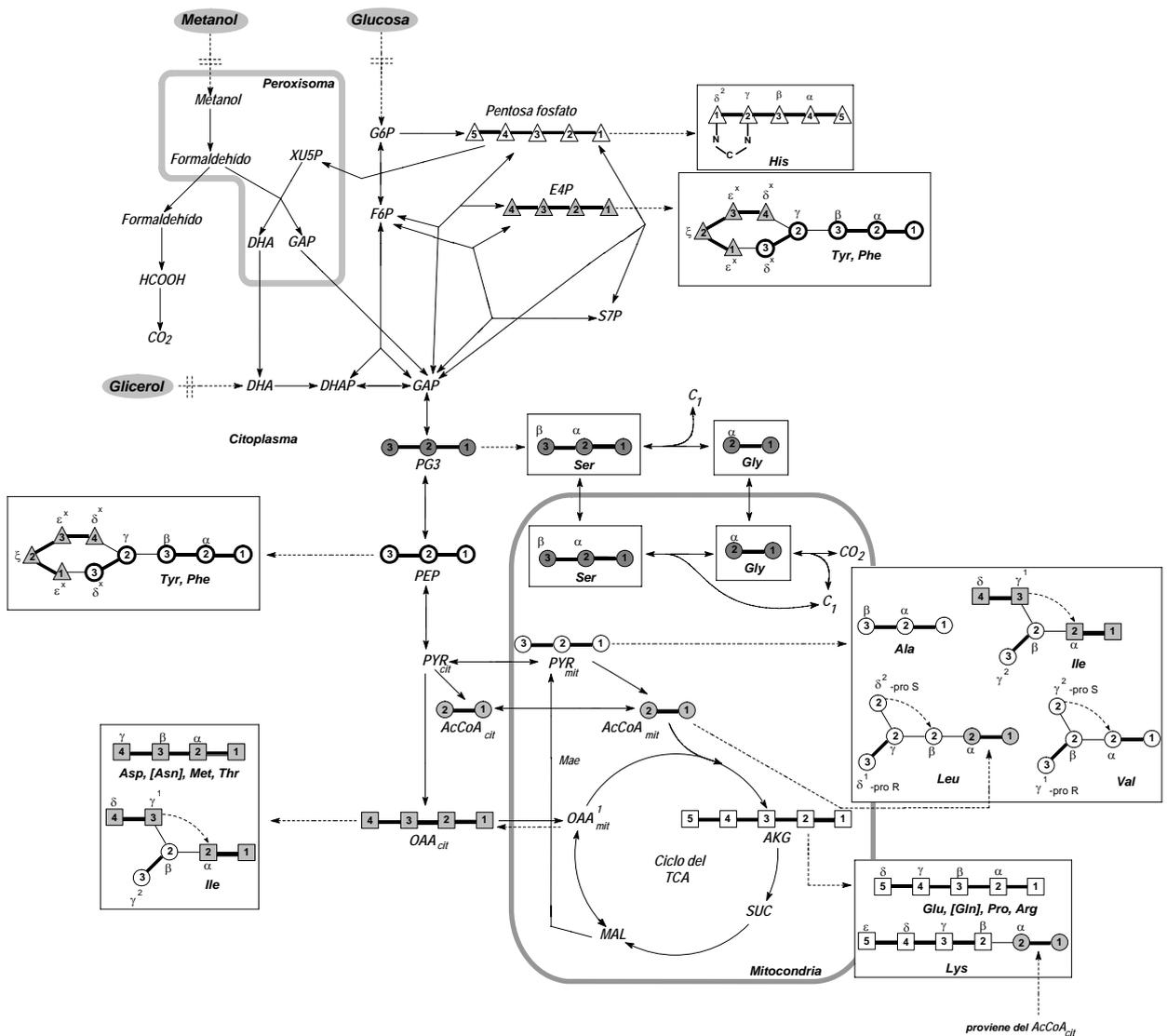


Figura I.10 Orígenes de los esqueletos de carbono de los diferentes aminoácidos proteínogénicos a partir sus precursores. Las líneas espesas corresponden a los enlaces carbono-carbono intacto de los fragmentos formados a través de moléculas intermediarias elementales, mientras que, las líneas finas corresponden a los enlaces entre átomos de carbono que provienen de diferentes metabolitos.

Referencia: Adaptado de Solà *et al.* (2007).

I.3 Objetivos

El presente trabajo de investigación está integrado dentro del Grupo de Ingeniería de Bioprocesos y biocatálisis aplicada del Departamento de Ingeniería Química de la UAB que centra sus actividades principales en el desarrollo y optimización de procesos de producción de proteínas recombinantes en la levadura *P. pastoris*, e incluyen la caracterización de su metabolismo con el objetivo de establecer una base de conocimiento para diseñar futuras estrategias de ingeniería metabólica

Este trabajo tiene como objetivo principal abordar el análisis de flujos metabólicos en la red de reacciones metabólicas del metabolismo central del carbono de la levadura *P. pastoris* mediante tres metodologías distintas de análisis de flujos metabólicos (MFA), así como el análisis estructural mediante módulos elementales. Además de establecer estas metodologías para el estudio del metabolismo de *P. pastoris*, también se pretende explorar su uso o aplicación combinada para así enriquecer al máximo la información obtenida sobre el sistema biológico.

Los objetivos específicos de este trabajo consisten en:

- i. Validación y reconciliación los datos fisiológicos experimentales previamente obtenidos por A. Solà (Solà, 2004) en cultivos en quimiostato, a través de balances materiales y análisis estadísticas, y describir ecuaciones de biomasa para la levadura *P. pastoris* creciendo en distintas fuentes de carbono, con base a datos reconciliados estadísticamente. En los casos en que los datos fisiológicos esenciales sean incompletos, realizar cultivos réplica.
- ii. Construcción de un modelo estequiométrico compartimentalizado para el metabolismo central del carbono de *P. pastoris*, considerando citoplasma, mitocondria y peroxisomas como compartimentos subcelulares, tomando como punto de partida la estructura de la red de reacciones bioquímicas descrita para el metabolismo central del carbono de *S. cerevisiae* creciendo en glucosa como única fuente de carbono, y

adaptando dicha red para la asimilación de otras dos fuentes de carbono, glicerol y/o metanol, de acuerdo con la información disponible en la bibliografía, y con datos experimentales de marcaje isotópico realizados anteriormente por A. Solà.

- iii. Determinación de la distribución de los flujos de carbono a través de la red metabólica en estado estacionario mediante la metodología clásica de análisis de flujos metabólicos (MFA), utilizando técnica de optimización lineal, como una primera aproximación al análisis de flujos metabólicos en la red descrita anteriormente.
- iv. Análisis de flujos metabólicos con restricciones derivadas de medidas experimentales de relaciones entre flujos metabólicos (cocientes de flujos) obtenidas mediante experimentos de marcaje isotópico combinados con RMN, con base a la aproximación descrita por Fischer *et al.* (2004). En esta metodología, a diferencia del MFA clásico, los balances de cofactores NADH y NADPH no se consideran en la ecuaciones estequiométricas, hecho que puede suponer una ventaja, ya que el balance exacto de estos cofactores en *P. pastoris* se desconoce y a priori se debe asumir el de *S. cerevisiae*.
- v. Diseño experimental de experimentos de marcaje isotópico para la determinación experimental de flujos metabólicos, particularmente en aquellas reacciones de la red metabólica para los cuales el protocolo de marcaje usado anteriormente no nos proporciona información (por ejemplo, ruta de las PP). Para este propósito se plantea realizar una primera aproximación al uso de la metodología de superficie de respuesta, con el objetivo de determinar una estrategia de marcaje para el cultivo de *P. pastoris* crecida en glicerol como fuente de carbono. Además, se plantea poner a punto un protocolo de *quenching* y extracción de metabolitos para la cuantificación, y determinación de patrones de marcaje de los metabolitos intermediarios mediante LC-MS/MS, con el objetivo final de realizar el análisis de flujos metabólicos basado en ^{13}C utilizando el software *^{13}C -Flux* (Wiechert, 2003). Cabe destacar que esta metodología tampoco requiere conocer los balances de

ATP, NADH y NADPH, con lo que una vez calculados los flujos metabólicos mediante ^{13}C -MFA, se puede inferir el balance redox y de ATP. Finalmente, se pretende comparar en paralelo los flujos metabólicos obtenidos mediante ^{13}C -MFA con el cálculo de flujos metabólicos basados en las restricciones derivadas del análisis de cocientes de flujos mediante ^{13}C -RMN. Con ello, también se pretende establecer cual es la mejor metodología que proporciona mayor información acerca del metabolismo celular de *P. pastoris*, o como se podrían combinar ambas metodologías con el mismo objetivo.

- vi. Explorar la metodología de análisis de módulos elementales, como herramienta complementaria al MFA. Concretamente, el análisis de módulos elementales es una herramienta matemática que permite definir y describir de manera sistemática todas las subredes metabólicas que son a la vez estequiométricamente y termodinámicamente posibles para un grupo de enzimas de una red metabólica. Además de establecer los principales módulos elementales activos en la red metabólica para distintas situaciones de cultivo, también se pretende realizar una primera aproximación de cálculo de flujos metabólicos a través de esta metodología, integrando también datos experimentales de cocientes de flujos determinados por A. Solà como restricciones. Para implementación de esta metodología se utilizó el software *FluxAnalyzer* (Klamt *et al.*, 2003) y Matlab como herramientas computacionales.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

II.1 Materiales

II.1.1 Microorganismo

Para la realización de los estudios computacionales de análisis de flujos metabólicos y de módulos elementales se utilizó la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como microorganismo modelo.

Los datos experimentales fueron mayoritariamente obtenidos de cultivos realizados por A. Solà (Solà, 2004) y S. Zinke (Zinke, 2007). Los experimentos fueron llevados a cabo con una cepa de *P. pastoris* X-33/pPICZ α A-ROL (Minning *et al.*, 2001) que expresa el gen heterólogo de la lipasa de *Rizopus oryzae* (ROL), bajo el control transcripcional del promotor *AOX1*, conforme lo descrito por Minning *et al.* (2001).

II.2 Métodos

II.2.1 Métodos experimentales

II.2.1.1 Fermentación

Los estudios de fermentación fueron llevados a cabo primeramente por A. Solà (Solà, 2004, Solà *et al.*, 2004 y 2007); estos cultivos fueron realizados con diferentes fuentes de carbono y en diferentes velocidades específicas de crecimiento ($\mu = 0,05$ y $0,16 \text{ h}^{-1}$). Todos los cultivos fueron operados en quimiostato.

Concretamente, los estudios fueron realizados con un medio de cultivo definido y tres fuentes de carbono distintas: glucosa, glicerol o metanol. Además, se realizaron cultivos con mezclas de glicerol y metanol en las siguientes proporciones: 20% de glicerol y 80% de metanol; 40% de glicerol y 60% de metanol y 80% de glicerol y 20% de metanol. Todos los cultivos fueron realizados a una temperatura de 30°C y pH 5,5. Todos los reactivos y las condiciones de cultivo están descritos en Solà (2004) y Solà *et al.* (2004 y 2007).

Para aquellos cultivos donde A. Solà no obtuvo medidas de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, o estas medidas no fueron fiables, se han realizado cultivos-réplica en el presente trabajo, siguiendo la misma metodología. Así mismo, S. Zinke (Zinke, 2007) también llevó a cabo estudios en quimiostato adicionales con la misma cepa de *P. pastoris* a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ utilizando glicerol como única fuente de carbono, conforme la metodología descrita por A. Solà (Solà, 2004), con el fin de realizar experimentos de marcaje isotópico complementarios a los realizados anteriormente por A. Solà.

II.2.1.2 Análisis químicos

En todos los cultivos realizados se realizaron análisis para determinar la concentración de los gases oxígeno y dióxido de carbono a la salida del reactor, concentración de la biomasa generada y análisis elemental de la misma, así como concentración de substratos (metanol y/o glicerol, o glucosa) y principales subproductos del metabolismo de *P. pastoris* (ácido acético, etanol, formaldehído y ácido fórmico). Los métodos analíticos utilizados están descritos en Solà, (2004) y Solà *et al.* (2004 y 2007).

II.2.1.2.1 Determinación de la masa molecular

Según Russell (1980) la fórmula molecular de un determinado compuesto químico o bioquímico expresa el número de átomos de cada elemento que forman una molécula. A través del análisis elemental es posible escribir la "fórmula mínima" de un microorganismo, cuya composición elemental se encuentran siempre presentes carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. La mayoría de ellos también incluye en su composición un porcentaje considerable de azufre y elementos metales inorgánicos como el fósforo, hierro, zinc, o molibdeno, que son considerados como cenizas.

Los procedimientos experimentales para determinar la composición porcentual en C, H, N y S se describen en Solà (2004); los análisis fueron realizados por el Servicio de Análisis Químicas de la UAB.

El procedimiento para determinar la fórmula molecular fueron los mismos descritos en Russell (1980), el cual consiste en dividir cada uno de los porcentuales de C, H, N y S por el correspondiente valor de peso atómico, obteniéndose el número de átomos de cada elemento en 100 g de muestra. Los valores obtenidos fueron normalizados con el valor obtenido para el átomo de carbono.

II.2.1.2.2 Determinación de proteína total

El método utilizado para determinación del contenido de proteínas totales en la levadura *P. pastoris* fue el método modificado de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). El principio de este método se basa en la mezcla de molibdato, tungstato y ácido fosfórico (reactivo Folin-Ciocalteu) que sufre una reducción cuando es reaccionado con las proteínas, en presencia del catalizador cobre (II). La intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes y enlaces peptídicos y varía según la clase de proteína. La solución azul muestra una absorbancia máxima a 750 nm.

Una alícuota de 0,5 mL de una suspensión de biomasa liofilizada (500 µg/mL) fue adicionada a 0,5 mL de NaOH 1M, la mezcla resultante fue hervida a 100°C durante 10 minutos; después dejarla enfriar, se adicionaron 0,5 mL de una solución preparada previamente con Na₂CO₃, CuSO₄ ·5H₂O y tartarato de Na-K. La solución resultante se agitó y después de 10 minutos se añadió 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu, dejándose en reposo en la ausencia de luz durante 30 min. A continuación, se midió la absorbancia de dicha mezcla a 750 nm. Para determinar la concentración de proteínas presente en la muestra, se utilizó una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovina (40-400 µg de proteínas/mL). Los análisis, para todas las condiciones de cultivo, fueron realizados por triplicado.

II.2.1.2.3 Determinación de carbohidratos

Para la determinación de carbohidratos, se utilizó el método colorimétrico fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), que se basa en la determinación de azúcares simples, polisacáridos y sus derivados, incluyendo sus metil ésteres con grupos reductores libres, después de la deshidratación de dichos carbohidratos por el ácido sulfúrico y subsecuente complejación de los productos formados con el fenol. El cambio de color de

las soluciones medidas en la región del visible es proporcional a la cantidad de carbohidratos presente en la muestra. La reacción es sensible y presenta un color amarillo pálido estable.

La biomasa liofilizada fue resuspendida en agua destilada; una alícuota de 1 mL de esta suspensión se mezcló con 1 mL de fenol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. El producto obtenido fue leído en espectrofotómetro a una absorbancia de 488 nm. Para determinar la concentración de carbohidratos totales en la muestra, se utilizó una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de glucosa (0-100 mg/L). Los análisis, para todas las condiciones de cultivo, se realizaron por triplicado.

II.2.1.2.4 Determinación de ácidos nucleicos (DNA y RNA)

La determinación de ácidos nucleicos (DNA y RNA) se basa en la cuantificación de la pentosa presente en la cadena. La presencia de la pentosa permite la cuantificación del anillo furanósico. Así, los desoxirribósidos pueden ser cuantificados por la reacción de la difenilamina (DNA) y los ribósidos por la reacción del orcinol (RNA).

II.2.1.2.4.1 Determinación del contenido de DNA

La concentración de DNA en células de *P. pastoris* se determinó mediante el método de la difenilamina (Burton, 1956). Este colorante reacciona selectivamente con 2-deoxipentosas. En disolución ácida la deoxipentosa se convierte en el reactivo β -hidroxilevulín aldehído que reacciona con la difenilamina para dar un compuesto azul.

Veinte cinco miligramos de biomasa liofilizada se resuspendieron en 10 mL de HClO_4 0,2 N y se llevó a 40°C durante 15 min; seguidamente, se centrifugó a 6000 rpm. Al precipitado se le añadió 10 mL de una solución de cloroformo y metanol (2:1) que fue centrifugado a 6000 rpm durante 5 min. Al precipitado resultante se le adicionó 5 mL de HClO_4 0,5 N y se mantuvo a

70°C durante 45 min; seguidamente se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. A tres alícuotas del sobrenadante (0,5, 1 y 1,5 mL) se les adicionaron HClO₄ 0,5 N hasta completar 2 mL, y seguidamente se les añadieron 4 mL de una solución de difenilamina (solución de difenilamina en una solución de ácido sulfúrico en ácido acético); la mezcla resultante se incubó a 30°C por un periodo de 16-24 h y posteriormente se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Para determinar la concentración de DNA en la muestra, se utilizó una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de patrón de DNA-Na de salmón (0,1 a 0,5 g de DNA disuelto en HClO₄ 0,5 N y posteriormente en una solución de cloroformo y metanol (2:1)). Los análisis, para todas las condiciones de cultivo, fueron realizados por triplicado.

II.2.1.2.4.2 Determinación del contenido de RNA

La cuantificación del contenido de RNA en células de *P. pastoris* fue realizada mediante el método del orcinol (Ceriotti, 1955). Este método se basa en la formación del furfural (reacción de una aldopentosa con ácido clorhídrico) en medio ácido con el orcinol formando un complejo de color azul-verdeado.

A 25 mg de biomasa liofilizada se le añadieron 10 mL de HClO₄ 0,2 N y se incubó a 4°C durante 15 min antes de ser centrifugado a 6000 rpm. Al precipitado se le añadió 10 mL de una solución de cloroformo y metanol (2:1) que fue posteriormente centrifugada a 6000 rpm por 5 min. Al precipitado obtenido después de la centrifugación se le añadieron 2 mL de KOH 0,3 N y se incubó a una temperatura de 30°C durante 18-24 h. A continuación, la muestra resultante fue enfriada, se le ajustó el pH a 1 con HClO₄ concentrado y se centrifugó a 6000 rpm durante 6 min. Al precipitado resultante se le añadió 1 mL de HClO₄ 0,2 N se centrifugó a 6000 rpm durante 6 min; el sobrenadante obtenido se mezcló con el sobrenadante de la etapa anterior. Se tomaron tres alícuotas de 0,10, 0,20 y 0,30 mL de dicha mezcla, a las que se adicionó agua destilada hasta alcanzar 2 mL de

volumen total y en seguida se adicionó 2 mL de una solución de orcinol (2g/5mL de etanol 95%) y 4 mL de una solución de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 200 mL de ácido clorhídrico concentrado). La mezcla resultante se incubó a 100°C por un periodo de 35 min y seguidamente se enfrió en un baño termostático a temperatura ambiente. La muestra fue leída a una absorbancia de 665 nm. Para determinar la concentración de RNA en la muestra, se utilizó una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de ribosa (2 mg de ribosa en 20 mL de cloroformo). Los análisis, para todas las condiciones de cultivo, fueron realizados por triplicado.

II.2.1.2.5 Determinación de lípidos totales

Los análisis de lípidos totales fueron realizados en duplicado con células liofilizadas de *P. pastoris*. Se realizó una extracción con hexano (tres veces) de las muestras de células liofilizadas (10 mg) en ultrasonidos durante 10 min. El extracto obtenido fue pesado y la diferencia entre el peso de muestra inicial y del extracto correspondió al porcentaje de lípidos contenidos en las células. Los análisis fueron realizados por los Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

II.2.1.2.6 Análisis de los aminoácidos proteinogénicos por espectrometría de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones (2D-RMN)

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica basada en la medición de absorción y radiación de radiofrecuencia por un núcleo en un campo magnético fuerte. La absorción de la radiación hace que el *spin* nuclear se alinee o gire en dirección de mayor energía. Los espectros de RMN pueden ser obtenidos en una dimensión (1D) o multidimensionales (2D, 3D, etc.), (Esta técnica y sus aplicaciones en el

análisis del metabolismo celular serán descritas con más detalle en el Capítulo V, apartado V.1.1).

Los análisis de los aminoácidos proteínogénicos con los diferentes estados de marcaje (provenientes de la hidrólisis ácida de células de *P. pastoris* marcadas isotópicamente, según metodología descrita por Solà, 2004) fueron determinados a través de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear (Varian Inova 600 MHz), de acuerdo con la metodología descrita en Solà (2004). En síntesis, se obtuvieron espectros en dos dimensiones 2D[¹³C,¹H]-COSY para las resonancias alifáticas y aromáticas a una temperatura de 40°C, operando a una frecuencia de resonancia de ¹H de 600 MHz, tal y como se describe en Szyperski (1995). Los espectros fueron procesados a través del software estándar Varian spectrometer software VNMR, versión 6.1. La integración de las estructuras escalares finas ¹³C-¹³C a partir del 2D[¹³C,¹H]-COSY, el cálculo de las abundancias relativas de los diferentes fragmentos de carbono que proviene de una misma molécula de fuente de carbono alimentada (valores *f*), así como el cálculo de cocientes de flujos a través de rutas clave del metabolismo a partir de las abundancias relativas de fragmentos de carbonos intactos presentes en los ocho intermediarios principales que unen el metabolismo central del carbono y la biosíntesis de los aminoácidos, se realizó con el auxilio del programa FCAL versión 2.3.1, (Szyperski *et al.*, 1999).

Los análisis de RMN y cálculos de cocientes de flujos metabólicos fueron realizados por Hannu Maaheimo y Paula Jouhten (Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, VTT Biotechnology, Helsinki, Finlandia).

II.2.1.2.7 Análisis de metabolitos intermediarios y aminoácidos libres por cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem o doble masa (LC-MS/MS) es una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad, que combina la energía de la separación del

soluto por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la energía de la detección de la espectrometría de masas (MS) (en el Capítulo V, apartado V.1.2 se proporcionan más detalles de esta técnica y su aplicación en el análisis del metabolismo).

Los análisis de los metabolitos intermediarios y de aminoácidos libres extraídos de células de *P. pastoris* marcadas isotópicamente fueron realizados con un sistema de LC-MS/MS, de acuerdo con la metodología descrita por de Koning & van Dam (1992). Cada muestra (extracto celular de *P. pastoris*) se analizó por quintuplicado.

La etapa de parada del metabolismo celular (*quenching*) consistió en pipetear un volumen de 5 mL de muestra del cultivo a un tubo de centrífuga de 30 mL de volumen con 15 mL de metanol a una temperatura aproximada de -50°C (el tiempo entre la toma de muestra y el *quenching* debe realizarse en un tiempo inferior a 5 segundos). Los tubos con 60% de metanol se encuentran previamente congelados a -80°C, unos momentos antes de la toma de muestra, se sacan del congelador; el momento en el cual esta solución de metanol se descongela, su temperatura es de aproximadamente -50°C. La muestra resultante se mezcló y centrifugó a -20°C a una velocidad de 8.500 rpm (10.000 ×g) durante 5 minutos en una centrifuga refrigerada modelo J2-21M/E Beckman. El supernadante se decantó y el *pellet* fue resuspendido en 1 mL de metanol 100% a -20°C y 1 mL tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a pH 7,00), en un vórtex.

Posteriormente, se realizó la etapa de extracción de los metabolitos celulares; para ello, se adicionó 2 mL de cloroformo a -20°C a la muestra obtenida de la etapa anterior, y se incubó la mezcla resultante en un agitador orbital a una temperatura de -20°C durante 2 horas. La mezcla obtenida se centrifugó a -20°C, a 8.500 rpm (10.000 ×g) durante 10 min; la fase acuosa conteniendo metanol se transfirió a otro tubo que fue posteriormente filtrada con un filtro de 0,2 µm (Millex GP Syringe Driven Filter Unit, Millipore). Estas muestras se almacenaron a -20°C, para su posterior análisis por LC-MS/MS.

Los análisis fueron realizados en un sistema de LC-MS/MS modelo API 4000™ (Applied Biosciences) utilizando una columna de 150 × 2,0 mm (tamaño de partícula de 4 μm) modelo Synergy Hydro (Phenomenex); también se usó una precolumna Hydron 4 × 2,00 mm (4 μm) (Phenomenex) y un soporte precolumna (Phenomenex). Los análisis fueron realizados con los solventes tributilalanina, ácido acético y metanol (con pureza cromatográfica). Todos los análisis fueron realizados por Bianca Klein (Instituto de Biotecnología de la Universidad de Jülich, Jülich, Alemania).

Los resultados obtenidos (representados por espectros) fueron tratados (integración automática de los picos de los espectros) mediante el software Analyst® 1.4.4 (Applied Biosciences).

II.2.1.2.8 Análisis de ¹³CO₂

La cuantificación del ¹³C incorporado al CO₂ producido durante un cultivo con una fuente de carbono marcada con ¹³C (por ejemplo, glicerol), fue obtenida a través del atrapamiento del CO₂ en los gases de salida del fermentador, los cuales fueron burbujeados en un frasco con 100 mL de una solución de KOH 10M por el periodo de un tiempo de residencia. El carbonato resultante (¹³CO₃⁼) fue cuantificado por espectrometría de ¹³C-RMN (espectrómetro de RMN Bruker 500 Avance) según la metodología descrita en Solà *et al.*, 2007. El enriquecimiento en ¹³C del CO₂ fue estimado comparando el contenido ¹³C en aniones de carbonato en las muestras correspondientes sin y con marcaje isotópico. Los análisis de ¹³CO₂ fueron realizados por el Prof. Francesc Sànchez (Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la UAB).

II.2.2 Métodos Computacionales

Tal y como se ha mencionado en el Capítulo I, este trabajo de investigación tiene como principal objetivo el análisis de flujos metabólicos en el metabolismo central de *P. pastoris* utilizando las metodologías del análisis de flujos metabólicos (MFA) clásico, el MFA con restricciones basadas en datos experimentales de ^{13}C -RMN, el MFA basado en ^{13}C (^{13}C -MFA) usando técnicas de LC-MS/MS, y el MFA combinado con el análisis de módulos elementales, así como los análisis previos de reconciliación de datos experimentales.

Los estudios de análisis y reconciliación de datos experimentales, MFA, MFA con restricciones basadas en ^{13}C -RMN y análisis de flujos a través de módulos elementales fueron realizados con el software *Matlab*® versión 7.0.4; además de este software, para obtener los módulos elementales de la red metabólica fue utilizado el software *FluxAnalyzer* versión 5.0 (Klamt *et al.*, 2003) y para el análisis ^{13}C -MFA y simulación de experimentos de marcaje isotópico correspondientes, fue utilizado el software *^{13}C -Flux* versión 20050329 (Wiechert, 2001).

En este capítulo solamente se proporciona una descripción general del software Matlab. La metodología de cálculos utilizando dicho software, así como los otros softwares utilizados en este trabajo, serán descritos en los capítulos correspondientes.

1.2.2.1 Matlab

Matlab (MATrix LABoratory) es un entorno de programación y desarrollo de aplicaciones totalmente integrado y orientado para llevar a cabo proyectos que impliquen cálculos matemáticos complejos y su visualización gráfica.

Matlab integra análisis numérico, cálculo matricial, procesamiento de señales y visualización gráfica en un medio donde los problemas y sus

soluciones son expresados de modo semejante a aquel en que se escribían tradicionalmente, sin necesidad de hacer uso de técnicas de programación tradicionales.

Matlab es un sistema de trabajo interactivo basado en la representación matricial. El programa permite realizar de un modo rápido la resolución numérica de problemas, en un tiempo mucho menor que con lenguajes de programación tradicionales como Fortran, Basic o C (Ortigueira, 2002).

Así mismo, dispone de un amplio conjunto de programas de apoyo, denominados *Toolboxes* que permiten realizar análisis y modelización de diversos problemas matemáticos. Entre estos *toolboxes* podemos destacar las técnicas de optimización, siendo los más utilizados en este trabajo las subrutinas *lsqlin*, *lsqnonneg* y *fmincon* (Ortigueira, 2002).

La subrutina '*lsqlin*' resuelve sistemas lineales con restricciones mediante un método de mínimos cuadrados condicionados, donde el problema de minimización viene dado por la siguiente función objetivo (López, 2002):

$$\min_x \frac{1}{2} \|Cx - d\|_2^2 \quad \text{sujeto a las} \quad \begin{array}{l} Ax \leq b \\ A_{eq}x = b_{eq} \\ lb \leq x \leq ub \end{array}$$

restricciones

donde C , A y A_{eq} son matrices y d , b , b_{eq} , lb , ub y x son vectores.

Para resolver sistemas lineales del tipo $Cx = d$ en que el vector x está sujeto $Ax \leq b$, donde C tiene dimensión $[m \times n]$, puede utilizar la siguiente sintaxis:

$$x = \text{lsqlin}(C,d,A,b)$$

Matlab resuelve también problemas donde son necesarias técnicas de optimización por mínimos cuadrados no negativos; la subrutina '*lsqnonneg*' se rige por la siguiente función objetivo (Ortigueira, 2002):

$$\min_x \frac{1}{2} \|Cx - d\|_2^2$$

$$x \geq 0$$

donde la matriz C y el vector d son los coeficientes de la función objetivo. La sintaxis puede ser dada por el tipo:

$$x = \text{lsqnonneg}(C,d)$$

La subrutina '*fmincon*', encuentra el mínimo de una función multivariable con algunas restricciones no lineales, donde las restricciones pueden ser igualdades o desigualdades, estas restricciones tiene el formato: *restricción* ≤ 0 , dada por (Ortigueira, 2002):

Minimizar: $f(x)$

Sujeto a: $A \times x \leq b$

$C \times x \leq c$ (restricciones no lineales)

La sintaxis para utilizar '*fmincon*' toma la siguiente forma:

$$[x, fval, flag, output] = \text{fmincon}('fun', x_0, A, b, Aeq, beq, vlb, vub, nonlcon)$$

donde x_0 es el valor inicial, A y b se refieren a las restricciones de desigualdad lineales, Aeq y beq : se refieren a las restricciones de igualdad, es decir: $Aeq \times x = beq$, vlb es un vector con los valores mínimos de las variables y vub con los valores máximos, y *nonlcon* se refiere a las restricciones no lineales, tanto de desigualdad como de igualdad. Cuando un parámetro de la función no existe se debe colocar en su lugar [].

Para definir las restricciones no lineales, se hace de la misma forma que la función objetivo, es decir, *nonlcon* puede ser las restricciones no lineales entre comillas, pueden ser funciones inline o pueden ser una función de Matlab escrita en fichero *.m.

CAPÍTULO III

Análisis y reconciliación estadística de datos experimentales

En este capítulo serán abordados el tratamiento estadístico aplicado para la reconciliación y validación de los datos experimentales obtenidos de cultivos de *P. pastoris* realizados en bioreactores operados en continuo bajo distintas condiciones ambientales con los de su composición celular bajo cada una de dichas condiciones de cultivo y, a partir de los datos reconciliados estadísticamente, proponer una ecuación estequiométrica para la formación de biomasa.

Además, también se llevaran a cabo los balances de carbono, así como el balance de las velocidades específicas de conversión (consumo de substratos y producción de productos) con el fin de evaluar estadísticamente (y detectar errores en) las medidas de dichos parámetros.

III.1 Introducción

La estadística es una ciencia matemática que tiene como objetivo la recolección, organización, análisis e interpretación de datos. La estadística nos proporciona herramientas para extraer información útil sobre el problema en estudio a partir de datos experimentales disponibles, los cuales son muchas veces incompletos (Montgomery & Runger, 1999).

Según van der Heijden *et al.* (1994a), el análisis estadístico de datos experimentales tiene como objetivo verificar la consistencia de los datos medidos y/o mejorar su exactitud. Según estos autores, la reconciliación o balance de datos experimentales también tienen como objetivo ajustar las tasas/velocidades de consumo y producción medidos, relacionado la exactitud de las medidas experimentales con un sistema de ecuaciones apropiadas. Según estos autores, la detección del error bruto sirve para verificar si los ajustes realizados son aceptables debido a las desviaciones estándar de los datos experimentales; para este propósito se utiliza un test estadístico apropiado, aumentando la confiabilidad de los resultados obtenidos. De acuerdo con van der Heijden *et al.* (1994b), cuando se ha detectado un error significativo en los cálculos, se debe verificar el motivo que ha conducido a tal error, de acuerdo con estos autores, estos errores pueden ser resultantes de uno de los siguientes factores: *i)* Por lo menos una de las medidas iniciales tiene un error bruto significativo; *ii)* La definición del sistema es incorrecta debido a que un componente no se incluye en la descripción del sistema o uno de los componentes tiene una composición diferente especificada; *iii)* Las variaciones especificadas son demasiado pequeñas, lo cual conlleva un resultado del test de la distribución χ^2 (Chi-cuadrado) demasiado sensible.

De acuerdo con van der Heijden *et al.* (1994a), la metodología para la reconciliación de datos puede ser basada en cuatro etapas principales, tal y como ilustra la Figura III.1.

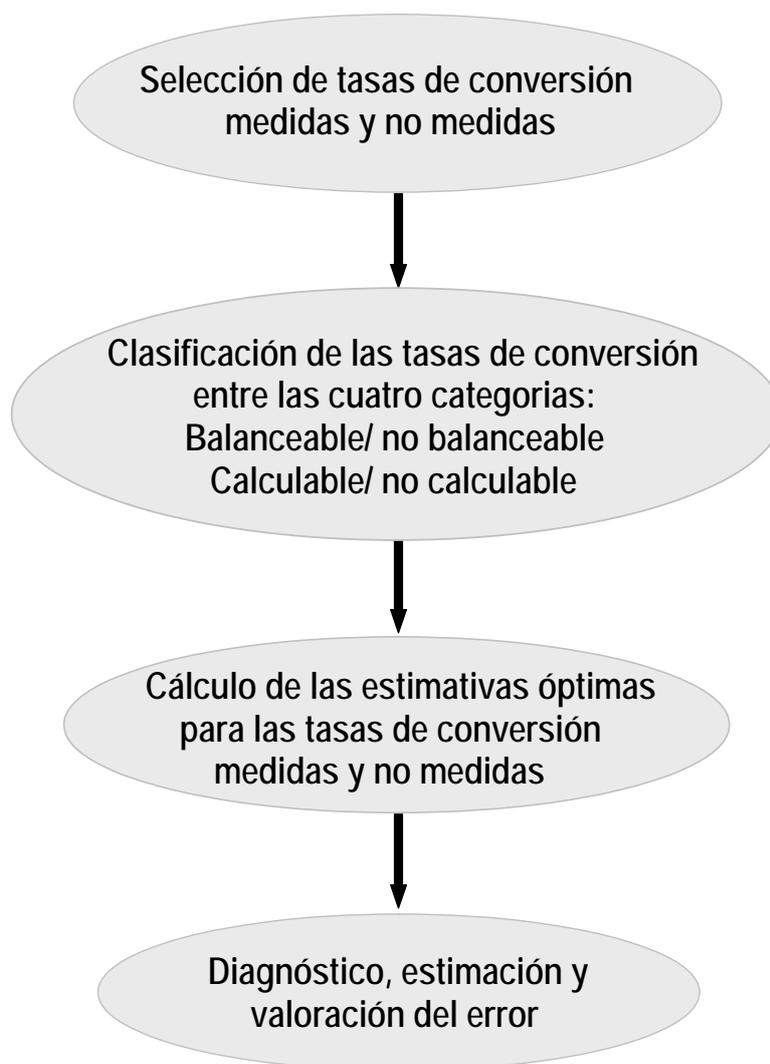


Figura III.1 Los cuatro pasos principales utilizados en la metodología de reconciliación de datos basado en los principios de conservación de masa.

Referencia: Adaptado de van der Heijden *et al.* (1994a).

III.1.1 Reconciliación estadística de la composición elemental y molecular de la biomasa

La reconciliación de datos experimentales de la composición elemental y de los constituyentes de la biomasa es la primera y la más importante para el análisis de flujos metabólicos.

Según Lange & Heijnen (2001), la metodología estadística utilizada para reconciliar datos experimentales de la composición de la biomasa, están basados en balances elementales y relaciones de igualdad, lo que conlleva en obtener una composición constante de la biomasa.

Simultáneamente, los márgenes del error de los datos experimentales disminuyen perceptiblemente con el proceso de reconciliación. Este método tiene como principal ventaja aumentar la exactitud de los datos de la composición de biomasa tanto de sus elementos como de sus moléculas, proporcionando una mejor estimación basada en los datos experimentales disponibles. Ello posibilita un mejor ajuste del análisis de flujos metabólicos.

III.1.1.1 Relación entre datos experimentales

La fracción de masa medida f de cada elemento i de la biomasa debe emparejar con la suma de su contenido x_i de cada molécula, así relacionando la composición elemental y molecular de la biomasa (Lange & Heijnen, 2001):

$$f_i = x_{i, \text{proteína}} \cdot f_{\text{proteína}} + x_{i, \text{carbohidratos}} \cdot f_{\text{carbohidratos}} + x_{i, \text{RNA}} \cdot f_{\text{RNA}} + \dots \quad (\text{III.1})$$

El contenido elemental x_i es especificado por la composición de cada molécula. La relación III.1 se basa en un balance de masa total y si todos los elementos y todas las moléculas se incluyen en el modelo, la suma de los elementos o las macromoléculas debe comprender la composición de la biomasa.

Como los metales no están presentes en las moléculas orgánicas que componen la biomasa, otra molécula denominada “metales” se introduce para completar la lista de moléculas que componen la biomasa. Los cationes inorgánicos K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, entre otros, tienen que ser incluidos para componer la lista de todos los elementos y pueden ser reunidos para formar un pseudo elemento “M” expresado en fracciones totales, pudiendo ser expresadas como:

$$\begin{aligned} \sum f_{\text{elementos}} &= 1 & (\text{a}) \\ \sum f_{\text{moléculas}} &= 1 & (\text{b}) \end{aligned} \quad (\text{III.2})$$

La Ecuación III.2b puede ser obtenida de la combinación lineal de las Ecuaciones III.2a y III.1, así tendremos más una relación independiente. El conjunto de restricciones lineales se puede representar en forma matricial tal como:

$$C.f = b \quad (\text{III.3})$$

donde C es la matriz de las restricciones que contienen una fila con los pesos (Ecuación III.2a), las otras filas contienen las relaciones de la igualdad y filas derivadas del balance elemental de C, H, N, O, P, S, y M (Ecuación III.1). El vector f contiene los elementos f_i que representa los componentes de la biomasa. La estructura de la matriz viene dada por:

$$C = \begin{bmatrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} \\ 0 & C_{22} & C_{23} \\ 0 & C_{32} & 0 \end{bmatrix}, \quad f = \begin{bmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \end{bmatrix}, \quad b = \begin{bmatrix} 0 \\ \vdots \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \quad (\text{III.4})$$

donde f_1 representa la fracción de los constituyentes de la biomasa medidos experimentalmente, f_2 y f_3 representa la fracción de masa de los elementos y moléculas, respectivamente, que constituye la biomasa. La primera fila de las submatrices $C_{1,i}$ corresponde la igualdad de las restricciones.

$$C_{11} = I, \quad C_{12} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ -1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & -1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \end{bmatrix}, \quad C_{13} = \begin{bmatrix} 0 & & & & 0 \\ 0 & & & & \vdots \\ \vdots & \ddots & & & \\ -1 & & & & \\ -1 & & \dots & & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{III.5})$$

La segunda fila de las submatrices $C_{2,i}$ contiene las restricciones elementales:

$$C_{21} = -I, \quad C_{23} = \begin{bmatrix} x_{C,proteínas} x_{C,carbohid} & \dots & \dots & x_{C,metales} \\ x_{H,proteínas} x_{H,carbohid} & & & \vdots \\ \vdots & \ddots & & \vdots \\ x_{M,proteínas} & \dots & \dots & x_{M,metales} \end{bmatrix} \quad (\text{III.6})$$

y la ultima fila corresponde el peso de las restricciones:

$$C_{32} = [1 \quad 1 \quad 1 \quad \dots \quad 1] \quad (\text{III.7})$$

Separando el sistema en dos partes correspondiente a los datos medidas y no medidas tenemos:

$$C_m \cdot f_m + C_c \cdot f_c = b \quad (\text{III.8})$$

donde el vector f_c corresponde a las variables no medidas. El vector que contiene el error \bar{f}_m de las fracciones de masa medidas será dado como:

$$\bar{f}_m = f_m - \delta \quad (\text{III.9})$$

donde δ representa el vector con los errores de las medidas. La estimación más probable $\hat{\delta}$ del vector de error δ puede ser obtenido a través de la minimización de la función objetivo:

$$O = \delta^T \cdot P_m^{-1} \cdot \delta \quad (\text{III.10})$$

restringido por:

$$C_m \bar{f}_m + C_m \delta + C_c f_c = b \quad (\text{III.11})$$

Usando los multiplicadores de Lagrange obtenemos la mejor estimativa para el vector del error:

$$\hat{\delta} = P_m \cdot C_m^T \cdot P_E^{-1} \cdot (b - C_m \bar{f}_m - C_c \hat{f}_c) \quad (\text{III.12})$$

con

$$\hat{f}_c = (C_c^T \cdot P_E^{-1} \cdot C_c)^{-1} \cdot C_c^T \cdot P_E^{-1} \cdot (b - C_m \bar{f}_m) \quad (\text{III.13})$$

y la matriz covariancia del vector de residuos viene ser definido como: $P_E = C_m \cdot P_m \cdot C_m^T$. El vector con las medidas reconciliadas \hat{f}_m puede ser calculado a través de:

$$\hat{f}_m = \bar{f}_m - \hat{\delta} \quad (\text{III.14})$$

Finalmente, la matriz covariancia reconciliada $\hat{P}_m = E[(f_m - \hat{f}_m) \cdot (f_m - \hat{f}_m)^T]$ puede ser calculada como:

$$\hat{P}_m = P_m [I - C_m^T \cdot P_E^{-1} \cdot (I + C_c \cdot ((C_c^T \cdot P_E^{-1} \cdot C_c)^{-1})^T \cdot C_c^T \cdot P_E) \cdot C_m \cdot P_m] \quad (\text{III.15})$$

La matriz covariancia es derivada de la diagonal de la matriz covariancia de las medidas subyacentes P_{mu} :

$$P_m = J \cdot P_{mu} \cdot J^T \quad (\text{III.16})$$

con J siendo la Jacobiana.

El test de la distribución χ^2 con la variable h puede ser utilizada de acuerdo con van der Heijden *et al.* (1994b); este test tiene como objetivo verificar la presencia de los errores brutos, donde h viene dada por:

$$h = \varepsilon^T P_\varepsilon^{-1} \varepsilon \quad (\text{III.17})$$

donde: h representa el test estadístico de la distribución χ^2 ; ε viene dada por: $\varepsilon = R_r \cdot f_m$, donde R_r es la matriz redundante reducida de R , que viene dada por: $R = C_m - C_c \cdot C_c^{-1} \cdot C_m$ y P_ε viene dada por: $P_\varepsilon = R_r \cdot F \cdot R_r^T$ donde F representa la matriz de varianza-covarianza.

Wang & Stephanopoulos (1983) demostraron que h es una variable estadística que sigue la distribución χ^2 con un número de grados de libertad (F) igual al rango (P_ϵ) = rango (R) (*i.e.*, el número de ecuaciones (restricciones) independientes).

De acuerdo con estos autores, un error es significativo cuando $h \geq \chi^2$, en caso contrario se puede asumir que no hay ningún error sistemático en las medidas (para un número apropiado de grados de libertad y del nivel de confianza deseado).

III.1.2 Reconciliación estadística de datos experimentales de substratos y productos

El análisis estadístico que se aplica a los datos experimentales de las tasas de consumo de substratos y de generación de productos se basa en el principio de que el sistema obtenido es sobredeterminado (ver Capítulo IV), es decir el número de medidas experimentales es mayor el grado de libertad del sistema, siendo posible verificar la presencia de errores en un determinado conjunto de medidas. Este análisis es posible porque el número de tasas medidas es mayor que $F + 1$, este es un factor muy importante porque permite utilizar la redundancia en las medidas en combinación con el modelo metabólico y la suposición del estado pseudo-estacionario para dicha verificación de errores (van der Heijden *et al.*, 1994b; Stephanopoulos *et al.* 1998).

Dada la Ecuación III.18 (Stephanopoulos *et al.* 1998):

$$R f_m = 0 \quad \text{(III.18)}$$

donde f_m son las tasas medidas y R es la matriz de redundancia.

El rango de la matriz de redundancia especifica el número de ecuaciones independientes que deben ser satisfechas por las tasas calculadas que contiene $I - \text{rango}(R)$ líneas independientes. Eliminado las líneas dependientes obtenemos el *rango* (R) ecuaciones independientes relativas a las variables de medidas.

$$R_r f_m = 0 \quad \text{(III.19)}$$

donde R_r es la matriz redundante reducida que solo contiene las líneas independientes de R . La Ecuación III.18 es la base para la posterior identificación del error.

Normalmente los datos experimentales obtenidos contienen cierto error que en algunos casos puede tratarse de errores sistemáticos. Como consecuencia de estos errores la Ecuación III.18 no siempre es exacta y obtenemos residuos diferentes de cero al multiplicar las tasas medidas por la matriz redundante reducida.

La ecuación que puede ser expresada por el vector de tasas medidas \bar{f}_m y viene dada por:

$$\bar{f}_m = f_m + \delta \quad (\text{III.20})$$

donde δ es error de las medidas experimentales.

Combinando la expresión anterior con la Ecuación III.19 obtenemos:

$$\varepsilon = R_r \bar{f}_m = R_r (f_m + \delta) = R_r \delta \quad (\text{III.21})$$

donde: ε representa el vector de residuos.

Si el modelo es correcto y no existen errores aleatorios o sistemáticos, es decir $\delta = 0$, todas las ecuaciones son satisfechas y ofrecen valores cero para los residuos. Sin embargo en todas las medidas observaremos cierto error que dará como resultado un vector residual diferente de cero.

Las mejores medidas estimadas serán aquellas que minimicen la magnitud del residuo tal y como se determina a continuación. Asumiendo que el vector de errores tiene una distribución normal con esperanza nula y que la matriz de varianza-covarianza viene expresada por la siguiente matriz F :

$$E(\delta) = 0 \quad (\text{III.22})$$

$$F \equiv E[(\bar{f}_m - v_m)(\bar{f}_m - v_m)^T] = E(\delta\delta^T) \quad (\text{III.23})$$

donde E es la esperanza y contiene los residuos que también se hallan normalmente distribuidos con un valor esperado medio igual a cero.

$$E(\varepsilon) = R_r E(\delta) = 0 \quad (\text{III.24})$$

La matriz varianza-covarianza viene dada por:

$$P = E(\varepsilon\varepsilon^T) = R_r E(\delta\delta^T) R_r^T = R_r F R_r^T \quad (\text{III.25})$$

Para estimar la varianza mínima del error del vector δ utilizamos la minimización de la suma de los errores cuadrados ponderados por su varianza.

$$\min_{\delta} (\delta^T F^{-1} \delta) \quad (\text{III.26})$$

La solución viene dada por:

$$\hat{\delta} = F R_r^T P^{-1} \varepsilon = F R_r^T P^{-1} R_r f_m \quad (\text{III.27})$$

donde $\hat{\delta}$ es un valor estimado.

A través de la Ecuación III.27, la mejor estimación para las tasas medidas puede ser obtenida por:

$$\hat{f}_m = \bar{f}_m - \hat{\delta} = (I - F R_r^T P^{-1} R_r) \bar{f}_m \quad (\text{III.28})$$

donde I es la matriz identidad.

Con el vector de residuos ε es posible también verificar si el error es significativo, bastando aplicar el teste de distribución χ^2 (Ecuación III.17).

III.1.2.1 Análisis del error utilizando balance del grado de reductancia

Otra metodología que puede ser utilizada para determinar la presencia de errores, esta relacionada con el empleo del balance del grado de reducción o reductancia (γ) (*reductance degree*).

Esta metodología, cuyos primeros trabajos realizó Erickon *et al.* (1978) y que posteriormente generalizó Roels (1983), consiste en multiplicar cada átomo que compone el metabolito por el grado de reducción (equivale al número de electrones libres que podrían ser transferidos al oxígeno en un proceso aeróbico) así, tenemos por ejemplo 4 grados de reducción para el carbono, 1 para el hidrógeno y -2 para el oxígeno. Para el nitrógeno se considera la valencia predominante en la fuente de carbono que es de -3 cuando ésta es el amoníaco en solución como en el presente trabajo. En otros casos se usa el valor que corresponda para la fuente de nitrógeno.

Para la ecuación de biomasa podemos escribir una expresión general para el grado de reducción γ de composición elemental $\text{CH}_a\text{O}_b\text{N}_c$. Esta expresión puede ser expresada como:

$$\gamma = 4 + a - 2b - 3c \quad (\text{III.29})$$

La metodología empleada para calcular este valor para otros tipos de compuestos es la misma descrita en la Ecuación III.29.

La Tabla III.1 presenta el grado de reductancia de los principales compuestos encontrados en procesos fermentativos.

La ecuación general para el balance de grados de reductancia de un dado sistema biológico viene dada por:

$$\gamma_x + \sum_{i=1}^M \gamma_{p,i} Y_{xp_i} - \sum_{i=0}^N \gamma_{s,i} Y_{xs_i} \quad (\text{III.30})$$

donde γ_x representa el grado de reductancia para la biomasa, $\gamma_{p,i}$ y Y_{xp_i} representa el grado de reductancia y el rendimiento de los productos respectivamente y $\gamma_{s,i}$ y Y_{xs_i} representa el grado de reductancia y el rendimiento de los substratos respectivamente.

La Ecuación III.30 puede ser utilizada también para determinar el error de las medidas experimentales, siendo apenas necesario sustituirla en una de las filas de la matriz estequiométrica y, a través de la metodología descrita anteriormente, es posible usarla también para determinar el error de las medidas y sus valores corregidos. Esta ecuación tiene como ventaja de no incluir los valores de producción de compuestos como el agua que nunca se pueden medir. En ciertos casos se ha utilizado, junto con el balance de carbono, para identificar la producción de un compuesto no esperado (Stephanopoulos *et al.* 1998). En el presente trabajo se ha usado como sustitución el balance de hidrógeno en la matriz estequiométrica. Esta ecuación no sirve como ecuación complementaria de balance sino solo de sustitución, puesto que en realidad es combinación lineal de las demás. Sin embargo, puede presentar ventajas porque en el cálculo matricial nos da más peso a las variables medidas y menos a aquellas que no se miden, como el H₂O. Es decir, se substituye el balance de hidrógeno por un balance global de electrones que se pueden transferir al oxígeno.

Tabla III.1 Grados de reductancia de algunos compuestos usados en procesos fermentativos.

Compuesto	Fórmula	Grados de reductancia (γ)
Acetaldehído	C_2H_4O	5
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	4
Ácido fórmico	CH_2O_2	2
Ácido sulfúrico*	H_2SO_4	0
Amonio*	NH_3	0
Dióxido de carbono	CO_2	0
Etanol	C_2H_6O	6
Formaldehído	CH_2O	4
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	4
Glicerol	$C_3H_8O_3$	4,67
Metanol	CH_4O	6
Oxígeno	O_2	-4

(*) Metabolitos utilizados en cálculos de análisis de error; corresponden a fuentes de azufre y nitrógeno, son utilizados para sustituir los compuestos en forma de iones sulfato y nitrato, evitando así balances de cargas en los cálculos.

Referencia: Adaptado de Stephanopoulos *et al.* 1998.

III.1.3 Análisis estadística de valores anómalos (Test Q de Dixon)

Dado un conjunto de medidas en replicado de un determinado experimento, uno o más de los valores obtenidos pueden diferenciarse considerablemente de la mayoría del resto. En este caso hay siempre una medida con un valor atípico que puede ser eliminado y que no debe ser incluido en los cálculos subsiguientes (el valor promedio y/o de la desviación estándar); sin embargo, esto solamente es aplicable si los valores sospechados se pueden caracterizar como valores anómalos (Efstathiou, 2006).

Generalmente, un valor anómalo (*outlier*) se define como observación generada de un modelo o de una distribución de un conjunto de datos. Aunque esta definición implica que un valor anómalo se puede encontrar dondequiera dentro de la gama de observaciones, es natural sospechar y examinar como valores anómalos solamente los valores del extremo.

El rechazo de las observaciones sospechadas se debe basar exclusivamente en un criterio objetivo y no en los argumentos subjetivos o intuitivos. Esto puede ser obtenido a través del test estadístico para “la detección de valores anómalos”. El test Q de Dixon es una prueba más simple de este tipo; esta prueba permite examinar si una (y solamente una) medida de un sistema pequeño de replicados (típicamente 3 a 10) puede ser rechazado o no (Rorabacher, 1991; Efstathiou, 2006).

El test Q se basa en la distribución estadística de los “cocientes del subrango” de un conjunto de datos ordenados de la misma población normal. Por lo tanto, una distribución Gaussiana normal de datos se asume siempre que se aplique este test. En caso de la detección y del rechazo de uno o más valores anómalos, el test Q no se puede reaplicar en el sistema de las observaciones restantes (Efstathiou, 2006).

El test es muy simple y se aplica como sigue:

1) Dado un experimento con n repeticiones, el conjunto de observaciones del sistema en orden ascendente puede ser expresado como:

$$x_1 < x_2 < \dots < x_n$$

2) El valor estadístico experimental Q (Q_{exp}) puede ser calculado de acuerdo con la Ecuación III.31. El valor de Q_{exp} es definido por el cociente de la diferencia del valor sospechado y el valor más cercano dividido por la amplitud del intervalo (diferencia entre el mayor y el menor valor). Así, para probar x_1 o x_n (como posibles valores anómalos) utilizamos los valores siguientes de Q_{exp} :

$$Q_{exp} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1} \quad Q_{exp} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} \quad (\text{III.31})$$

3) El valor obtenido de Q_{exp} se compara a un valor crítico Q (Q_{crit}) encontrado en tablas. Este valor crítico debe corresponder al nivel de confianza (CL) generalmente a un 95% (Rorabacher, 1991; Efstathiou, 2006).

4) Si $Q_{exp} > Q_{crit}$, entonces el valor sospechado se pueden caracterizar como un valor anómalo y puede ser rechazado; si no, el valor sospechado debe ser conservado y utilizado en todos los cálculos subsiguientes.

La hipótesis nula asociada al test Q es como sigue: “No hay ninguna diferencia significativa entre el valor sospechado y el resto de ellos, cualquier diferencia se debe atribuir exclusivamente a los errores al azar” (Efstathiou, 2006).

III.2 Análisis y reconciliación estadística de datos experimentales de la composición elemental y molecular de la biomasa

El trabajo de tesis doctoral de Aina Solà (Solà, 2004) tenía como principal objetivo la caracterización del metabolismo central del carbono de *P. pastoris*, basándose en el análisis de cocientes de flujos metabólicos a través de la metodología METAFoR (*Metabolic Flux Ratio Analysis*) mediante técnicas de marcaje isotópico de ^{13}C combinadas con el posterior análisis por Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional (2D-RMN) (Szyperski, 1995, Maaheimo *et al.*, 2001). Por lo tanto, la metodología utilizada por A. Solà no utiliza datos composicionales de los constituyentes macromoleculares de la biomasa (proteínas, carbohidratos, ácidos grasos y ácidos nucleicos). A posteriori, durante el presente trabajo, y solo para algunas condiciones de cultivos estudiados, se cuantificaron estos constituyentes en muestras de células liofilizadas de los cultivos realizados por A. Solà, así como de algún cultivo-réplica realizado durante el presente estudio.

También cabe señalar que en los análisis elementales de células crecidas bajo distintas condiciones ambientales realizados por A. Solà (Solà, 2004), no incluyeron la determinación de la fracción de átomos de fósforo y de metales, así como el contenido de agua en la biomasa seca (liofilizada), es decir el contenido de agua química y físicamente adsorbida.

III.2.1 Metodología de cálculo

Para los análisis de reconciliación de los constituyentes macromoleculares de la biomasa, inicialmente se asumió como referencia la misma composición elemental de las macromoléculas (proteínas, DNA, RNA,

ácidos grasos y carbohidratos) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* creciendo aeróbicamente sobre glucosa, pues esta presenta metabolismo similar al de la levadura *P. pastoris* en condiciones similares (Solà *et al.*, 2004). Según Kocková-Kratochvílová (1990) en cultivos con la levadura *S. cerevisiae* crecida en medio sintético, la composición de ácidos grasos (lípidos) esta constituida básicamente de un 60% de ácidos grasos y 40% de fosfolípidos, donde el grupo acil está constituido de los ácidos palmitoleico, oleico, palmítico y esteárico en una proporción de 44:17:14:10, respectivamente. Un grupo acil se substituye en los fosfolípidos con un promedio de un 23, 62, y 16% de etanolamina colina y serina, respectivamente, limitado a través de un grupo fosfato. La composición elemental de la proteína fue la misma utilizada por Lange & Heijnen (2001), la cual fue obtenida a través del análisis cuantitativo experimental de la composición aminoacídica de la biomasa de *S. cerevisiae*. También se asumió, que los ácidos nucleicos presentan en su composición guanina y citosina en aproximadamente un 20% de cada uno, y que los carbohidratos son polihexosas de cadenas lineales infinitas (Lange & Heijnen, 2001). La composición elemental de cada macromolécula está listada en la Tabla III.2.

Tabla III.2 Composición elemental de los constituyentes de la biomasa.

<i>Macromolécula</i>	<i>Fórmula elemental</i>
Proteína ^a	CH _{1,581} N _{0,275} O _{0,318} S _{0,003}
Carbohidratos ^b	CH _{1,667} O _{0,833}
Ácidos Grasos ^b	CH _{1,873} N _{0,010} O _{0,149} P _{0,010}
RNA ^b	CH _{1,232} N _{0,389} O _{0,737} P _{0,105}
DNA ^b	CH _{1,255} N _{0,378} O _{0,612} P _{0,102}
Fosfato	HPO ₄
Sulfato	SO ₄
Agua	H ₂ O
Metales	M

a. Lange & Heijnen (2001).

b. Kocková-Kratochvílová (1990).

La metodología utilizada para la reconciliación de los datos experimentales esta descrita en el apartado III.1.1.

La matriz *C* fue construida conforme las Ecuaciones III.4 a III.7, algunas simplificaciones fueran realizadas con objetivo de ajustar mejor los

datos experimentales; la primera simplificación fue considerar que en la composición elemental las cenizas esta básicamente formada por el elemento fósforo y metales y en los constituyentes de la biomasa además de las macromoléculas, presentase en su composición agua, azufre en forma de sulfato y fósforo y metales. La matriz C generada de dimensión $[7 \times 14]$ fue dividida en C_m y C_c y el vector f de dimensión $[1 \times 14]$ fue dividido en f_m y f_c conforme la Ecuación III.8 (para más detalles ver sección de Rutinas, apartado R.1). Según Lange & Heijnen (2001), los ácidos nucleicos (DNA y RNA) pueden interferir en los análisis del contenido de carbohidratos en las células y en su trabajo de investigación el factor de corrección que correlaciona los ácidos nucleicos con carbohidratos viene dado por:

$$f_{carb} = f_{medido} - 0,445.f_{DNA} - 0,264.f_{RNA} \quad (III.32)$$

En este trabajo fue considerado que las fracciones de ácidos nucleicos en las células de *P. pastoris* pueden interferir en los análisis de carbohidratos y el factor de corrección sigue la Ecuación III.32.

El grado de libertad (F) fue calculado a través del rango de la matriz R . El test de distribución χ^2 fue aplicado a través del cálculo de la variable h conforme la Ecuación III.17 con el objetivo de detectar la presencia de errores brutos. Los datos reconciliados satisfacen las restricciones del sistema: a un intervalo reducido del error y se puede asignar a cada medida individual y si el sistema es inconsistente este puede ser excluido.

III.2.2 Resultados y Discusión

Los análisis de los constituyentes de la biomasa de los cultivos llevados a cabo por A. Solà (Solà, 2004) con la levadura *P. pastoris* a dos velocidades específicas de crecimiento ($\mu = 0,05$ y $0,16 \text{ h}^{-1}$) y distintas combinaciones de fuentes de carbono, descritos en el Capítulo II, fueron divididos en dos etapas: análisis macromoleculares (proteínas, carbohidratos, ácidos grasos y ácidos nucleicos) (Tabla III.3) y análisis elemental (C, H, N, O y S) (Tabla III.4 y III.5).

Tabla III.3 Fracciones de los constituyentes macromoleculares de la biomasa de algunos cultivos, en %.

<i>Substrato</i>	<i>D (h⁻¹)</i>	<i>Prot. ± SD*</i>	<i>Carb.** ± SD</i>	<i>Ácid. Gra. ± SD</i>	<i>RNA ± SD</i>	<i>DNA ± SD</i>	<i>Suma</i>
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	45,04 ± 15,80	45,33 ± 9,70	5,43 ± 0,17	2,92 ± 0,81	1,12 ± 0,44	99,84
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	42,55 ± 13,00	56,71 ± 14,50	5,23 ± 0,15	3,51 ± 0,78	1,13 ± 0,35	109,13
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	45,74 ± 6,86	47,81 ± 8,50	3,21 ± 0,17	3,15 ± 0,48	1,13 ± 0,47	101,08
100% Metanol	0,05	41,35 ± 8,00	44,87 ± 13,00	4,40 ± 0,14	1,76 ± 0,66	1,10 ± 0,18	93,48
100% Glucosa	0,16	32,79 ± 6,00	41,69 ± 4,50	0,29 ± 0,15	0,24 ± 0,50	1,13 ± 0,25	76,14
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	42,18 ± 5,00	41,80 ± 7,50	5,78 ± 0,15	3,38 ± 0,34	1,13 ± 0,87	94,28

(*) Desviación estándar

(**) Valor corregido de acuerdo con la Ecuación III.32

Tabla III.4 Fracción elemental (%) de la biomasa para todas las condiciones de cultivo.

<i>Substrato</i>	<i>D (h⁻¹)</i>	<i>C ± SD</i>	<i>H ± SD</i>	<i>N ± SD</i>	<i>O ± SD</i>	<i>S ± SD</i>	<i>Cenizas ± SD</i>
100% Glicerol	0,05	41,73 ± 0,62	6,56 ± 0,06	5,31 ± 0,14	38,66 ± 0,81	0,14 ± 0,03	7,60 ± 0,38
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	43,69 ± 2,18	6,57 ± 0,33	6,49 ± 0,32	30,63 ± 4,59	0,26 ± 0,03	12,36 ± 0,61
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	38,15 ± 1,91	6,42 ± 0,32	7,50 ± 0,38	38,00 ± 1,90	2,36 ± 2,40	7,57 ± 0,67
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	42,36 ± 2,12	6,50 ± 0,33	8,48 ± 0,42	32,43 ± 4,86	0,38 ± 0,04	9,85 ± 0,62
100% Metanol	0,05	38,43 ± 1,92	5,90 ± 0,29	8,62 ± 0,43	34,14 ± 1,71	1,72 ± 0,17	11,19 ± 0,38
100% Glucosa	0,16	38,93 ± 1,95	6,41 ± 0,32	7,32 ± 0,37	35,15 ± 1,76	0,20 ± 0,02	11,99 ± 0,51
100% Glicerol	0,16	42,49 ± 0,51	6,28 ± 0,21	7,13 ± 0,17	34,69 ± 0,46	0,23 ± 0,02	9,18 ± 0,46
60% Glicerol y 40% Metanol	0,16	42,36 ± 1,1	6,50 ± 0,57	8,47 ± 0,02	32,43 ± 1,70	n.d.	10,24 ± 0,51
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	40,48 ± 2,02	6,23 ± 0,31	8,46 ± 0,42	31,04 ± 1,55	0,36 ± 0,04	13,43 ± 0,56

n.d. no determinado

Tabla III.5 Fórmula elemental de la biomasa para todas las condiciones de cultivo.

<i>Substrato</i>	<i>D (h⁻¹)</i>	<i>Fórmula elemental</i>	<i>Cociente entre C:N</i>	<i>Peso Molecular (g·mol⁻¹)</i>	<i>γ</i>
100% Glicerol	0,05	CH _{1,886} N _{0,109} O _{0,695} S _{0,001}	9,17	26,57	4,17
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	CH _{1,805} N _{0,127} O _{0,526} S _{0,002}	7,87	24,07	4,38
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	CH _{2,019} N _{0,169} O _{0,747} S _{0,023}	5,93	29,07	4,16
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	CH _{1,841} N _{0,172} O _{0,574} S _{0,003}	5,83	25,54	4,19
100% Metanol	0,05	CH _{1,842} N _{0,192} O _{0,666} S _{0,017}	5,20	27,73	4,04
100% Glucosa	0,16	CH _{1,976} N _{0,161} O _{0,677} S _{0,002}	6,20	27,13	4,15
100% Glicerol	0,16	CH _{1,772} N _{0,144} O _{0,612} S _{0,002}	6,94	25,70	4,12
60% Glicerol y 40% Metanol	0,16	CH _{1,840} N _{0,171} O _{0,574}	5,83	25,43	4,18
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	CH _{1,847} N _{0,179} O _{0,575} S _{0,003}	5,58	25,66	4,18

Los resultados experimentales obtenidos para la composición de biomasa para algunas condiciones de cultivo (Tabla III.3) revelaron que las células de *P. pastoris* están constituidas mayoritariamente de carbohidratos y proteínas (más de 80% de su peso seco), de manera similar a lo observado para *S. cerevisiae*. No obstante, el porcentaje de proteínas determinado para células crecidas con 100% glucosa como fuente de carbono a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$, fue claramente inferior ($32,79 \pm 6,00 \%$) al observado en los otros cultivos estudiados (y a la referenciada para *S. cerevisiae*, alrededor del 40~42%), probablemente debido a un error en los análisis (tal y como sugiere el hecho que la suma de los componentes celulares sea sólo el 76,14% del peso seco). No obstante, el análisis de la desviación estándar (*SD*) de los valores de % de proteínas indican que el mayor error de medida ocurre en los análisis de células crecidas con 80% de glicerol y 20% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, que fue superior a un 10%. El análisis de carbohidratos también presentó en algunos cultivos errores superiores a un 10%, particularmente en el cultivo operado con 60% glicerol y 40% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, donde el porcentaje de carbohidratos también fue muy superior al de los otros cultivos ($56,71 \pm 14,50\%$). También cabe destacar que, según Oura (1983), el porcentaje de DNA en células de *S. cerevisiae* es de aproximadamente un 0,3% del material celular; sin embargo, en células de *P. pastoris* crecidas en todas las condiciones de cultivo evaluadas dicho porcentaje fue de aproximadamente un 1%. También cabe resaltar que el porcentaje de RNA fue aproximadamente tres veces mayor que de DNA, excepto para el cultivo operado con 100% glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ donde el porcentaje de DNA fue cuatro veces superior al de RNA, mientras que cultivo con 100% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ presentó una misma proporción de DNA y RNA, lo que a priori nos conduce a concluir que estos dos cultivos presentaron un error de medidas experimentales, ocasionada por el analista. La exactitud de las medidas experimentales fue evaluada a través de la desviación estándar y utilizada también en los cálculos de reconciliación.

Por otro lado, el análisis elemental reveló diferencias en la relación C:N, sobretodo entre los cultivos crecidos a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, que sugieren un aumento relativo del contenido proteico al aumentar la fracción de metanol

en el medio de cultivo (Tabla III.4 y III.5). A priori, cabría correlacionar dicha relación con el contenido proteico celular. A pesar que los ácidos nucleicos contienen N, su contenido celular es muy bajo, en un rango de aproximadamente 4 a 6%, excepto para el cultivo operado con 100% glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ que fue incluso significativamente más bajo 1%; así mismo el contenido de ácidos grasos se situó entre 3 y 5,8%, excepto para el cultivo operado con 100% glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ que fue inferior a 0,50%; como la fracción de nitrógeno en la formula molecular aproximada es muy baja, la contribución de éstos compuestos al contenido en N puede ser despreciado. Sin embargo, dados los resultados experimentales parciales obtenidos, no se observa una correlación clara entre el cociente C:N y el contenido celular en proteína.

En ninguna de las condiciones de cultivos se analizaron los contenidos de metales, agua, y compuestos inorgánicos como fosfatos y sulfatos en solución, resultando en una suma de las fracciones inferior a 100%, excepto en los cultivos con 60% de glicerol y 40% metanol y 40% de glicerol y 60% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, evidenciando también un error sistemático en las medidas experimentales.

Los resultados experimentales están condicionados a la metodología analítica empleada y la cantidad y concentración del material en la célula, lo que resulta en muchos casos en errores debido a la extracción y recuperación del material celular utilizados, así como a las condiciones ambientales en las cuales se guarda y se manipula la muestra, lo que puede provocar la absorción de agua del ambiente y volatización de algunos productos. Además, los errores pueden estar condicionados al método analítico utilizado, provocando una interferencia de uno o más productos en el análisis de un determinado producto, como por ejemplo la interferencia de ácidos nucleicos en el análisis de carbohidratos. Por otro lado, el número limitado de medidas realizadas (una sola serie de análisis, en triplicados) debido a la poca cantidad de material celular disponible, y para algunas condiciones de cultivo, la falta de material biológico, también limitan el análisis de éstos datos experimentales. La diferencia entre las desviaciones estándar de las medidas en una sola muestra y entre un conjunto de

muestras de cultivos repetidos (réplicas biológicas) podría indicar también si estos valores experimentales están dentro de los márgenes de errores del método analítico empleado y si ocurren o no errores sistemáticos de las medidas.

A través del análisis de reconciliación de datos fue posible obtener el porcentaje de agua, sulfatos en solución y metales + fósforo. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente a través de la variable h (Ecuación III.17). A través de la determinación del rango de la matriz R fue verificado que el grado de libertad del sistema es igual a 7, lo que corresponde a 4,25 del test de distribución χ^2 a un nivel de confianza de 75%, siendo rechazado cuando $h > 75\%$ (Tabla III.7).

Los valores reconciliados de los constituyentes de la biomasa (Tabla III.6) revelaron que para algunas condiciones de cultivo, el porcentaje de proteínas son corregidos considerablemente (respecto a los valores medidos iniciales), por ejemplo para las células crecidas en 100% glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$; en el caso del contenido de carbohidratos, los valores reconciliados son significativamente menores, principalmente en el cultivo operado con 60% de glicerol y 40% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, que fue prácticamente el doble de lo obtenido experimentalmente. También es significativo el valor reconciliado del porcentaje de ácidos grasos para el cultivo realizado con 100% glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ con una disminución de aproximadamente un 90% del valor experimental; así mismo, el mismo tipo de discrepancias se observaron en cuanto al contenido de DNA y RNA, donde la concentración de DNA fue de cuatro veces superior a de RNA, lo que evidencia un error de análisis. Cabe resaltar también que los resultados reconciliados están condicionados a los márgenes de error atribuido para cada análisis, es decir cuanto mayor el desvío estándar mayor será la corrección de los datos experimentales.

Es significativo señalar que la reconciliación de la composición elemental (Tabla III.8) de cada condición de cultivo reveló que el cociente C:N, el cual disminuye con el aumento de la fracción de metanol en el medio de alimentación en cultivos en continuo con fuente de carbono mixta (glicerol y metanol), limitados por carbono ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$), ahora si que

aparece estar correlacionado con un aumento correspondiente en el contenido proteico en la células. Esta correlación también se puede verificar mediante de los valores reconciliados obtenidos para el contenido de proteínas (Figura III.2).

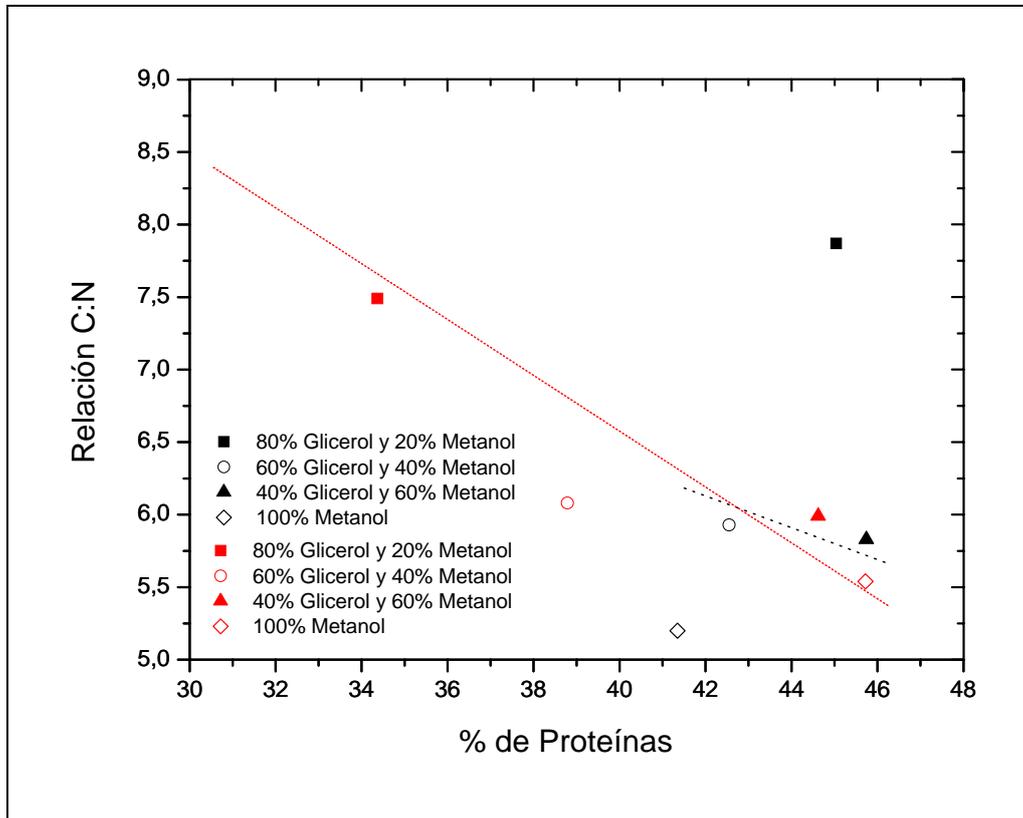


Figura III.2 Dependencia del porcentaje de proteínas y ácidos nucleicos con el coeficiente C:N obtenido a través del análisis elemental en cultivos operados con metanol y mezclas de glicerol/metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Los datos en negro representan los datos experimentales y los de rojo los datos reconciliados estadísticamente.

Globalmente, mientras que la reconciliación de datos composicionales medidos revela alguna discrepancia significativa entre valores medidos y reconciliados, las composiciones elementales reconciliadas se diferencian poco de las obtenidas experimentalmente. Jungo *et al.* (2006) observaron que la composición elemental de *P. pastoris* no cambia mucho, independientemente de la tasa de dilución en cultivos operados en continuo o, en cultivos en discontinuo. Esta observación contrasta con los resultados

obtenidos experimentalmente por A. Solà (Solà, 2004), que observó cambios significativos en la composición elemental de la biomasa, principalmente en las fracciones de nitrógeno (Figura III.2).

En el análisis de reconciliación realizado también se verificó el impacto del contenido de agua en los cálculos de reconciliación, aunque no se hubiese determinado experimentalmente dicho parámetro. El conocimiento exacto sobre el contenido de agua es de gran importancia para cálculos de energética celular (Lange & Heijnen, 2001). Experimentos realizados por Lange & Heijnen (2001) con la levadura *S. cerevisiae* demostraron que la biomasa seca rápidamente absorbe agua, incluso en ambientes considerados secos como por ejemplo en un desecador con sílica gel. Larson *et al.* (1993), citado en Lange & Heijnen (2001), determinaron experimentalmente el contenido de agua en células de *S. cerevisiae*; según estos autores, el porcentaje es de un 3,6%. En los cálculos realizados, el porcentaje estimado osciló entre 0,5 a 7,5%, no evidenciándose ninguna correlación con el tipo de substrato sobre el cual las células crecieron ni con su contenido proteico, lo que podría indicar que la biomasa liofilizada presenta adsorción de agua en su superficie. Esta hipótesis vendría apoyada por la diferencia observada entre los porcentajes de proteína obtenidos experimentalmente y los valores correspondientes obtenidos mediante reconciliación de los datos experimentales. La consideración del agua como constituyente de la biomasa seca indicó también que, aunque esté en una proporción pequeña, el contenido de agua no puede ser despreciable; esta consideración fue verificada a través del análisis estadístico, donde los datos reconciliados para la biomasa sin considerar el contenido de agua fueron rechazados. Esta misma observación fue reportada por Lange & Heijnen (2001) en los cálculos realizados para la levadura *S. cerevisiae*.

También se consideró que el material celular presenta en su composición una fracción de compuestos inorgánicos como el azufre que puede estar disuelto en el citoplasma en forma de sulfato y metales y fósforo; el objetivo de añadir estos componentes fue el de ajustar el balance de azufre y principalmente de fósforo con la composición elemental y los constituyentes macromoleculares, pues A. Solà (Solà, 2004) no los determinó

experimentalmente. El mayor contenido de sulfato fue hallado en los cultivos operados con 100% metanol, 60% de glicerol y 40% metanol y 40% de glicerol y 60% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ respectivamente, contrastando con la fracción de azufre obtenida a través de la composición elemental (Tabla II.7), donde el mayor porcentaje fue hallado en los cultivo operados con 60% de glicerol y 40% metanol, 100% metanol y 40% de glicerol y 60% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ respectivamente. Tampoco se observó ninguna influencia del substrato sobre la fracción de metales + fósforo.

Tabla III.6 Fracciones de los constituyentes macromoleculares reconciliada de la biomasa de algunos cultivos, en %.

<i>Substrato</i>	<i>D (h⁻¹)</i>	<i>Prot.± SD</i>	<i>Carb.±SD</i>	<i>Ácid. Gra.±SD</i>	<i>RNA± SD</i>	<i>DNA± SD</i>	<i>SO₄± SD</i>	<i>H₂O± SD</i>	<i>M + P ± SD</i>
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	34,37±1,89	41,16±4,02	5,65±0,80	2,87±0,44	1,11±0,17	0,32±0,08	2,80±3,49	11,71±0,61
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	38,79±2,11	28,35±3,96	5,17±0,77	3,51±0,35	1,13±0,15	7,00±0,38	6,49±0,69	9,56±2,89
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	44,62±2,27	33,95±4,01	3,20±0,48	3,13±0,47	1,18±0,17	4,83±0,25	0,57±0,12	3,71±3,38
100% Metanol	0,05	45,72±2,27	24,80±4,00	4,23±0,65	1,76±0,18	1,11±0,14	10,84±0,55	4,62±0,51	6,92±2,74
100% Glucosa	0,16	40,17±1,80	38,60±2,97	0,29±0,49	0,25±0,25	1,14±0,15	0,09±0,06	7,53±2,39	11,95±0,59
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	43,16±2,05	28,98±3,65	5,58±0,84	3,39±0,34	1,13±0,15	0,53±0,11	4,48±2,58	12,76±0,65

Tabla III.7 Fracción elemental (%) reconciliada de la biomasa para todas las condiciones de cultivo.

<i>Substrato</i>	<i>D (h⁻¹)</i>	<i>C ± SD</i>	<i>H ± SD</i>	<i>N ± SD</i>	<i>O ± SD</i>	<i>S ± SD</i>	<i>Cenizas ± SD</i>	<i>h</i>
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	42,04 ± 1,59	6,04 ± 0,18	6,55 ± 0,31	32,92 ± 1,53	0,25 ± 0,03	12,21 ± 0,61	4,24
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	38,58 ± 1,29	6,28 ± 0,16	7,40 ± 0,35	37,87 ± 1,19	2,33 ± 0,23	7,55 ± 0,37	4,25
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	42,75 ± 1,54	6,17 ± 0,17	8,33 ± 0,38	32,61 ± 1,52	0,38 ± 0,04	9,76 ± 0,51	3,77
100% Metanol	0,05	39,37 ± 1,24	6,08 ± 0,15	8,29 ± 0,39	33,33 ± 1,14	1,74 ± 0,17	11,20 ± 0,55	4,20
100% Glucosa	0,16	39,00 ± 1,12	6,12 ± 0,13	7,07 ± 0,30	35,33 ± 1,11	0,20 ± 0,02	12,09 ± 0,59	3,38
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	41,43 ± 1,19	6,10 ± 0,14	8,13 ± 0,35	30,68 ± 1,10	0,36 ± 0,04	13,30 ± 0,65	4,10

Tabla III.8 Fórmula elemental reconciliada de la biomasa para todas las condiciones de cultivo.

<i>Substrato</i>	<i>D (h⁻¹)</i>	<i>Fórmula elemental</i>	<i>Cociente entre C:N</i>	<i>Peso Molecular (g·mol⁻¹)</i>	<i>γ</i>
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	CH _{1,724} N _{0,134} O _{0,587} S _{0,002}	7,49	25,06	4,16
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	CH _{1,953} N _{0,165} O _{0,736} S _{0,023}	6,08	28,76	4,12
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	CH _{1,733} N _{0,167} O _{0,572} S _{0,003}	5,99	25,33	4,11
100% Metanol	0,05	CH _{1,853} N _{0,180} O _{0,635} S _{0,017}	5,54	27,06	4,14
100% Glucosa	0,16	CH _{1,872} N _{0,155} O _{0,676} S _{0,002}	6,47	26,91	4,07
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	CH _{1,767} N _{0,168} O _{0,555} S _{0,003}	5,94	25,11	4,17

Con el objetivos de verificar si la composición de los constituyentes macromoleculares difiere para cada condición de cultivo, fue utilizado el test Q de Dixon, de acuerdo con el apartado III.1.3, a un nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0,05$). El análisis estadístico reveló que las fracciones de los constituyentes macromoleculares para cada condición de cultivo efectivamente difieren entre si ($Q_{exp} > Q_{crit}$), excepto para el contenido de proteínas. Con base a este análisis, no fue posible formular una sola ecuación de biomasa a través del promedio de todas las composiciones celulares, independiente de la velocidad de crecimiento y fuente(s) de carbono, pues estos constituyentes no presentan concentraciones similares.

Así pues, con base a los datos reconciliados para los constituyentes macromoleculares (Tabla III.6), fue propuesta una ecuación estequiométrica para la formación de biomasa para cada condición situación de cultivo.

Además, para formular la estequiometría de la composición macromolecular de la biomasa se tuvo en cuenta un conjunto de consideraciones o simplificaciones, utilizadas previamente en la formulación de la ecuación de biomasa para la levadura *S. cerevisiae*. En concreto, se consideró que la composición de ácidos grasos está constituida básicamente de ácido palmitoleico y ácido oleico en proporciones iguales (Vanrolleghe *et al.*, 1996) y, por ser muy pequeña la fracción de DNA en la célula, esta puede ser sumada a la fracción de RNA, considerando así una fracción única de ácidos nucleicos (Oura, 1983). Para los cálculos de los coeficientes estequiométricos se adoptaron las formulas elementales de las macromoléculas que están listadas en la Tabla III.2; la hoja de cálculo para la obtención de los coeficientes estequiométricos se encuentra en la sección de anexos en el apartado A.I. La Tabla III.9 presenta la ecuación de biomasa resultante para cada situación de cultivo estudiado, junto con dos ecuaciones para la levadura *S. cerevisiae* extraída de la bibliografía. Los coeficientes estequiométricos de la levadura *P. pastoris* presentaran mayor contenido proteico (excepto para el cultivo operado con 80% glicerol y 20% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$) y de carbohidratos (excepto en metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, 60% glicerol y 40% metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ y 40% glicerol y 60% metanol a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$), mientras que el contenido de ácidos grasos (estimados a partir del

análisis de lípidos totales) y ácidos nucleicos fueron relativamente menores que en la levadura *S. cerevisiae*.

Tabla III.9 Coeficientes estequiométricos para la composición bioquímica de 1 Cmol de biomasa de *P. pastoris* y *S. cerevisiae*.

Microorganismo	Proteínas (Cmol)	Carbohidratos (Cmol)	Ácidos Nucleicos (Cmol)	Ácido palmítico (mol)	Ácido oleico (mol)	Glicerol (mol)
<i>P. pastoris</i> ^(a)						
80% Glicerol y 20% Metanol (0,05 h ⁻¹)	0,4333	0,4348	0,0344	0,0027	0,0027	0,0018
60% Glicerol y 40% Metanol (0,05 h ⁻¹)	0,5329	0,3263	0,0435	0,0027	0,0027	0,0018
40% Glicerol y 60% Metanol (0,05 h ⁻¹)	0,5534	0,3557	0,0365	0,0015	0,0015	0,0010
100% Metanol (0,05 h ⁻¹)	0,6155	0,2798	0,0266	0,0022	0,0022	0,0014
100% Glucosa (0,16 h ⁻¹)	0,5436	0,4378	0,0133	0,0002	0,0002	0,0000
40% Glicerol y 60% Metanol (0,16 h ⁻¹)	0,5521	0,3106	0,0395	0,0027	0,0027	0,0018
<i>S. cerevisiae</i> ^(b, c)	0,4780	0,3602	0,0533	0,0030	0,0030	0,0020
	0,4700	0,3300	0,0523	0,0034	0,0034	0,0027

(a) Determinado en este trabajo

(b) Vanrolleghem *et al.* 1996

(c) Pitkänen *et al.* 2003.

III.3 Análisis y reconciliación estadística de sustratos y productos

El objetivo principal de la corrección de los datos experimentales mediante distintas metodologías es verificar si presentan algún tipo de error ya a nivel de balance elemental o de grado de reductancia y si existiera, hallar valores corregidos con varianzas menores o rechazar las medidas con errores muy grandes. Dicho paso resulta muy conveniente si se desea proceder al cálculo de flujos metabólicos con posterioridad, dada la sensibilidad de estos métodos al error experimental.

III.3.1 Metodología de cálculo

Las tasas obtenidas a través de los datos experimentales fueron corregidas a través de un balance elemental utilizando la metodología descrita en el apartado III.1.2.

Para cada experimento se construyeron dos matrices basadas en los balances elementales; la matriz C_m corresponde a los componentes medidos experimentalmente y la matriz C_c a los componentes calculados. Las tasas medidas corresponden a las tasas de substrato utilizado (glucosa, glicerol y/o metanol), oxígeno, dióxido de carbono y biomasa. Así mismo, fueron considerados como componentes calculados los siguientes substratos o productos: agua, amonio (fuente de nitrógeno del medio de cultivo) y sulfato (fuente de azufre del medio de cultivo, este substrato sólo fue considerado en los casos en que se dispone de la medida de azufre en la composición elemental de la biomasa). También se consideró que la fuente de nitrógeno en el medio se hallaba en la forma de amonio y la fuente de azufre esta en la forma de ácido sulfúrico, el objetivo fue simplificar los cálculos, ya que no es necesario balancear los electrones de la reacción global de substrato a biomasa. Se generó también un vector (f_m) representando todas las tasas medidas experimentalmente (substrato, oxígeno, dióxido de carbono y biomasa) y un otro vector (\bar{f}_m) correspondiendo a las tasas medidas añadidas a un error experimental δ . Los valores de δ corresponden a los mismos valores de errores relativos obtenidos en los experimentos de Solà (2004), que obtuvo un 3% para las medidas de substratos, excepto para metanol que fue de un 2%; para la medida de biomasa y CO₂ el error encontrado fue de un 5% y de 10% para el O₂. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, con la finalidad de verificar si los datos obtenidos son satisfactorios. Para el análisis estadístico fue utilizado el test de distribución χ^2 y a través de la Ecuación III.17 fue calculada la variable h . Los grados de libertad fueron obtenidos a través del cálculo del rango de la matriz de redundancia R y el resultado comparado con el valor hallado en las tablas a un nivel de confianza de $\alpha = 0,25$ (75%), (ver sección de Rutinas, apartado R.2).

Un ejemplo de las matrices y vectores generados para este tipo de cálculo se describe mas abajo. El ejemplo descrito se refiere al cultivo realizado usando 100% glicerol como fuente de carbono y a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Las unidades de las tasas de los vectores f_m y \bar{f}_m están expresados en $C\text{-mmol h}^{-1}$.

$$C_m = \begin{bmatrix} & GOL & O_2 & CO_2 & BIOM \\ C & 1 & 0 & 1 & 1 \\ H & 2,670 & 0 & 0 & 1,886 \\ O & 1 & 2 & 2 & 0,695 \\ N & 0 & 0 & 0 & 0,109 \\ S & 0 & 0 & 0 & 0,001 \end{bmatrix}, \quad \text{(III.33.a)}$$

$$C_c = \begin{bmatrix} & NH_3 & H_2O & H_2SO_4 \\ C & 0 & 0 & 0 \\ H & 3 & 2 & 2 \\ O & 0 & 1 & 4 \\ N & 1 & 0 & 0 \\ S & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$f_m = \begin{bmatrix} GOL & -13,64 \\ O_2 & -9,41 \\ CO_2 & 6,61 \\ BIOM & 7,65 \end{bmatrix}, \quad \bar{f}_m = \begin{bmatrix} GOL & -14,05 \\ O_2 & -10,35 \\ CO_2 & 7,94 \\ BIOM & 8,03 \end{bmatrix} \quad \text{(III.33.b)}$$

De manera complementaria, se verificó también la fiabilidad de los resultados obtenidos experimentalmente por Solà (2004) mediante el análisis del error a través del balance por grado de reductancia. Este procedimiento tuvo como principal finalidad verificar si los valores medidos experimentalmente de los gases (O_2 y CO_2) difieren mucho dos valores corregidos. Los resultados obtenidos también fueron analizados estadísticamente. La metodología empleada para estos cálculos está descrita en el apartado III.1.2.1

Para cada condición de cultivo fue generada una ecuación de grado de reductancia conforme se describe en la Tabla III.10.

La ecuación generada fue substituida en la fila correspondiente al átomo de hidrógeno de los matrices C_m y C_c , obtenidas en el cálculo anterior,

que fueron posteriormente utilizadas para calcular los flujos corregidos de acuerdo con la metodología descrita anteriormente para balance elemental.

Como se ha mencionado en el apartado III.1.2.1, el objetivo de sustituir el balance de hidrógeno en la matriz estequiométrica, es el de dar más peso a las variables medidas y menos a aquellas que no se miden, es decir se substituye el balance de hidrógeno por un balance global de electrones que se pueden transferir al oxígeno.

Tabla III.10 Ecuación del grado de reductancia para cada situación de cultivo.

Substrato	D (h^{-1})	Ecuación del grado de reductancia
100% Glicerol	0,05	$4,17 + 4 k_{O_2} - 4,67 k_{GOL}$
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	$4,16 + 4 k_{O_2} - 4,67 k_{GOL} - 6 k_{MET}$
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	$4,12 + 4 k_{O_2} - 4,67 k_{GOL} - 6 k_{MET}$
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	$4,11 + 4 k_{O_2} - 4,67 k_{GOL} - 6 k_{MET}$
100% Metanol	0,05	$4,14 + 4 k_{O_2} - 6 k_{MET}$
100% Glucosa	0,16	$4,07 + 4 k_{O_2} - 4 k_{GLC}$
100% Glicerol	0,16	$4,12 + 4 k_{O_2} - 4,67 k_{GOL}$
60% Glicerol y 40% Metanol	0,16	$4,19 + 4 k_{O_2} - 4,67 k_{GOL} - 6 k_{MET}$
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	$4,17 + 4 k_{O_2} - 4,67 k_{GOL} - 6 k_{MET}$

III.3.2 Resultados y Discusión

Tal y como se ha explicado anteriormente, A. Solà (2004) realizó una serie de cultivos con *P. pastoris* operados en quimiostato, usando diferentes fuentes de carbono (glucosa, glicerol y/o metanol) y dos velocidades específicas de crecimiento (μ), una cercana a la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) observada en cultivos en discontinuo de *P. pastoris* usando glicerol como única fuente de carbono ($0,18 h^{-1}$) y otra cercana a la μ_{max} usando metanol como fuente única de carbono ($0,07 h^{-1}$), Solà (2004). Estos cultivos en quimiostato se realizaron en un volumen de 0,8 litros, usando un medio definido con $10 g L^{-1}$ de fuente(s) de carbono. La tasa de dilución, la concentración (medida experimental) de fuente de carbono (glucosa, glicerol y/o metanol) en el medio de alimentación, y de velocidades de producción de CO_2 (CER) y de consumo de O_2 (OUR) están

listadas en la Tabla III.11. En los casos para los cuales A. Solà no obtuvo datos experimentales de CER y OUR (Solà, 2004), se realizaron réplicas de los cultivos en las mismas condiciones. En ninguno de los cultivos realizados en condiciones aeróbicas fue detectada la formación de etanol y acetato extracelulares; además, en cultivos realizados con metanol o mezclas de metanol y glicerol tampoco fueron detectados la presencia de ácido fórmico y formaldehído en el medio de cultivo.

Tabla III.11 Tasa de dilución (D), concentraciones de fuente(s) de carbono (glucosa, glicerol, metanol) en el medio de cultivo de alimentación Concentraciones de substrato(s) residual en el cultivo, biomasa, velocidad específica de formación de dióxido de carbono (CER) y velocidad oxígeno consumido (OUR)). Las relaciones en % de metanol y glicerol en los cultivos de substratos mixtos están referidos a peso (p/p).

<i>Substrato</i>	<i>D (h⁻¹)</i>	<i>Fuente(s) de carbono a la entrada del reactor (g L⁻¹)</i>	<i>Fuente(s) de carbono a la salida del reactor (g L⁻¹)*</i>	<i>Biomasa (g L⁻¹)</i>	<i>CER (mmoles CO₂ h⁻¹)</i>	<i>OUR (mmoles O₂ h⁻¹)</i>
100% Glicerol	0,05	10,46	0,00	5,50	6,64	9,44
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	7,56 1,88	0,00 0,09	4,74	6,00	10,48
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	5,14 3,76	0,00 0,17	3,82	6,00	9,20
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	4,00 6,00	0,00 0,00	3,88	6,72	10,72
100% Metanol	0,05	10,22	2,43	1,93	5,28	11,68
100% Glucosa	0,16	9,95	0,50	5,36	13,60	11,60
100% Glicerol	0,16	9,13	3,05	3,85	7,84	7,04
60% Glicerol y 40% Metanol	0,16	5,14 3,76	0,05 2,61	3,15	9,68	14,40
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	3,40 5,35	0,00 3,93	2,58	6,96	11,04

Datos de Solà (2004)

*cifra superior corresponde a glicerol y cifra inferior a metanol

Con los datos experimentales obtenidos de Solà (2004) (Tabla III.11), fue realizado un balance de carbono, con la finalidad de verificar si dichos datos presentaban errores de medición importantes, como paso previo a ser utilizados en el análisis de flujos metabólicos. Los errores en el balance de carbono de cada cultivo están listados en la Tabla III.12.

Tabla III.12 Error obtenido en los balances de carbono.

Substrato	D (h^{-1})	Error (%)
100% Glicerol	0,05	5
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	7
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	3
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	3
100% Metanol	0,05	15
100% Glucosa	0,16	10
100% Glicerol	0,16	0
60% Glicerol y 40% Metanol	0,16	5
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	5

En la mayoría de los cultivos realizados, los balances de carbono cierran con un error del 5% aproximadamente o menor. Sólo dos cultivos, el realizado con 100% glucosa y con 100% metanol presentaron un error significativamente mayor (10% y 15%, respectivamente), hecho que condiciona la exactitud de los flujos metabólicos calculados para las células creciendo en estas condiciones. En el caso específico del cultivo con metanol como única fuente de carbono, el mayor error podría ser debido a una pérdida significativa de substrato por evaporación (*stripping*).

Los datos de RQ encontrados en la bibliografía obtenidos en cultivos de levaduras metilotróficas son escasos. O. Cos (Cos, 2005), en cultivos a elevadas densidades celulares realizados en discontinuo con la misma cepa que A. Solà, creciendo con glicerol como única fuente de carbono, ha obtenido valores de RQ alrededor de 0,55 en la fase exponencial del cultivo (es decir, a μ_{\max} o cercanas a la μ_{\max}), mientras que para cultivos en *fed-batch* usando metanol como única fuente de carbono ha obtenido RQ menores, del orden de 0,4. Egli *et al.* (1982) realizó una serie de cultivos en continuo con las levaduras metilotróficas *Hansenula polymorpha* (*Pichia augusta*) y *Kloeckera* sp., usando glucosa, metanol y distintas mezclas de metanol: glucosa como

fuentes de carbono. Egli *et al.* (1982) vieron que, al aumentar la proporción de metanol respecto a glucosa en el medio de alimentación, el RQ disminuye gradualmente desde aproximadamente 1,0, cuando las células crecen sobre glucosa, hasta 0,45-0,55 característico del metanol como única fuente de carbono.

En general, los valores de RQ calculados para los cultivos de A. Solà (Tabla III.13) estarían dentro de los rangos reportados por Cos (2005) y Egli *et al.* (1982), pero pone de manifiesto algunos posibles errores significativos en sus medidas de OUR. Concretamente, para el cultivo de 100% glicerol creciendo a μ alta sin limitación de O₂ esta diferencia es muy clara (RQ de 1,11 A. Solà vs 0,55 O. Cos). Dichos errores pueden ser debidos a una subestimación de la cantidad de O₂ consumido por las células cuando el aire de salida del reactor no es desecado completamente antes de ser analizado por el espectrómetro de masas.

Las tasas específicas de consumo de sustrato y producción de los metabolitos están listadas en la Tabla III.13. En los casos que hubo sustratos residuales en el reactor, se consideraron tasas específicas de consumo por parte de las células, es decir, la diferencia entre el caudal de sustrato en la entrada menos el caudal de sustrato en la salida del reactor, por unidad de biomasa.

Egli *et al.* (1986) observaron que la concentración residual de metanol es siempre más baja durante el crecimiento con mezclas de sustrato que en cultivos operados con metanol como única fuente de carbono. Según estos autores, la actividad específica de la enzima AOX es más alta que cuando las células de *P. pastoris* son crecidas en metanol o en glicerol como fuente de carbono. Una probable explicación es que el metanol es el sustrato limitante de la reacción, las células mantienen un alto índice de oxidación del sustrato aumentando la cantidad de la enzima a tasas limitantes, disminuyendo así la concentración residual de metanol (Brinkmann *et al.*, 1990). De manera análoga, se ha demostrado que la actividad específica de la enzima AOX aumenta cuando disminuye la tasa de dilución en cultivos crecidos en quimiostato usando metanol como única fuente de carbono (Jungo *et al.*, 2006). En este estudio se observó un comportamiento similar,

donde la concentraciones de metanol residual en cultivos a elevada tasa de dilución ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$) fueron más altas en los cultivos correspondientes operados a velocidad de crecimiento más baja ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$). Además, en el caso de los cultivos a una velocidad de crecimiento más alta también se observó que la concentración de metanol residual en el caldo de cultivo aumenta con el aumento de la fracción de metanol en el medio de alimentación (Tabla III. 11).

Para el análisis de flujos metabólicos se calcularon primeramente las tasas específicas de consumo o producción para cada tipo de sustrato y producto del cultivo, obtenidas según se describe en Materiales y Métodos (Capítulo II), y expresadas en $\text{mmol h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{biomasa}}$.

Tabla III.13 Tasas específicas de sustratos y productos obtenidas experimentalmente.

Substrato	<i>D</i> (h⁻¹)	Substrato (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	OUR (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	CER (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	Biomasa (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	RQ*
100% Glicerol	0,05	-1,03	-2,14	1,50	1,74	0,76
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	-0,87 -0,59	-2,75	1,59	1,82	0,58
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	-0,73 -1,47	-3,02	1,97	1,59	0,65
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	-0,56 -2,42	-3,44	2,16	1,81	0,63
100% Metanol	0,05	-6,31	-7,56	3,44	1,60	0,45
100% Glucosa	0,16	-1,57	-2,71	3,18	5,91	1,17
100% Glicerol	0,16	-2,75	-2,30	2,55	5,67	1,11
60% Glicerol y 40% Metanol	0,16	-2,81 -1,83	-5,71	3,83	5,65	0,67
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	-2,29 -2,75	-5,35	3,37	5,40	0,63

(*) El RQ es definido como la relación entre CER/OUR.

III.3.2.1 Reconciliación de datos experimentales por balance elemental

Los valores de velocidades de conversión obtenidos a través del balance elemental (Tabla III.14), revelaron que los valores calculados obtenidos para las medidas de gases (CER y OUR) presentaron diferencias significativas en relación a los valores experimentales, especialmente entre los valores medidos y reconciliados de OUR, lo que resultó en valores de RQ menores que los inicialmente determinados experimentalmente. Por ejemplo, tal y como se observa en la Tabla III.14 y Figura III.3, en los cultivos operados con mezclas de glicerol y metanol a μ baja, estos valores decrecen exponencialmente con el aumento de la fracción de metanol en el medio de alimentación, confirmando las observaciones descritas por Egli *et al.* (1982). Las tasas de consumo de substrato calculadas a través de la metodología por balance elemental fueron iguales a las obtenidas experimentalmente; sin embargo, la tasas de formación de biomasa reconciliada presentó valores más altos respecto a las medidas experimentales. Los grados de libertad (rango (R)) para todas las situaciones de cultivo fueron igual a 2, lo que corresponde a 0,575 del test de distribución χ^2 a un nivel de confianza de 75% ($\alpha = 0,25$). Este valor fue comparado con los valores de h obtenidos para cada condición de cultivo (Tabla III.14) y en todas las situaciones el valor encontrado fue menor que el valor hallado en las tablas. Ello significa que los datos reconciliados contendrían errores sólo con un nivel de confianza muy bajo (menor del 0,25). Por tanto, desde un punto de vista estadístico, se acepta la hipótesis de que los resultados calculados están de acuerdo con el balance estequiométrico global planteado.

Tabla III.14 Tasas específicas de sustratos y productos obtenida a través del balance elemental.

Substrato	<i>D</i> (h⁻¹)	<i>Substrato</i> ± SD* (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	<i>OUR</i> ± SD (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	<i>CER</i> ± SD (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	<i>Biomasa</i> ± SD (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	<i>RQ</i>	<i>h</i>
100% Glicerol	0,05	-1,09 ± 0,02	-2,14 ± 0,07	1,57 ± 0,06	1,77 ± 0,07	0,73	0,546
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	-0,90 ± 0,01 -0,54 ± 0,01	-2,37 ± 0,04	1,43 ± 0,03	1,54 ± 0,04	0,60	0,463
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	-0,73 ± 0,02 -1,46 ± 0,02	-3,81 ± 0,06	1,98 ± 0,05	1,70 ± 0,05	0,52	0,396
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	-0,56 ± 0,01 -2,33 ± 0,03	-4,76 ± 0,06	2,15 ± 0,04	1,89 ± 0,04	0,45	0,226
100% Metanol	0,05	-5,71 ± 0,08	-9,96 ± 0,15	3,94 ± 0,08	1,80 ± 0,05	0,40	0,378
100% Glucosa	0,16	-1,50 ± 0,02	-3,36 ± 0,08	3,34 ± 0,08	5,74 ± 0,12	0,99	0,375
100% Glicerol	0,16	-2,75 ± 0,06	-3,56 ± 0,12	2,37 ± 0,10	6,05 ± 0,20	0,67	0,251
60% Glicerol y 40% Metanol	0,16	-2,78 ± 0,07 -1,85 ± 0,01	-7,34 ± 0,06	4,07 ± 0,05	6,32 ± 0,07	0,56	0,496
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	-2,23 ± 0,02 -2,70 ± 0,03	-7,06 ± 0,06	3,40 ± 0,05	6,08 ± 0,07	0,48	0,207

(*) SD Desviación Estándar.

III.3.2.2 Reconciliación de datos experimentales por balance por grado de reductancia

Los valores de las velocidades de conversión obtenidos a través del balance por grado de reductancia (Tabla III.15) para los cultivos con 100% glucosa y 100% glicerol (a las dos velocidades de crecimiento) fueron prácticamente los mismos encontrados cuando fue utilizado la metodología del balance elemental. Sin embargo, en cultivos operados con metanol o mezclas de glicerol/metanol hubo una diferencia significativa en los valores obtenidos para las velocidades de conversión de gases (CER y OUR): los valores reconciliados de velocidades de consumo de O₂ (OUR) fueron en general más bajos que los obtenidos a través del balance elemental, mientras que el valor de la velocidad de producción de CO₂ (CER) presentó valores más altos, lo que resultó mayores valores de RQ. También se observó que las tasas reconciliadas de consumo de substrato y formación de biomasa obtenidas a través de las dos metodologías fueron prácticamente iguales. En relación a los valores experimentales, la metodología de reconciliación por grado de reductancia presentó mayores valores para la formación de biomasa y menores valores de RQ, ello debido a que las tasas de producción de CO₂ (CER) y consumo de O₂ (OUR) son relativamente más altas. En este caso, también se observa que los valores de RQ decrecen de forma exponencial (tendencia de los datos) con el aumento de la fracción de metanol en el medio alimentación, aunque dicha disminución es menos acentuada que con los valores correspondientes de RQ obtenidos por la metodología por balance elemental (Figura III.2). El grado de libertad del sistema para cada condición de cultivo fue igual a 2, y a través del cálculo de la variable h (Ecuación II.17) se verificó que los datos experimentales son estadísticamente satisfactorios a un nivel de 75% (0,575) del test de distribución χ^2 (Tabla III.15). Es decir, la existencia de errores sólo podría considerarse a un nivel de confianza muy bajo (menor de $\alpha = 0,25$).

Tabla III.15 Tasas específicas de sustratos y productos obtenida a través del balance grados de reductancia.

Substrato	<i>D</i> (h⁻¹)	Substrato ± SD* (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	OUR ± SD (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	CER ± SD (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	Biomasa ± SD (mmol h⁻¹g⁻¹celulas)	RQ	<i>h</i>
100% Glicerol	0,05	-1,09 ± 0,02	-2,14 ± 0,07	1,57 ± 0,06	1,77 ± 0,07	0,73	0,546
80% Glicerol y 20% Metanol	0,05	-0,91 ± 0,01 -0,54 ± 0,01	-2,13 ± 0,04	1,45 ± 0,04	1,53 ± 0,04	0,68	0,512
60% Glicerol y 40% Metanol	0,05	-0,74 ± 0,01 -1,49 ± 0,03	-3,19 ± 0,05	2,06 ± 0,04	1,68 ± 0,04	0,64	0,395
40% Glicerol y 60% Metanol	0,05	-0,57 ± 0,01 -2,42 ± 0,04	-3,80 ± 0,06	2,27 ± 0,05	1,88 ± 0,05	0,60	0,357
100% Metanol	0,05	-5,79 ± 0,08	-7,30 ± 0,12	4,02 ± 0,08	1,80 ± 0,05	0,55	0,539
100% Glucosa	0,16	-1,52 ± 0,03	-3,86 ± 0,13	3,37 ± 0,13	5,91 ± 0,20	1,00	0,301
100% Glicerol	0,16	-2,74 ± 0,06	-3,62 ± 0,12	2,35 ± 0,11	6,04 ± 0,20	0,65	0,245
60% Glicerol y 40% Metanol	0,16	-2,80 ± 0,07 -1,86 ± 0,04	-6,53 ± 0,18	4,15 ± 0,16	6,29 ± 0,21	0,64	0,533
40% Glicerol y 60% Metanol	0,16	-2,25 ± 0,04 -2,76 ± 0,05	-5,94 ± 0,10	3,56 ± 0,09	6,05 ± 0,12	0,60	0,291

(*) SD Desviación Estándar.

Estudios realizados por Egli *et al.* (1982) con las levaduras *H. polymorpha* y *Kloeckera* sp. en cultivos operados en continuo y crecidas en medios conteniendo glucosa, metanol o mezclas de glucosa/metanol como fuente de carbono revelaron que, a una velocidad de crecimiento de aproximadamente $0,16 \text{ h}^{-1}$ (en condiciones de co-asimilación de los dos substratos), el RQ disminuyó con el aumento de la fracción de metanol en el medio de alimentación. Según estos autores, el consumo de oxígeno y la producción de CO_2 aumentan con el aumento de la fracción de metanol en el medio de alimentación. Para *P. pastoris* se obtuvo la misma tendencia en los valores de RQ estimados a partir las velocidades de conversión reconciliadas (por las dos metodologías, balance elemental y grados de reductancia) de los cultivos con mezclas de glicerol/metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ (es decir, en condiciones de co-asimilación de los dos substratos), realizados por Solà (2004), tal y como se presenta en la Figura III.3. Cabe destacar que, a pesar de que los experimentos realizados por Solà (2004) se realizaron con una fuente multicarbono distinta a la usada por Egli *et al.* (1982), se observó la misma tendencia en la evolución de valores RQ respecto a la fracción de metanol en el medio de alimentación. Por el contrario, en los cultivos de *P. pastoris* con mezclas de glicerol:metanol a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ donde sólo una parte del metanol del medio de alimentación es asimilado por las células, esta tendencia no es tan acusada, aunque el valor de RQ disminuye con el aumento de la concentración de metanol en el medio de cultivo.

Finalmente, cabe también destacar que el valor del RQ calculado a partir de los datos experimentales de OUR y CER para el cultivo de *P. pastoris* operado con glucosa a $0,16 \text{ h}^{-1}$, (que no se muestra en la Figura III.3), fue muy similar al valor corregido a través del balance elemental y a los valores experimentales reportados por Egli *et al.* (1982) para células de *H. polymorpha* creciendo con glucosa.

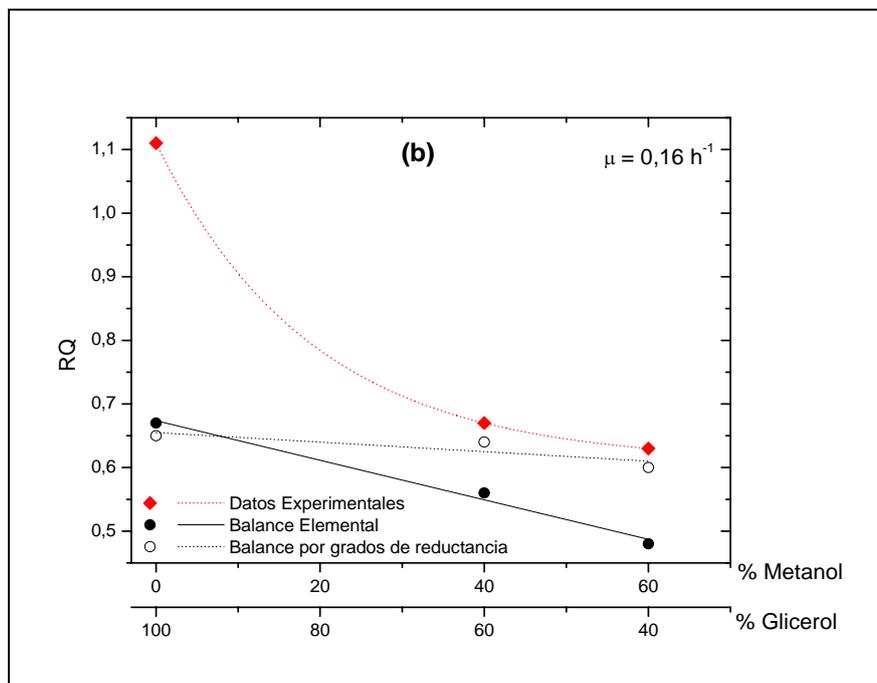
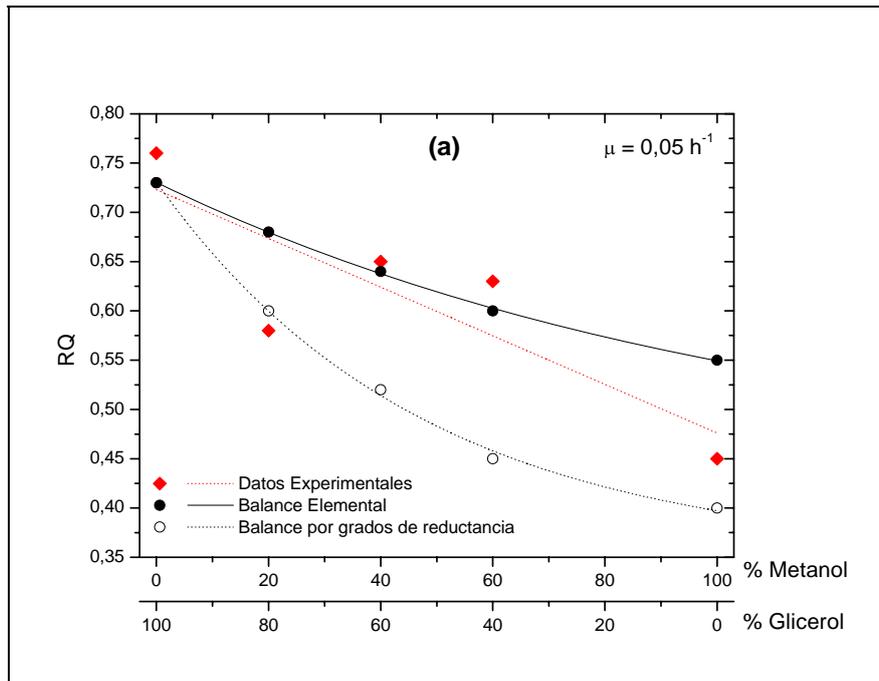


Figura III.3 Coeficiente de respiración (RQ) en función de la composición en cultivos operados en continuo a $\mu = 0,05$ (a) y $0,16 \text{ h}^{-1}$ (b), donde (♦) representa los datos experimentales; (●) valores obtenidos a través del balance elemental; (○) valores obtenidos a través del balance de grados de reductancia.

Jungo *et al.* (2007) realizaron experimentos con *P. pastoris* crecida en medio con metanol y glicerol; estos autores verificaron que con el

aumento de la fracción de metanol en el medio de alimentación, la tasa de asimilación (consumo) de oxígeno, la tasa de producción de CO₂ y la tasa de producción de calor aumentaron significativamente frente a cultivos operados con glicerol. Sin embargo, la producción de biomasa (rendimiento de biomasa) disminuyó con el aumento de fracción del metanol en el medio de alimentación. En nuestro caso, se observó el aumento del consumo de oxígeno y de la producción de CO₂ con el aumento de la fracción de metanol en el medio (disminuyendo el valor de RQ).

Según Babel *et al.* (1993), citado en Jungo *et al.* (2007), un fenómeno importante en los procesos fermentativos realizados con mezclas de sustratos y relacionado con el metabolismo celular es el efecto del “sustrato auxiliar”; este fenómeno puede ser definido como el aumento del rendimiento del crecimiento celular debido a la utilización simultánea de sustratos fisiológicamente similares. Según estos autores, el rendimiento celular puede ser aumentado con la utilización de mezclas de sustratos debido a su utilización más eficaz (respecto a la asimilación de cada uno de ellos por separado). Por otro lado, la asimilación de sustratos mixtos conlleva, por regla general, un incremento de las velocidades de crecimiento específicas (respecto a las velocidades de crecimiento específicas máximas para el sustrato en el cual las células están creciendo en una tasa de crecimiento específica más baja). Así pues, en este trabajo se observó que en cultivos limitados por carbono (a baja velocidad específica de crecimiento) la co-asimilación de metanol y glicerol resulta en un aumento del rendimiento de biomasa respecto al rendimiento observado para el cultivo a la misma velocidad de dilución usando metanol como única fuente de carbono (el aumento de la fracción de glicerol en el medio de alimentación aumentó el rendimiento celular), demostrando que el glicerol funciona como sustrato auxiliar. Además, en los cultivos a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ también se observó en los casos donde hubo una co-asimilación parcial de metanol que el glicerol funciona como sustrato auxiliar, ya que las células asimilan metanol a una velocidad de dilución muy superior ($0,16 \text{ h}^{-1}$) a la velocidad específica de crecimiento máxima determinada para células creciendo sobre metanol puro ($0,07 \text{ h}^{-1}$, Solà, 2004) (Tabla III.11, III.14 y III.15).

En muchos trabajos publicados, los valores escogidos para calcular flujos metabólicos son los valores corregidos (reconciliados) a través del balance elemental. Según algunos autores, la principal ventaja es que el error obtenido en las medidas es minimizado. Es decir, por ejemplo los balances de carbono son prácticamente iguales a cero. Esto minimiza la propagación del error realizado en las medidas experimentales en los cálculos de flujos metabólicos subsiguientes. La acumulación de errores en cálculos sucesivos podría resultar en la estimación de unos flujos metabólicos no compatibles con el metabolismo del microorganismo en estudio o con estimaciones de flujos metabólicos obtenidos experimentalmente mediante técnicas de marcaje isotópico. Así por ejemplo, en el trabajo publicado por van Gulik *et al.* (2000) el cálculo de flujos metabólicos para un modelo estequiométrico de *S. cerevisiae* fue obtenido a través de los datos experimentales corregidos por el balance elemental y por grados de reductancia.

Cabe resaltar también, aunque los resultados presentados por las dos metodologías sean muy parecidos, los valores de h hallados en la metodología de reconciliación por balance elemental fueron un poco menores, hecho que indica que los resultados obtenidos con base a dicha metodología son más fiables que los obtenidos por la metodología de reconciliación por grado de reductancia.

En este trabajo, los cálculos de flujos metabólicos y flujos asociados a módulos elementales también fueron obtenidos a partir de los valores de velocidades específicas de consumo de sustratos y producción de productos corregidos (reconciliados) con base al balance elemental, ya que además del valor de la variable h sea menor, los valores de RQ fueron más parecidos con los valores obtenidos por Egli *et al.* (1982) y Cos (2005).

CAPÍTULO IV

Análisis clásica de flujos metabólicos

En este capítulo se describe cómo se ha construido el modelo de red metabólica con base a los conocimientos descritos en el Capítulo I y cómo se realizaron cálculos de flujos metabólicos a través de ésta red partiendo de los datos fisiológicos reconciliados obtenidos en el Capítulo III, utilizando la metodología clásica descrita principalmente por Stephanopoulos *et al.* (1998).

IV.1 Introducción

El análisis de flujos metabólicos (*Metabolic Flux Analysis* – MFA) es una metodología matemática que permite calcular los flujos metabólicos intracelulares de un sistema *in vivo* en estado estacionario. Para ello es necesario disponer de una descripción o modelo de las reacciones intracelulares cuyos flujos se desea conocer y de la medida de algunos de los flujos. Generalmente, los flujos medidos se calculan a partir de algunas o todas las velocidades de consumo de substratos (fuentes de carbono, de nitrógeno, de oxígeno, etc.) y/o producción de metabolitos (por ejemplo, CO₂, etanol, acetato, etc.) y macromoléculas (DNA, RNA, lípidos, proteínas, carbohidratos, etc.).

El MFA puede ser utilizado también para calcular rendimientos teóricos de ciertos metabolitos específicos.

Este procedimiento tiene gran interés cuando el objetivo buscado es mejorar el proceso de síntesis de productos de alto valor añadido mediante procesos biotecnológicos (Nissen *et al.*, 1997; Stephanopoulos *et al.*, 1998; Schuster *et al.*, 2000). La cuantificación permite, por ejemplo, determinar las condiciones de máxima producción del metabolito de interés para una determinada cantidad de sustrato utilizado. Esta metodología permite también identificar características importantes relacionadas con la regulación de la red de metabolitos como por ejemplo si los nodos (ramificaciones) de las rutas metabólicas son flexibles o rígidos. Un nodo es flexible cuando la distribución relativa del flujo, a través de las distintas ramas que lo forman, varía de acuerdo a las necesidades metabólicas del momento. Generalmente, las enzimas involucradas en las reacciones de dicho nodo presentan afinidades similares con el sustrato de la reacción. En cambio, un nodo es rígido cuando las razones entre los flujos de entrada y salida del nodo están estrictamente regulados (Stephanopoulos *et al.*, 1998). En este caso, aunque tenga lugar una variación en cualquiera de los flujos de entrada la relación entre éste y los flujos de salida se mantiene. Naturalmente existen situaciones intermedias en las que los nodos responden de manera intermedia y por tanto se denominan nodos débilmente rígidos.

Según Jørgensen (Jørgensen *et al.* 1995); Nissen (Nissen *et al.* 1997) y Stephanopoulos (Stephanopoulos *et al.* 1998) entre las aplicaciones del MFA se hallan:

- *Calcular los flujos extracelulares no medidos e identificar errores en las determinaciones analíticas* – A través del análisis de modelos estequiométricos y de flujos medidos es posible calcular flujos intracelulares no medidos, así como las tasas de producción de varios metabolitos o productos. Así, el cálculo de flujos puede utilizarse como modelo de predicción y también puede ser utilizado para la validación o revisión del propio modelo o de los datos obtenidos experimentalmente.
- *Calcular la producción máxima teórica para un determinado sustrato o producto* – El cálculo de la producción teórica está basado

en la estequiometría de una vía metabólica configurada para la máxima producción de un producto a través de un determinado sustrato. Las relaciones entre flujos pueden ser fijadas con la finalidad de obtener la máxima cantidad de producto formado y restringiendo así la producción de un determinado metabolito intermediario indeseado;

- *Identificar la existencia de diferentes vías* – La construcción de la matriz estequiométrica basado en el MFA requiere una detallada información sobre la bioquímica del microorganismo. En algunos casos la estequiometría de las vías no es conocida o alguna de ellas puede estar inactiva, o aún, puede haber varias isoenzimas con igual función o con pequeñas variaciones en sus funciones que no son conocidas con detalle. A través del cálculo de flujos metabólicos de las diferentes rutas bioquímicas puede ser posible identificar el conjunto de vías que estén activas o que sean más probables. Así mismo, permite obtener informaciones funcionales de diferentes isoenzimas y/o vías;
- *Examinar la influencia de las vías metabólicas alternativas y su distribución de flujos metabólicos* – En conexión con la optimización de la producción del metabolito, es posible identificar una o varias condiciones fisiológicas, para el aumento de la producción de un metabolito en particular sobre un determinado sustrato o para aumentar el flujo principal con la finalidad de obtener el metabolito deseado.
- *Identificar un posible punto de ramificación rígida o nodos en una vía celular* – A través de la comparación de la distribución de flujos en diferentes condiciones de operación es posible identificar si el nodo de la vía es rígido o flexible. En general el punto de enlace rígido resiste a cambios de división de flujo, sirviendo para identificar las reacciones que limitan el flujo por una determinada vía metabólica.

IV.1.1 Modelización matemática

Según Vallino & Stephanopoulos (1990), para definir un modelo estequiométrico que describa en principio las principales reacciones bioquímicas entre los principales metabolitos existentes del microorganismo estudiado, se debe primeramente llevar a cabo un balance de masa sobre los metabolitos intracelulares. De acuerdo con estos autores, en este balance se deben considerar todas las reacciones y todos los metabolitos existentes en el microorganismo. Los balances deberán cumplir las leyes de conservación de masa de todos los elementos básicos (C, H, O, N, S y P). Las concentraciones intracelulares de los metabolitos se consideran constantes y sus variaciones se calculan a través de las tasas de las reacciones en las que intervienen. Según estos autores, cuando los datos del metabolismo del microorganismo en estudio son insuficientes se debe agregar datos de otros microorganismos que presenten rutas bioquímicas similares o incluir resultados de ensayos enzimáticos para verificar si las vías metabólicas están activas o no.

La estequiometría de una serie de reacciones intracelulares se especifica a través de una matriz estequiométrica.

De acuerdo con van Gulik & Heijnen (1995) y Vanrolleghem *et al.* (1996) el balance de masa para cada metabolito i , que interviene en un sistema metabólico con volumen V en un bioreactor con crecimiento y/o producción celular puede definirse por:

$$\frac{dVC_i}{dt} = V(r_{Ai} + \Phi_i) \quad (\text{IV.1})$$

donde: r_{Ai} representa la velocidad de conversión del metabolito i . Este valor está determinado por todas las velocidades de las reacciones en que participa el metabolito i y donde es producido o consumido. $\Phi_i = \mu C_i$ representa la velocidad de transporte de i sobre el límite de un bioreactor con volumen V , donde μ representa la velocidad específica de crecimiento celular (equivalente a la tasa de dilución).

Según Vanrolleghem *et al.* (1996) y Stephanopoulos *et al.* (1998) en las reacciones metabólicas intervienen metabolitos tanto intracelulares como extracelulares, pudiendo considerarse que para los metabolitos esencialmente intracelulares todo lo que se produce se consume. En este último caso r_{Ai} se reduce a cero, si se considera que en el microorganismo no existen compartimentos internos, porque no hay velocidad de transporte. Es decir para los metabolitos intracelulares se considera que todo lo producido es consumido siendo su balance neto igual a cero. Además, puesto que los cultivos se llevan a cabo habitualmente en un quimiostato y las concentraciones extracelulares pueden considerarse constantes en el estado estacionario, la Ecuación IV.1 puede ser reducida a:

$$\Phi_i = -r_{Ai} \quad (\text{IV.2})$$

Sólo un pequeño número de metabolitos se intercambia entre el sistema metabólico y el ambiente (nutrientes, CO₂, O₂, H₂O, biomasa y productos). Para metabolitos que son intercambiados con el ambiente tendremos la Ecuación IV.2. La tasa de conversión de estos compuestos se determina por las tasas de las reacciones bioquímicas en las que el metabolito i es consumido o producido. Para todos los compuestos intracelulares restantes, $\Phi_i = 0$ y por tanto la Ecuación IV.2 se simplifica como:

$$r_{Ai} = 0 \quad (\text{IV.3})$$

La Ecuación IV.3 se puede describir en forma matricial como:

$$r_{Ai} = G^T \times v \quad (\text{IV.4})$$

donde G^T representa la matriz transpuesta, compuesta por los coeficientes estequiométricos de J reacciones r_j , definida como $G^T = [r_1, r_2, \dots, r_j]$; v representa el vector de tasas de las reacciones en que intervienen los metabolitos intracelulares. La ecuación de este vector representa el balance algebraico lineal para los K metabolitos con J flujos metabólicos desconocidos. El número de reacciones (J) es habitualmente mayor que el número de metabolitos (K).

Para un conjunto de ecuaciones algebraicas, los grados de libertad vienen dados por:

$$F = J - K \quad (\text{IV.5})$$

es decir el número de grados de libertad es igual al número de metabolitos (balances) menos el número de reacciones (flujos). Esto representa el número mínimo de medidas que son necesarias para el cálculo de todo el conjunto de flujos metabólicos. Si n tasas de reacciones o flujos metabólicos fueran medidos y su número fuera igual al valor de F calculado anteriormente, el sistema será determinado y la solución será única. En este caso todas las demás tasas de reacción podrían ser calculadas a partir de los valores de las tasas medidas (en el caso de incluir consideraciones de irreversibilidad en las reacciones del modelo su solución sería distinta).

Por otro lado, si el número de tasas de reacciones o flujos metabólicos medidos fueran mayores que F , el sistema será sobredeterminado, lo que significa que se dispone de ecuaciones extra. La existencia de estas ecuaciones extras puede ser utilizada para el análisis de consistencia de un balance total. Además permite verificar la exactitud de la medida de los flujos, la validez de la hipótesis del estado pseudo-estacionario y el cálculo de los valores los flujos intracelulares desconocidos.

En el caso de que el número de reacciones o flujos metabólicos medidos fueran menores que F el sistema será indeterminado, y los flujos desconocidos solo podrían determinarse a partir de información adicional o usando un criterio de optimización global impuesto en el balance metabólico.

IV.1.1.1 Sistemas metabólicos determinados

La resolución de los flujos de un conjunto vías metabólicas definido a partir de un sistema determinado puede obtenerse a partir la consideración de los compuestos que no son intercambiados con el ambiente exterior, en estos casos $r_{Ai} = 0$. Como las vías metabólicas están compuestas por n reacciones bioquímicas intracelulares al tiempo que intervienen p compuestos que son intercambiados con el exterior, el total de tasas de reacción desconocidas en principio es igual a $n + p$. El sistema puede ser resuelto siempre que $(n + p - \text{rango } G)$ tasas de reacción sean medidas.

De acuerdo con van Gulik & Heijnen (1995), Vanrolleghem *et al.* (1996) y Stephanopoulos *et al.* (1998) la solución de la Ecuación IV.4 puede ser resuelta a partir de su consideración como sistema algebraico. Para que la ecuación pueda ser resuelta, la matriz G y el vector v se dividen respectivamente en las submatrices G_m y G_c y v_m y v_c , donde G_c es una matriz cuadrada de dimensiones $[K \times K]$ que está asociada con la tasa de velocidad de reacción de v_c , y G_m está asociada con las tasas de conversión medidas (generalmente tasas de intercambio cambio v_m distintas de cero). La ecuación resultante será:

$$0 = G^T \times v = G_m^T \times v_m + G_c^T \times v_c \quad (\text{IV.6})$$

Donde se miden exactamente un número F de flujos (v_m). La Ecuación IV.6 puede ser rescrita conforme la Ecuación IV.7 en la cual el vector v_c se ha aislado y la matriz G_c se ha invertido.

$$v_c = - (G_c^T)^{-1} \times G_m^T \times v_m \quad (\text{IV.7})$$

La Ecuación IV.7 permite calcular v_c mediante K ecuaciones algebraicas lineales. En algunos casos la solución puede ser encontrada a través del método de eliminación de Gauss-Jordan.

Un requisito para que la solución sea única es que todas las ecuaciones algebraicas sean linealmente independientes, es decir que ninguna ecuación algebraica sea combinación lineal de otras ecuaciones. Esta independencia lineal es necesaria para la inversión de la matriz G_c , lo que puede ser verificado a través de la determinación del rango de la matriz. Si, la matriz contiene un rango entero igual a K , el $\det (G_c)$ será diferente de cero, y la matriz puede ser invertida. En este caso los flujos no medidos podrán ser calculados. Sin embargo, si el rango de G_c es menor que K , la matriz será singular lo que significa que el $\det (G_c)$ será igual a cero y la solución no podrá hallarse a través de la Ecuación IV.7. En este caso el sistema se denomina indeterminado.

El rango de la matriz G_c puede ser menor que K principalmente en dos ocasiones:

- Si el sistema de reacciones estequiométricas del conjunto de filas contenida en G_c fuera linealmente dependiente, una o más filas

incluidas en G_c se puede escribir como combinación lineal de otras líneas. Si las reacciones estequiométricas fueran linealmente dependientes se podrá comprobar determinando del rango de la matriz estequiométrica total G .

- Si G posee rango completo, es decir, $\text{rango}(G) = K$, existe al menos una submatriz cuadrada de G con rango entero. Ésta puede ser utilizada para cálculos de inversión.
- Si el $\text{rango}(G) < K$, una de las filas de G_c será linealmente dependiente de otras líneas. Debido a un gran número de reacciones típicamente presente en las vía metabólicas, la cuestión de la dependencia lineal de las reacciones estequiométricas ocurre frecuentemente. En estos casos es necesaria la eliminación de todas las reacciones linealmente dependientes y/o incluir informaciones adicionales para su solución;
- Aunque G tenga rango completo, es posible que el conjunto de medidas escogidos resulte en una matriz G_c que posea un rango que es menor que K . En este caso este conjunto de medidas podrá ser utilizado como análisis de consistencia. Sin embargo, primero deberá usarse un conjunto de medidas distinto para determinar los flujos desconocidos.

IV.1.1.2 Sistemas metabólicos sobredeterminados

Un sistema sobredeterminado ocurre cuando el número de flujos medidos es mayor que los grados de libertad del sistema. En este caso, la utilización de los datos disponibles permite realizar un análisis de datos estadísticos y minimización de errores. Además, con un sistema sobredeterminado es posible verificar la validez del estado estacionario asumido habitualmente para los metabolitos intracelulares.

En un sistema sobredeterminado la matriz G_c^T de la Ecuación IV.7 no es cuadrada, no pudiendo ser invertida. En este caso el sistema puede resolverse como (Stephanopoulos *et al.*, 1998):

$$v_c = - (G_c^T)^{\#} G_m^T \times v_m \quad (\text{IV.8})$$

donde $(G_c^T)^{\#}$ es la pseudoinversa de G_c^T que puede calcularse como:

$$(G_c^T)^{\#} = (G_c G_c^T)^{-1} \times G_c \quad (\text{IV.9})$$

La Ecuación IV.9 se utiliza cuando el producto $G_c G_c^T$ no es singular, una condición que se satisface cuando G_c tiene rango completo. Esta es la condición para la solución de un sistema sobredeterminado. Una solución equivalente, basada en la descomposición en valores singulares, puede obtenerse utilizando el método de la pseudoinversa de Moore-Penrose que es más conveniente desde el punto de vista numérico.

Para una matriz cuadrada la pseudoinversa es idéntica con su inversa, la Ecuación IV.8 es una solución general de la Ecuación IV.6 cuando el número de medidas es mayor o igual a los grados de libertad.

La Ecuación IV.8 es muy utilizada cuando hay pequeñas variaciones en las medidas experimentales. Sin embargo, si hubiera variaciones significativas en algunos flujos medidos podría no satisfacerse la condición de conservación del flujo en algunos nodos de la vía, principalmente en que la suma del flujo de masa entrante en un nodo puede ser distinto de la suma de flujos de masa provenientes de los otros nodos generando un problema en el cálculo de la distribución de flujos. Este problema puede ser identificado a través del error bruto contenido en el flujo medido.

La solución consistirá en primer lugar en calcular la matriz de redundancia, conforme la Ecuación IV.10:

$$R = G_m - G_c^T (G_c^T)^{\#} G_m \quad (\text{IV.10})$$

Y a través de ella se podrá determinar la matriz redundante reducida R_r seleccionando el conjunto de ecuaciones linealmente independientes de la misma.

En otro procedimiento, descrito por Tsai & Lee (1988) y citado por Stephanopoulos *et al.* (1998), se propone una mejor estimación para ambos tipos de flujos, los medidos y los no medidos, al mismo tiempo. La Ecuación IV.6 se puede reordenar resultando en:

$$\begin{pmatrix} v_m \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I & 0 \\ G^T & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_m \\ v_c \end{pmatrix} = T_x v \quad (\text{IV.11})$$

donde I es la matriz identidad de dimensión igual al número de flujos medidos. La primera línea de la Ecuación IV.11 especifica simplemente que $v_m = v_m$, a la vez que la segunda línea es idéntica a la Ecuación IV.6. Escrita de la forma mostrada, la Ecuación IV.11 introduce una separación exacta entre los vectores de los flujos medidos y calculados, v_c y v_m , respectivamente, además de no permitir ninguna mejora de los flujos medidos a través de la eliminación de algunas medidas. No obstante esto puede conseguirse a través de una división general alternativa del vector de flujo, donde los flujos, medidos o no, son separados en una forma alternativa obteniéndose:

$$\begin{pmatrix} v_m \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T_{11} & T_{12} \\ T_{21} & T_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \end{pmatrix} \quad (\text{IV.12})$$

La segunda línea de la Ecuación IV.12 refleja claramente el estado estacionario del balance de metabolitos. Las matrices T_{11} y T_{12} son definidas a través de la matriz identidad. Los vectores v_1 y v_2 se pueden seleccionar iguales a v_m y v_c respectivamente, con lo que el método resulta en el procedimiento explicado anteriormente. En cualquier caso la selección de los vectores v_1 y v_2 debe hacerse de forma que la matriz T_{22} pueda ser invertida para producir una solución del vector v_2 en términos de v_1 , obteniéndose:

$$v_2 = - T_{22}^{-1} T_{21} v_1 \quad (\text{IV.13})$$

Combinando la Ecuación IV.13 con la Ecuación IV.12, tendremos la relación entre la tasa medida v_m y los elementos de v_1 .

$$v_m = T_r v_1 \quad (\text{IV.14})$$

donde T_r es:

$$T_r = T_{11} - T_{12} T_{22}^{-1} T_{21} \quad (\text{IV.15})$$

La Ecuación IV.14 especifica un sistema sobredeterminado exactamente igual al obtenido con las ecuaciones originales de balance y si los errores medidos se hallan distribuidos normalmente con una media igual a cero y una matriz de varianza-covarianza igual a F , entonces el estimador de máxima probabilidad para los elementos de v_1 vendrá dado por:

$$\hat{v}_1 = (T_r^T F^{-1} T_r)^{-1} T_r^T F^{-1} v_m \quad (\text{IV.16})$$

donde la especie con circunflejo especifica el mejor estimador de las cantidades buscadas para errores de medida normalmente distribuidos. La estimación de los elementos de v_2 , \hat{v}_2 , pueden ser obtenidas por la combinación de la Ecuación IV.16 con la Ecuación IV.13, obteniéndose:

$$\hat{v}_2 = -T_{22}^{-1} T_{21}^{-1} \hat{v}_1 \quad (\text{IV.17})$$

Las Ecuaciones IV.16 y IV.17 representan la mejor estimación para todos los flujos en un modelo metabólico, tanto medidos como no medidos. Muchas veces no se dispone de información sobre la varianza y la covarianza de las medidas. Sin embargo, si los errores en los flujos medidos son de magnitud parecida y no están correlacionados, la Ecuación IV.16 puede ser rescrita utilizando la estimación por mínimos cuadrados de los elementos de v_1 . En este caso la ecuación resultante sería:

$$\hat{v}_1 = (T_r^T T_r)^{-1} T_r^T v_m \quad (\text{IV.18})$$

En la deducción previa se asumió indirectamente que se cumple la condición de estado estacionario y que todos los errores se hallan distribuidos sólo entre los flujos medidos. No obstante los errores pueden darse también en las ecuaciones del estado pseudo-estacionario, es decir que pequeñas acumulaciones de los metabolitos correspondientes son también posibles. Entonces la Ecuación IV.11, se puede utilizar para la estimación de los flujos intracelulares. La solución vendrá dada directamente a través de la Ecuación IV.19:

$$\hat{v} = (T^T F^{-1} T)^{-1} T^T F^{-1} \begin{pmatrix} v_m \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{IV.19})$$

donde: F es la matriz de la varianza-covarianza para los residuos tanto de los flujos medidos como de la suposición de estado pseudoestacionario. Como en el caso anterior, si los errores son de la misma magnitud, la estimación por mínimos cuadrados vendrá dada por la Ecuación IV.20.

$$\hat{v} = (T^T T)^{-1} T^T \begin{pmatrix} v_m \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{IV.20})$$

La Ecuación IV.20 es bastante utilizada para calcular flujos metabólicos por ser más sencilla. Sin embargo, la Ecuación IV.19 es

preferible y puede utilizarse especificando valores muy pequeños para las varianzas del estado pseudoestacionario. Los resultados obtenidos deberían ser idénticos a los obtenidos con la metodología precedente.

IV.1.1.3 Sistemas metabólicos indeterminados

Cuando el número de flujos medidos es menor que los grados de libertad del sistema, hay un número infinito de soluciones existentes para el conjunto de flujos. En este caso la resolución de sistemas indeterminados, representando vías metabólicas, se realiza a partir de la Ecuación IV.6. Todas las variables (flujos) pueden ser calculadas a través de la optimización lineal. Con esta técnica, es posible obtener una solución para los flujos intracelulares a través de la optimización de la función objetivo apropiada (van Gulik & Heijnen, 1995). En este caso la Ecuación IV.6 se reescribe en la siguiente forma:

$$G_{ex}^T v_{ex}^T = 0 \quad \text{y} \quad v_{ex} \geq 0 \quad (\text{IV.21})$$

donde G_{ex}^T es la matriz estequiométrica expandida que incluye, para las reacciones reversibles, la estequiometría de la reacción escrita como dos reacciones irreversibles de direcciones opuestas (formación y su reversa) y v_{ex} representa el correspondiente vector de flujos expandido, de dimensión J_{ex} .

Una resolución descrita por van Gulik & Heijnen (1995), consiste en dividir la matriz G_{ex} en G_{Am} y G_{Ac} , donde G_{Am} está asociada con el flujo medido representado por el vector v_{Am} , y G_{Ac} está asociado con el flujo a ser calculado, representado por el vector v_{Ac} , correspondiendo la ecuación:

$$G_{Ac}^T \times v_{Ac} + G_{Am}^T \times v_{Am} = 0 \quad (\text{IV.22})$$

La Ecuación IV.22 puede escribirse de la siguiente forma:

$$G_{Ac}^T \times v_{Ac} = b \quad (\text{IV.23})$$

donde: $b = - G_{Am}^T \times v_{Am}$

Para encontrar una solución al sistema es necesario aplicar métodos de programación lineal, en la cuál tendremos una función objetivo dado por:

$$Z = c^T \times v_{Ac} \quad (\text{IV.24})$$

La combinación lineal de los flujos v_{Ac} se minimiza bajo la siguiente condición:

$$A_{Ac} \times v_{Ac} = b \quad (IV.25)$$

donde el vector A_{Ac} contiene el factor de peso para cada variable.

La optimización lineal puede ser realizada usando cualquier método de minimización multivariable como por ejemplo la variación del algoritmo Simplex.

IV.1.1.4 Análisis de sensibilidad paramétrica

El análisis de sensibilidad tiene como objetivo verificar la sensibilidad o vulnerabilidad de la solución encontrada ante perturbaciones en las medidas. La primera etapa consiste en examinar si el sistema está bien condicionado o sea si la matriz estequiométrica está bien posicionada. El mal condicionamiento de la matriz estequiométrica implica que incluso pequeñas variaciones en las medidas pueden causar un gran impacto en el flujo calculado. La medida de la sensibilidad de una matriz por esta causa se mide por medio del llamado *número de condicionamiento*, que se describe por:

$$C(G^T) = \|G^T\| \|(G^T)^\# \| \quad (IV.26)$$

donde $\| \|$ indica la norma de una matriz y $(G^T)^\#$ es la pseudoinversa de la matriz estequiométrica.

El cálculo del número de condicionamiento puede ser difícil de calcular pero los paquetes de rutinas numéricos más habituales suelen incluir rutinas para ello. En general se requiere partir del cálculo de la norma de la matriz, la cual es una medida del mayor valor por el cual cualquier vector x es amplificado al multiplicarse por la matriz en cuestión y se define por:

$$\|G^T\| = \max \frac{\|G^T x\|}{\|x\|} \quad (IV.27)$$

Se puede demostrar que la Ecuación IV.27 es equivalente al cálculo de la raíz cuadrada del mayor valor propio (o autovalor o valor característico) de la matriz por el producto $G \cdot G^T$:

$$\|G^T\| = \sqrt{\lambda_{\max}(GG^T)} \quad (\text{IV.28})$$

A partir de los valores propios de GG^T y de los valores propios de una matriz similar a la pseudoinversa de G^T calculado como:

$$(G^T) = (GG^T)^{-1}G \quad (\text{IV.29})$$

Se puede calcular el número de condicionamiento usando la Ecuación IV.26. Sin embargo esta aproximación de cálculo usando los valores propios requiere mucho tiempo de cálculo y en la práctica se usan métodos alternativos. Como se ha dicho los autovalores de GG^T y los autovalores de una matriz (G^T) describen el número de condicionamiento. El cuadrado de los autovalores de la matriz GG^T son iguales a los denominados valores singulares de la matriz G^T . Éstos se hallan más fácilmente a través del método de la descomposición en valores singulares (SVD). Este procedimiento se lleva a cabo rápidamente por cualquier paquete comercial de cálculo numérico. Así se halla el mayor valor singular para ambos G^T y su pseudoinversa (G^T) , y los dos valores son multiplicados para hallar el número de condicionamiento de la matriz.

Para una matriz simétrica con autovalores positivos, el número de condicionamiento viene dado como la relación entre el mayor y el menor de los autovalores encontrados. Por tanto el número de condicionamiento es siempre mayor que 1. Esto también se cumple para matrices asimétricas. Si el número de condicionamiento fuera muy grande indica que la matriz esta mal condicionada.

La magnitud del número de condicionamiento proporciona una importante información sobre los requisitos de exactitud en la medida de los flujos. Las medidas de los flujos deberán realizarse al menos a la misma precisión (o con los mismos números de dígitos) que los contenidos en el número de condicionamiento. Por ejemplo para un número de condicionamiento de 10^4 (cinco dígitos) las medidas deben tener una precisión de al menos cinco dígitos. Sin embargo, las tasas de reacciones

obtenidas en procesos fermentativos difícilmente pueden ser medidas con gran precisión y generalmente solo pueden ser especificadas con dos dígitos.

Por tanto un requisito práctico para un buen condicionamiento de la matriz estequiométrica es que el número de condicionamiento debe estar entre 1 y 100, lo que satisface la mayor parte de los modelos metabólicos. Si el número de condicionamiento fuera mayor que 100 la matriz estequiométrica estará mal condicionada, y será necesario modificar la bioquímica utilizada en el desarrollo del modelo.

Inicialmente el cálculo del número de condicionamiento siempre corresponde la primera etapa del análisis de sensibilidad de un modelo metabólico, aunque no proporciona ninguna información sobre la sensibilidad real de los cálculos a las respectivas variaciones de los flujos medidos. Esta información puede ser obtenida a través de los elementos de la matriz solución que, para un sistema determinado, vendrá dada por:

$$\frac{\partial v_c}{\partial v_m} = -(G_c^T)_x G_m^T \quad (IV.30)$$

En la Ecuación IV.30 el elemento de la fila j y la columna i especifica la sensibilidad del flujo j con respectivas variaciones medidas para el flujo i . Por tanto los elementos de la matriz solución proporcionan información sobre la sensibilidad del sistema.

IV.1.1.4.1 Análisis de sensibilidad de los flujos metabólicos calculados

Los flujos metabólicos calculados están sujetos a un margen de error ocasionados por las medidas experimentales.

La estimación de los intervalos de confianza de los flujos metabólicos puede ser resuelta a través del cálculo de la aproximación local de FIM (*Fisher-Information-Matrix*).

La definición de FIM esta basada en la sensibilidad paramétrica w_{ij} que describe un cambio infinitesimal del estado de la variable x_i de acuerdo con el cambio del parámetro p_j (Joshi *et al.*, 2006):

$$w_{ij} = \frac{\partial x_i}{\partial p_j} \quad (\text{IV.31})$$

Las variables de estado son dependientes del tiempo, así como la sensibilidad w_{ij} . La ecuación diferencial ordinaria para w_{ij} y para un modelo con l parámetros tiene la forma:

$$\underline{\dot{x}} = \underline{f}(\underline{x}, \underline{p}) \quad (\text{IV.32})$$

dado por :

$$\dot{W} = \frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{x}} \cdot W + \frac{\partial \underline{f}}{\partial \underline{p}} \quad (\text{IV.33})$$

con la matriz W :

$$W = \begin{bmatrix} w_{11} & w_{12} & \cdots & w_{1l} \\ w_{21} & w_{22} & \cdots & \vdots \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ w_{n1} & w_{n2} & \cdots & w_{nl} \end{bmatrix}. \quad (\text{IV.34})$$

FIM puede ser expresado de acuerdo con la sumatoria de todos los tiempos t_k , que vendrá dada por:

$$F = \sum_{t_k} W^T \times C^{-1} \times W, \quad (\text{IV.35})$$

donde C es la matriz varianza-covarianza de las medidas experimentales. La varianza $\sigma_{\hat{p}}^2$ para el parámetro estimado \hat{p} viene dado por:

$$\sigma_{\hat{p}}^2 = E[(\hat{p} - (I \hat{p}))^2], \quad (\text{IV.36})$$

donde $E[\bullet]$ es la esperanza. Las desviaciones estándar de los parámetros son por lo tanto las raíces cuadradas de la diagonal de los elementos de F^{-1} . La ecuación siguiente es verdadera para la variación de un solo parámetro $\sigma_{\hat{p}}^2$ basado en la desigualdad de Cramer-Rao, sin embargo, esta desigualdad sólo puede ser utilizada para límites más bajos de las desviaciones estándar, porque el sistema es no lineal en los parámetros (Joshi *et al.*, 2006; Kremling *et al.*, 2007):

$$\sigma_{\hat{p}}^2 \geq (F^{-1})_{jj} \quad (\text{IV.37})$$

El intervalo de confianza del parámetro p_j vendrá dado por la estimativa \hat{p}_j de p_j :

$$\hat{p}_j - \sigma_{p_j} \cdot t_{\alpha/2}^v < p_j < \hat{p}_j + \sigma_{p_j} \cdot t_{\alpha/2}^v \quad (\text{IV.38})$$

donde $t_{\alpha/2}^v$ corresponde la distribución t de Student, v el grado de libertad y α corresponde a $(1-\alpha)$ 100% intervalo de confianza apropiado.

IV.2 Construcción del modelo de red metabólica

El proceso de estimar flujos metabólicos se caracteriza por la búsqueda de un modelo estequiométrico que describa de forma adecuada el metabolismo en estudio. Este proceso se basa en un método de tentativas y errores con base en conocimientos bioquímicos y de algunas hipótesis adecuadas que son necesarias para definir detalles bioquímicos no conocidos y para evitar complicaciones numéricas en los cálculos (Gombert, 2001).

A la práctica, el análisis de flujos metabólicos típicamente no se centra en la red metabólica completa, que puede estar constituida por hasta unas 1000 reacciones, sino que se limita a las 50-100 reacciones del metabolismo central o intermediario. Este conjunto de reacciones establece una red muy interconectada que cataliza la mayoría de flujos de materia (Figura IV.1). En células eucariotas, el metabolismo intermediario tiene lugar en distintos compartimentos (organelos) celulares como la mitocondria, peroxisoma y núcleo. Ésta compartimentalización conlleva que muchos metabolitos no pueden cruzar libremente las membranas que definen los compartimentos, existiendo mecanismos más o menos complejos de transporte. La compartimentalización de una red metabólica introduce un elevado grado de complejidad en los cálculos de flujos metabólicos y de módulos elementales.

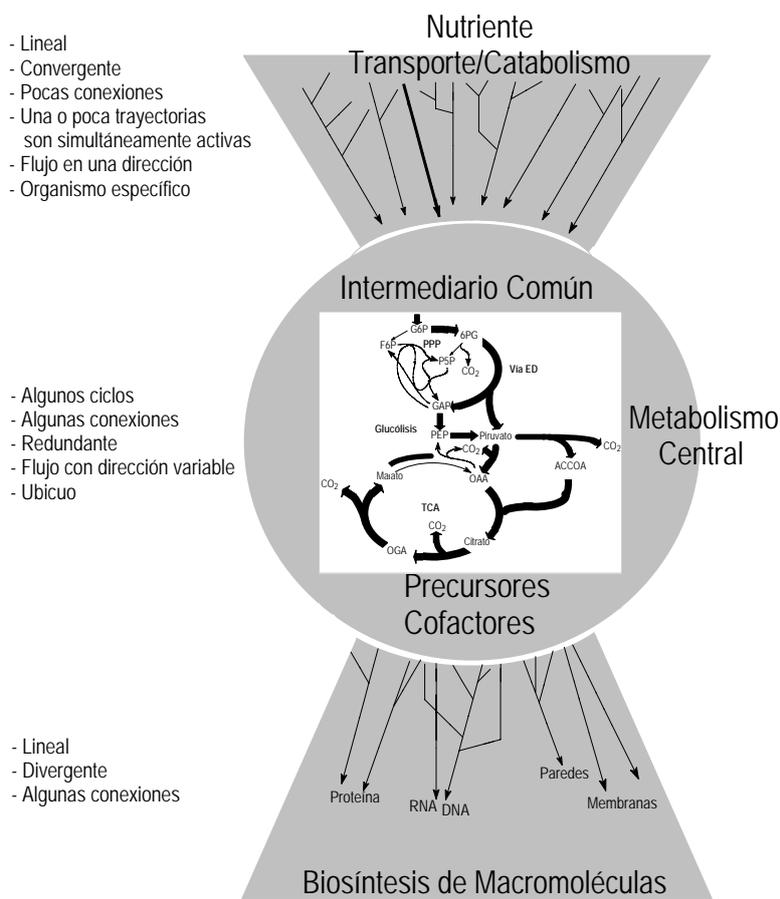


Figura IV.1 Resumen de los principales pasos para la organización de una red metabólica y determinación de los flujos metabólicos.

Referencia: Sauer, 2006.

Debido a la falta de información en la bibliografía y bases de datos sobre el metabolismo intermediario del carbono de *P. pastoris*, inicialmente, se utilizó la información sobre modelos y estudios de caracterización metabólica (estequiometría, estructura de la red metabólica, compartimentalización de rutas) del metabolismo central/intermediario de *S. cerevisiae* previamente descritos por Gombert *et al.* (2001) y Pitkänen *et al.* (2003). Cabe señalar que, estudios previos con técnicas de marcaje isotópico sugieren que el metabolismo intermediario del carbono de la levadura metilotrófica *P. pastoris* creciendo sobre glucosa en condiciones respiratorias presenta muchas similitudes estructurales con de la levadura *S. cerevisiae* (Solà, 2004). Además, éstos estudios también probaron que las rutas de biosíntesis de aminoácidos de *P. pastoris* son esencialmente análogas a las descritas para *S. cerevisiae*. Por otro lado, éste

microorganismo modelo posee su genoma secuenciado, por lo que tiene la ventaja de tener sus rutas metabólicas estudiadas y muy bien definidas (Föster *et al.*, 2003; <http://pathway.yeastgenome.org/>).

En este trabajo fue propuesto un modelo de red metabólica compartimentalizado que consideró tres organelos celulares: citoplasma, mitocondria y peroxisoma. En este modelo, basado inicialmente en el modelo estequiométrico compartimentalizado descrito para *S. cerevisiae* por Pitkänen *et al.* (2003), fueron considerados las siguientes rutas o vías del metabolismo intermediario:

- Vías metabólicas que ocurren en el citoplasma: glucólisis, gluconeogénesis, formación y asimilación de glicerol, vías fermentativas, y vía de las pentosas fosfato;
- Vías y reacciones metabólicas que ocurren en la mitocondria: ciclo de los TCA y enzima málico; y vías asociadas a intermediarios del ciclo de los TCA (reacciones anapleróticas);
- Vías metabólicas que ocurren en el peroxisoma: metabolismo del metanol (Harder & Venhuis, 1989).

Fueron considerados también el transporte de metabolitos para el interior y exterior celular, y entre los compartimentos internos de la célula. Esos transportes fueron modelados de acuerdo con tres posibles mecanismos de transporte presente en una levadura (Serrano, 1991): difusión simple, difusión facilitada y transporte activo. El transporte de sustratos (glucosa, glicerol y metanol) para el interior celular ocurre por difusión facilitada, los productos formados son liberados para el exterior celular a través de difusión pasiva. Se consideró que todo el metanol transportado para el interior celular se difunde directamente hacia el peroxisoma.

A pesar de que la fosforilación oxidativa ocurre en la membrana interna de la mitocondria (Capítulo I, apartado I.1.2.8), se consideró que la fosforilación oxidativa ocurre simultáneamente en dos compartimentos celulares, mitocondria y citoplasma, es decir, que la fosforilación puede ocurrir tanto en la membrana interna como en la membrana externa de la mitocondria. Esta consideración también fue usada por van Gulik *et al.*

(2000) en la construcción de un modelo estequiométrico para la levadura *S. cerevisiae*. Esta consideración es necesaria ya que el NADH y NADPH son impermeables a la membrana mitocondrial. Se han descrito diversas lanzaderas redox en *S. cerevisiae* (Bakker *et al.*, 2001), pero se desconoce cuáles de ellas son funcionales en *P. pastoris*. Por ello, se optó por incluir una ecuación para la fosforilación oxidativa en el citosol. En otros modelos estequiométricos para *S. cerevisiae*, se considera la lanzadera redox de la alcohol deshidrogenasa (Pitkänen *et al.*, 2003) y, por lo tanto, incluyen una sola ecuación para la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Fue considerado también el mismo valor de la eficiencia de respiración (PO-medio) para *S. cerevisiae* propuesto por Pitkänen *et al.* (2003), es decir, el PO-medio considerado fue igual a uno. El balance de ATP no está cerrado debido a factores desconocidos para el requerimiento de manutención celular y PO-medio. En este modelo se consideró el metabolito FADH equivalente a 1 NADH.

Para la construcción de la red metabólica de *P. pastoris* también se consideraron los estudios previos de *identificación de redes metabólicas activas* (o caracterización de la topología de la red metabólica). Este análisis tiene un carácter cualitativo y, en general, se realiza con el auxilio de experimentos de marcaje isotópico de sustrato, en los cuales se mide la incorporación de ^{13}C en los metabolitos intracelulares (Maaheimo *et al.*, 2001; Gombert, 2001).

Así pues, la topología de la red y la compartimentalización de las vías y metabolitos del modelo de partida fueron completadas y refinadas a partir de datos experimentales obtenidos de cultivos de *P. pastoris* con marcaje de sustratos mediante ^{13}C y técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) (Solà, 2004; Solà *et al.*, 2004; Solà *et al.*, 2007). Concretamente, dichos estudios han permitido establecer que la síntesis de aminoácidos en células de *P. pastoris* creciendo en glucosa, glicerol o mezclas glicerol/metanol ocurre esencialmente como en *S. cerevisiae* (con diferencias locales mínimas), o la importancia relativa de vías metabólicas relacionadas con el TCA (vías anapleróticas, enzima málico, transporte de intermediarios C4 del TCA entre el citoplasma y mitocondria).

La estequiometría del modelo metabólico considerado de partida (Pitkänen *et al.*, 2003) considera un solo compartimiento (mitocondria). Existen una serie de metabolitos (básicamente los productos finales de la glicólisis e intermediarios del TCA) para los cuales se debe considerar que existen grupos de moléculas (*pools*) segregados, ya que no pueden cruzar libremente la membrana mitocondrial. En la estequiometría considerada, estos metabolitos son el piruvato, acetil-CoA, oxalacetato, α -cetoglutarato y NAD(P)H. Para éstos metabolitos, se han descrito sistemas de transporte específicos (Pronk *et al.*, 1996, Kispal *et al.*, 1993, van Roermund *et al.*, 1999, Palmieri *et al.*, 1999, todos citados en Maaheimo *et al.*, 2001, y Bakker *et al.*, 2001). Además, los aminoácidos cuya ruta biosintética usa alguno de éstos precursores, se debe tener en cuenta de qué *pool* (citoplasmático o mitocondrial) provienen. El modelo de Pitkänen simplifica o no tiene en cuenta todas estas consideraciones. En particular, considera que toda la síntesis de aminoácidos procede de precursores citoplasmáticos, es decir, no se considera compartimentalizado. En el estudio presente, dichas consideraciones si que se han tenido en cuenta de la siguiente manera:

IV.2.1 Compartimentalización del piruvato

Según Jones & Fink (1982), los aminoácidos que poseen átomos de carbono provenientes del piruvato son: valina, alanina, isoleucina y leucina. Se sabe que valina es sintetizada a partir de piruvato mitocondrial. En el caso de la alanina, este aminoácido es sintetizado a partir de piruvato por una única reacción catalizada por la enzima alanina aminotransferasa, pero no se conoce con seguridad en que compartimiento ocurre la reacción. Según Gombert (2001), el análisis de la secuencia del genoma de *S. cerevisiae* demostró que existen dos genes codificadores de alanina aminotransferasas, una citoplasmática y otra mitocondrial. En este trabajo se consideró que la biosíntesis de la alanina es realizada en la mitocondria, pues la comparación de los patrones de marcaje de alanina con los de valina (sintetizada a partir de piruvato mitocondrial) en células de *P. pastoris* crecidas en cultivos en quimiostato usando glicerol o glucosa como fuente de carbono, indicaron que

la síntesis de alanina era a partir de piruvato mitocondrial (Solà *et al.*, 2004).

Así pues, debido a la compartimentalización de la biosíntesis de aminoácidos de la familia del piruvato, fueron considerados dos *pools* de piruvato y que éste metabolito, formado en la vía glicolítica, puede ser difundido de forma unidireccional del citoplasma para la mitocondria mediante un transportador específico (Pronk *et al.*, 1996, citado en Maaheimo *et al.*, 2001).

IV.2.2 Compartimentalización del acetil coenzima A

Los patrones de marcaje isotópico observados en los aminoácidos derivados de más de un precursor del metabolismo intermediario del carbono, como por ejemplo, leucina, isoleucina, lisina y fenilalanina, también pueden ser utilizadas para obtener informaciones interesantes sobre la localización subcelular de sus rutas biosintéticas. De acuerdo con Gombert (2001), el marcaje en el átomo de carbono C2 del acetil coenzima A (ACCOA) reveló que la reacción de incorporación del ACCOA en la vía biosintética de la lisina, catalizada por las dos formas de la enzima hemocitrato sintasa, ocurre en el núcleo.

Para no incluir un cuarto compartimiento en el modelo estequiométrico utilizado para cálculo de flujos metabólicos, el *pool* de acetil coenzima A nuclear fue considerado como citosólico para diferenciarlo del pool de acetil coenzima A mitocondrial. Se incluyó también una reacción de transporte unidireccional del ACCOA citoplasmático hacia el interior mitocondrial. Dicho transportador ha sido caracterizado en *S. cerevisiae* (Kispal *et al.*, 1993; van Roermund *et al.*, 1999, citados por Maaheimo *et al.*, 2001).

IV.2.3 Enzima málico

El enzima málico cataliza la síntesis de piruvato mitocondrial a partir de malato mitocondrial, siendo una vía de síntesis de piruvato adicional a la ruta catalizada por la piruvato kinasa.

Boles *et al.* (1998) demostraron que, a pesar de no se conocerse exactamente su función, el enzima málico (Mae1) es activa en células de *S. cerevisiae* creciendo en glucosa. Estudios de marcaje isotópico en cultivos en discontinuo y continuo de *S. cerevisiae*, con distintas fuentes de carbono (glucosa y/o acético), han confirmado que el enzima málico está activo en distinto grados; por ejemplo, mientras que Maaheimo *et al.* (2001) demostraron que en cultivos en discontinuo usando glucosa como fuente de carbono (metabolismo respirofermentativo), el enzima málico tiene un papel muy importante en la síntesis de piruvato mitocondrial, en cultivos en continuo con el mismo substrato en condiciones limitantes (metabolismo respirativo), la importancia de este enzima es mucho menor (Gombert *et al.*, 2001, Fiaux *et al.*, 2003). Solà (2004) verificó también que el enzima málico esta activo (aunque a niveles bajos) en células de *P. pastoris* cuando estas están creciendo aeróbicamente en quimiostato con medios conteniendo distintas fuentes de carbono (glucosa, glicerol, glicerol/metanol).

Así pues, el enzima málico, el cual cataliza la conversión de malato en piruvato en la mitocondria (ésta reacción es irreversible), fue inicialmente incluida en el modelo de la red metabólica. En *S. cerevisiae*, sólo se ha descrito un isoenzima (Mae1), el cual usa NADP⁺ como cofactor (<http://pathway.yeastgenome.org/>), pero en la levadura *S. pombe* existen 2 isoenzimas, uno usa NAD⁺ y el otro NADP⁺. En *P. pastoris* no se conoce con seguridad, ya que el genoma ha sido recientemente secuenciado pero todavía está en proceso de anotación, (Integrated Genomics, <http://www.integratedgenomics.com>). En el modelo del presente trabajo sólo se ha considerado la isoenzima que produce NADPH.

IV.2.4 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)

El ciclo de los TCA constituye una de las vías metabólicas mejor conocidas. Se sabe que en los organismos eucariotas opera en el interior de la mitocondria. Estudios llevados a cabo para la biosíntesis de glutamato demostraron que este aminoácido es sintetizado en el citoplasma directamente a través de α -cetoglutarato. El α -cetoglutarato es sintetizado en el ciclo de los TCA a través del isocitrato, que utiliza tanto NAD^+ como NADP^+ mitocondriales como aceptor de electrones. Se sabe que en *S. cerevisiae* sólo un 10% del NADPH generado en la dicha reacción es utilizado para la biosíntesis de biomasa (Bruinenberg *et al.*, 1983). El modelo de la red metabólica propuesta considera que el α -cetoglutarato puede ser sintetizado usando tanto NAD^+ como NADP^+ , el α -cetoglutarato también puede ser transportado de forma unidireccional para el citoplasma. El modelo propuesto considera que la reacción de formación de malato a través de succinato ocurre en la presencia de NAD^+ , conforme el modelo de Pitkänen *et al.* (2003).

Para el OAA (y otros compuestos C_4 intermediarios del TCA) se han descrito diversos transportadores específicos (Palmieri *et al.*, 1999, citado en Maaheimo *et al.*, 2001). En cultivos aeróbicos en quimostato de *S. cerevisiae* y *P. pastoris* se ha visto que el transporte entre citoplasma y mitocondria es bidireccional (Fiaux *et al.*, 2003, Solà *et al.*, 2004, Gombert *et al.*, 2001), mientras que en cultivos discontinuos es sólo de entrada (Maaheimo *et al.*, 2001). En nuestro modelo lo consideramos, por tanto, bidireccional.

Dado que NADH y NADPH son impermeables a la membrana mitocondrial, deben definirse dos *pools* para cada una de dichas moléculas, el citosólico y el mitocondrial. Para NADH se han propuesto distintas lanzaderas (para más detalles ver Bakker *et al.*, 2001) pero se desconoce cuales son activas en *P. pastoris*, por lo que, tal y como se ha explicado anteriormente, no se ha considerado la lanzadera propuesta en el modelo de Pitkänen *et al.* (2003) y se ha optado por incluir una ecuación de fosforilación oxidativa citosólica.

Algunas reacciones del ciclo de los TCA fueron fusionadas en una sola con la finalidad de simplificar los cálculos numéricos, como por ejemplo la reacción catalizada por la enzima succinato dehidrogenasa para la formación de fumarato a partir del succinato.

IV.2.5 Ciclo del glioxilato

En este modelo no fue incluido el ciclo del glioxilato porque los datos obtenidos por análisis del metabolismo mediante técnicas de marcaje isotópico con ^{13}C , revelaron que este ciclo no está operando cuando las células de *P. pastoris* son crecidas en quimiostato en medio conteniendo glucosa, glicerol o mezclas de glicerol/metanol (Solà *et al.*, 2004; Solà *et al.*, 2007).

IV.2.6 Ecuaciones bioquímicas

Así pues, la estequiometría de la red metabólica para *P. pastoris* definida para este estudio se implementó a partir del modelo estequiométrico descrito por Pitkänen *et al.* (2003) para *S. cerevisiae*, definido a su vez básicamente a partir de libros de texto de bioquímica (Stryer, 1995) y bases de datos (<http://pathway.yeastgenome.org/>), y a la cual se introdujeron las siguientes modificaciones basadas en las consideraciones descritas en los puntos anteriores:

1. las reacciones correspondiente a la fosforilación oxidativa (reacciones *fo1* y *fo2*, Anexo (apartado A.II.1) y Figura IV.2) fueron las mismas adoptadas por van Gulik *et al.* (2000), es decir se incluyó una reacción de fosforilación oxidativa citosólica.
2. Las reacciones correspondientes al metabolismo del metanol (reacciones *vm1-5*, Anexo (apartado A.II.1) y Figura IV.2) fueron obtenidas de Wolf (1996) y las del metabolismo del glicerol de Gancedo & Serrano (1989).
3. Se añadió una ecuación correspondiente al enzima málico.

4. Se añadieron las ecuaciones de transporte de OAA, PYR y ACCOA entre citosol y mitocondria, tal y como se formulan en red metabólica descrita para *S. cerevisiae* por Gombert *et al.* (2001).
5. En las reacciones correspondiente a la biosíntesis de aminoácidos (aa1-aa20, Anexo (apartado A.II.1)) descritas por Pitkänen *et al.* (2003) se tuvo en cuenta la compartimentalización citosólica/mitocondrial de los precursores OAA, ACCOA y cofactores NADH y NADPH.
6. Fue considerado que la composición de los ácidos grasos (lípidos) esta constituida básicamente de ácidos oleico y ácido palmitoleico en proporciones iguales, de acuerdo con Vanrolleghem *et al.* (1996) y Pitkänen *et al.* (2003).

La composición de la biomasa resultante, denominada *bm*, fue obtenida a través de datos experimentales para *P. pastoris* y reconciliados conforme descrito en el Capítulo III, apartado III.2. Debido a que los datos experimentales no eran completos, se tomaron una serie de consideraciones: Para los cultivos utilizando glicerol como fuente de carbono, la composición celular se consideró independiente de la velocidad de crecimiento. La composición de biomasa obtenida en los cultivos con glicerol 80% y metanol 20% a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ se consideró la misma que con 100% glicerol (a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$). Asimismo, la composición celular del cultivo con 60% glicerol y 40% metanol a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ se consideró igual a la correspondiente del cultivo operado con la misma mezcla de substratos a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Con el objetivo de simplificar la red metabólica, las reacciones estequiométricas de formación de proteínas, ácidos grasos, ácidos nucleicos y polisacáridos fueron substituidas en las ecuaciones de formación de biomasa (denominada *bm* tal y como se describe en el Anexo (apartado A.II.1)), resultando en una ecuación de formación biomasa a partir de precursores del metabolismo central (ecuaciones *f_{bm}* del Anexo (apartado A.II.1)).

En conjunto, el modelo estructurado de la red metabólica propuesta constituye de 52 metabolitos y 53 reacciones bioquímicas.

La primera etapa del análisis de sensibilidad para ésta red, previo al cálculo de flujos metabólicos, consistió en el cálculo del número de condicionamiento ($C(G)$).

El número de condicionamiento de una matriz de coeficientes de parámetros es muy importante para el análisis de un sistema con el objetivo de verificar si la matriz está bien o mal condicionada. Este número nos indica la máxima ampliación que la variación relativa de la solución puede sufrir frente a una perturbación. Según Stephanopoulos *et al.* (1998), este número debe estar comprendido entre 1 y 100; números mayores que estos valores significa que podemos tener problemas de condicionamiento y de estabilidad numérica. Los problemas de estabilidad numérica están relacionados con el algoritmo que utilizamos para resolver el sistema, una matriz mal condicionada será siempre numéricamente inestable. Nos interesa, por lo tanto, identificar si la matriz metabólica pueden traer problemas de condicionamiento. El mal condicionamiento ($C(G)>100$) significa que tendremos que modificar la red metabólica propuesta, es decir, eliminar o añadir reacciones bioquímicas, y en la peor de las hipótesis eliminar compartimentos celulares.

El número de metabolitos y el número de reacciones bioquímicas (r) que compone la red metabólica fueron representados en una matriz G de dimensiones $[52 \times 53]$, obteniéndose una matriz (G) que fue expresada como:

$$G = \begin{bmatrix} & emp1 & emp2 & emp3 & \dots & vm3 & vm4 & vm5 \\ GLC_{cyt} & -1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 \\ G6P_{cyt} & 1 & -1 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 \\ F6P_{cyt} & 0 & -1 & 0 & \dots & 0 & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots & \vdots \\ GAP_{per} & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 1 & 0 \\ XU5P_{per} & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & -1 & 0 \\ DHA_{per} & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \quad (IV.39)$$

Para calcular el número de condicionamiento fue utilizada la metodología descrita en Stephanopoulos *et al.* (1998), (apartado IV.1.1.4). El número de condicionamiento obtenido fue igual a 28, significando que la matriz que compone la red metabólica propuesta está bien condicionada. Wahlbom *et al.* (2001) construyeron una red metabólica para *S. cerevisiae* no compartimentalizada y encontraron un número de condicionamiento igual a

49, según estos autores con este valor los flujos metabólicos calculados pueden ser expresados con dos dígitos de precisión. En este trabajo los flujos metabólicos fueron expresados con dos cifras decimales para expresar mayor exactitud en los cálculos.

En resumen, la red metabólica propuesta que fue utilizada para describir todas las condiciones de cultivo estudiadas está ilustrada en la Figura IV.2, las reacciones implicadas en cada vía se encuentran en el Anexo (apartado A.II.1).

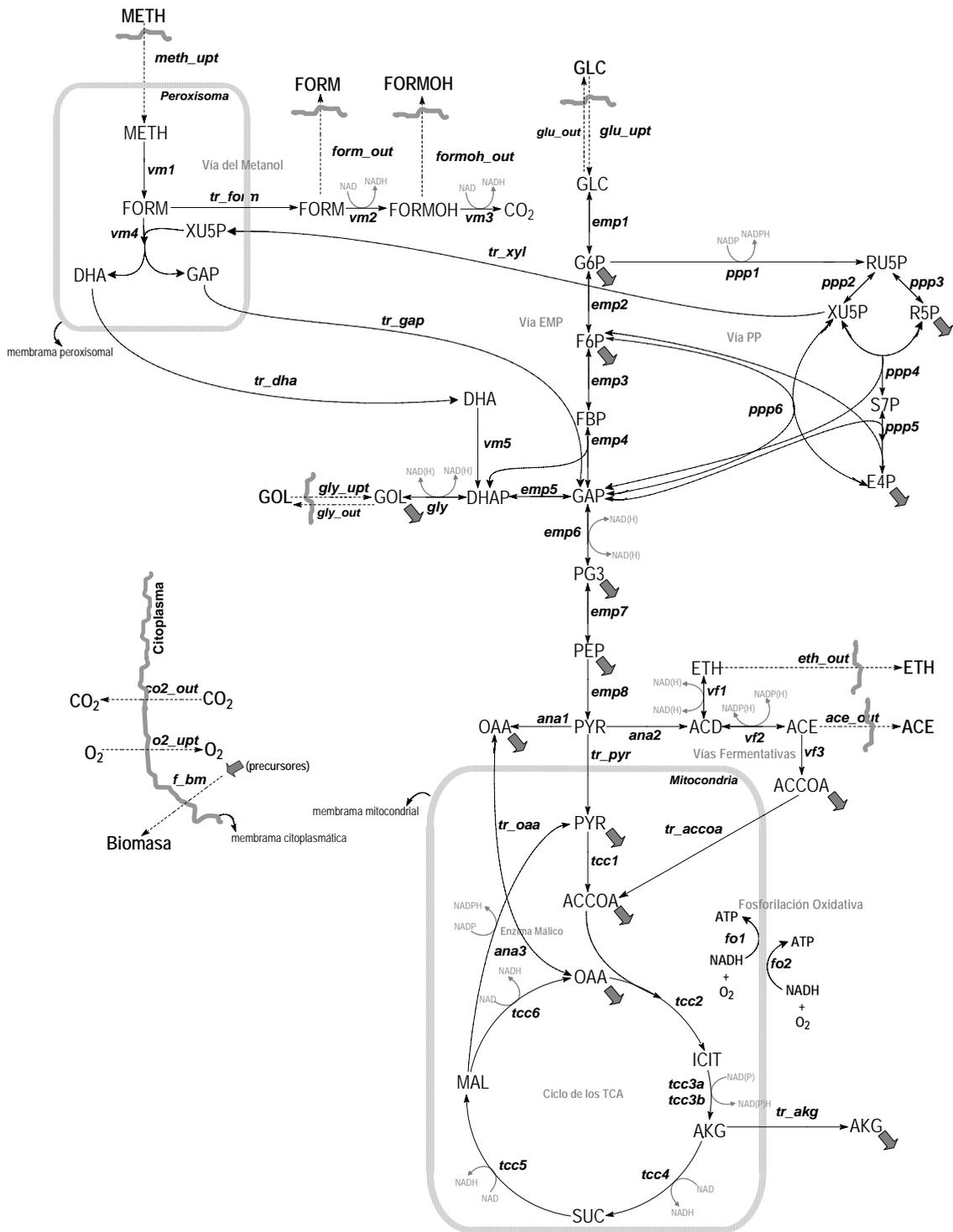


Figura IV.2 Red metabólica propuesta en este trabajo.

Las fechas en gris representan los metabolitos precursores para la síntesis de biomasa.

IV.3 Análisis de flujos metabólicos

La tercera etapa de este trabajo consistió en verificar si la red metabólica propuesta y descrita en el apartado IV.2 puede describir todo el conjunto de flujos metabólicos para todas las condiciones de cultivos estudiadas.

IV.3.1 Metodología de cálculo y mejora del modelo estequiométrico

Después de la construcción y verificación del número de condicionamiento, la primera etapa realizada consistió en verificar el grado de libertad del sistema (F), este número suministra el número mínimo de medidas necesarias para calcularse todo el conjunto de flujos metabólicos, y clasificarlos en relación al tipo de sistema resultante, es decir, si el sistema obtenido a través de F es un sistema determinado, sobredeterminado o indeterminado.

Como se ha mencionado anteriormente, la red metabólica está compuesta por 53 reacciones bioquímicas y 52 metabolitos, de los cuales 10 son metabolitos externos (biomasa, glicerol, glucosa, metanol, ácido acético, etanol, CO₂, O₂, ácido fórmico y formaldehído), y 42 metabolitos internos. El grado de libertad obtenido fue igual a 11, correspondiendo al número mínimo de medidas experimentales para que el sistema sea determinado o sobredeterminado, si el número de medidas experimentales fuera menor que 11 el sistema será indeterminado, necesitando así utilizar técnicas de optimización. Para el análisis de flujos se utilizaron como medidas experimentales las tasas específicas de consumo y producción de substratos y productos y biomasa, listados en el capítulo anterior. El total de medidas experimentales fue igual a 10; como el grado de libertad del sistema es 11, el sistema estudiado es indeterminado, y su resolución esta condicionada a utilización de técnicas de optimización numérica.

En los cultivos operados con glucosa o glicerol como fuentes de carbono, las reacciones referentes a asimilación del metanol no fueron considerados en los cálculos, debido no haber metanol en medio de cultivo.

Con estas suposiciones la matriz estequiométrica fue reducida a 41 reacciones bioquímicas y 41 metabolitos, de los cuales 7 son externos (biomasa, glicerol, glucosa, ácido acético, etanol, CO₂ y O₂), lo que resultó en un grado de libertad igual a 7. Fueron realizados 7 medidas experimentales (biomasa, glicerol, glucosa, ácido acético, etanol, CO₂ y O₂), obteniéndose un sistema determinado.

Aunque los sistemas obtenidos para los cultivos realizados con glucosa y glicerol fueran determinados, para los cálculos de análisis de flujos metabólicos (MFA) fue empleado la misma metodología utilizada para la resolución de sistemas indeterminados. La metodología descrita por Stephanopoulos *et al.* (1998) (apartado IV.1.1.2), tiene el inconveniente de considerar todas las reacciones reversibles. En sistemas que comprenden redes metabólicas más complejas no siempre es posible obtener resultados de flujos metabólicos esperados mediante esta metodología. Concretamente, algunas reacciones irreversibles en condiciones fisiológicas pueden presentar soluciones con valores de flujos negativos, significando que la reacción vaya al revés. Así pues, para que los resultados de flujos metabólicos obtenidos fuesen solo aquellas que tengan sentido desde el punto de vista fisiológico, se impusieron una serie de restricciones en las ecuaciones del modelo estequiométrico referentes a la reversibilidad de las reacciones, basado en conocimientos bioquímicos (Stryer, 1995). De esta manera, el cálculo de flujos metabólicos realizado en este estudio incluye tanto restricciones basadas en los balances de materia como restricciones de tipo termodinámico.

La metodología empleada para calcular flujos metabólicos fue la misma utilizada por Pitkänen *et al.* (2003).

Los m metabolitos y n flujos fueron organizados en una matriz estequiométrica (C) de m filas y n columnas. Un vector (d), con dimensiones de $[m \times 1]$, representa el acumulo de metabolitos incluyendo las tasas extracelulares. Las tasas de acumulo de metabolitos intracelulares fue asumido como cero, es decir que pequeñas acumulaciones de los metabolitos correspondientes podrán también ser posibles, lo que satisface la condición del estado pseudo-estacionario.

La notación matricial del sistema y la solución del vector flujo (x) puede expresarse a través de la Ecuación IV.40.

$$C x = d \quad (\text{IV.40})$$

Adicionalmente, una restricción de igualdad y desigualdad fue impuesta para el vector de flujo x . Las restricciones fueron usadas para direccionar los flujos metabólicos, es decir imponer el criterio de irreversibilidad de un determinado flujo metabólico. La notación de la matriz de las restricciones de desigualdad fue definida por:

$$A x \leq b \quad (\text{IV.41})$$

La matriz C determina si el flujo x está restringido, si $A = 0$, el flujo no está restringido, lo que resulta que las reacciones bioquímicas son reversibles y el flujo obtenido podrá ser positivo o negativo; si $A = -1$, el flujo está restringido al valor de b , las reacciones serán irreversibles y el flujo obtenido será positivo. Como presentado en el Anexo (apartado A.II.1), los flujos *emp8* (Vía EMP), *ana1-2* (punto de ramificación del piruvato), *ana3* (enzima málico), *vf1* (vía fermentativa), *tcc1-6* (ciclo del TCA), *ppp1* (vía PP), *f_bm* (formación de biomasa), *fo1-2* (fosforilación oxidativa), *glu_upt*, *gly_upt*, *meth_upt*, *o2_upt*, *co2_out*, *glu_out*, *gly_out*, *ace_out*, *eth_out*, *form_out*, *formoh_out*, *tr_accoa*, *tr_pyr*, *tr_akg*, *tr_xyl*, *tr_form*, *tr_gap*, *tr_dha* (reacciones de transporte), *vm1-5* (vía del metanol) fueron restringidos a valores positivos ($A = -1$).

Las Ecuaciones IV.40 y IV.41 fueron resueltas a través del comando *lsqlin* contenido en el software Matlab, tal y como se describe en el Capítulo II, apartado II.2.2.1; los análisis de las desviaciones estándar de los flujos calculados fueron resueltos de acuerdo con la metodología descrita en el apartado IV.1.1.4.1. Las rutinas utilizadas están descritas en la sección de Rutinas (apartado R.3).

En todos los casos (condiciones de cultivo) estudiados, se llevaron a cabo varias aproximaciones para optimizar los cálculos de distribución de flujos metabólicos a través de la red metabólica.

Concretamente, se usaron distintas modificaciones/variantes del modelo metabólico propuesto anteriormente para el análisis de flujos metabólicos:

Una de ellas fue adaptada a partir de la metodología empleada por Pitkänen *et al.* (2003). En su trabajo, estos autores utilizaron una red semi-compartmentalizada para describir el metabolismo central de *S. cerevisiae* en cultivos operados de forma aerobia y anaerobia utilizando glucosa o mezcla de glucosa y xilosa como fuentes de carbono. Una metodología propuesta en su trabajo fue fijar el cociente entre NADH y NADPH en la reacción de formación de α -cetoglutarato en el ciclo de los TCA; esta reacción puede utilizar unos de estos dos aceptores de electrones (en nuestro caso corresponde a las reacciones *tcc3a* y *tcc3b*). En su modelo estequiométrico, Pitkänen y colaboradores fusionaron las reacciones *tcc3a* y *tcc3b* en una sola, y variaron el cociente estequiométrico de NADH y NADPH utilizado por la reacción de 0,2 a 1, variando así la especificidad del enzima respecto a estos cofactores; es decir, cuando el coeficiente de la reacción dependiente de NAD⁺ es igual a 1, el NADPH no es producido en la reacción (y el coeficiente de la reacción correspondiente será por lo tanto igual a cero), y lo mismo sucede cuando el coeficiente de la reacción dependiente NADP⁺ es igual a 1. Estos autores llegaron a la conclusión que los mejores resultados se obtenían cuando se utilizaba la relación media de (1:1) para los cofactores NADH:NADPH, es decir fueron consideradas dos ecuaciones para la formación de α -cetoglutarato.

En este trabajo, se realizaron pruebas de cálculos de flujos metabólicos variando el cociente estequiométrico de los dos metabolitos, considerando los valores 0,2, 0,5, 0,8 y 1,0. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios (fisiológicamente coherentes con el metabolismo celular), como los obtenidos por Pitkänen *et al.* (2003), estos resultados no están presentados en la memoria. Por lo tanto, en el modelo estequiométrico propuesto en este trabajo no se consideró fijar la relación NADH/NADPH en la reacción de formación de α -cetoglutarato, es decir, se consideraron dos reacciones independientes, una con formación de NADH y otra NADPH.

Otra variante del modelo estequiométrico concierne la reacción catalizada por el enzima málico. Tal y como se ha mencionado en el Capítulo I, apartado I.2.3, este enzima, que tiene como función convertir el malato en piruvato, puede usar como cofactor el NADP⁺ (*S. cerevisiae*) o NAD⁺ y NADP⁺ (*S. pombe*). A. Solà (Solà, 2004) verificó que esta enzima está activa (aunque a niveles muy bajos) en células de *P. pastoris* creciendo en glucosa, glicerol y mezclas de metanol/glicerol. Sin embargo, no se sabe si los dos aceptores de electrones (NAD⁺ y NADP⁺) son usados por el enzima málico de *P. pastoris*. En este trabajo, la primera tentativa fue fijar la especificidad de cofactor NADH:NADPH (desde una relación 0:1 a una 1:0) en la reacción catalizada por el enzima málico de la misma manera que se ha descrito anteriormente para las reacciones *tcc3a* y *tcc3b*; os resultados obtenidos no fueron satisfactorios (resultados nos presentados en la memoria). La especificidad de cofactor que finalmente se consideró como aceptable es la reacción catalizada por la enzima málica dependiente solamente de NADPH.

En otra tentativa de mejorar la calidad de los cálculos de flujos metabólicos fue utilizar variantes del modelo estequiométrico con distintos mecanismos de transporte de metabolitos a través de las membranas mitocondrial y peroxisomal. Este estudio se basó en el trabajo de van Gulik *et al.* (2000), quienes propusieron un modelo complejo de red compartimentalizada para el hongo *Penicillium chrysogenum*. La red propuesta en ese trabajo estaba compartimentalizada en tres organelos celulares (citoplasma, mitocondria y peroxisoma) y el transporte de metabolitos entre dichos compartimentos celulares se formularon en su modelo metabólico mediante distintas reacciones de transporte, como por ejemplo el transporte de malato mitocondrial para el citoplasma acoplado a la reacción de transporte de succinato citosólico para la mitocondria (Tabla IV.1). Los resultados obtenidos combinando las distintas reacciones de transporte empleados por van Gulik *et al.* (2000), inicialmente no consideradas en el modelo propuesto en este trabajo, tampoco fueron satisfactorios. Otra alternativa consistió en probar distintas lanzaderas tipo redox entre los compartimentos mitocondrial y citoplasmático, acoplando así el transporte de equivalentes redox con el de intermediarios del ciclo de los

TCA a través de la membrana mitocondrial. Por ejemplo, una de las alternativas, descrita por Bakker *et al.* (2001), consistió en acoplar el transporte de oxaloacetato mitocondrial para el citoplasma con la reacción de transporte de malato citosólico hacia la mitocondria, lo que resulta en una entrada neta de NADH para la mitocondria. Los resultados obtenidos no fueron fisiológicamente coherentes. Además de estas alternativas fue propuesto también utilizar la lanzadera ADH descrita en Pitkänen *et al.* (2003), que proponen que la reacción de acetaldehído a etanol puede ocurrir sobre dos diferentes formas; la primera utiliza un equivalente de reducción en la forma de NADH citosólico y la segunda NADH mitocondrial. Los resultados obtenidos fueron los mismos obtenidos cuando se utilizó la aproximación propuesta por van Gulik *et al.* (2000), que consiste en que la reacción de fosforilación oxidativa puede ocurrir tanto en la membrana interna como en la membrana externa de la mitocondria, utilizando en este caso NADH citosólico.

Globalmente, estas tentativas de mejorar los resultados de MFA tienen por tanto la importante limitación de que se desconoce totalmente si existen mecanismos de consumo/producción de NAD(P)⁺ en *P. pastoris* distintos a los de *S. cerevisiae*. Consecuentemente, las consideraciones en cuanto a la especificidad de cofactores NADH:NADPH en las reacciones mencionadas anteriormente han sido arbitrarias y no tienen que ser necesariamente ciertas. No obstante, los cálculos obtenidos con base a dichas consideraciones resultaron ser globalmente más ajustados a las estimaciones de cocientes de flujos metabólicos obtenidas experimentalmente mediante técnicas de marcaje isotópico, tal y como se describe a continuación.

Tabla IV.1 Reacciones de transporte empleadas en el modelo estequiométrico inicial.

Reacción:	Transporte sobre la membrana mitocondrial*
<i>tr_mal/suc</i>	1 MAL _{mit} + 1 SUCC _{cyt} → 1 MAL _{cyt} + 1 SUCC _{mit}
<i>tr_cit/mal</i>	1 CIT _{mit} + 1 MAL _{cyt} → 1 CIT _{cyt} + 1 MAL _{mit}
<i>tr_cit/icit</i>	1 CIT _{cyt} + 1 ICIT _{mit} → 1 CIT _{mit} + 1 ICIT _{cyt}
	Transporte sobre la membrana peroxisomal*
<i>tr_cit/succ</i>	1 CIT _{cyt} + 1 SUCC _{per} → 1 CIT _{per} + 1 SUCC _{cyt}

Referencia: van Gulik *et al.* (2000).

* Inicialmente fue considerado en el modelo el ciclo del glioxilato.

IV.3.2 Análisis de flujos metabólicos de *P. pastoris* creciendo en substratos únicos o mixtos

Una vez fijado el modelo estequiométrico, se describe a continuación el análisis de flujos metabólicos para cada condición de cultivo estudiada, y su comparación con los datos experimentales previamente obtenidos mediante técnicas de marcaje isotópico de ¹³C por Solà (2004) para cada una de las mismas condiciones de cultivo, los cuales permitieron calcular algunos cocientes de flujos metabólicos en puntos clave de la red de reacciones metabólicas según la metodología y algoritmos desarrollados originalmente por Szyperski (1995) y Maaheimo *et al.* (2001), (**Metabolic Flux Ratio [METAFoR] Analysis**). Además, los resultados del análisis de flujos obtenidos para los cultivos de *P. pastoris* usando glucosa o glicerol como fuentes únicas de carbono también fueron comparados con datos de flujos metabólicos de la bibliografía para *S. cerevisiae* en cultivos operados quimiostato a 0,10 h⁻¹, estimados mediante técnicas de marcaje isotópico con ¹³C (Gombert *et al.*, 2001, Fiaux *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2003).

Para que sea posible realizar un análisis comparativo entre los flujos metabólicos obtenidos experimentalmente en este trabajo y los cocientes de flujos obtenidos por marcaje isotópico de ¹³C debemos formular ecuaciones que describan numéricamente la fracción de un determinado metabolito que proviene de cada uno de sus posibles precursores, o su contribución a una u

otra vía bioquímica (es decir, el reparto del flujo de carbono en una bifurcación dada en una red de reacciones bioquímicas). Algunas de estas ecuaciones (particularmente, aquellas que definen cocientes de flujos metabólicos en la ruta de las pentosas) fueron formuladas con base a los trabajos de Fisher *et al.* (2004) y Fredlund *et al.* (2004).

Una limitación importante para la comparación *vis-a-vis* de los cocientes de flujos metabólicos obtenidos a partir de MFA clásico y los obtenidos experimentalmente a partir de técnicas de marcaje isotópico es que para el caso de reacciones bidireccionales, el MFA sólo nos permite estimar el flujo neto, mientras que las técnicas de marcaje isotópico empleadas nos permiten estimar el flujo en cada uno de los sentidos de la reacción. Por ejemplo, en este trabajo, la reacción de transporte de OAA entre citoplasma y mitocondria (reacción *tr_ooo*) fue considerada como una reacción bidireccional y valor obtenido para esta reacción, es decir, el flujo neto, indica la diferencia entre el flujo de entrada y el de salida de OAA. Ello dificultará la comparación en términos cuantitativos de cocientes de flujos metabólicos teóricos vs experimentales donde intervenga la reacción *tr_ooo*. En estos casos, se deberá hacer un análisis comparativo de tipo cualitativo.

La Tabla IV.2 presenta las ecuaciones formuladas de acuerdo con la red metabólica propuesta y presentada en la Figura IV.2.

Tabla IV.2 Ecuaciones de contribución de un determinado metabolito a una determinada vía bioquímica.

Vía y metabolito	Ecuación
Catabolismo de la glucosa a través de la ruta de las pentosas: PEP generado a través de al menos una de las reacciones transcetolasa de las pentosas*	$a \geq \frac{ppp4 + 2(ppp5) + 3(ppp6)}{2(emp4) + ppp4 + ppp6}$
Fracción de glucosa (G6P) directamente oxidada y que entra en la vía de las pentosas	$b = \frac{ppp1}{emp1}$
Contribución de la ruta de las pentosas fosfato al catabolismo de la glucosa: PEP generado a través de al menos una de las reacciones transcetolasa de las pentosas	$c = \frac{ppp4 + ppp5 + ppp6}{emp6}$
Anaplerosis (fracción de OAAmit que proviene del OAAcyt)	$d = \frac{tr_oaa}{tcc6 + tr_oaa}$
Fracción de OAAcyt que proviene de PYRcyt	$e = \frac{ana1}{ana1 + tr_oaa }$
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (Enzima málico)	$f = \frac{ana3}{ana3 + tr_pyr}$
Fracción de ACCOAmít sintetizada a partir PYRmit	$g = \frac{tcc1}{tcc1 + tr_accoa}$
Fracción de metanol que es desasimilada a CO ₂	$h = \frac{vm3}{vm3 + vm4}$
Fracción de GAP que proviene de glicerol (respecto al metanol)	$i = \frac{gly}{gly + vm5}$
Fracción de GAP que proviene de metanol	$j = 1 - \frac{gly}{gly + vm5}$

* según Fischer *et al.* (2004) y Fredlund *et al.* (2004).

IV.3.2.1 Análisis comparativo de los cocientes de flujos metabólicos calculados con los medidos

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los flujos metabólicos obtenidos en este trabajo se compararon con los datos obtenidos a través del análisis METAFoR; además, para el caso de los cultivos con glucosa o glicerol como fuentes únicas de carbono, los datos obtenidos también se compararon con datos de flujos metabólicos de *S. cerevisiae* creciendo en las mismas fuentes de carbono obtenidos experimentalmente por otros grupos de investigación mediante técnicas de ¹³C-MFA (Tabla IV.3), ya que las

redes metabólicas (topología o rutas metabólicas activas) y estados metabólicos (metabolismo respirativo) en ambos organismos es similar.

Tabla IV.3 Orígenes de los metabolitos intermediarios de la levadura *P. pastoris* en cultivos operados en quimiostato y crecidas en glucosa a

$\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ y glicerol a $\mu = 0,05$ y $0,16 \text{ h}^{-1}$.

Cultivo	Glucosa (0,16 h ⁻¹) <i>P. pastoris</i>		Glucosa (0,1 h ⁻¹) <i>S. cerevisiae</i>		Glicerol (0,05 h ⁻¹) <i>P. pastoris</i>		Glicerol (0,16 h ⁻¹) <i>P. pastoris</i>		Glicerol (0,1 h ⁻¹) <i>S. cerevisiae</i>
	Análisis METAFOR*	Cálculos basados en MFA**	Análisis METAFOR (Fiaux et al., 2003)	Análisis mediante ¹³ C-MFA (Gombert et al., 2001)	Análisis METAFOR*	Calculados basados en MFA**	Análisis METAFOR*	Calculados basados en MFA**	Análisis mediante ¹³ C- MFA (Zhang et al., 2003)
Contribución de la ruta de las pentosas fosfato al catabolismo de la glucosa: PEP generado a través de al menos una de las reacciones transcetolasa de las pentosas.	41 ± 9	44	40 ± 8	52					
Fracción de glucosa (G6P) directamente oxidada y que entra en la vía de las pentosas		35		44,2					
Catabolismo del glicerol a través de la ruta de las pentosas: PEP generado a través de al menos una de las reacciones transcetolasa de las pentosas.						14		30	21
Anaplerosis (fracción de OAAmit que proviene del OAAcyt)	38 ± 2	33	31 ± 2	42	33 ± 2	<i>tr_oaa</i> ≈ 0	48 ± 4	54	43
Fracción de OAAmit que proviene del TCA (=100-anaplerosis)***	62 ± 2	67	69 ± 2	58	67 ± 2		52 ± 4	46	57
Fracción de OAAcyt que proviene de PYRcyt	63 ± 4	59	62 ± 4	60	32 ± 2	<i>tr_oaa</i> ≈ 0	68 ± 2	53	
Fracción de OAAcyt que proviene de OAAmit (100- OAAcyt a través PYRcyt)	37 ± 4	41	38 ± 4	40	68 ± 2		32 ± 4	47	
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (Enzima málico)	4 ± 2	0	0~13	5	2 ± 2	0	2 ± 1	0	muy bajo
Fracción de ACCOmit sintetizada a partir PYRmit		96		63		100		100	

Datos presentados en porcentaje. (*) Datos obtenidos de Solà (2004); (**) Calculados en este trabajo; (***) También se puede denominar como “actividad relativa del ciclo de los TCA”, según Blank y Sauer (2004).

La distribución de flujos metabólicos en el ciclo de los TCA y rutas asociadas realizado por Solà *et al.* (2004) para cultivos de *P. pastoris* operados en continuo a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ usando glucosa o glicerol como fuentes únicas de carbono (Figuras IV.3, IV.4 y IV.5 y Anexo, apartado A.III.1), revelaron que el flujo de entrada de OAA citosólico a la mitocondria es mayoritariamente unidireccional, es decir, la mayor parte de OAA citoplasmático proviene del piruvato citosólico y apenas una pequeña fracción proviene del OAA mitocondrial. Sin embargo, en cultivos operados con glicerol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ indican que una fracción importante del OAA citosólico es generado en la mitocondria y transportado para el citoplasma, es decir que el flujo de transporte de OAA a través de la membrana mitocondrial es esencialmente bidireccional.

Estos resultados experimentales son, en la mayoría de los casos, coherentes con los calculados mediante MFA: Un transporte esencialmente bidireccional de OAA resulta en un flujo neto (tr_oaa) próximo a cero o incluso negativo, que quiere decir que hay más salida neta de OAA de la mitocondria para el citoplasma. Sólo en el caso que el flujo de transporte de OAA a través de la membrana mitocondrial es muy mayoritario en un sentido u otro (salida o entrada) se podrá considerar tr_oaa como reacción irreversible (de entrada o salida) y por lo tanto tendrán sentido los cálculos de cocientes de flujo metabólicos donde interviene ésta reacción. Cabe destacar los siguientes puntos:

En primer lugar, en el cultivo operado con glucosa (donde el transporte de OAA desde el citoplasma a la mitocondria es esencialmente unidireccional), el cociente calculado para la anaplerosis (fracción de OAA mitocondrial que proviene del OAA citosólico) y fracción de OAA citosólico que proviene del OAA mitocondrial fue muy cercano al obtenido experimentalmente por Solà *et al.* (2004). Además, los datos obtenidos en este trabajo son muy próximos a los obtenidos para *S. cerevisiae* por Fiaux *et al.* (2003) y Gombert *et al.* (2001). Así, podemos decir que el metabolismo de *P. pastoris* en condiciones aeróbicas en cultivos operados en quimiostato con glucosa (metabolismo respiratorio) es muy similar al de la levadura *S. cerevisiae* en condiciones análogas.

En segundo lugar, la reacción de transporte de OAA entre citoplasma y mitocondria para cultivos operados con glicerol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ están de acuerdo con los resultados obtenidos por Solà *et al.* (2004), es decir $tr_{\text{oa}} \approx 0$. Sin embargo, al ser éste valor próximo a cero, el cálculo del cociente de flujos referente a anaplerosis y cociente de flujos referente a formación de OAA citosólico (Tabla IV.3) no pudo ser calculado.

En tercer lugar, para el cultivo operado con glicerol a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ el flujo neto de la reacción tr_{oa} obtenido a través del cálculo de MFA es positivo, lo que, en principio, es coherente con los datos experimentales obtenidos por Solà *et al.* (2004) que muestran un transporte de OAA citosólico hacia la mitocondria esencialmente unidireccional; por este motivo el coeficiente de flujo para la anaplerosis y cociente referente a la formación de OAA citosólico fueron calculados y presentaron valores cercanos a los obtenidos Solà (2004).

En cuarto lugar, en referencia a la fracción de ACCOA mitocondrial sintetizada a partir del PYR mitocondrial, el ACCOA mitocondrial es directamente importado del citoplasma, los cálculos obtenidos indican que la importación de ACCOA citoplasmático a la mitocondria es prácticamente nula. Según Gombert *et al.* (2001), en *S. cerevisiae* crecida en glucosa a $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$, la importación de ACCOA citoplasmático es también minoritaria y despreciable con respecto a la vía de la piruvato deshidrogenasa. La misma observación fue reportada en Zhang *et al.* (2003) cuando células de *S. cerevisiae* fueron crecidas en glicerol a $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$, observación que también es coherente con los resultados de MFA obtenidos en este trabajo, pues el flujo de entrada de ACCOA citosólico a la mitocondria calculados para cultivos de glicerol fue igual o prácticamente igual a cero.

Otra estimación muy importante se refiere al catabolismo de la glucosa a través de la ruta de las pentosas; en este caso el cálculo fue obtenido a través de la ecuación propuesta por Fredlund *et al.* (2004) para la levadura *Pichia anomala* y presentado en la Tabla IV.2. El cociente de flujo obtenido a partir de los flujos metabólicos estimados por MFA son coherentes con los resultados obtenidos por Solà *et al.* (2004) y comparables a los de Fiaux *et al.* (2003) y Gombert *et al.* (2001) para *S. cerevisiae*.

Según Oura (1983), en *S. cerevisiae* la cantidad de NADPH necesaria para la formación de biomasa es de aproximadamente 931 mmol para 100 g de masa seca de células; Bruinenberg *et al.* (1983) estimaron que la cantidad necesaria es de 831 mmol para 100 g de masa seca de células. Utilizando estos valores, es posible hacer una estimación del flujo a través de la vía de las pentosas, considerando que esta es la única vía de generación de NADPH y que un factor de conversión de glucosa a células de 0,5 g/g para cada 100 mmol de glucosa consumidos, 9 g de masa seca de células son generados y 74,8 o 83,8 mmol de NADPH son requeridos. Como cada molécula de G6P que entra en la vía de las pentosas genera dos moléculas de NADPH, un flujo de 37,4 o 41,9 mmol por 100 mmol de glucosa puede ser calculado para la vía de las pentosas. El mismo cálculo puede ser realizado para glicerol obteniendo un flujo de 19,1 o 21,4 mmol por 100 mmol de glicerol. Para el cultivo con glucosa el flujo obtenido a través de los cálculos de MFA fue de 35%, en el trabajo de tesis de Gombert (2001) con *S. cerevisiae* crecida en glucosa a $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ el flujo obtenido fue de 44,2%. En relación a los cultivos con glicerol a $\mu = 0,05$ y $0,16 \text{ h}^{-1}$ fueron obtenidos flujos de 16 y 14%, respectivamente, mientras que Zhang *et al.* (2003) obtuvieron un flujo de 15% para *S. cerevisiae* creciendo en glicerol a $0,1 \text{ h}^{-1}$.

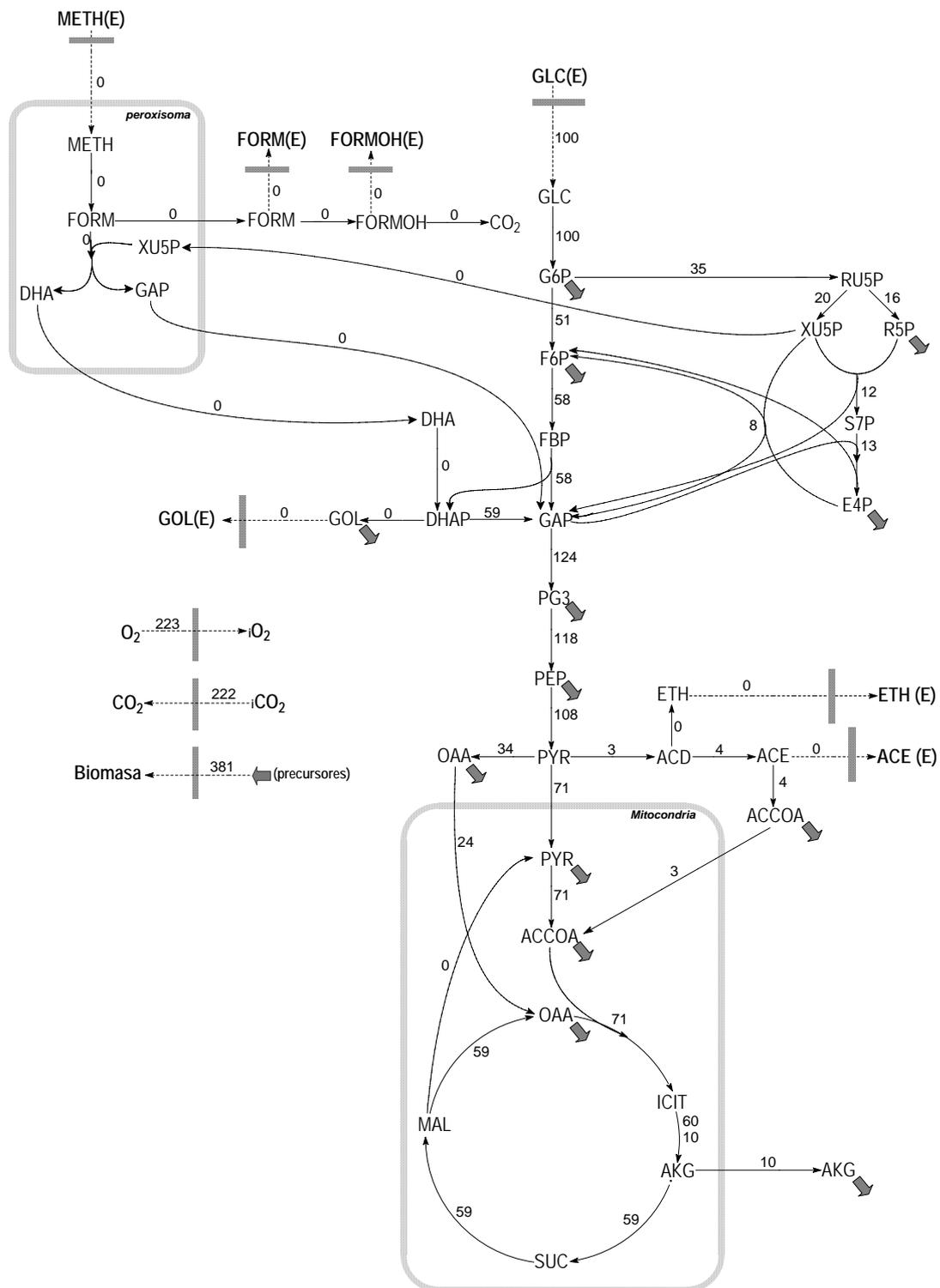


Figura IV.3 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glucosa en cultivo operado en quimiostato a una velocidad de crecimiento igual a 0,16 h⁻¹. Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

La relación de flujos metabólicos calculados para las rutas de asimilación y desasimilación de metanol (Figuras IV.4 y IV.5 y Anexo, apartado A.III.1), es decir la ruta de generación de GAP a partir de metanol y la ruta de generación de CO₂ fue similar a los resultados experimentales obtenidos a partir de experimentos de marcaje isotópico. Concretamente, para los cultivos de *P. pastoris* creciendo en condiciones de limitación de fuentes de carbono (glicerol/metanol) a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, donde ambos substratos son utilizados simultáneamente (concentraciones residuales en el reactor por debajo límite de detección), la caracterización de los flujos metabólicos mediante MFA indica que la fracción de metanol que se oxida directamente a CO₂ es mínima; es decir, que mayor parte de las moléculas de metanol son metabolizadas a GAP. Ello implica que en estas condiciones de cultivo el metanol, al igual que el glicerol, se utiliza como fuente de carbono y energía (es decir, que el ciclo de los TCA tiene un papel en el catabolismo del metanol). Estos cálculos son en la primera vista parecidos con los resultados de experimentos de marcaje isotópico correspondientes (Solà, 2004, Solà *et al.*, 2007), los cuales demostraron que el número de moléculas de metanol que se asimila a GAP se incrementa de manera gradual y significativa a medida que se incrementa la fracción de metanol en el medio de alimentación (tal como indican los patrones de marcaje con ¹³C para el PEP, los cuales muestran como la fracción de moléculas de PEP con sus enlaces C-C intactos, es decir, generados a partir de una molécula única de glicerol va disminuyendo a medida que se incrementa la fracción de átomos de carbono que provienen del metanol, que se incorporan a nivel de GAP para generar luego PEP). En el caso extremo (cultivo con metanol como única fuente de carbono y energía), una fracción significativa de moléculas de metanol es oxidada directamente a CO₂.

Por el contrario, cuando *P. pastoris* está creciendo en mezclas de glicerol/metanol a elevadas velocidades específicas de crecimiento ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$), una fracción importante del metanol presente en el medio de alimentación se acumula en el reactor (la concentración residual de metanol en el reactor se incrementa al incrementarse la fracción de metanol en el medio de alimentación). Los experimentos de marcaje isotópico

correspondientes demostraron que el número de moléculas de metanol que se asimila a GAP debe ser muy pequeño (tal como indica el hecho de que los patrones de marcaje con ^{13}C para el PEP son muy parecidos a los detectados en el cultivo con glicerol como única fuente de carbono). Los resultados obtenidos mediante MFA cuales muestran que la fracción de metanol que se metaboliza por la ruta disimilatoria hasta CO_2 es mayor que en los cultivos a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ y que en este caso aproximadamente la mitad del metanol es oxidado a CO_2 (Tabla IV.4 y IV.5). Esta vía conlleva una generación de NADH y, por lo tanto, cabe pensar que a velocidades elevadas de crecimiento, una fracción significativa del metanol consumido por las células sea utilizado como fuente de energía (vía ruta disimilatoria a CO_2 , NO a través del TCA) pero NO como fuente de carbono. El ciclo de los TCA es una ruta que genera NADH. Se podría postular que el hecho que se pueda obtener NADH de la desasimilación directa de metanol a CO_2 podría permitir la reducción las necesidades catabólicas del TCA (e incrementar las anabólicas). Sin embargo, los resultados de marcaje isotópico para estas condiciones muestran que la actividad relativa del ciclo de los TCA (es decir, la fracción de OAAmit que proviene de MALmit) no presenta diferencias importantes respecto a la del cultivo con glicerol como única fuente de carbono a la misma velocidad de crecimiento. De hecho, podremos postular a través de las observaciones obtenidas de los cálculos de MFA que el metanol es asimilado a GAP (Tabla IV.4 y IV.5) a la velocidad de crecimiento más baja ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$) y dicha asimilación aumenta cuanto mayor es la fracción de metanol en el medio de alimentación.

Cabe destacar también el impacto que la asimilación de metanol produce sobre ruta de las pentosas fosfato (PPP), sobretodo en los cultivos a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. La asimilación de metanol a GAP implica que este ciclo opera de manera cíclica, con un flujo creciente de pentosas hacia el peroxisoma para poder formar triosas a partir de la reacción con el formaldehído. Este flujo es creciente a medida que se incrementa la fracción de metanol en el medio de alimentación. Así mismo, parte del GAP contribuye de manera creciente a la síntesis de pentosas, cerrando así el ciclo. Cabe señalar que la síntesis de NADPH a partir de la rama oxidativa de la ruta PPP disminuye a medida

que se incrementa la fracción de metanol en el medio de alimentación, hecho coherente con la disminución del rendimiento de biomasa observada respecto al cultivo con glicerol como única fuente de carbono, sugiriendo que el metabolismo del metanol conlleva una limitación en la producción de NADPH y por lo tanto, una menor producción de biomasa (Figuras IV.4 y IV.5).

Los experimentos de marcaje isotópico realizados por A. Solà (2004) para estos cultivos mostraron un claro impacto de la asimilación de metanol sobre algunas distribuciones locales de cocientes de flujos metabólicos en el ciclo de los TCA y rutas asociadas en células de *P. pastoris* creciendo en quimiostato en condiciones limitantes de fuentes de carbono (glicerol + metanol). Sin embargo, cocientes clave como la actividad relativa del ciclo de los TCA (fracción de OAAmit que proviene del TCA) o fracción de OAAcyt que proviene de OAAmit no parecen estar correlacionados con la fracción de metanol en el medio de alimentación en los cultivos a baja velocidad específica de crecimiento (donde hay coasimilación completa de glicerol y metanol), sino con la velocidad de crecimiento. Por ejemplo, en dichos cultivos se observa que la fracción de OAAcyt que proviene de OAAmit está entre el 75 y 60% aprox., indicando que hay una importante salida de OAAmit (o otros intermediarios del ciclo de los TCA). Por el contrario, en cultivos a elevadas velocidades de crecimiento, estos valores son mucho más bajos (30-20% aprox.). Esta observación es coherente con el flujo neto de transporte de OAA a través de la membrana mitocondrial (*tr_oaa*), el cual es negativo o casi cero (salida neta o salida = entrada) para cultivos operados con glicerol y glicerol:metanol (80:20 y 60:40) a velocidad 0,05 h⁻¹ mientras que es positivo (entrada neta) con el incremento de metanol en el medio para los cultivos a 0,05 y 0,16 h⁻¹. El signo del flujo *tr_oaa* también es coherente con la fracción de OAAmit proveniente de PEP citoplasmático (anaplerosis) estimada experimentalmente, ya que indican que el flujo de entrada de OAAcyt a la mitocondria es relativamente menor en los cultivos a baja velocidad de crecimiento.

Finalmente, los experimentos de marcaje isotópico demostraron que en los cultivos con mezclas de glicerol:metanol, la fracción de piruvato

mitocondrial generado a partir de malato (reacción catalizada por el enzima málico) tiene valores basales, al igual que en las células crecidas en glucosa o glicerol como fuentes únicas de carbono. No obstante, se decidió considerar ésta reacción (*ana3*) para el MFA con el fin de probar si el aumento de la complejidad de la red de reacciones bioquímicas condiciona la coherencia de los cálculos (es importante recordar que la reacción catalizada por éste enzima implica generación de NADPH, al igual que la ruta de la vía de las PP, el hecho que los flujos a través de la ruta de vía de las PP se vean alterados por la asimilación de metanol, podría crear una mayor necesidad de generar NADPH mediante vías alternativas como el enzima málico). Los cálculos del flujo a través del enzima málico obtenidos mediante MFA para los distintos cultivos con mezclas glicerol:metanol a las dos velocidades de crecimiento reflejan una actividad prácticamente nula de esta vía metabólica; sin embargo, estos valores son, en general, relativamente bajos, en coherencia con los datos experimentales de marcaje isotópico.

Con la finalidad de se verificar la fiabilidad de los flujos metabólicos calculados, también se verificó el impacto de los errores ocasionados por las medidas experimentales en los flujos calculados. Los puntos clave para éste análisis consistieron en verificar las desviaciones estándar en la vía de las pentosas fosfato y en el ciclo de los TCA. La rama oxidativa de la vía de las pentosas (*ppp1*) presentó mayores desviaciones estándar, principalmente en los cultivos a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ (Figura IV.6 (a)). Este error esta asociado principalmente que en esta rama son regenerados 2 moles de NADPH y no conocemos el balance exacto de este cofactor. Dauner *et al.* (2001) y Fredlund *et al.* (2004) observaron también que la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato presenta mayor desviación estándar que las otras reacciones de ésta vía. Las reacciones *ppp4* y *ppp6* también presentaron errores significativos principalmente el cultivo operado con glicerol:metanol (60:40) a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ estos errores fueron mayores que en la rama oxidativa (*ppp1*) debido estos flujos presentares valores cercanos a cero (Figura IV.6 (b)).; fue observado también que en el cultivo operado con 100% glicerol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ el flujo correspondiente a la formación de F6P y GAP (*ppp6*) presentó un error de aproximadamente 100% ($0,02 \pm 0,02 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$).

Las desviaciones estándar en el ciclo de los TCA para los cultivos realizados a baja velocidad de crecimiento ($\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$) (Figura IV.7(a)) demostraron que el error de cálculo en esta vía fue muy pequeño y que un error significativo ocurre principalmente en la reacción *tcc3b*, sobretodo para los cultivos operados con glicerol y metanol; cabe señalar que en esta reacción el isocitrato formado en el paso anterior del ciclo sufre una descarboxilación oxidativa formando el α -cetoglutarato; esta reacción está catalizada por dos tipos de enzima isocitrato dehidrogenasa, una que es dependiente de NAD^+ y otra de NADP^+ ; sin embargo, no sabemos en que condiciones de cultivo estas dos enzimas están operativas y en que proporción, ni el balance exacto de estos dos cofactores en la mitocondria. Estas dos incógnitas pueden estar relacionadas al error obtenido en los cálculos de flujos metabólicos para estas dos situaciones de cultivo. En los cultivos operados a alta velocidad de crecimiento ($\mu=0,16 \text{ h}^{-1}$) (Figura IV.7(b)) se obtiene un error significativo en la reacción *tcc6*, que corresponde a la formación de oxaloacetato a partir del malato. Asimismo, el malato, que se forma a partir succinato, también es precursor de la síntesis del piruvato mediante el concurso del enzima málico (*ana3*), para el cual no sabemos exactamente de cual cofactor es dependiente; en nuestro modelo se consideró el cofactor NADPH , lo que puede proporcionar errores en los cálculos de flujos metabólicos en este grupo de reacciones, pues el malato participa como sustrato en dos reacciones distintas (*tcc6* y *ana3*). Otro error significativo ocurre en la reacción *tcc3a* (formación de α -cetoglutarato a partir de isocitrato, dependiente de NAD^+). Dauner *et al.* (2001) observaron también que el error en la reacción de formación de oxaloacetato presentó mayor error. Otra observación importante reportada por estos autores fue que mayores errores fueron obtenidos en cultivos con mayor velocidad de crecimiento. Por otro lado, si bien los errores distribuidos a lo largo de su red metabólica fueron menores que los obtenidos en este trabajo, cabe señalar que el trabajo realizado utilizaba una red sin compartimientos y el microorganismo en estudio era la bacteria *B. subtilis*; además, la red metabólica era constituida por un conjunto de 25 reacciones y 25 metabolitos, es decir, más reducida que la utilizada en nuestro estudio. Otra observación importante es que

Dauner y colaboradores utilizaron la metodología descrita por Wiechert *et al.* (1997) para calcular las desviaciones estándar. En general, los altos valores de desviaciones estándar pueden estar asociados a los errores de las medidas experimentales, al tamaño de la red metabólica, al método empleado para calcular estos errores y a la estabilidad numérica del método para calcular los flujos metabólicos, pues el sistema presenta infinitas soluciones.

Tabla IV.4 Orígenes de los metabolitos intermediarios de la levadura *P. pastoris* en cultivos operadas en quimiostato y crecidas en metanol, glicerol y mezclas de metanol:glicerol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Datos presentados en porcentaje.

Cultivo	100% Glicerol		80% Glicerol 20% Metanol		60% Glicerol 40% Metanol		40% Glicerol 60% Metanol		100% Metanol
	<i>Análisis METAFOR</i>	<i>Cálculos basados en MFA</i>	<i>Cálculos basados en MFA</i>						
Fracción de OAAmit que proviene del OAAcyt (anaplerosis)	33 ± 2	<i>tr_ooa</i> ≈ 0	32 ± 3	30	36 ± 3	<i>tr_ooa</i> > 0	29 ± 4	<i>tr_ooa</i> > 0	38
Fracción de OAAmit que proviene del TCA (= 100 - anaplerosis)	67 ± 2		65 ± 3	70	64 ± 3		71 ± 4		62
Fracción de OAAcyt que proviene de PYRcyt	32 ± 2	<i>tr_ooa</i> ≈ 0	37 ± 4	58	35 ± 2	<i>tr_ooa</i> > 0	33 ± 3	<i>tr_ooa</i> > 0	58
Fracción de OAAcyt que proviene de OAAmit (100 - OAAcyt a través PYRcyt)	68 ± 2		63 ± 4	42	75 ± 2		67 ± 3		42
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (enzima málico)	2 ± 2	0	0 ± 2 * 1 ± 8**	0	1 ± 3* 5 ± 11**	0	1 ± 2* 6 ± 13**	0	0
Fracción de ACCOAmít sintetizada a partir PYRmit		100		99		91		0	90
PEP con enlaces C1-C2-C3 intactos (sólo se rompen por incorporación de C de metanol)			70		60		48		
Fracción de metanol que es desasimila a CO ₂				15		20		8	0
Fracción de GAP que proviene de glicerol (respecto a la de metanol)				65		40		25	0
Fracción de GAP que proviene de metanol				35		60		75	100

† Datos obtenidos de Solà (2004); (*) limite inferior; (**) limite superior.

Tabla IV.5 Orígenes de los metabolitos intermediarios de la levadura *P. pastoris* en cultivos operadas en quimiostato y crecidas en glicerol y mezclas de metanol:glicerol a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$. Datos presentados en porcentaje.

Cultivo	100% Glicerol		60% Glicerol 40% Metanol		40% Glicerol 60% Metanol	
	Análisis METAFOR	Calculados basados en MFA	Análisis a METAFOR	Calculados basados en MFA	Análisis METAFOR	Calculados basados en MFA
fracción de OAAMit que proviene del OAAct (anaplerosis)	48 ± 4	30	42 ± 2	42	43 ± 2	57
Fracción de OAAMit que proviene del TCA (=100 - anaplerosis)	52 ± 4	70	58 ± 2	58	57 ± 2	43
Fracción de OAAct que proviene de PYRcyt	68 ± 2	53	78 ± 2	59	76 ± 3	59
Fracción de OAAct que proviene de OAAMit (100 - OAAct a través PYRcyt)	32 ± 2	47	22 ± 2	41	24 ± 3	41
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (enzima málico)	2 ± 1	0	0	0 ± 2* 0 ± 6**	0 ± 0* 0 ± 0**	0
Fracción de ACCOAMit sintetizada a partir PYRmit		100		100		100
PEP con enlaces C1-C2-C3 intactos (sólo se rompen por incorporación de C de metanol)			97		91	
Fracción de metanol que es desasimila a CO ₂				68		53
Fracción de GAP que proviene de glicerol (respecto a la de metanol)				82		64
Fracción de GAP que proviene de metanol				18		36

† Datos obtenidos de Solà (2004); (*) limite inferior; (**) limite superior.

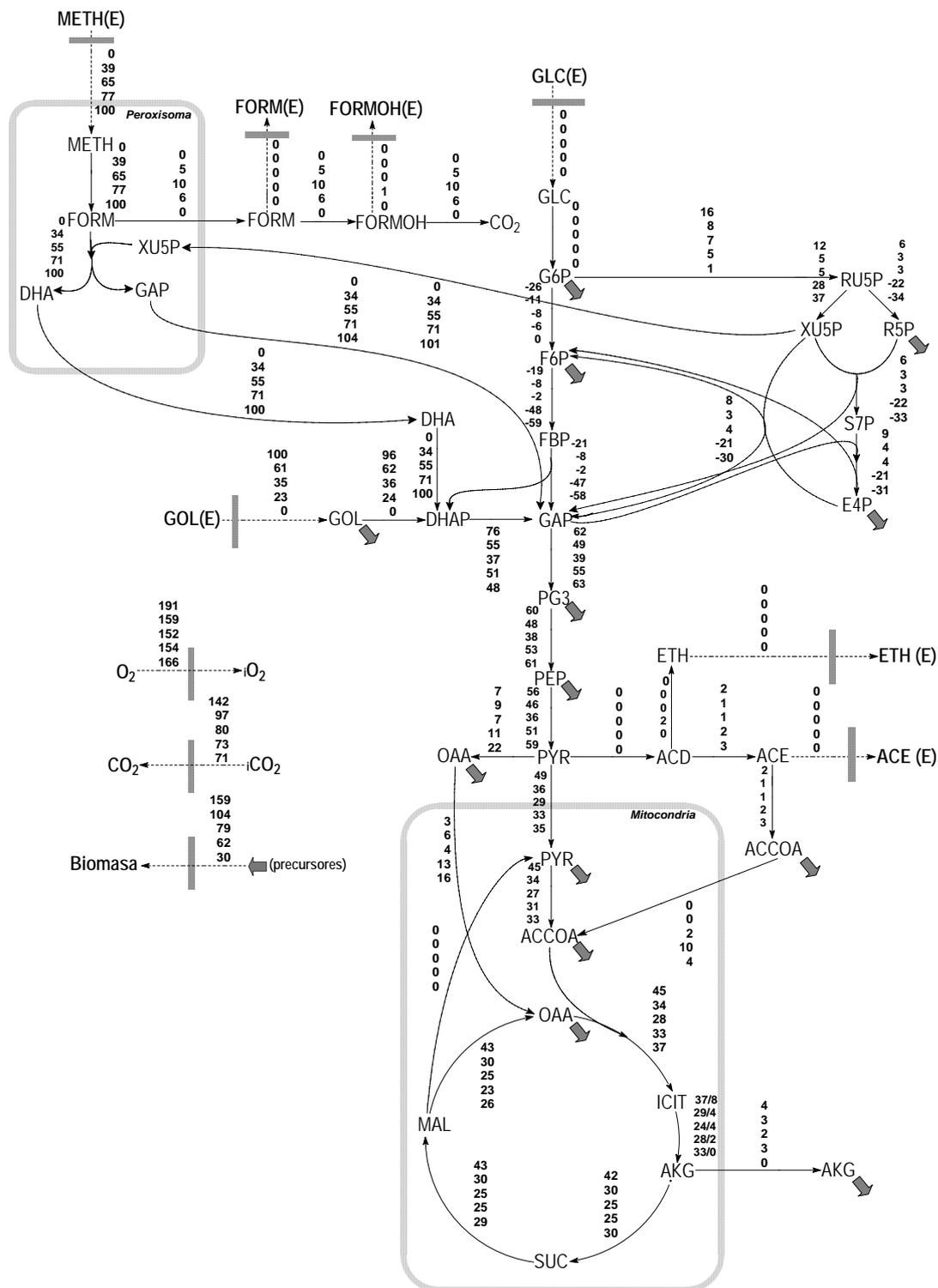


Figura IV.4 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol y mezclas de glicerol:metanol en cultivos operados en quimiostato a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Los valores están en orden decreciente de concentración de glicerol, es decir glicerol:metanol (100:0); glicerol:metanol (80:20); glicerol:metanol (60:40); glicerol:metanol (40:60) y glicerol:metanol (0:100). Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

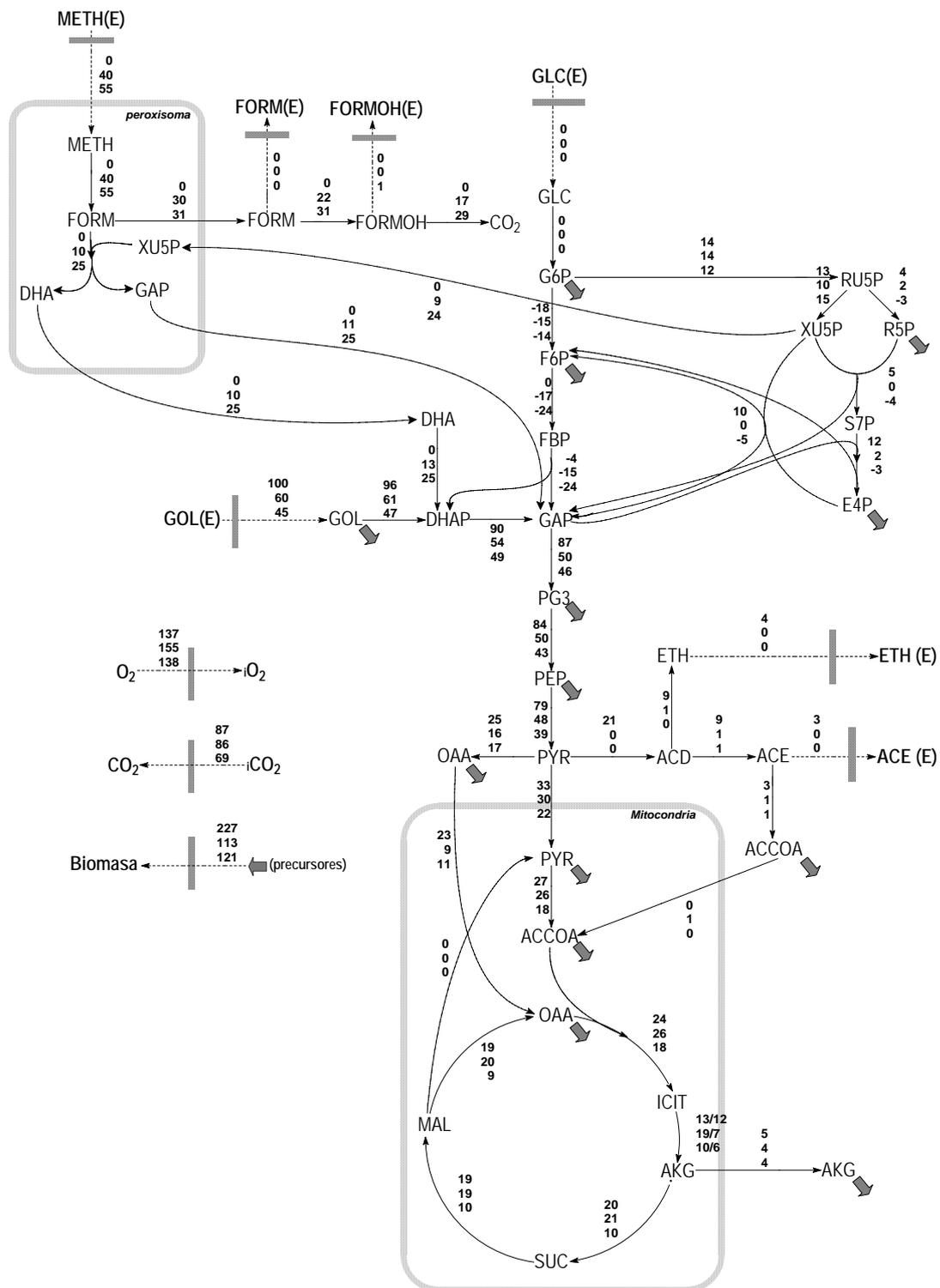


Figura IV.5 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol y mezclas de glicerol:metanol en cultivos operados en quimiostato a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$. Los valores están en orden decreciente de concentración de glicerol, es decir glicerol:metanol (100:0); glicerol:metanol (60:40) y glicerol:metanol (40:60). Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

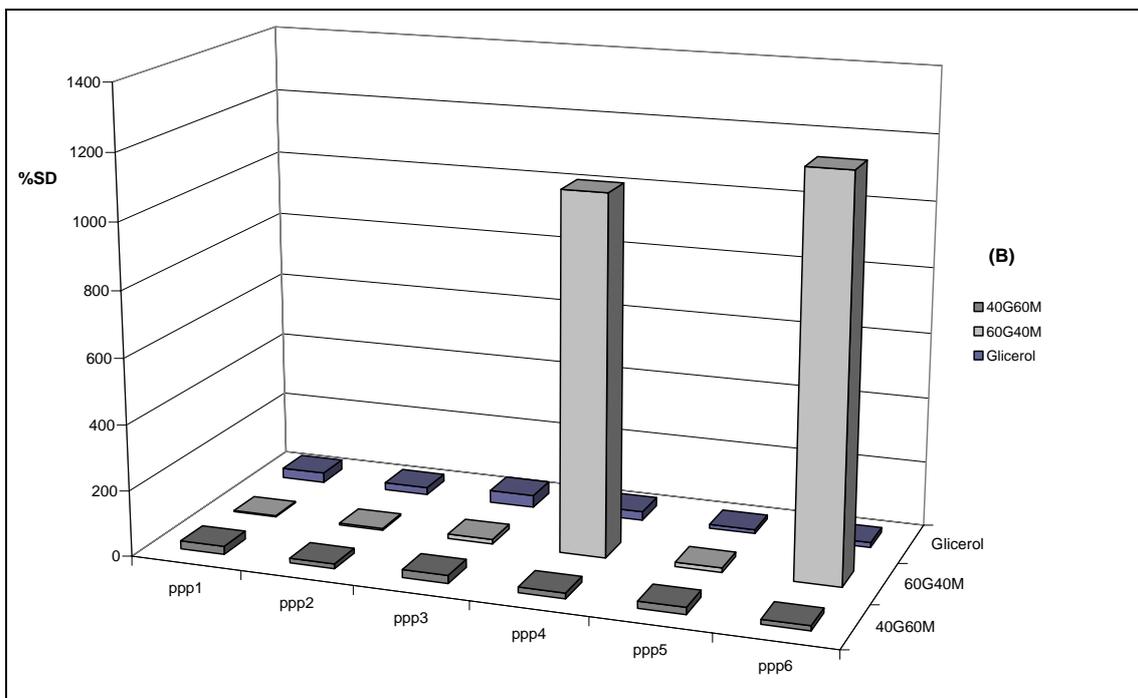
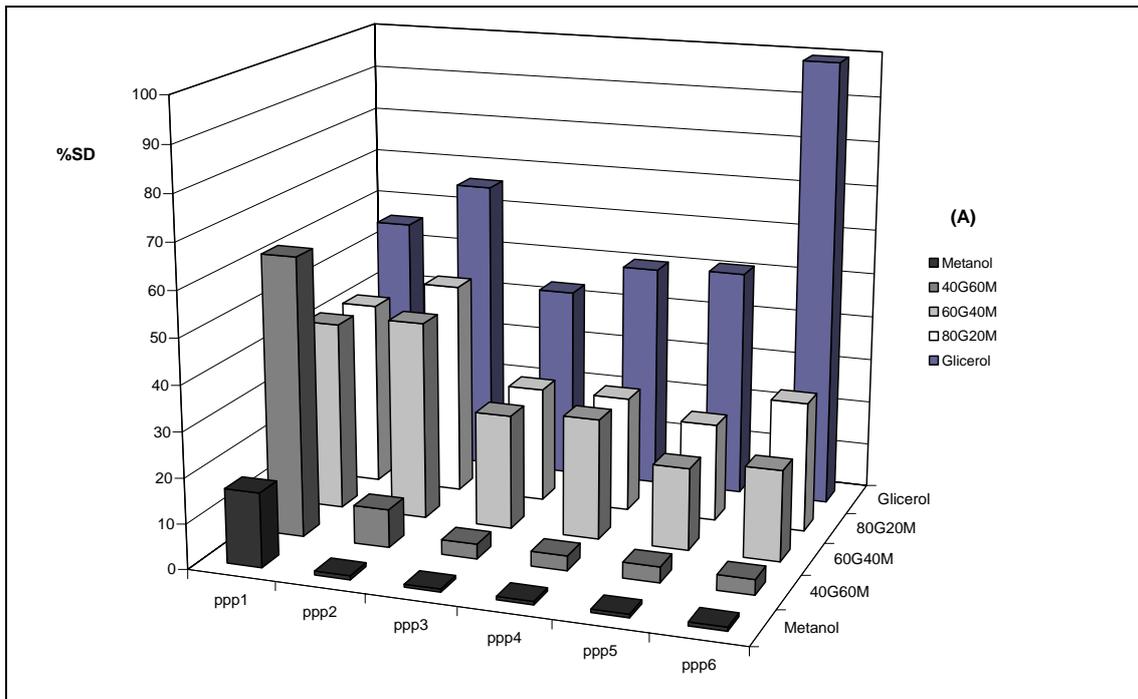


Figura IV.6 Desviaciones estándar en relación al flujo metabólico calculado, para las reacciones de la vía de las pentosas fosfato; donde: (a) cultivos a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$; (b) cultivos a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$; y 80G20M representa el cultivo glicerol:metanol (80:20); 60G40 M el cultivo glicerol:metanol (60:40) y 40G20M el cultivo glicerol:metanol (40:60).

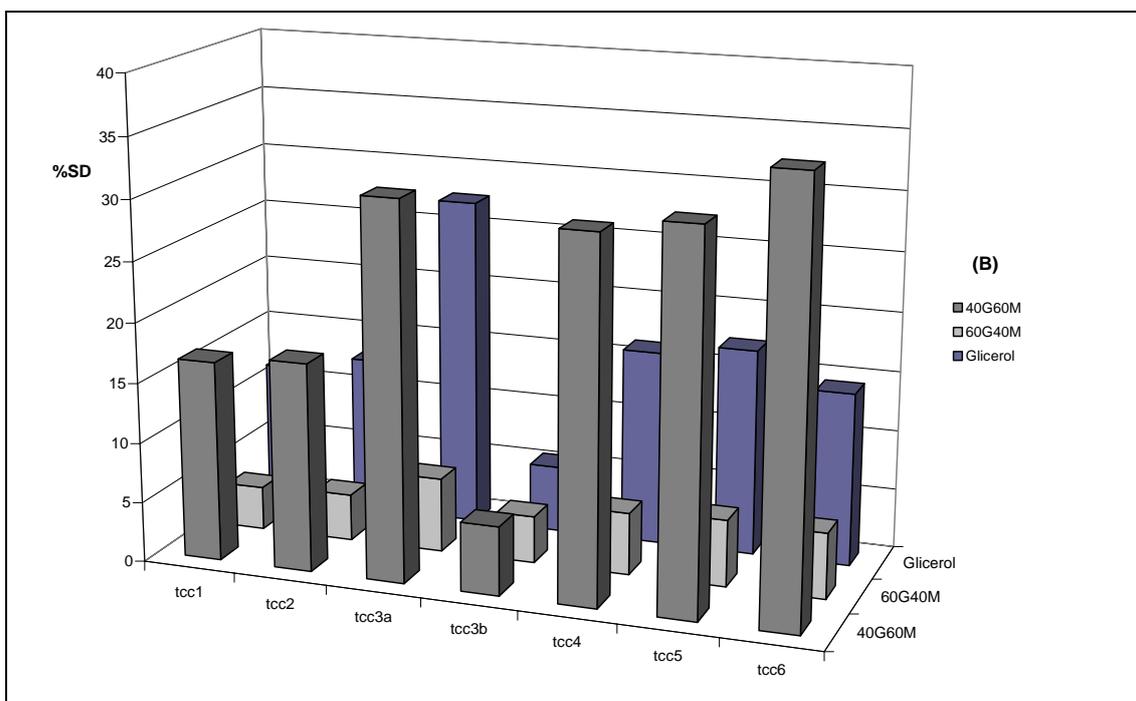
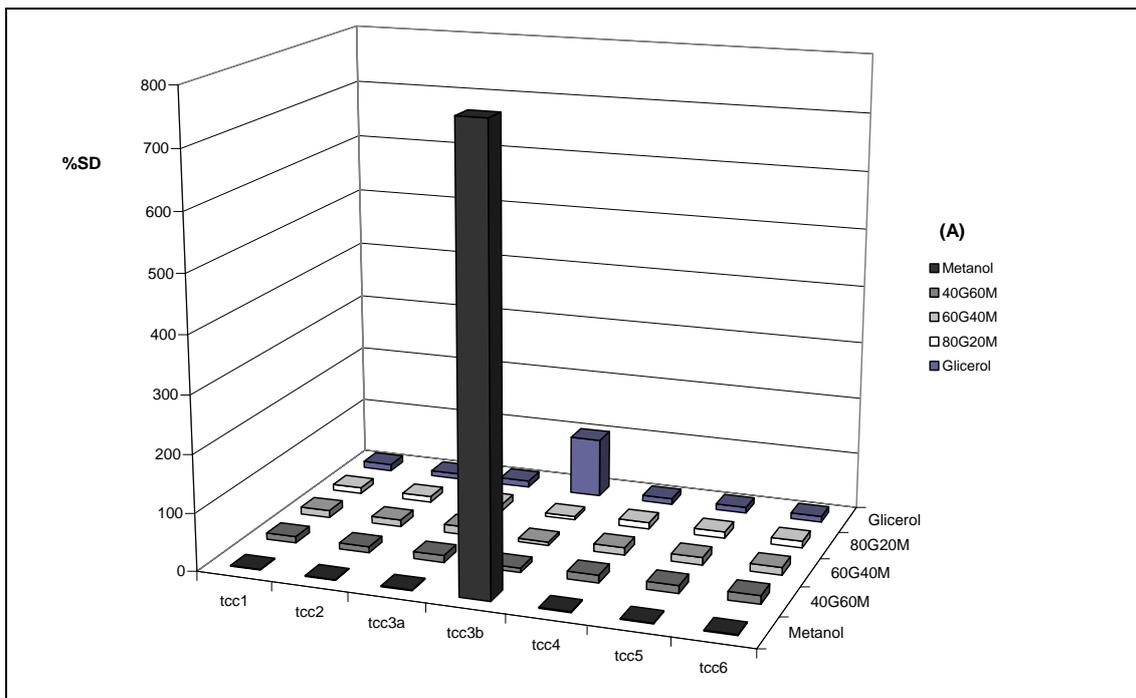


Figura IV.7 Desviaciones estándar en relación al flujo metabólico calculado, para las reacciones del ciclo de los TCA; donde: (a) cultivos a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$; (b) cultivos a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$; y 80G20M representa el cultivo glicerol:metanol (80:20); 60G40 M el cultivo glicerol:metanol (60:40) y 40G20M el cultivo glicerol:metanol (40:60).

Globalmente, el modelo estequiométrico descrito y flujos metabólicos calculados con base al mismo reflejan el importante impacto del metanol en la redirección de flujos metabólicos en cultivos con sustratos mixtos. En un siguiente paso, se integraron una serie de restricciones basadas en datos de experimentos de marcaje con ^{13}C en los cálculos de flujos metabólicos, para así ganar en fiabilidad de los datos e riqueza de la información derivada de los mismos.

CAPÍTULO V

Análisis de flujos metabólicos basados en datos obtenidos a partir de experimentos de marcaje isotópico con ^{13}C

En este capítulo será abordado el análisis de flujos metabólicos (MFA) basado en datos obtenidos a partir de experimentos de marcaje con ^{13}C .

Concretamente, el estudio se basa en la aplicación de la metodología descrita por Fischer *et al.* (2004) para el cálculo de flujos metabólicos introduciendo restricciones derivadas de cocientes de flujos metabólicos estimados experimentalmente mediante ^{13}C -RMN (Solà, 2004). El método de marcaje isotópico usado en estos estudios detecta los patrones ^{13}C en 10-15 aminoácidos constituyentes de proteínas, cuyos esqueletos de carbono están conservados en los ocho intermediarios clave del metabolismo central a partir de los cuales se sintetizan (Szyperski, 1995). Ello posibilita la interpretación directa y local de patrones de marcaje seleccionados, cuantificando así la contribución relativa de rutas convergentes a la formación de un determinado metabolito (cocientes de flujos). Los cocientes de flujos metabólicos pueden luego ser utilizados como restricciones adicionales en el análisis de flujos metabólicos convencionales. Para ello, hubo la necesidad de introducir algunas modificaciones (añadir o eliminar algunas reacciones) en la estequiometría de la red metabólica descrita anteriormente.

Por otro lado, dado el reducido número de restricciones derivadas de experimentos de ^{13}C -RMN que se pueden aplicar en este modelo biológico (3 o 4), también se realizó una primera aproximación al análisis de flujos

metabólicos basado en ^{13}C (^{13}C -based MFA), (Wiechert, 2001). En esta metodología se integran simultáneamente datos de ^{13}C (patrones de marcaje de diversos metabolitos libres intracelulares, obtenidos mediante RMN o espectrometría de masas), flujos extracelulares y requerimientos biosintéticos mediante modelos computacionales. Generalmente, la distribución de flujos se identifica mediante el ajuste iterativo de los flujos a los datos medidos, donde se minimiza la diferencia entre los espectros de isótopos observados y simulados (Wiechert, 2001). Esencialmente, es un procedimiento de ajuste de parámetros, donde la relación entre flujos desconocidos y datos medidos es descrita mediante modelos matemáticos de complejidad variable. Es importante señalar que esta metodología permite pues simular experimentos de marcaje isotópico, posibilitando así la optimización del diseño de los mismos. Para estos estudios, se utilizó el programa ^{13}C -Flux (Wiechert *et al.*, 2001), y se partió de una red metabólica más sencilla. El objetivo principal de dichos estudios fue implementar un procedimiento que permitiera obtener datos suficientes para determinar los flujos relacionados a la vía de las pentosas fosfato, ya que la metodología basada en ^{13}C -RMN no permite determinar cocientes de flujos metabólicos para esta ruta cuando se usan determinados substratos como el glicerol. Globalmente, la combinación de diversos métodos de análisis de flujos metabólicos persigue la obtención de un patrón de flujos final que sea más preciso.

V.1 Introducción

La identificación y determinación estructural de moléculas de origen biológico tiene gran aplicación para el conocimiento del funcionamiento del metabolismo celular; además su conocimiento permite la comprensión de algunos mecanismos moleculares responsables de ciertas enfermedades, así como el diseño y desarrollo de nuevos medicamentos.

La determinación espectrométrica se basa principalmente en la exposición de la molécula a campos de energía y la respuesta de la dicha

molécula a estos campos son gravados en forma de espectros. Las técnicas espectrométricas más utilizadas son la espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS), infrarrojo (IV) y ultravioleta (UV); estas técnicas son usadas de forma independiente o complementaria una de la otra (Silverstein *et al.*, 1991). En este apartado se discutirá brevemente las técnicas de RMN y MS por ser las más usadas en el análisis de moléculas biológicas.

V.1.1 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno, siendo posible también obtener espectros con átomos que presentan número de *spin* $I = \frac{1}{2}$ (^1H , ^3H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P), (Silverstein *et al.*, 1991).

Un protón en un espectro de resonancia magnética nuclear está sujeto tanto al campo magnético externo como al campo inducido por los electrones que lo rodean. Pero, además, si en su entorno hay otros protones, sus campos magnéticos, aunque sean pequeños afectan a la frecuencia de absorción del protón que se está observando. Este desplazamiento a campo bajo es debido al desapantallamiento que provocan los átomos adyacentes. El desdoblamiento de señales en multipletes, denominado desdoblamiento de *spin*, se origina cuando los *spins* magnéticos de dos tipos diferentes de protones interactúan. Cuando esta interacción ocurre se dice que los protones están acoplados magnéticamente (Silverstein *et al.*, 1991).

El desdoblamiento *spin-spin* se explica teniendo en cuenta todos los posibles *spins* individuales de los protones. En algunas moléculas el campo magnético que incide en algunos protones del grupo CH_3 está alineado con el campo magnético externo, y en otras se alinea contra el campo, tal y como se muestra en la Figura V.1(a).

Cuando el protón H_a está alineado con el campo externo, los protones H_b se ven afectados por un campo magnético externo ligeramente más

intenso, es decir, se ven desapantallados y absorben a un campo menor. Por otro lado, cuando el campo de H_a está alineado en contra al campo magnético externo, los protones H_b se encuentran apantallados o protegidos, ya que sienten la presencia de un campo magnético menor al externo y, por tanto, absorben a campo más alto.

El desdoblamiento *spin* es una propiedad recíproca, es decir, si un protón desdobla a otro, el segundo protón debe desdoblar al primero. Así, en una molécula con cuatro átomos de hidrógeno (H_a , H_b , H_b y H_b), el protón H_a , vecino a los otros tres átomos de hidrógeno, genera una señal cuadruplete porque acopla con los tres protones H_b . Este cuadruplete se genera porque hay ocho permutaciones de los *spins* de los tres protones H_b , tal y como se muestra en la Figura V.1 (b), donde las permutaciones de *spins* resultan cuatro señales, siendo las dos del centro tres veces mayores que las de los extremos ya que corresponden a tres permutaciones posibles de *spins* equivalentes (absorben a la misma frecuencia).

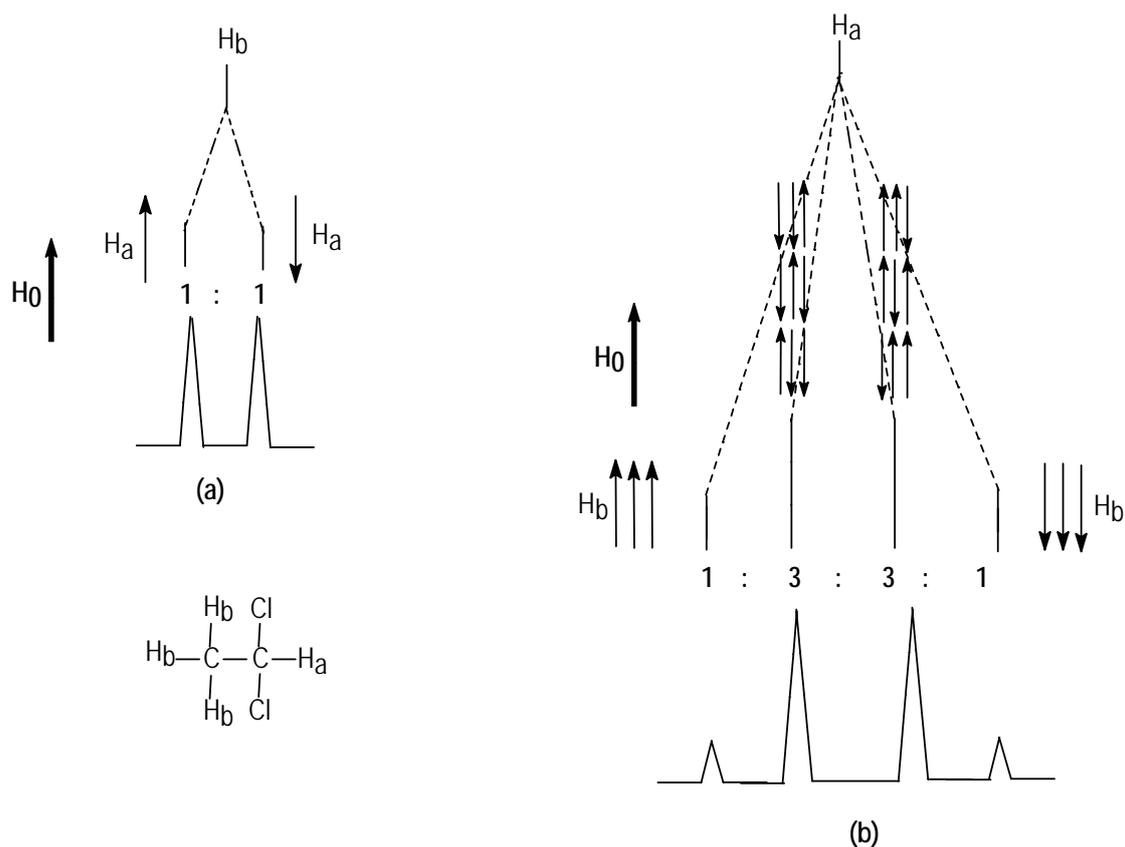


Figura V.1 Desdoblamiento de *spin* de 1,1 dicloroetano. (a) desdoblamiento *spin-spin* (doblete); (b) desdoblamiento *spin* resultando en cuatro señales (quadruplete).

Referencia: adaptado de Silvertein *et al.*, 1991.

En general, la multiplicidad o número de picos de una señal, viene dada por la regla N+1, donde N es el número de protones equivalentes que desdoblan una señal. Las áreas relativas del multiplete N+1 vienen dadas por el llamado triángulo de Pascal (Tabla V.1).

Tabla V.1 Áreas relativas del multiplete N+1 que vienen dadas por el triángulo de Pascal.

Número de protones equivalentes	Número de picos (multiplicidad)	Relaciones de área (triángulo de Pascal)
0	1 (singlete)	1
1	2 (doblete)	1 1
2	3 (tripleto)	1 2 1
3	4 (cuadruplete)	1 3 3 1
4	5 (quintuplete)	1 4 6 4 1
5	6 (sextuplete)	1 5 10 10 5 1

Referencia: Silvertein *et al.*, 1991.

Las distancias entre picos de los multipletes dan mucha información estructural. A la distancia entre los picos de un multiplete (medida en Herzios) se le llama constante de acoplamiento entre los protones magnéticamente acoplados. Se simboliza como J_{ab} donde H_a y H_b son los protones que acoplan entre sí.

Además de los desplazamientos químicos y de los acoplamientos escalares existe un efecto muy importante para la determinación de estructuras mediante RMN, el llamado **Efecto Nuclear Overhauser (NOE)**. Es una interacción a través del espacio mediante la cual cambia la intensidad de la señal de un determinado núcleo cuando se irradia otro núcleo vecino (cercano en el espacio). El NOE es una interacción dipolo-dipolo y como tal depende de la potencia r^{-6} . Nos permite medir distancias interatómicas de pocos Å (Silvertein *et al.*, 1991).

La RMN es un método relativamente moderno (en comparación a otras espectroscopias) pues data de 1946, año en el que Purcell de la Universidad de Harvard y Bloch y Packard de la Universidad de Stanford obtuvieron los primeros resultados y elaboraron la teoría, el primer espectro con señales separadas para una molécula orgánica data de 1951 (Garrido, 2003). El primer espectro de una proteína (una ribonucleasa) fue obtenido en 1957. Estos estudios permitieron realizar la asignación de señales individuales y establecer algunas diferencias entre la proteína plegada y

desnaturalizada. Estudios llevados a cabo con RMN probó también que era posible determinar la dinámica de proteínas y de ácidos nucleicos. Solamente en 1975, a través del trabajo realizado por Gibbons, fue posible determinar la estructura completa de una proteína mediante la realización de medidas de constantes de acoplamiento y de NOEs 1D del esqueleto de la proteína. En 1984 Wüthrich (Wüthrich *et al.*, 1984 citado en Garrido, 1983) resuelve por primera vez la estructura de una proteína en disolución a resolución atómica, concretamente el inhibidor de la proteasa seminal de toro (Garrido, 2003).

Los espectrómetros de RMN consisten esencialmente en un imán, un emisor y un detector de radiofrecuencia, además de un ordenador y un registrador que realiza las gráficas que constituyen el espectro. Actualmente los espectrómetros de RMN trabajan de 200 hasta 900 MHz (Silverstein *et al.*, 1991; Solà, 2004).

En general, los espectros RMN se determinan en disolución; los disolventes utilizados deben ser químicamente inertes, disolver un 2-5% en peso del mayor número de sustancias posibles, y principalmente presentar el menor número de señales posible (transparencia magnética), siendo los disolventes deuterados los que reúnen esta última condición, entre ellos el deuterocloroformo (CDCl_3) es el más utilizado (Silverstein *et al.*, 1991).

Los espectros de RMN pueden ser obtenidos en una dimensión (1D) o multidimensionales (2D, 3D, etc.), (Kaiser, 2000).

La espectrometría en 1D es la técnica más sencilla y comprende en espectros de ^1H , $^{13}\text{C}(^1\text{H})$ y DEPT (**D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer); esta última técnica consiste en obtener multiplicidades de picos de ^{13}C causados por la protección o apantallamiento de los protones, por lo que el espectro obtenido presenta una serie de picos de radicales CH_3 , CH_2 y CH , como ilustra la Figura V.2 (Silverstein *et al.*, 1991, Kaiser, 2000).

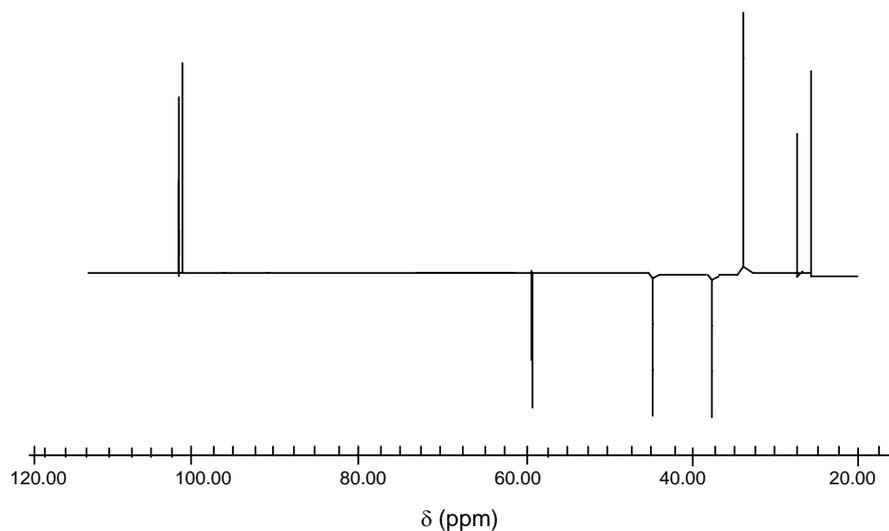


Figura V.2 Espectro DEPT de un compuesto hipotético, los picos CH_3 y CH están presentados para arriba y los picos CH_2 para abajo.

Referencia: Adaptado de Silverstein *et al.*, 1991.

La espectrometría de RMN en 2D nos permite obtener espectros en dos dimensiones (2D) homo (^1H , ^1H) y heteronucleares (^1H , ^{13}C), además de correlacionar hidrógenos y/o carbonos que posean alguna relación escalar ($^nJ_{\text{H,H}}$, $^nJ_{\text{C,H}}$, $^nJ_{\text{C,C}}$) o espacial (H,H- o H,C-NOE) entre si. Las técnicas 2D más utilizadas están listadas en la Tabla V.2.

Tabla V.2 Técnicas bidimensionales disponibles en Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

COSY (homonuclear C Orrelation S pectroscop Y)	Establece las correlaciones entre hidrógenos que están acoplados por ${}^{2-3}J_{H,H}$ (acoplamientos geminales y vecinales, medidos en el espectro 1D) para así discernir la multiplicidad de las señales observados en el espectro de ${}^1\text{H}$ -RMN.
COSYLR (COSY for Long Rang couplings)	Una variante del COSY, pero en este caso manifiesta las correlaciones debido a acoplamientos a la larga distancia.
DQF-COSY (Double Quantum Filter-COSY)	Otra variante del COSY en la cual las señales de la diagonal están ausentes o, al menos, bastante minimizadas. Muy útil para observar correlaciones de hidrógenos con desplazamiento químico (δ_H) muy próximos uno de los otros.
TOCSY (T O tal C orrelation S pectroscop Y)	Muy parecido al COSY pero las correlaciones conllevan la condición H omonuclear H Artmann- H Ahn (HOHAHA). Esta técnica tiene como principal utilidad determinar la estructura de compuestos que poseen un carbono sin hidrógenos o un heteroátomo, separando dos subsistemas en la misma molécula.
NOESY (Nuclear O verhauser E nhancement S pectroscop Y)	También tiene aspecto de un COSY; no obstante, las correlaciones conllevan interacciones debidas al NOE ente los hidrógenos que están espacialmente próximos (en general, menor de que 4 Å). A través de esta técnica es posible establecer la configuración relativa de cada hidrógeno en la molécula y generalmente la geometría molecular como un todo.
HETCOR (H E Teronuclear C ORrelation spectroscopy)	Con este experimento es posible marcar los carbonos que contienen hidrógenos, tanto en el caso que ya hayan sido señalados todos los hidrógenos del espectro de ${}^1\text{H}$ -RMN o viceversa, pues la técnica depende de los acoplamientos ${}^1J_{C,H}$. El espectro presenta un eje horizontal (dimensión F_2) correspondiendo a los δ_C y un eje vertical (dimensión F_1) correspondiendo a los δ_H .
COLOC (C O rrelation spectroscopy for L O ng-range Couplings)	El espectro se presenta como un HETCOR sin embargo, las correlaciones se refieren a los acoplamientos ${}^nJ_{C,H}$ ($n \geq 2$). Las informaciones obtenidas de las correlaciones ${}^nJ_{C,H}$ permiten establecer la posición de los carbonos no hidrogenados.
HMQC (Heteronuclear M ultiple Q uantum Coherence)	Técnicas 2D con detección inversa. En los dos casos la secuencia de pulsos involucra transiciones múltiplo-cuánticas, en esta técnica la detección es realizada por intermedio de un núcleo mucho más sensible (detección indirecta en el canal de ${}^1\text{H}$ o ${}^{19}\text{F}$ o ${}^{31}\text{P}$). Estas técnicas substituyen los HETCOR y COLOC. Los espectros HMQC y HMBC son editados con el eje horizontal (dimensión F_2) correspondiendo a los δ_H y el eje vertical (dimensión F_1) a los δ_C .
HMBC (Heteronuclear M ultiple B ond Coherence)	
HSQC-ED (Heteronuclear S ingle Q uantum Coherence – E Diting) HSQC-TOCSY	Técnicas 2D con gradiente de campo. En este caso se utilizan bobinas adicionales de gradiente de campo en el espectrómetro, reduciendo o eliminando los varios ciclos de modulación de fase en el transmisor y en el receptor de frecuencia. En la correlación HSQC-ED tiene el aspecto de un HMQC, pero son involucradas transiciones cuánticas simples y en la correlación HSQC-TOCSY tiene el aspecto de un HSQC además de las correlaciones H,H como en el TOCSY.

Referencia: Adaptado de Kaiser, 2000.

V.1.2 Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica en la cual los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, posteriormente separados de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) y finalmente detectados (Silverstein *et al.*, 1991).

El primer espectro de masa obtenido data de 1886 cuando Golstein descubre los iones positivos en un tubo de descarga eléctrica a baja presión. El análisis de macromoléculas solo fue posible en la década de los 80, cuando Kiochi Tanaka en 1987, utilizando el método de la ionización suave por rayos láser, obtuvo los espectros de masas de la quimotripsina, carboxipeptidasa A y citocromo C. Tanaka, probó que la longitud de onda del láser de nitrógeno, impide que la radiación sea absorbida por los aminoácidos aromáticos, lo cual impide la fragmentación de las proteínas. J. B. Fenn, utilizando el método de ionización por electropulverización (*electrospray*) de una solución acuosa de proteínas de hasta 40 kDa, demostró que era posible obtener la masa molecular de moléculas grandes con una precisión de 0,01% (del Río Portilla, 2003).

Los espectrómetros de masa consisten esencialmente de un sistema de introducción de muestra; cámara de ionización; analizador y detector. Los detalles de ellos difieren en la forma en que se realizan los diferentes procesos requeridos para realizar el fenómeno (Silverstein *et al.*, 1991). Las técnicas de MS están listadas en la Tabla V.3.

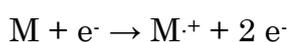
La técnica más usual se basa en el impacto de electrones (EI), en que las moléculas analizadas se encuentra en fase gaseosa y son bombardeadas por un haz de electrones y el resultado del impacto de los electrones son grabados como un espectro de iones positivos separados con base en las diferentes relaciones masa/carga. La mayoría de estos iones presenta solamente una carga positiva. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como “huella química” para caracterizar los componentes de una mezcla, debido a que las masas atómicas de los elementos que compone una molécula no son números enteros (Silverstein *et al.*, 1991, Gombert, 2001).

Tabla V.3 Tipos de espectrómetros de masas clasificados en función de las cámaras de ionización y su agente ionizante.

Tipo	Técnica	Agente ionizante
Fase Gaseosa	Impacto de electrones (EI)	Electrones energéticos
	Ionización química (CI)	Iones gaseosos reactivos
	Ionización por campo (FI)	Electrodo de elevado potencial
	Desorción por campo (FD)	Electrodo de elevado potencial
	Ionización por electronebulización (ESI)	Campo eléctrico elevado
	Desorción/ionización asistida por una matriz (MALDI)	Haz de láser
Desorción	Desorción por plasma	Fragmentos de fisión del átomo de Cf
	Bombardeo con átomos rápidos (FAB)	Haz de átomos energéticos
	MS de iones secundarios (SIMS)	Haz de iones energéticos
	Ionización por termonebulización (TS)	Elevada temperatura

Referencia: Adaptado de Wilkins, 1997 y Dass, 1998.

Los espectros de masa son normalmente obtenidos utilizándose un haz de electrones de energía de 70 eV. El mecanismo más sencillo que ocurre es la remoción de un electrón del haz, formándose un ion molecular, lo que resulta en un catión radical ($M^{\cdot+}$). La ionización de la muestra se consigue por bombardeo mediante electrones (e^-), según el proceso (Silvertein *et al.*, 1991, Gombert, 2001):



El punto representa el electrón desemparejado. Muchos de estos iones moleculares son desintegrados en la orden $10^{-9} - 10^{-3}$ s, resultando en el caso más sencillo, en un fragmento con carga positiva y en un radical.



Como consecuencia del bombardeo electrónico en la cámara de ionización, las moléculas se rompen en una serie de fragmentos, siempre que una misma molécula se rompa en las mismas condiciones nos proporcionará el mismo tipo y número de fragmentos, constituyendo la fragmentación patrón. Gracias a esto se pueden determinar qué compuestos están presentes en una la muestra. Por otra parte, la intensidad relativa de los distintos picos nos permitirá también deducir la proporción en que cada

componente se encuentra en la muestra. El pico que aparece con valor más elevado de m/z corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar, con excepción de los picos relativos a los isótopos, y recibe el nombre de masa patrón. Esta masa patrón nos permite determinar la masa molecular, siempre que se opere con una tensión de ionización no excesivamente elevada, la cual produciría la fragmentación total de la molécula (Silvertein *et al.*, 1991).

Un espectro de masa (Figura V.3) representa los fragmentos cargados (incluso el ion molecular) en función de sus concentraciones relativas. El pico más intenso del espectro (denominado pico base) tiene como valor 100%, las intensidades de los demás picos son expresadas en porcentajes de la intensidad del pico base (Silvertein *et al.*, 1991).

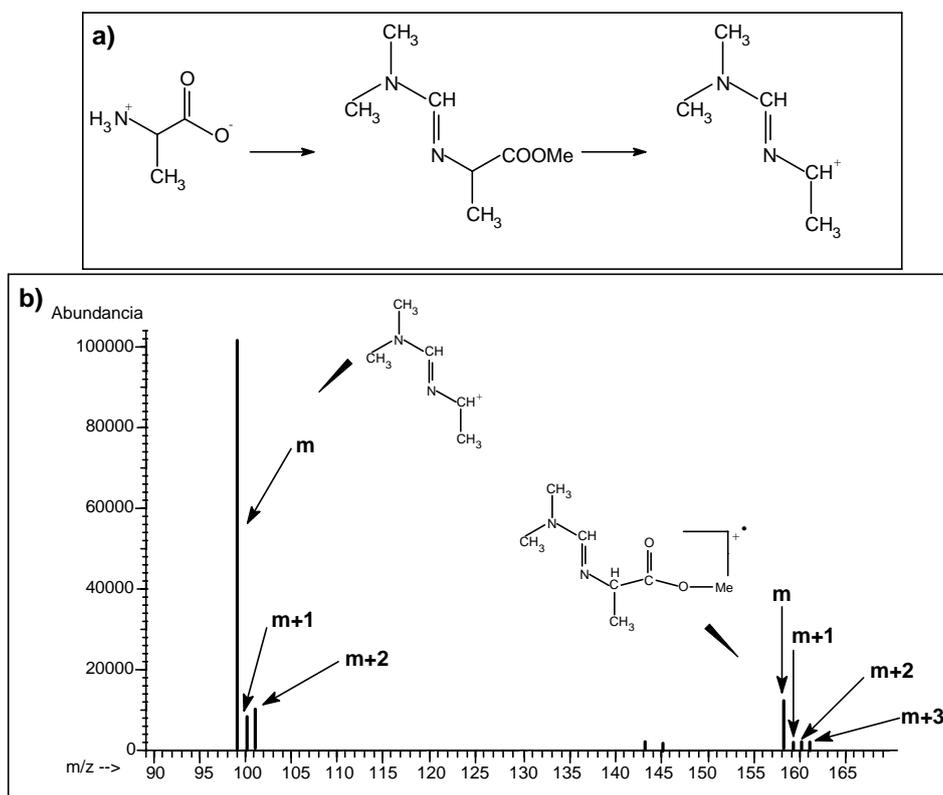


Figura V.3 a) Fragmentación de una molécula de alanina. La alanina (izquierda) es derivatizada a éster metil alanina N-(N',N'-)dimetilmileno, que genera el ion molecular del aminoácido derivado (centro) y un fragmento del átomo de C2 y C3 de la molécula original de alanina. b) Espectro de masa correspondiente al ion molecular y uno fragmento de ion de la alanina obtenida de la Figura a) El fragmento a la izquierda contiene los átomos de C2 y C3 de la alanina y el fragmento a la derecha contiene los 3 átomos de alanina. Los marcajes en los dos fragmentos pueden ser medidos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-MS). La diferencia entre los marcajes del fragmento a la izquierda con lo de la derecha, resulta el marcaje en el átomo C1 de la alanina.

Referencia: Christensen & Nielsen, 1999.

Para el análisis de macromoléculas biológicas es común la utilización de la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (CG-MS). En esta técnica, la mezcla es separada a través de la columna del cromatógrafo y posteriormente ionizada causando simultáneamente la fragmentación de las moléculas, el espectro resultante contiene además de la masa del ion molecular del isotópomo, varios fragmentos de masa del isotópomo (Christensen & Nielsen, 1999).

La combinación de la cromatografía líquida (LC) y la espectrometría de masas (MS), proporciona un gran potencial para el análisis de

metabolitos, por no ser necesaria la derivatización pre o postcolumna de la muestra (Sulyok *et al.*, 2006).

Esta técnica, que en muchos casos utiliza detectores espectrométricos multi-masas, puede ser utilizada potencialmente, para medir un amplio de rango de analitos, sin limitaciones de masa molecular, con una preparación de la muestra en forma simple, sin necesidad de una derivatización química, y debido a la robustez de los instrumentos, un mantenimiento limitado. En la LC-MS, los compuestos se separan en primer lugar mediante cromatografía líquida y posteriormente se detectan gracias a un espectrómetro de masas. Así se obtiene información referente a la estructura de la molécula y el resultado es mucho más fiable que el de otros detectores. La especificidad se puede llevar a un nivel superior mediante la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), (Sulyok *et al.*, 2006).

V.1.3 Análisis de vías metabólicas mediante marcaje isotópico de carbono

Los primeros experimentos llevados a cabo con isótopos de carbono, más concretamente el átomo de ^{14}C , para la localización de un determinado metabolito y cuantificación de flujos metabólicos empezó en los años 80 por Blum & Steins con células de *Tetrahymena*. A lo largo de los años y con avance de las técnicas de RMN fue posible también determinar y cuantificar las vías metabólicas *in vivo* (Wiechert, 2001). Los experimentos utilizando átomos de ^{14}C fueron prácticamente substituidos por ^{13}C por ser isotopicamente más estable; además, el tiempo de realización de experimentos con dicho isótopo es relativamente más rápido; también permite obtener informaciones específicas sobre la localización celular de un determinado metabolito sin la necesidad de ser degradado, gracias al análisis por la RMN y/o MS. Los experimentos con ^{13}C también nos pueden proporcionar información sobre la formación o rompimiento de los enlaces covalentes entre átomos de carbono de los compuestos que participan en una determinada red de reacciones bioquímicas a través de la observación de las constantes de acoplamiento escalar ^{13}C - ^{13}C o de las constantes de

acoplamientos bipolares en uno o varios espectros de RMN (Szyperski, 1998; Wiechert, 2001).

La utilización de la RMN y de la MS en la investigación de vías metabólicas con substratos marcados tiene como principal ventaja, en relación a otras técnicas de análisis, la capacidad de distinguir las diferentes posiciones de los átomos de ^{13}C en una mezcla de compuestos; en la RMN también es posible en experimentos con células *in vivo*. Un metabolito puede presentar en su estructura diferentes posiciones de los átomos marcados, denominando a cada una de las especies posibles “isotopómero” (combinación de los términos isótopo e isómero). En un metabolito con n átomos de carbono, las posiciones de los átomos de carbono marcado o no pueden presentarse en su composición 2^n diferentes posiciones de marcaje, resultando en 2^n diferentes isotopómeros. La Figura V.4 ilustra 4 de los 8 isotopómeros posibles de una metabolito M con 3 átomos de carbono y los espectros cuando éstos son observados mediante RMN (^1H y ^{13}C) y MS (Wiechert & de Graaf, 1996; Schmidt *et al.*, 1999; Wiechert, 2001; Wiechert *et al.*, 2001).

La distribución de ^{13}C en un metabolito con n átomos de carbono puede ser determinada a través de la fracción o porcentual de cada isotopómero que compone el *pool* del metabolito. La suma de las fracciones de los isotopómeros corresponde a 1 ó 100% (Wiechert, 2001; Wiechert & de Graaf, 1996).

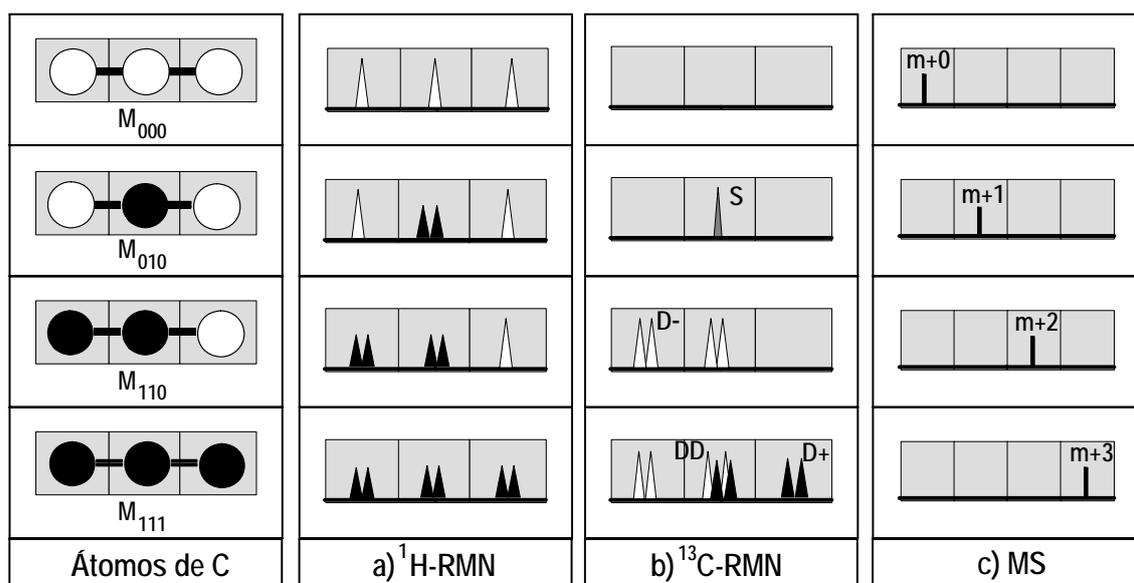


Figura V.4 Análisis espectrométrica de 4 de los 8 isotopómeros posibles de un metabolito M con 3 átomos de carbono. Los círculos en blanco corresponden a los átomos ^{12}C , representado también con el número 0 y los círculos en negro los de ^{13}C , también representado con el número 1. **a)** espectro de ^1H -RMN: los picos singletes formados por los átomos de ^{12}C y picos dobletes corresponden a los átomos de ^{13}C para cada posición del átomo de carbono en separado; **b)** espectro de ^{13}C RMN: compuesto de pico singlete (S), doblete izquierdo (D-), doblete derecho (D+) y doblete de doblete (DD); **c)** espectro de masa (MS): picos de masa de los isotopómeros idealizados sin los efectos de masa de los isótopos de O, H, N.

Referencia: Wiechert *et al.*, 2001.

V.1.3.1 Experimentos con marcaje isotópico de carbono

El análisis del metabolismo celular a través de experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C , también llamado experimentos de marcaje (Carbon-Labeling Experiments, CLE) es una técnica relativamente reciente que fue empleada primeramente por Malloy *et al.* en 1988, quienes investigaron la actividad del ciclo de los TCA en el corazón de rata mediante el análisis isotopomérico de ^{13}C por RMN (Wiechert, 2001).

La metodología empleada consiste básicamente en utilizar uno o más substratos marcados con ^{13}C en una o en diversas posiciones del esqueleto que compone la molécula del substrato, resultando en una mezcla isotopomérica definida. La composición inicial es de gran importancia para

la determinación final de los metabolitos intermediarios o productos extracelulares. El substrato usado en estos experimentos presenta en su composición átomos de ^{13}C marcado en una cierta posición, como por ejemplo glucosa 100% marcada en el carbono 1 ($[1-^{13}\text{C}]$ glucosa) o glucosa 100% uniformemente marcada ($[U-^{13}\text{C}_6]$ glucosa) (Stephanopoulos *et al.*, 1998; Dauner *et al.*, 2001).

Típicamente, la identificación, distribución y cuantificación de los átomos de ^{13}C en los distintos metabolitos celulares son realizados cuando el cultivo celular se encuentra en un estado fisiológico bien definido, normalmente en el estado estacionario de un cultivo operado en continuo o pseudoestacionario en la fase exponencial de un cultivo discontinuo (Wiechert, 2001). Cabe destacar también que se están desarrollando nuevas metodologías para el análisis de flujos metabólicos en estados no estacionarios (Wiechert & Nöh, 2005; Nöh *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2006, todos citados en Sauer, 2006)

La distribución de los átomos de ^{13}C a través de las vías metabólicas depende de su grado de enriquecimiento y posición en el substrato. Al iniciar la alimentación de unas células en estado metabólico estacionario con un substrato marcado isotópicamente, la distribución de estos átomos en los metabolitos celulares se encuentra en el estado transitorio o isotópicamente no estacionario; a lo largo del cultivo, los átomos de ^{13}C son incorporados al *pool* que compone los metabolitos intracelulares hasta que esta composición sea finalmente equilibrada alcanzando el estado isotópicamente estacionario; sin embargo el sistema siempre se mantiene metabólicamente estacionario (Wiechert & de Graaf, 1996).

La introducción de las moléculas marcadas con ^{13}C en una red metabólica produce metabolitos marcados con carbono ^{13}C de manera aleatoria (no hay selectividad biológica de ^{13}C vs ^{12}C). La determinación del grado de enriquecimiento de cada átomo y la elucidación de las abundancias relativas de cada isotópómeros en el *pool* de metabolitos pueden ser cuantificadas por diversas metodologías analíticas, normalmente a través de técnicas de RMN, CG-MS y más recientemente, LC-MS (Szyperski, 1995; Szyperski, 1998; Christensen & Nielsen, 1999; Gombert *et al.*, 2001; Fischer

& Sauer, 2003; Kapla *et al.*, 2003; van Winden *et al.*, 2005; Nöh *et al.*, 2006; Kleijn *et al.*, 2007).

Marx *et al.* (1995) desarrollaron una metodología que se basa en el enriquecimiento específico de la posición de los átomos de carbono y posterior análisis por RMN; Szyperski, (1995) obtuvo la composición isotopomérica de los aminoácidos proteínogénicos analizando la distribución de los enlaces de carbono-carbono intactos entre átomos de ^{13}C en sus esqueletos, provenientes del substrato suministrado a las células a través de su red de reacciones metabólicas; de esta manera, pudieron inferir los patrones de marcaje de los ocho intermediarios clave del metabolismo central del carbono a partir de los cuales se sintetizan dichos aminoácidos, ya que los esqueletos de carbono están conservados entre los correspondientes aminoácidos y metabolitos. De manera análoga, Christensen & Nielsen (1999) también obtuvieron la composición isotopomérica de los intermediarios metabólicos del metabolismo central del carbono a través del análisis por CG-MS de los fragmentos de aminoácidos y carbohidratos sintetizados a partir de dichos intermediarios.

Así pues, las metodologías desarrolladas por Szyperski (1995) y Christensen & Nielsen (1999) se basan en la cuantificación indirecta de los patrones de marcaje de metabolitos intracelulares a través del análisis de los esqueletos de carbono de los aminoácidos que tiene sus orígenes en los metabolitos que proviene de las vías metabólicas centrales (EMP, ciclo de los TCA y ruta de las PP). Según estos autores, conociendo los padrones de marcaje en los átomos de carbono de los aminoácidos proteínogénicos (obtenidos a partir de la hidrólisis de las proteínas celulares), es posible deducir el padrón de marcaje en los respectivos metabolitos precursores. La ventaja de analizar los átomos marcados en los aminoácidos es que éstos se hallan en gran proporción en la biomasa (la proteína celular de una levadura constituye aproximadamente un 40% de su peso seco), mientras que los metabolitos precursores se encuentran en cantidades muy pequeñas.

La metodología desarrollada por Szyperski (Szyperski, 1995, Szyperski *et al.*, 1996), tiene como objetivo cuantificar el grado de participación de diversas rutas metabólicas convergentes en la síntesis de

metabolitos precursores de la biosíntesis de los aminoácidos proteínogénicos. Esta metodología, que fue inicialmente desarrollada y aplicada a un cultivo con la bacteria *E. coli* creciendo en glucosa como fuente de carbono consiste en recoger una pequeña cantidad de células del cultivo y someterlas a una hidrólisis ácida; de esta manera se obtiene la mezcla de aminoácidos de las proteínas celulares. La muestra obtenida es liofilizada y resuspendida en agua deuterada, y la solución resultante es finalmente analizada por RMN mediante técnicas de correlación (2D) [^{13}C , ^1H]-COSY. La estimación de los cocientes de flujos metabólicos en las rutas que dan lugar a los precursores biosintéticos de cada aminoácido pueden ser obtenidos a partir de las intensidades de los picos observados en el espectro; a través de ecuaciones probabilísticas es posible obtener las fracciones isotopoméricas de cada aminoácido y formular una ecuación que correlaciona la fracción de aminoácido con su metabolito precursor. La metodología propuesta por Szyperski presenta algunos inconvenientes como el tiempo relativamente largo necesario para la obtención de la banda correspondiente a la región alifática y la otra banda correspondiente a la región aromática del espectro, así como el acumulo de espectros bidimensionales de la mezcla de aminoácidos durante un largo periodo de tiempo (a menudo un fin de semana entero), razón por la cual es necesario aumentar la relación señal/ruido para las señales más débiles (por ejemplo los aminoácidos menos abundantes) y utilizar espectrómetros de elevado campo (600 MHz o más para ^1H) (Solà, 2004). Según Wiechert (2001), la utilización de la RMN también conlleva en algunos inconvenientes, principalmente a lo referente a la interpretación de todos los picos que componen el espectro; en algunos casos es necesario el auxilio de un especialista; además, la descomposición enmarañada de picos singletes, dobletes y tripletes en un espectro y la cuantificación de sus áreas necesita en muchas ocasiones la adaptación de un software que no siempre está disponible (por ejemplo, el programa FCAL, (Szyperski *et al.*, 1999)).

Otro método que fue desarrollado por Christensen & Nielsen (Christensen & Nielsen, 1999) y modificado por Dauner & Sauer (Dauner & Sauer, 2000) consiste en analizar los diferentes aminoácidos proteínogénicos

por CG-MS. La biomasa obtenida al final del cultivo con marcaje isotópico es sometida a hidrólisis ácida, la mezcla resultante es secada y derivatizada separadamente por dos reactivos: cloroformiato de etilo (ECF) y dimetilacetal-(N,N)-dimetilformamida (DMFDMA) (método de Christensen & Nielsen, 1999) o (N)-t-butildimetilsilil-(N)-metil-trifluoroacetamida (MTBSTFA) (método de Dauner & Sauer, 2000). Finalmente las muestras derivatizadas son analizadas por CG-MS. El espectro de masa obtenido corresponde a las intensidades de los isotopómeros de masa de un único fragmento de aminoácido. Las intensidades son corregidas en función del marcaje natural de los átomos agregados a los fragmentos debido al proceso de derivatización y a través de ecuaciones matemáticas utilizando las intensidades corregidas del isotopómero de masa que contiene n átomos de carbono marcado es posible obtener la marcación de cada fragmento del aminoácido. Según Gombert (2001), obteniendo los datos de marcaje y utilizando una rutina numérica es posible calcular flujos metabólicos del metabolismo central. Según este autor, esta metodología presenta algunos inconvenientes debido a la derivatización, pues no todos los aminoácidos pueden ser analizados; por ejemplo, los aminoácidos cisteína y triptofano son oxidados y otros como asparagina y glutamina, pierden radicales amina y son convertidos a aspartato y glutamato, respectivamente. Dauner & Sauer (2000) observaron que dependiendo del isotopómero y del tiempo de retención en la columna del cromatógrafo puede resultar en una sobrecarga del detector del MS. Otra observación reportada por Fernandez & Rosiers en 1996 sobre problemas en espectrometría de masas, y observada por Wiechert (Wiechert, 2001), se refiere a que la abundancia natural de otros átomos puede interferir en el espectro de masa del isotopómero; por ejemplo, el silicio (^{28}Si) es uno de los átomos que está presente en uno de los agentes derivatizantes, la abundancia del ^{29}Si es de 4,70% y del ^{30}Si es de 3,09%, pudiéndose presentar interferencia en el espectro de masa. Una alternativa citada en Wiechert (Wiechert, 2001) y Nöh (Nöh *et al.*, 2006) es la utilización de la espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC-MS) o en tándem (LC-MS/MS), estas metodologías presentan como principal ventaja la no derivatización de los aminoácidos.

Según Wiechert & de Graaf (1996), cuando no disponemos de datos derivados de experimentos de marcaje isotópico, los flujos de carbono extracelulares medidos pueden ser insuficientes para la determinación de todos los flujos intracelulares desconocidos de una red metabólica a través de ecuaciones de balance estequiométrico (particularmente, en vías metabólicas paralelas, ciclos,...). Así, para este tipo de análisis es necesario formular hipótesis adicionales o considerar/incluir otro tipo de balances. Por ejemplo, Vallino (1991) citado en Wiechert & de Graaf (1996), considera que determinadas reacciones de la red metabólica (la enzima málica en su caso), permanece inactiva bajo un estado fisiológico determinado; otros trabajos como los de Roels (1983) y Jørgensen (1995), también citado en Wiechert & de Graaf (1996), consideran en sus redes el metabolismo energético (es decir, el balance de ATP, NADH o NADPH). Usualmente, la producción de ATP a través del NADH es asumido como una etapa de reacción estequiométricamente conocida. No obstante, la fosforilación oxidativa no está basada en un mecanismo con estequiometría fijada y solamente en algunos casos son conocidas la eficiencia termodinámica *in vivo*. Además, hay la posibilidad de existencia de ciclos fútiles introducidos a través del balance de los cofactores NADH, NADPH y ATP (Wiechert & de Graaf, 1996).

Una alternativa, desarrollada por el grupo de U. Sauer del Instituto ETH Zürich (Suiza) substituye las restricciones del balance energético/redox por restricciones derivadas de experimentos de marcaje isotópico, concretamente de datos de cocientes de flujos metabólicos (Fischer *et al.*, 2004; Fredlund *et al.*, 2004). Esta metodología se ha aplicado en este estudio al análisis de flujos metabólicos de *P. pastoris*, tal y como se describe a continuación.

V.2 Análisis de flujos metabólicos con restricciones de ^{13}C -RMN

En este apartado serán discutidos la metodología y el análisis de flujos metabólicos utilizando restricciones derivadas de datos de cocientes de flujos metabólicos basados en experimentos de marcaje con ^{13}C combinados con técnicas de RMN, obtenidos en su mayor parte por A. Solà (Solà, 2004).

V.2.1 Modificaciones en la red metabólica

El uso de técnicas de marcaje isotópico con ^{13}C combinadas con RMN para el análisis *in vivo* del metabolismo celular permite la obtención de flujos metabólicos o cocientes de flujos metabólicos sin necesidad de conocer la estequiometría de todas las reacciones en las que intervienen los cofactores NADH, NADPH y ATP (Szyperski 1998, Wiechert, 2003).

Así pues, el uso de estas técnicas experimentales permite, a priori, el análisis de flujos metabólicos en sistemas donde se conocen poco o nada los requerimientos estequiométricos de su metabolismo redox (Fischer *et al.*, 2004; Gombert *et al.*, 2001; Wiechert, 2003). Por otro lado, la incorporación de restricciones matemáticas derivadas del análisis experimental de cocientes de flujos metabólicos en el análisis de flujos metabólico clásico tiene como otra ventaja de disminuir el número de soluciones numéricas encontrada, pues se adicionan ecuaciones provenientes de los datos de ^{13}C , aumentando el número de restricciones al sistema numérico (Fischer *et al.*, 2004).

En este estudio, se introdujeron las siguientes modificaciones en la red metabólica de *P. pastoris* definida en el Capítulo IV (apartado IV.2): *i*) eliminación de los cofactores NAD(P)H en las todas aquellas ecuaciones de la red donde intervenían; además, se eliminaron alguna de éstas ecuaciones, concretamente: la ecuación *tcc3b*, pues esta reacción sin NADPH es igual la ecuación *tcc3a*, y la ecuación referente a fosforilación oxidativa, que fue substituida por una de consumo de oxígeno con la finalidad de ajustar el balance estequiométrico de oxígeno del metabolismo celular; *ii*) la ecuación de transporte de oxaloacetato a través de la membrana mitocondrial fue

reformulada en dos ecuaciones, cada una de ellas correspondientes a una de las dos direcciones de transporte: una de entrada de OAA para el interior de la mitocondria y otra de salida de éste metabolito para el citoplasma. El objetivo de introducir estas dos ecuaciones de manera independiente y no en forma de una ecuación única bidireccional fue adecuar la estequiometría del transporte de OAA a los datos experimentales disponibles, ya que las técnicas de marcaje isotópico y RMN utilizadas por A. Solà (Solà, 2004) permiten determinar de manera independiente la salida y entrada de OAA a la mitocondria (Maaheimo *et al.*, 2001). La Figura V.5 ilustra a red metabólica modificada, la estequiometría de reacciones implicadas en cada vía metabólica se encuentran descritas en sección de anexos, apartado A.II.2.

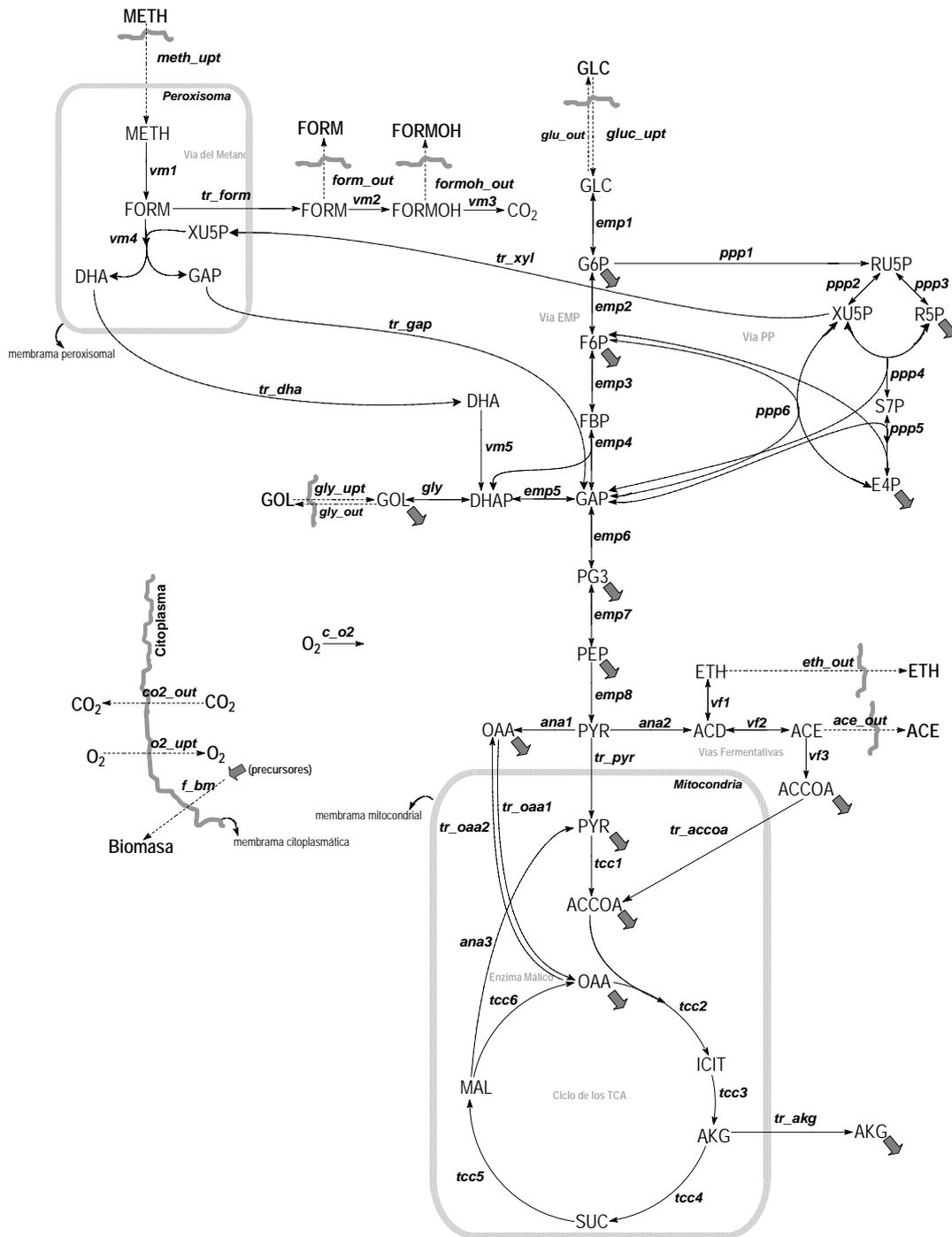


Figura V.5 Red metabólica modificada utilizada en los cálculos de flujos de metabólicos con restricciones matemáticas provenientes (o derivadas) del análisis por ¹³C-RMN.

Las flechas en gris representan los metabolitos precursores para la síntesis de biomasa.

V.2.2 Metodología de cálculo

Como se ha mencionado anteriormente, las ecuaciones que describen numéricamente la fracción de un determinado metabolito que proviene de cada uno de sus posibles precursores, o su contribución a una u otra vía bioquímica (repartimiento de las rutas metabólicas en cada bifurcación) fue obtenida de acuerdo con los trabajos de Fischer *et al.* (2004) y Fredlund *et al.* (2004).

La Tabla V.4 presenta las ecuaciones formuladas de acuerdo con la red metabólica descrita en el apartado V.2.1.

Tabla V.4 Ecuaciones de contribución de un determinado metabolito a una determinada vía bioquímica.

Vía y metabolitos	Ecuación
Contribución de la ruta de las pentosas fosfato al catabolismo de la glucosa: PEP generado a través de al menos una de las reacciones transcetolasa de las pentosas*	$\alpha \geq \frac{ppp4 + 2(ppp5) + 3(ppp6)}{2(emp4) + ppp4 + ppp6}$
Fracción de OAAcyt que proviene de PYRcyt	$b = \frac{ana1}{ana1 + tr_oaa2}$
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (enzima málico) (limite superior y inferior)	$c \geq \frac{ana3}{ana3 + tr_pyr}$ $d \leq \frac{ana3}{ana3 + tr_pyr}$
Fracción de OAAmit que proviene de OAAcyt (anaplerosis)	$e = \frac{tr_oaa1}{tr_oaa1 + tcc6}$

* según Fischer *et al.* (2004) y Fredlund *et al.* (2004).

La metodología de cálculo utilizada fue la misma descrita por Fischer *et al.* (2004).

Según estos autores para calcular los flujos metabólicos (r) es necesaria la resolución de la Ecuación V.1.

$$Nv - b = R_{mb} \quad (V.1)$$

donde N es la matriz estequiométrica; v es el vector que contiene los flujos metabólicos r , b es el vector de flujos medidos y R_{mb} es el vector de los residuos que proviene del balance de masa.

Las ecuaciones descritas en la Tabla V.3 fueron rescritas como:

$$ppp4 + 2(ppp5) + 3(ppp6) - a[2(emp4) + ppp4 + ppp6] = R_a \quad (V.2)$$

$$ana1 - b(ana1 + tr_oaa2) = R_b \quad (V.3)$$

$$ana3 + c(ana3 + tr_pyr) = R_c \quad (V.4)$$

$$-ana3 + c(ana3 + tr_pyr) = R_d \quad (V.5)$$

$$tr_oaa1 - e(tr_oaa2 + tcc6) = R_e \quad (V.6)$$

La suma de los pesos de los cuadrados de los residuos que proviene de las restricciones a través de los balances de metabolitos y los flujos medios fueron minimizados usando el software Matlab y su función *fmincon*, en la cual generó una distribución aleatoria de flujos. El peso de los residuos fue obtenido a través de la división de los residuos con las variancias experimentales (σ^2). Para cada metabolito usado como precursor de la síntesis de biomasa fue asumido un error de 5%. Para las restricciones de los flujos medios b y e y de las reacciones límites a y c , descritos en la Tabla V.4, la propagación del error fue minimizado a través de la Ecuación V.7.

$$\min_v = \sum \frac{R_{mb}^2}{\sigma_{mb}^2} + \frac{R_b^2}{\sigma_b^2 \left(\frac{\partial R_b}{\partial b}\right)^2} + \frac{R_e^2}{\sigma_e^2 \left(\frac{\partial R_e}{\partial e}\right)^2} + \frac{\left(\frac{R_a + |R_a|}{2}\right)^2}{\sigma_a^2 \left(\frac{\partial R_a}{\partial a}\right)^2} + \frac{\left(\frac{R_c + |R_c|}{2}\right)^2}{\sigma_c^2 \left(\frac{\partial R_c}{\partial c}\right)^2} \quad (V.7)$$

Para los cocientes de flujos a y c que fueron implementados como restricciones límite, solo se consideraron en la función objetivo los errores residuales de las desviaciones positivas de los valores experimentales, las reacciones irreversibles descritas en la sección de anexos (apartado A.II.2), fueron restringidas a valores positivos. La matriz Jacobiana obtenida para cada función fue calculada para estimar la sensibilidad de cada flujo con relación a los errores de medida; los intervalos de confianza también fueron calculados para cada flujo metabólico.

La solución única de cada flujo fue estimada a través del promedio de las doce soluciones independientes con un criterio de error igual al que fue obtenido a través de los puntos de partida aleatorios (para más detalles ver la sección de rutinas, apartado R.4).

La desviación estándar de los flujos metabólicos calculados se calcularon mediante la metodología FIM, tal y como se describe en el Capítulo IV (apartado IV.1.1.4.1).

V.2.3 Análisis de flujos metabólicos

Los flujos metabólicos fueron calculados con base a los datos obtenidos experimentalmente a través del análisis de cocientes de flujos metabólicos (**Metabolic Flux Ratio analysis**, METAFoR analysis) y utilizando el programa FCAL (Solà *et al.*, 2004 y Solà *et al.*, 2007) y presentados en la Tabla V.5; la distribución de flujos fue calculada a través de la metodología descrita anteriormente.

Tabla V.5 Orígenes de los metabolitos intermediarios de la levadura *P. pastoris* en cultivos operadas en quimiostato y crecidas en glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ y glicerol y mezclas de glicerol/metanol a $\mu = 0,05$ y $0,16 \text{ h}^{-1}$.

Cultivo	100% Glucosa (0,16 h ⁻¹)	100% Glicerol (0,05 h ⁻¹)	80% Glicerol 20% Metanol (0,05h ⁻¹)	60% Glicerol 40% Metanol (0,05h ⁻¹)	40% Glicerol 60% Metanol (0,05h ⁻¹)	100% Glicerol (0,16 h ⁻¹)	60% Glicerol 40% Metanol (0,16h ⁻¹)	40% Glicerol 60% Metanol (0,16h ⁻¹)
<i>Metabolito</i>	Fracción del <i>pool</i> total (media \pm desviación estándar)*							
Contribución de la ruta de las pentosas fosfato al catabolismo de la glucosa: PEP generado a través de al menos una de las reacciones transcetolasa de las pentosas.	41 \pm 9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fracción de OAAcyt que proviene de PYRcyt.	63 \pm 4	32 \pm 2	37 \pm 4	35 \pm 2	33 \pm 3	68 \pm 2	78 \pm 2	76 \pm 3
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (enzima málico) (límite superior).	4 \pm 2	2 \pm 2	1 \pm 8	5 \pm 11	6 \pm 13	2 \pm 1	0 \pm 6	0 \pm 0
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (enzima málico) (límite inferior).	n.d.	n.d.	0 \pm 2	1 \pm 3	1 \pm 2	n.d.	0 \pm 2	0 \pm 0
Fracción de OAAmit que proviene de OAAcyt (anaplerosis).	38 \pm 2	33 \pm 2	32 \pm 3	36 \pm 3	29 \pm 4	48 \pm 4	42 \pm 2	43 \pm 2

*Datos presentados en porcentaje.

n.d. no determinado

V.2.3.1 Análisis de flujos metabólicos en cultivos operados con glucosa

El análisis de flujos metabólicos para el cultivo de *P. pastoris* crecida en glucosa como fuente de carbono a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ se utilizó como caso control o de referencia, con el objetivo de verificar la coherencia de los resultados obtenidos, y compararlos con los obtenidos mediante MFA clásico; concretamente, se deseaba comprobar si el balance de los cofactores (NADH y NADPH) utilizados como restricción en los cálculos de MFA clásico fueron válidos.

La distribución de los flujos metabólicos para el cultivo operado con glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ se presenta en la Figura V.6 y en la sección de anexos, apartado A.III.2. Los resultados obtenidos fueron muy semejantes a los calculados a través de la metodología del MFA presentados y discutidos en el Capítulo IV.

Utilizando la misma metodología descrita por Oura (1983) y Bruinenberg *et al.* (1983) para estimar el flujo de G6P que entra en la vía de las pentosas y que está descrito en el Capítulo IV (apartado IV.3.2.1), el flujo neto de G6P convertido a RU5P debe estar entre 37,4 y 41,9 mmol por 100 mmol de glucosa cuando se restringe el flujo a través de la PPP mediante el balance de NADPH. El flujo obtenido a través de los cálculos con restricciones de ^{13}C fue de 36% mmol por 100 mmol de glucosa ($0,54 \pm 0,10 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$) estando dentro de los límites teóricos.

En cuanto a los flujos de transporte de metabolitos a través de la membrana mitocondrial, el análisis de flujos metabólicos con restricciones derivadas de ^{13}C -RMN reveló que el flujo de entrada de OAA para el interior de la mitocondria es mayor que el su flujo de salida hacia el citoplasma; el flujo neto (entrada – salida) fue de un 17% ($0,26 \pm 0,045 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$), inferior al flujo neto estimado mediante la metodología de MFA clásica, (24% [$0,36 \pm 0,02 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$]). Además, una fracción significativa de ACCOA citoplasmático (17%) es transportada para el interior de la mitocondria, lo que contrasta con el valor obtenido en los cálculos hechos con la metodología del MFA, que fue de un 3% ($0,04 \pm 0,10 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$). No obstante, el error obtenido para este cálculo fueron relativamente grandes

con ambas metodologías: si consideremos el margen error, los flujos calculados están dentro del mismo rango de valores, es decir podríamos considerar que el valor del flujo obtenido en las dos metodologías son estadísticamente iguales (cabe recordar que la metodología METAFoR no permite cuantificar la entrada directa de piruvato al ciclo de los TCA vs su entrada vía ACCOA). Al igual que ocurría con el análisis de flujos metabólicos clásico, una pequeña fracción de malato es convertida a piruvato, es decir el enzima málico esta activa aunque en niveles muy bajos.

Los flujos metabólicos en el ciclo del TCA presentaron valores esencialmente iguales a los obtenidos con la metodología del MFA clásico; sin embargo, el error asociado a los cálculos de los flujos metabólicos en la metodología clásica fueron menores que utilizando la metodología descrita en este capítulo; igualmente, los cálculos de flujos para la vía de las pentosas fueron análogos a los obtenidos mediante MFA clásico, destacando además que el uso de restricciones derivadas de datos de ^{13}C -RMN resultó en unos errores asociados reducidos para esta vía.

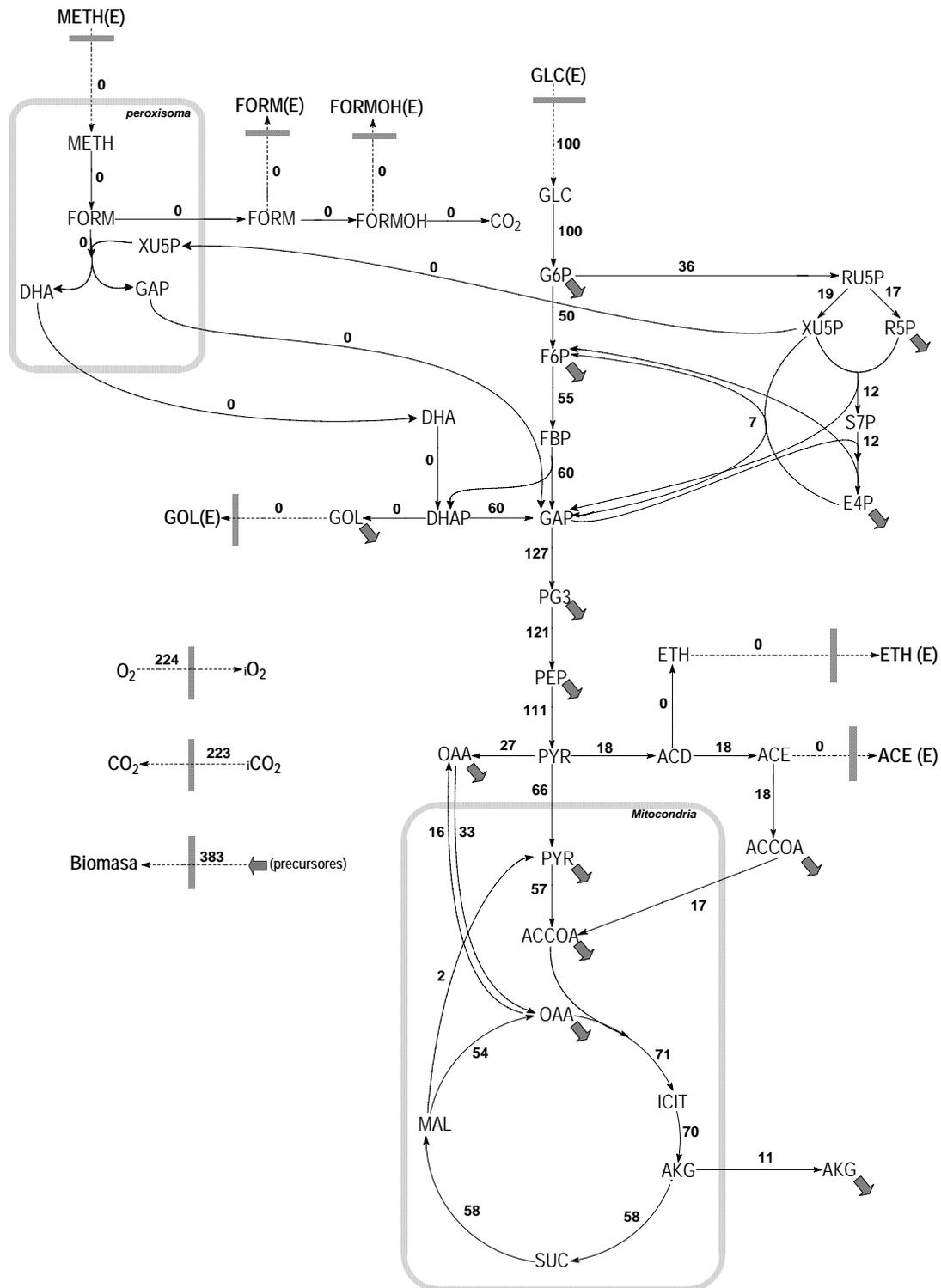


Figura V.6 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glucosa en cultivo operado en quimiostato a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$. Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

Globalmente, podemos concluir que las consideraciones asumidas para el análisis de flujos metabólico clásico en cuanto al balance de NAD(P)H son esencialmente correctas, al menos para células creciendo aeróbicamente sobre glucosa.

V.2.3.2 Análisis de flujos metabólicos en células de *P. pastoris* creciendo sobre glicerol o mezclas de glicerol/metanol

En este apartado se describe el análisis de la distribución de flujos metabólicos en células de *P. pastoris* creciendo sobre glicerol o mezclas de glicerol/metanol en cultivos operados en continuo a dos velocidades de crecimiento distintas, alta y baja.

V.2.3.2.1 Análisis de flujos metabólicos en cultivos operados con glicerol y mezclas de glicerol/metanol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$

La distribución de los flujos metabólicos en el cultivo de glicerol a baja velocidad de crecimiento se presenta en la Figura V.7 y en la sección de anexos, apartado A.III.2. Se observa que la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (PPP) presenta poca actividad ($0 \pm 0,10 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$), es decir la fracción de G6P que es convertida a RU5P es mínima o incluso nula, y hay poca o nula formación de NADPH. Ello implica que el NADPH requerido para la síntesis de biomasa debe obtenerse de otras reacciones. Los flujos calculados a través de la vía de las PP mediante la metodología clásica (restringido por el balance redox) estiman que el flujo de G6P que es convertido en RU5P (ver Capítulo IV, apartado IV.3.2.1), debe estar entre 19,1 y 21,4 mmol por 100 mmol de glicerol. Por otro lado, cuando se comparan la distribución de flujos a través de la rama no oxidativa de la ruta de las pentosas se observan diferencias no solo en los valores absolutos como también en la direccionalidad de algunas reacciones. Por ejemplo, se obtiene una pequeña fracción de XU5P y E4P (intermediarios requeridos para la síntesis de biomasa) a través de la reacción entre F6P y GAP (el flujo de ésta reacción es negativo, pues la reacción se da de forma reversa a la formulada en el modelo estequiométrico). Esta distribución de flujos en la vía de las PP contrasta con los cálculos realizados con la metodología del MFA clásico, mediante la cual se determina que hay una contribución de intermediarios de la vía de las PP a la glicólisis (es decir, se generan los productos F6P y GAP a partir de XU5P y E4P). Curiosamente, Kleijn *et al.*

(2007) observaran el mismo fenómeno (cambio de direccionalidades) cuando compararan distintas metodologías.

Otra observación relevante en el análisis de flujos metabólicos en el cultivo con glicerol fue los flujos metabólicos obtenidos para la gluconeogénesis de GAP a G6P, donde los valores obtenidos fueron relativamente más bajos, comparados con los obtenidos por MFA clásico.

En el cálculo de los flujos metabólicos a través de la bifurcación del piruvato citosólico, donde hemos introducido las restricciones matemáticas correspondientes a los cocientes de flujos metabólicos experimentalmente determinados, se observa que el transporte oxaloacetato es mayoritariamente de entrada del citoplasma para la mitocondria, por otro lado, una fracción significativa de piruvato citosólico es convertido a ACCOA (generando NADPH), que a su vez es transportado del citoplasma para la mitocondria, lo que contrasta también con los cálculos realizados por MFA, donde el NADPH es sintetizado mayoritariamente en la rama oxidativa de la vía de las PP.

Una posible explicación para estas diferencias observadas entre los flujos calculados mediante las dos metodologías investigadas, se debe al hecho que en los cálculos hechos con las restricciones por ^{13}C -RMN para células creciendo en glicerol solo disponemos de datos experimentales sobre cocientes de flujos para la bifurcación correspondiente al nodo del piruvato y el ciclo de los TCA, por lo que el cálculo de flujos a través de la vía de las pentosas fosfato y la glucólisis/gluconeogénesis no se encuentran restringidas matemáticamente, lo que puede resultar en varias soluciones numéricas, las cuales muchas veces no son coherentes con las observaciones del metabolismo en estudio. Otra posible explicación es que el balance redox considerado para células creciendo sobre glicerol es incorrecto.

Experimentos de marcaje isotópico realizados por Zhang *et al.* (2003) con la levadura *S. cerevisiae* creciendo en glicerol en cultivos operados en continuo a una velocidad de crecimiento de $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$, demostraron que la vía de las pentosas fosfato es el principal generador de NADPH; aunque la reacción de oxidación del isocitrato a α -cetoglutarato en el ciclo de los TCA

sea catalizada por la enzima isocitrato dehidrogenasa es dependiente de NADP, esta genera solamente 1 mol de NADPH y el flujo del enzima málico es muy bajo. En nuestro caso los cálculos realizados sugieren que tanto el flujo a través de la vía de las PP presenta baja actividad y que prácticamente todo el NADPH es generado en el ciclo de los TCA, a través de la reacción del isocitrato a α -cetoglutarato (ya que el enzima málico está activo a un nivel muy bajo) y también a través del *piruvato by-pass*.

En los cultivos operados con mezclas de substratos (glicerol y metanol) (Figura V.7) la distribución de flujos en la vía de las pentosas también contrasta con los resultados obtenidos mediante los cálculos hechos con MFA: a pesar de que en todos los casos se observa un flujo de pentosas a modo de ciclo para la asimilación del formaldehído proveniente de la oxidación del metanol, sólo las células del cultivo operado con 80% glicerol y 20% de metanol parecen tener una actividad de la rama oxidativa de las pentosas fosfato (PPP) significativa; en este caso la mayor parte del RU5P generada a partir de G6P es convertida a XU5P, la cual es transportada al peroxisoma. Por el contrario, en los cultivos operados con 60% glicerol y 40% de metanol y 40% glicerol y 60% de metanol, la PPP funciona opuesta: la síntesis de pentosas tiene lugar mediante la rama no oxidativa de la PPP, no a partir de G6P, pues el flujo de la rama oxidativa en estos dos casos es prácticamente nulo. También se observa que, cuanto mayor es la fracción de metanol en el medio de alimentación, los flujos en rama no oxidativa de la vía de las pentosas son más negativos, indicando un modo funcionando inverso al clásicamente descrito para el metabolismo de la glucosa. Es interesante destacar que para el caso de las células creciendo sobre la mezcla 80% glicerol y 20% metanol, el mayor flujo a través de la rama oxidativa de la vía de las PP (donde se genera NADPH) en relación a los valores correspondientes en los otras condiciones de cultivos, va acompañado de un menor flujo relativo en otra reacción generadora de NADPH, la formación de acetaldehído a partir de piruvato. También cabe destacar que el error asociado al cálculo de flujos metabólicos utilizando esta metodología, presentado en la Figura V.8(a), demostró que el cálculo de flujos en esta vía está condicionado a altas desviaciones estándar,

principalmente en la reacción *ppp6*, donde hay la formación de GAP; se observó que el error fue mayor en los cultivos operados con mezclas de sustratos.

La asimilación de metanol por la célula produce un flujo significativo de formaldehído que es oxidado directamente a CO₂ (ruta disimilatoria del metanol). No obstante, la fracción de formaldehído que se oxida directamente a CO₂ parece variar mucho según la fracción de metanol en el medio de alimentación: En las células del cultivo operado con 80% glicerol y 20% de metanol, aproximadamente un 80% del metanol inicial es oxidado directamente a CO₂. Por el contrario, en los otros cultivos, la fracción de formaldehído que es oxidado directamente a CO₂ es claramente más baja (del orden del 20 %). Así pues, el glicerol y metanol parecen tener distintas funciones en el metabolismo energético y del carbono durante su utilización simultánea, es decir, contribuyen al metabolismo energético celular de distinta manera según condiciones de cultivo. En el caso del cultivo operado con 80% glicerol y 20% metanol la distribución de flujos en las rutas disimilatoria y asimilatoria de metanol sugiere que el metanol podría jugar un papel de sustrato auxiliar de la asimilación de glicerol, es decir, que la energía derivada de su disimilación se usaría en parte para la incorporación de carbono del glicerol, resultando en una mayor eficiencia de conversión del carbono para este sustrato; no obstante, los rendimientos sustrato/biomasa obtenidos experimentalmente (ver Capítulo III) no son suficientemente claros para poder afirmar o refutar esta hipótesis. La función del metanol como sustrato auxiliar se ha descrito para ciertas condiciones de cultivo mixto glucosa/metanol de la levadura metilotrófica *H. polymorpha* (Müller *et al.*, 1985, Babel *et al.*, 1993). Así mismo, tal y como los estudios de marcaje isotópico de Solà *et al.* (2007) indican, se descarta que en condiciones de utilización simultánea de estos dos sustratos, el metanol sea un sustrato a partir del cual se genere únicamente energía (NADH) y CO₂ a través de su ruta disimilatoria, sino que también es asimilado y contribuye al metabolismo del carbono; esto se refleja en el flujo creciente de formaldehído a GAP y DHA al aumentar la fracción de metanol en el medio de alimentación.

Los flujos metabólicos a través de la bifurcación del piruvato citosólico, donde tenemos las restricciones matemáticas, se observa que el transporte oxaloacetato es mayoritariamente bidireccional, con flujos netos de entrada al interior de la mitocondria muy pequeños o prácticamente nulo en todas las condiciones de cultivo. Se obtuvieron resultados análogos a los obtenidos con la metodología utilizada en el Capítulo IV, mediante la cual se estimó un pequeño flujo neto de entrada de OAA citoplasmático a la mitocondria; sin embargo, utilizando la metodología de MFA con restricciones derivadas del análisis METAFoR para el cultivo operado con 40% glicerol y 60% metanol, el flujo neto (entrada - salida) fue de 1% ($0,03 \pm 0,02 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$) lo que contrasta con los cálculos correspondientes realizados por MFA, donde ocurre un flujo neto de entrada de OAA a la mitocondria claramente superior (13% o $0,28 \pm 0,00 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$). Por el contrario, la ruta de entrada de piruvato a la mitocondria a través del *bypass* de síntesis de ACCOA citosólico y su transporte a la mitocondria son significativamente mayores a los calculados mediante MFA. El enzima málico no presentó actividad significativa en ninguna de las condiciones de cultivo. Globalmente, se observa que la distribución de flujos de entrada de piruvato citosólico a la mitocondria y ciclo de los TCA a través de las 3 rutas posibles (entrada de OAA generado a partir de piruvato citosólico mediante la pívuvato decarboxilasa, transporte directo de piruvato, o indirecto a través la entrada de ACCOA formado a partir de piruvato citosólico – es decir, el llamado *pyruvate bypass*, Flores *et al.* 2000) varía según la metodología de cálculo de flujos empleada. Cabe destacar que los errores obtenidos en el cálculo de flujos metabólicos en el ciclo de los TCA (Figura V.8(b)) fueron mayores para la reacción correspondiente a la formación de ACCOA a partir de PYR (reacción *tcc1*); ello puede ser consecuencia del hecho que el protocolo de los experimentos de marcaje isotópico realizados por Solà *et al.* (2004 y 2007) no permite distinguir entre el piruvato mitocondrial directamente importado del citoplasma del que entra al ciclo de los TCA vía *bypass* del piruvato, reflejándose significativamente en el error de cálculo de flujos del piruvato a través de la membrana mitocondrial.

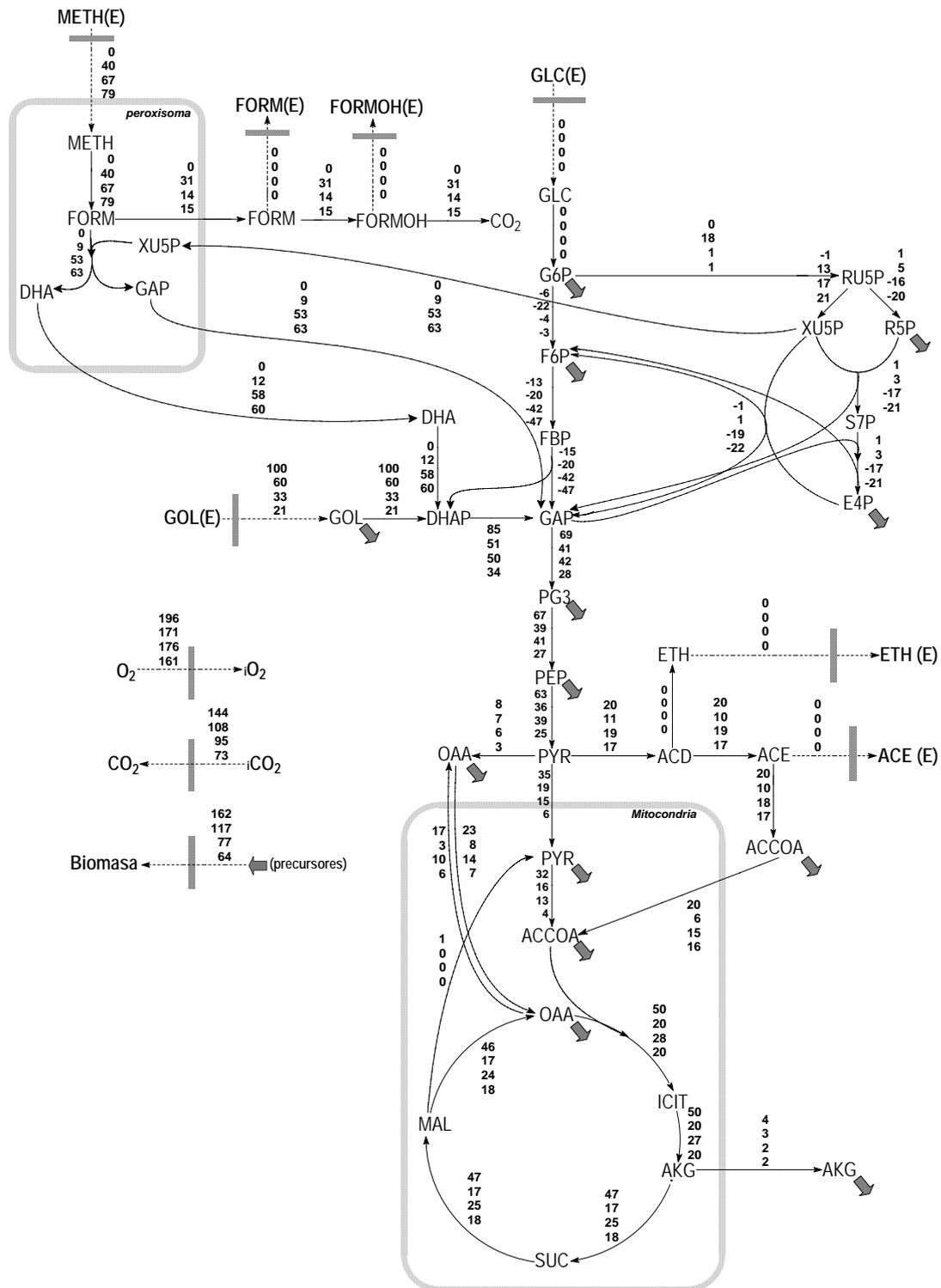


Figura V.7 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol y mezclas de glicerol:metanol en cultivos operados en quimiostato a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Los valores están en orden decreciente de concentración de glicerol, es decir glicerol:metanol (100:0); glicerol:metanol (80:20); glicerol:metanol (60:40) y glicerol:metanol (40:60).

Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

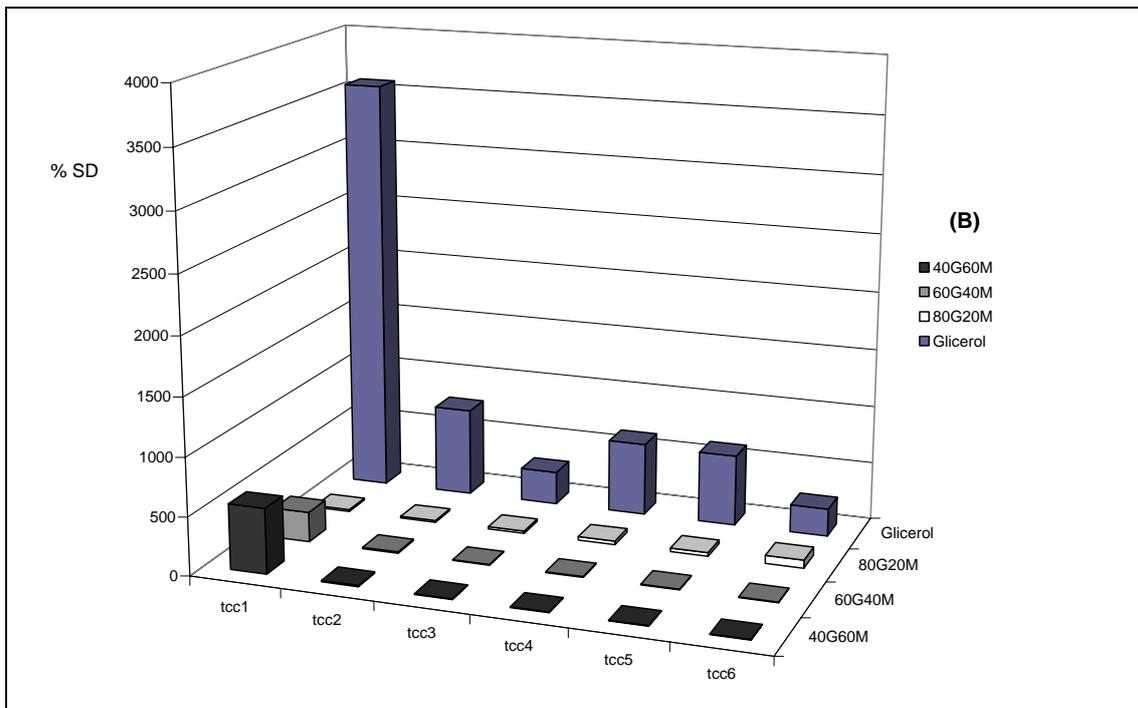
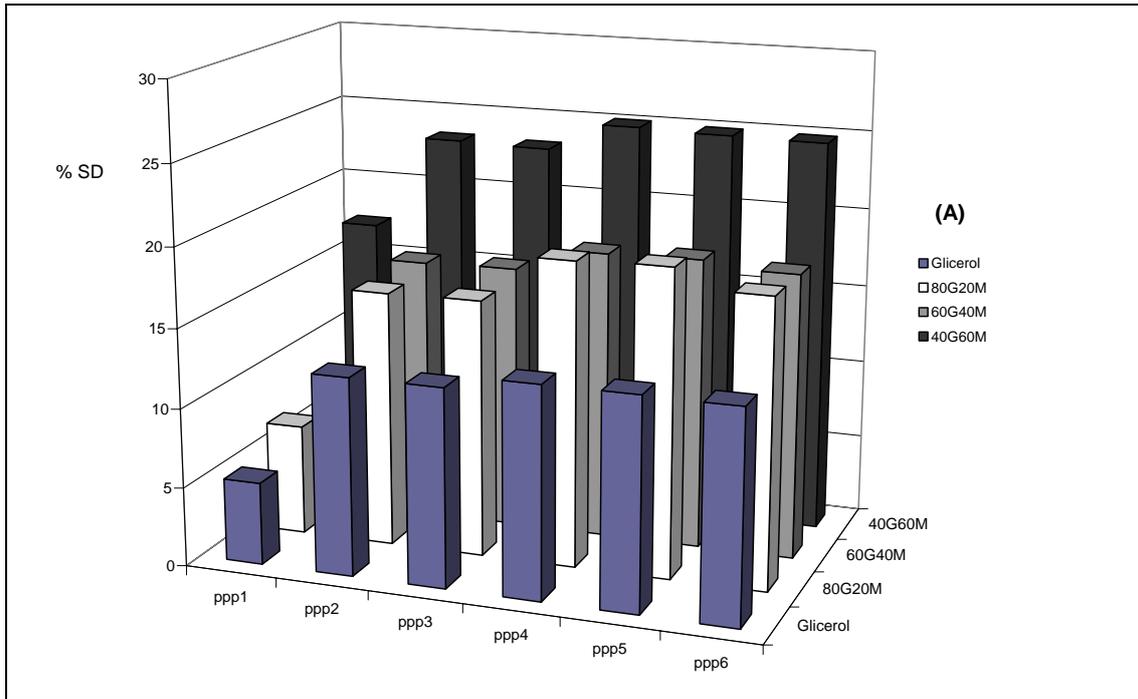


Figura V.8 Desviaciones estándar en relación al flujo metabólico calculado, para los cultivos a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$; donde: (a) vía de las pentosas fosfato (b) ciclo de los TCA; y 80G20M representa el cultivo glicerol:metanol (80:20); 60G40M el cultivo glicerol:metanol (60:40) y 40G20M el cultivo glicerol:metanol (40:60).

V.2.3.2.2 Análisis de flujos metabólicos en cultivos operados con glicerol y mezclas de glicerol/metanol a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$

El cultivo operado con glicerol a una velocidad de crecimiento de $0,16 \text{ h}^{-1}$ (Figura V.9 y en la sección de anexos, apartado A.III.2) mostró que el flujo a través de la gluconeogénesis y rama oxidativa de la vía de las PP es significativamente mayor que a baja velocidad de crecimiento, lo cual, en principio, es coherente con una mayor demanda de G6P, R5P y NADPH para formación de biomasa. El flujo calculado para la rama oxidativa de esta vía mediante MFA con restricciones derivadas del análisis METAFoR presentó un valor mayor que obtenido utilizando la metodología clásica: 48% ($1,33 \pm 0,09 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$) vs 14% ($0,38 \pm 0,12 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$), respectivamente. Cabe destacar que en los cultivos operados con mezclas de glicerol/metanol (Figura V.9 y en la sección de anexos, apartado A.III.2) los resultados obtenidos mediante MFA con restricciones derivadas del análisis METAFoR, el flujo en esta rama fue prácticamente el doble de los obtenidos a través de la metodología clásica; así mismo, la distribución de flujos en la rama oxidativa de la vía de las PP y contribución de esta vía a gluconeogénesis/glucólisis calculados mediante la metodología de MFA con restricciones METAFoR fueron significativamente más altas que los calculados con la metodología clásica. Cabe destacar también que el error en estos cálculos fueron del orden de 3-13% (Figura V.10(a)), claramente inferior a los obtenidos mediante el MFA clásico, del orden de 12-1200% (ver Figura IV.6(b)).

Los resultados obtenidos mediante el MFA con restricciones de ^{13}C -RMN (análisis METAFoR) para la distribución de flujos en el cultivo con glicerol como única fuente de carbono en el nodo del piruvato difirieron significativamente de los obtenidos por MFA. Concretamente, una pequeña fracción piruvato citosólico es convertida a acetaldehído ($0,24 \pm 0,04 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$), que a su vez es totalmente convertido a ACCOA y transportada al interior de la mitocondria; en cambio, el flujo de carbono a través de este *bypass* cuantificado mediante MFA fue nulo (0% o $0,00 \pm 0,00 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$). Cabe destacar que el transporte de oxaloacetato es mayoritariamente

del citoplasma para la mitocondria, a diferencia de lo que ocurre a baja velocidad de crecimiento.

En los cultivos realizados con mezclas de sustratos, al igual que en el caso del cultivo con glicerol, se observan flujos mayores en la gluconeogénesis de GAP a G6P, y de formación de RU5P a través de la rama oxidativa de la vía de las PP, respecto a los cultivos realizados a baja velocidad de crecimiento. No obstante, los flujos calculados para esta vía fueron mayores a los obtenidos anteriormente mediante la metodología del MFA.

La distribución de flujos a través de la ruta de asimilación y desasimilación de metanol también sufre variaciones importantes según la fracción de metanol en el medio. Así, la fracción de formaldehído que se oxida directamente a CO₂ es el 35 % ($0,65 \pm 0,06 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$) en las células del cultivo operado con 60% glicerol y 40% de metanol y del 34,5 % ($0,58 \pm 0,06 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$) en las células crecidas en 40% glicerol y 60% metanol. Así pues, para los cultivos 60G40M y 40G60M, donde se asimila simultáneamente glicerol y metanol, parece haber un claro efecto de la velocidad de crecimiento específica sobre la porción de metanol desasimilado, la cual se incrementa significativamente (de un 20% a un 35% aproximadamente) a velocidades altas de crecimiento (que están muy por encima de la velocidad máxima de crecimiento sobre metanol como única fuente de carbono a $\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$ (Solà, 2004)). Por otro lado, la distribución de flujos para las rutas del metabolismo del metanol son claramente diferentes a las obtenidas anteriormente mediante MFA clásico: en el cultivo operado 60% glicerol y 40% metanol, el flujo de carbono de formaldehído a CO₂ fue menor que lo obtenido a través del MFA clásico, mientras que para el cultivo con 40% glicerol y 60 metanol los cálculos realizados mediante la metodología clásica de MFA indican que el flujo de conversión de formaldehído en CO₂ es mayor, concretamente un 29% ($1,48 \pm 0,14 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$) respecto al flujo estimado mediante MFA con restricciones derivadas del análisis METAFoR, un 19% ($0,91 \pm 0,06 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{biom}$).

Los flujos a través del ciclo de los TCA fueron sensiblemente menores a los calculados mediante MFA clásico. El enzima málico no presenta

actividad en los cálculos de MFA con restricciones derivadas del análisis METAFoR, tal y como ya se observó mediante MFA clásico. En relación a los flujos de carbono para el interior o exterior mitocondrial, se observa que la vía principal de entrada de piruvato es su transporte directo; una pequeña fracción piruvato citosólico entra al ciclo de los TCA vía *bypass* (a través del MFA este flujo es cero). El transporte de OAA presenta un flujo neto de entrada para el interior de la mitocondria; no obstante, los valores obtenidos fueron prácticamente la mitad de los obtenidos por MFA. A pesar que los valores absolutos de los flujos a través de las distintas vías de entrada de piruvato citosólico a la mitocondria /ciclo de los TCA son distintos según la metodología de cálculo empleada, la distribución relativa de flujos entre éstas rutas es muy parecida; también cabe señalar que las desviaciones estándar de los flujos metabólicos obtenidos por esta metodología se situaron entre un 4 y un 15% (Figura V.10(b)), mientras que utilizando la metodología clásica estas desviaciones se situaron en un rango de 3-33% (ver Figura IV.7(b)), por lo que se concluye que el método METAFoR presenta mayor fiabilidad en esta parte de la red metabólica comparada con la metodología clásica.

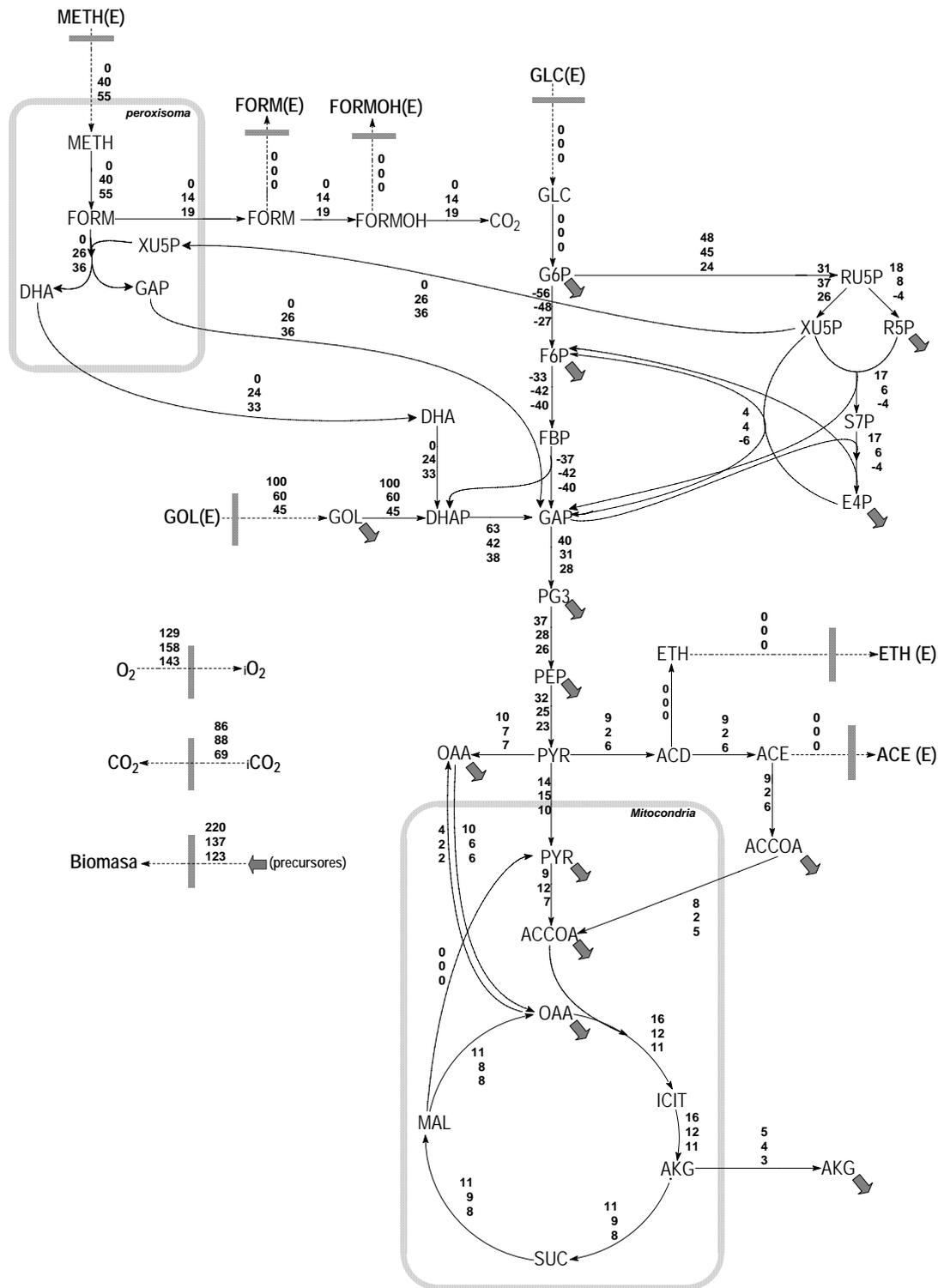


Figura V.9 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol y mezclas de glicerol:metanol en cultivos operados en quimiostato a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$. Los valores están en orden decreciente de concentración de glicerol, es decir glicerol:metanol (100:0); glicerol:metanol (60:40) y glicerol:metanol (40:60). Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

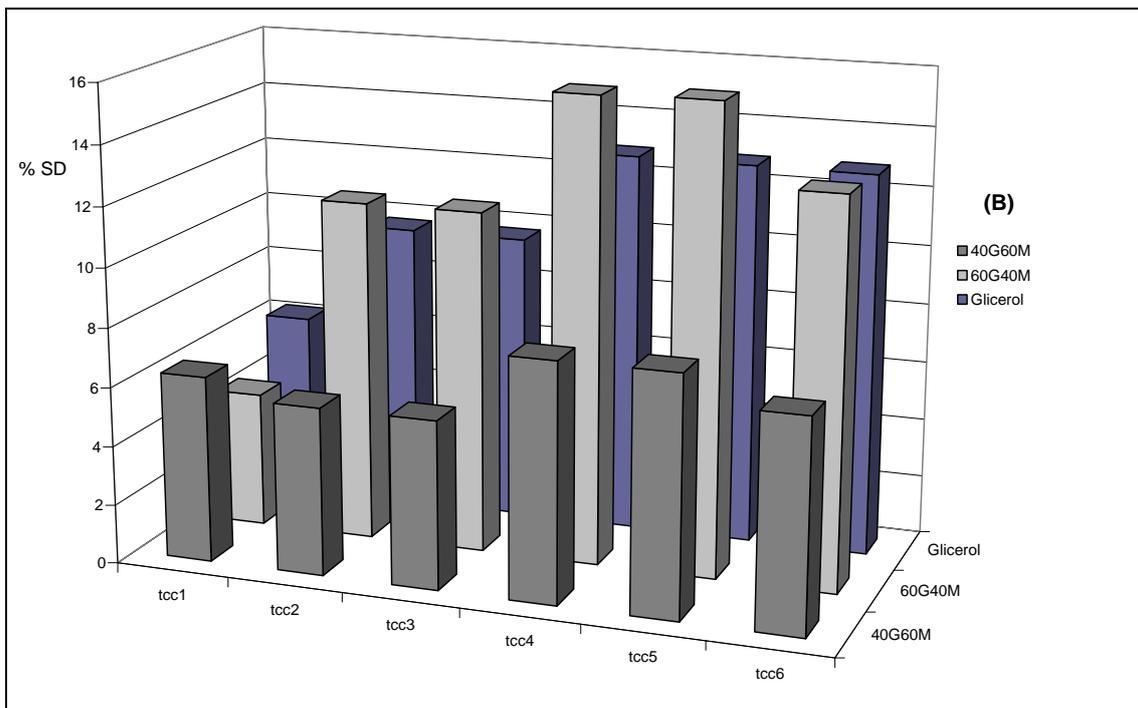
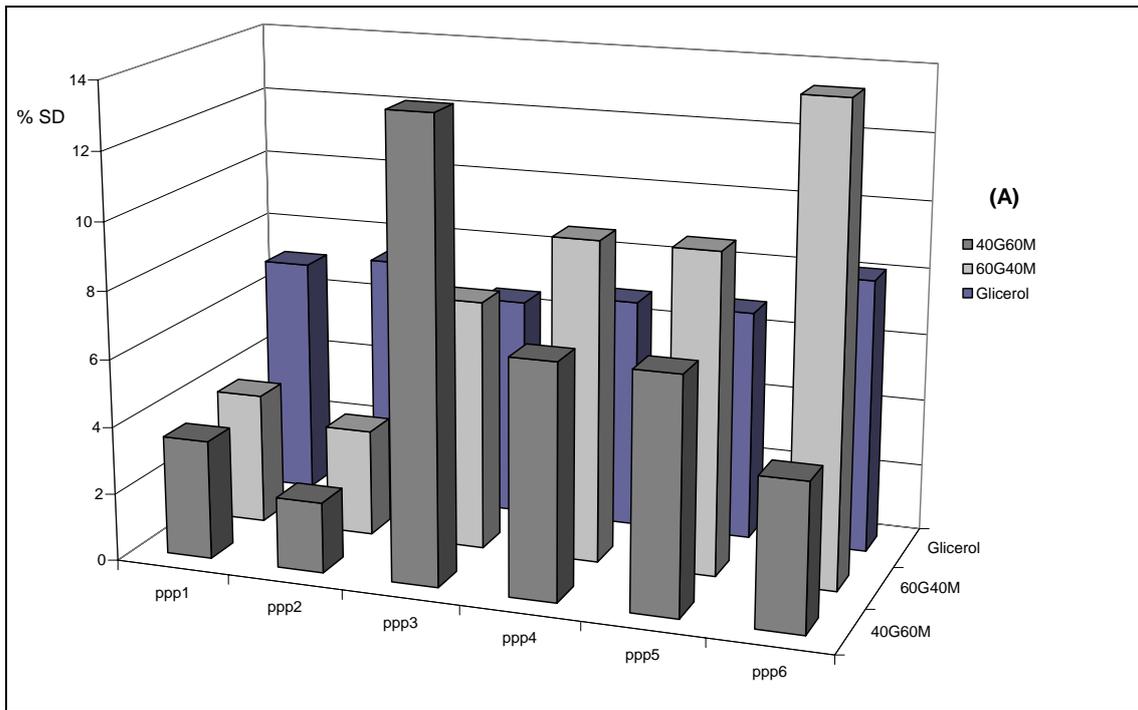


Figura V.10 Desviaciones estándar en relación al flujo metabólico calculado, para los cultivos a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$; donde: (a) vía de las pentosas fosfato (b) ciclo de los TCA; y 60G40M el cultivo glicerol:metanol (60:40) y 40G20M el cultivo glicerol:metanol (40:60).

Globalmente, la metodología de análisis de flujos metabólicos usando restricciones basadas en datos de marcaje isotópico y RMN muestra una importante limitación al ser aplicada a nuestro caso de estudio (crecimiento sobre glicerol o mezclas glicerol/metanol) debido al reducido número de restricciones que se pueden introducir (sólo 3). Con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos mediante esta metodología, se repitieron los mismos cálculos descritos anteriormente combinando las restricciones derivadas de los experimentos de ^{13}C -RMN con el uso del balance de NADPH como restricción adicional; en otra tentativa, se añadieron los balances de NADH y NADPH como restricciones adicionales. No obstante, los resultados obtenidos para estos dos casos no fueron satisfactorios, ya que se observó que los flujos intracelulares calculados no se ajustaban a los flujos de entrada y de salida (flujos extracelulares medidos experimentalmente) por ejemplo, algunas vías metabólicas como la vía de las PP y de los TCA presentaron flujos con valores superiores a 100% (en relación al substrato utilizado), tal y como muestra la Tabla V.6 (la distribución de flujos en la red metabólica para todas las situaciones de cultivo no se han incluido en la memoria). Estos resultados podrían indicar que los balances de estos cofactores asumidos no son correctos.

Otra posibilidad de cálculo explorada en este estudio, descrita en el trabajo de tesis de Gombert (2001), consistió en no considerar el balance de oxígeno; en una primera tentativa se eliminó solamente el consumo de oxígeno de las reacciones de la red bioquímica; la distribución de flujos obtenidos fueron los mismos obtenidos anteriormente considerando el balance de oxígeno, demostrando que esta aproximación también puede ser aplicada para nuestro caso. Otra tentativa fue considerar el balance de NADPH y eliminar el de oxígeno, pero el resultado obtenido no fue satisfactorio.

Tabla V.6 Distribución de flujos en algunas vías metabólicas utilizando datos de cociente de flujos con restricciones de RMN (¹³C-MFA) y utilizando los cofactores NADH/NADPH.

Cultivo	Glicerol	80G20M	60G40M	40G60M
<i>Vía de las pentosas fosfato</i>				
<i>ppp1</i>	113		42	41
	100	46	50	52
<i>ppp2</i>	93		40	56
	92	49	45	55
<i>ppp3</i>	100		46	49
	107	43	46	58
<i>Ciclo de los TCA</i>				
<i>tcc1</i>	104		40	49
	95	44	50	48
<i>tcc2</i>	103		49	46
	102	46	47	51
<i>tcc3</i>	102		42	43
	103	46	42	53
<i>Enzima Málico</i>				
<i>ana3</i>	128		50	58
	96	45	52	56

* valor superior cultivos a velocidad de crecimiento de $\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$, valor inferior a $\mu=0,16 \text{ h}^{-1}$.

** % de flujo en relación al substrato utilizado.

Como conclusión, las diferencias en la distribución de flujos encontradas según la metodología utilizada pueden reflejar al menos dos limitaciones importantes (o una combinación de las mismas): 1) el reducido número de restricciones derivadas de ¹³C-RMN reduce de manera importante la sensibilidad del análisis de flujos a través de la red metabólica, particularmente en la vía de las PP y metabolismo del metanol; 2) el metabolismo redox asumido puede ser incompleto y/o presentar especificidades de cofactores distintas a las asumidas

Debido a estas limitaciones, se consideró la implementación de un método de análisis de flujos metabólicos basado en ¹³C, el cual permita

complementar y enriquecer la información disponible, sobretodo la referente a la distribución de flujos metabólicos a través de la vía de las PP y del metabolismo del metanol. Concretamente, se ha investigado la aplicación de LC-MS como técnica de cuantificación de ^{13}C que permite la cuantificación de enriquecimiento isotópicos en metabolitos primarios intracelulares, combinado con el uso de un programa (*^{13}C -Flux*, Wiechert, 2001) para ^{13}C -MFA. Además, se aprovechó el potencial de este programa para realizar estudios de simulación de marcaje isotópica de ^{13}C con el objetivo de determinar la mejor estrategia de marcaje para optimizar/maximizar la información extraíble del experimento de marcaje.

V.3 Análisis de flujos metabólicos usando datos derivados de marcaje isotópico con ^{13}C y LC-MS/MS

La cuantificación de flujos metabólicos mediante experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C es un proceso largo, donde la cuantificación de todos los flujos intracelulares son calculados a través de pocas suposiciones. Para la modelización y análisis de flujos metabólicos, además de ser necesario el conocimiento de las vías metabólicas involucradas y su compartimentalización, también se requieren datos previamente obtenidos a partir de experimentos básicos; en algunos casos los experimentos son repetidos variando el substrato marcado o su composición isotopomérica (Wiechert & de Graaf, 1996, Wiechert *et al.*, 2001).

Según Wiechert & de Graaf (1996) los flujos intracelulares pueden ser cuantificados a través de las siguientes suposiciones (Figura V.11):

- solamente los flujos extracelulares son medidos;
- solamente se miden las fracciones marcadas (patrones de marcaje) en un estado isotopicamente estacionario;
- los flujos extracelulares medidos son combinados con las fracciones marcadas de un sistema isotopicamente estacionario;

- los flujos extracelulares medidos y el tiempo de enriquecimiento en un sistema en estado isotópicamente no estacionario (estado transitorio) pueden ser observados;
- las medidas de los flujos extracelulares y las fracciones de isotopómeros en estado estacionario están disponibles.

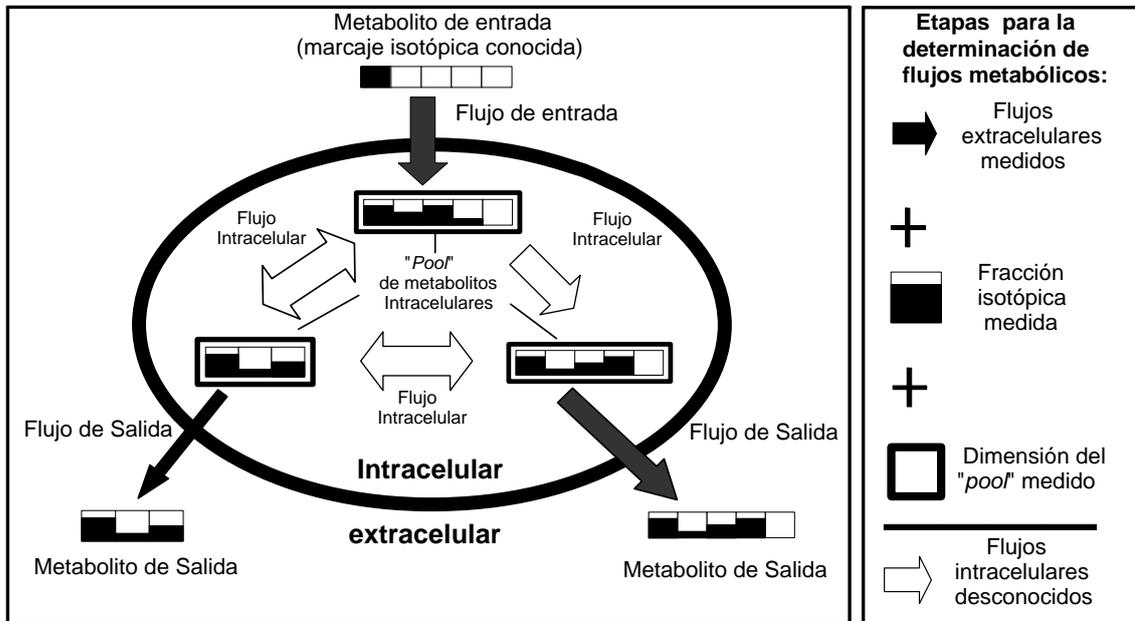


Figura V.11 Principio del análisis de flujos metabólicos mediante marcaje con ^{13}C . A través de los flujos extracelulares medidos y de la fracción isotópica de los metabolitos intracelulares son obtenidos los flujos intracelulares desconocidos. Referencia: Wiechert & de Graaf (1996).

El modelo matemático que describe la relación entre flujos y datos experimentales proveniente de los experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C , se basa en algunas hipótesis (Wiechert *et al.*, 1996), como:

- el sistema microbiano observado se encuentra bien definido en el estado fisiológicamente estacionario a lo largo de la toma de las medidas experimentales;
- las vías metabólicas de interés que involucran todas las transformaciones bioquímicas relevantes son conocidas en respecto a: *i)* las enzimas involucradas en el proceso, *ii)* la transición de cada átomo de carbono involucrada en una reacción metabólica, *iii)* (bi)direccionalidad de las reacciones;

- las enzimas no distinguen entre los distintos isotopómeros de un dado metabolito con respecto a las tasas de reacción (en sistemas de reacciones en fase líquida).

La construcción de un modelo para un sistema con marcaje de átomos de carbono necesita además del conocimiento de todas las etapas de reacciones bioquímicas de una red metabólica, los átomos de carbono que están involucrados en cada paso de reacción.

V.3.1 Metodología para el análisis de flujos metabólicos basado en ¹³C. Modelización matemática

V.3.1.1 Notación

La notación que describe la transición de los átomos de carbono y que fue primeramente introducida por Wiechert & de Graaf en 1993 consiste en poner el símbolo # seguido por la cantidad de letras necesarias que compone el número de átomos de carbono de la molécula. El ejemplo abajo representa la reacción de la transaldolasa en la vía de las pentosas fosfato y la conversión de la fructosa 1,6-bisfosfato a gliceraldehído 3-fosfato (Wiechert & de Graaf, 1996):



En las reacciones de entremezcla (*scrambling reactions*) son usualmente asumidas como simétricas, es decir ambos los pasos de entremezcla tiene igual probabilidad, como ilustra la reacción abajo:



V.3.1.2 Modelización matemática

Considerando una red metabólica compuesta por 7 reacciones y 9 metabolitos (Figura V.12), y todas las reacciones y transiciones de los átomos de carbono involucrados en el sistema e introduciendo una notación formal que pueden ser expresadas por:

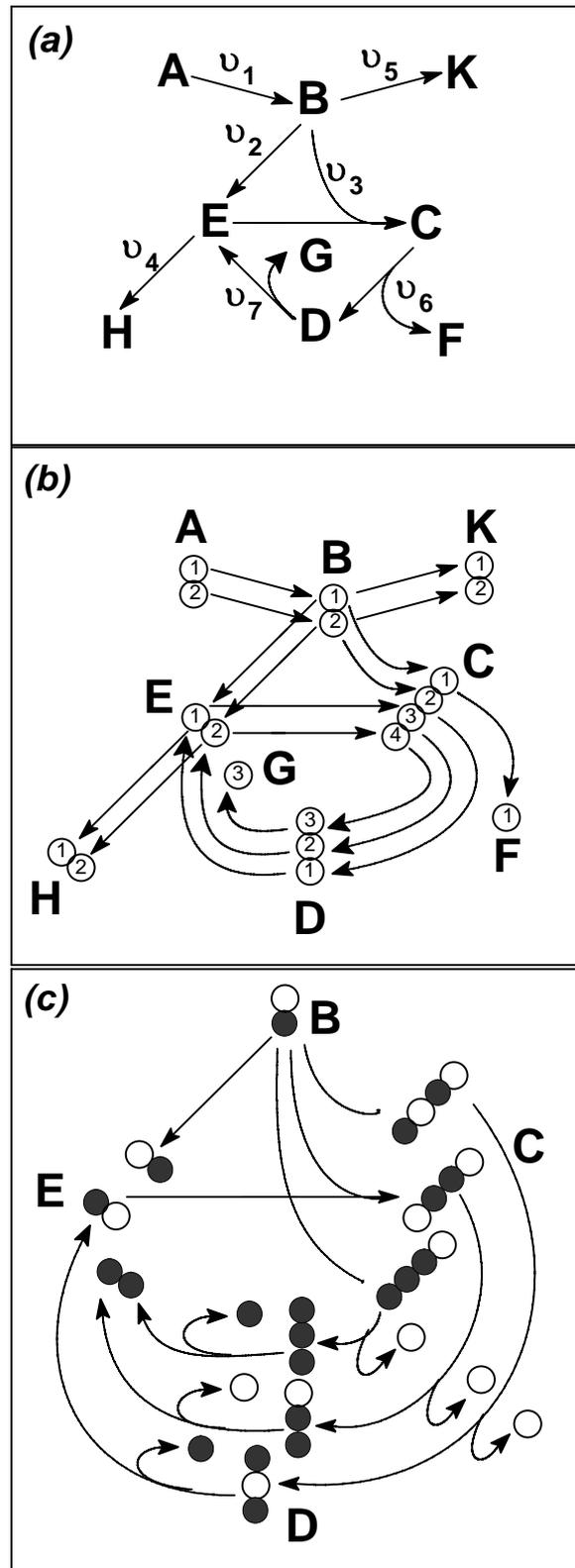
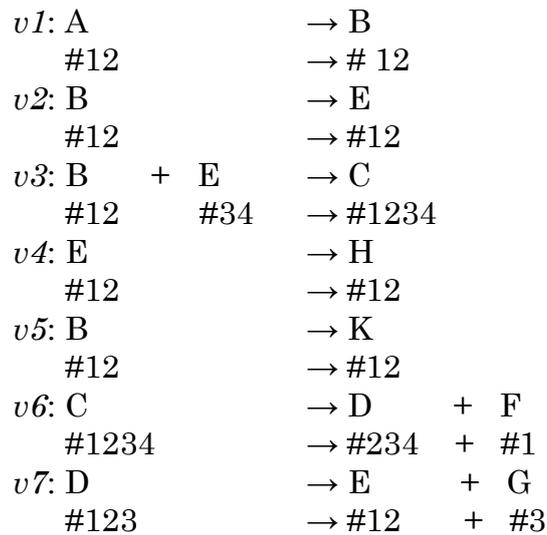
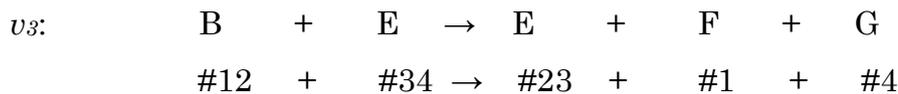


Figura V.12 Tipos de redes bioquímicas, presentando: *a)* red metabólica; *b)* red de átomos de carbono; *c)* red de isotopómeros bajo la hipótesis que todas las reacciones son unidireccionales y el sustrato está marcado. En esta situación sólo 13 de los 48 isotopómeros posibles son producidos.

Referencia: Wiechert & de Graaf (1996).



y ahora reduciendo la red metabólica presentada en la Figura V.12 en una red equivalente (Figura V.13), donde los productos F#1 y G#1 son obtenidos a través de los átomos B#1 y E#2 respectivamente, en vez de C#1 y D#3 respectivamente. Esta simplificación nos permite eliminar los átomos C#1, D#3 y C#4 de la red, lo que resulta en la completa eliminación de los metabolitos D y C de la red. Estas consideraciones nos permiten simplificar la red metabólica descrita en la Figura V.12, no solamente en relación al número reacciones, más también cuanto a composición de isotómeros, reduciendo la complejidad de la red. La nueva red metabólica esta compuesta por 5 reacciones (v_1, v_2, v_3, v_4, v_5), donde la reacción v_3 viene dada por:



Dado los valores de los flujos metabólicos v_1, \dots, v_5 denominado por las correspondientes variables $v_i \geq 0$, más precisamente, dos variables $v_i^{\rightarrow}, v_i^{\leftarrow}$, representando la dirección del flujo. Cuando una reacción es irreversible, uno de esos flujos será igual a cero. En el ejemplo (Figura V.13) la entrada de substrato y formación de los productos (v_1, v_4 y v_5) son irreversibles, también el flujo intracelular v_3 es considerado irreversible y el flujo v_2 reversible.

Las direcciones de todos los flujos molares de la red de reacciones pueden ser expresadas por los vectores:

$$v^{\rightarrow} = (v_1^{\rightarrow}, v_2^{\rightarrow}, v_3^{\rightarrow}, v_4^{\rightarrow}, v_5^{\rightarrow}) \text{ y } v^{\leftarrow} = (v_1^{\leftarrow}, v_2^{\leftarrow}, v_3^{\leftarrow}, v_4^{\leftarrow}, v_5^{\leftarrow}) \quad (\text{V.8})$$

Las etapas irreversibles son dadas por:

$$v_1^{\leftarrow} = v_3^{\leftarrow} = v_4^{\leftarrow} = v_5^{\leftarrow} = 0 \quad (\text{V.9})$$

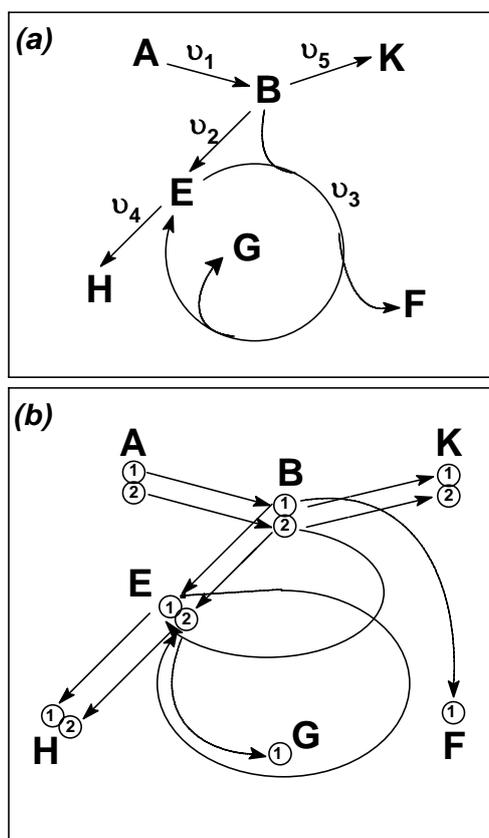


Figura V.13 Redes metabólica reducida obtenida através de la Figura V.12. *a)* red metabólica; *b)* red de átomos de carbono.

Referencia: Wiechert & de Graaf (1996).

Las unidades físicas de los flujos son dadas en $[mol\ h^{-1}]$. Los pasos de reacciones no involucra solamente substratos a productos más también los átomos de carbono del substrato para átomos de carbono de los productos (o isotopómeros respectivamente), las unidades también viene dada por $[mol\ h^{-1}]$.

A través de los vectores $v^{\rightarrow}, v^{\leftarrow}$ podremos componer un vector de flujos totales (en dos dimensiones) que vendrá dado por:

$$v = \begin{pmatrix} v^{\rightarrow} \\ v^{\leftarrow} \end{pmatrix} \quad (\text{V.10})$$

el vector de flujo neto puede ser expresado como:

$$v^{net} = v^{\rightarrow} - v^{\leftarrow} \quad (\text{V.11})$$

Solamente algunos de estos flujos netos pueden ser observados experimentalmente y también todos los componentes de v deben ser no negativos lo que satisface la desigualdad de los componentes $v \geq 0$.

El marcaje total del *pool* de metabolitos es representada por el porcentual del material marcado sobre todas las posiciones de los átomos de carbono. Solamente los metabolitos intermediarios y los metabolitos de entrada dentro del sistema son computados para el balance. Las fracciones marcadas dentro de un metabolito son representadas con letra minúscula y además todo el *pool* de átomos de carbono intermediario considerados son enumerados, como ejemplo para el metabolito B, las fracciones son representadas por las letras b_1 y b_2 . Esto da lugar a las variables de las fracciones marcadas en que $x_i \in [0,1]$ y el vector de marcaje total x . En nuestro caso solamente B y E son intermediarios tales que:

$$x = (b_1, b_2, e_1, e_2)^T \quad (\text{V.12})$$

El marcaje de los átomos de carbono que compone el substrato son inicialmente conocidos, estos átomos son enumerados conforme descrito anteriormente, y el vector x^{inp} que define la constante de los átomos en la entrada de la red metabólica vendrá dado por:

$$x^{inp} = (a_1, a_2)^T \quad (\text{V.13})$$

Cuando se considera la composición isotopomérica que componen los metabolitos, el modelo matemático será más complejo. Para distinguir las fracciones isotopoméricas de un metabolito se usan números binarios específicos que relacionan el número de átomos de carbono marcado. Para el metabolito B, que contiene dos átomos de carbono, el número de fracciones de isotopómeros será dado por $2^2 = 4$, que son expresados por b_{00} , b_{01} , b_{10} , b_{11} . El vector x de las fracciones del isotopómero, vendrá dado por:

$$x = (b_{00}, b_{01}, b_{10}, b_{11}, e_{00}, e_{01}, e_{10}, e_{11})^T \quad (\text{V.14})$$

y las relaciones:

$$\begin{aligned} b_{00} + b_{01} + b_{10} + b_{11} &= 1 & b_{10} + b_{11} &= b_1 & e_{10} + e_{11} &= e_1 \\ e_{00} + e_{01} + e_{10} + e_{11} &= 1 & b_{01} + b_{11} &= b_2 & e_{01} + e_{11} &= e_2 \end{aligned} \quad (\text{V.15})$$

que contiene las fracciones del isotopómero y átomos marcados. El vector x^{inp} de composición isotopomérica de entrada puede ser definido como:

$$x^{inp} = (a_{00}, a_{01}, a_{10}, a_{11})^T \quad (\text{V.16})$$

Finalmente, la modelización de los experimentos en estado isotopicamente no estacionario requiere el conocimiento del tamaño absoluto del *pool* molar. Para un metabolito específico conviene representarlo por la letra en itálica, como por ejemplo el *B* para el *pool* de tamaño B. En general el modelo que corresponde el *pool* de variables está comprendido por el vector:

$$X = (B, E) \quad (\text{V.17})$$

V.3.1.2.1 Ecuaciones de balance para el metabolito

Se pueden formular varios tipos de balance material para cada *pool* intracelular usando la introducción de variables de estado. La primera ecuación de balance estequiométrico bien conocida que contiene la participación de cada flujo de un dado *pool* de metabolitos, fue desarrollada por Holms en 1986 (Wiechert & de Graaf, 1996). Sin embargo, el tamaño del *pool* absoluto no cambia en un sistema metabólico estacionario debido a que la suma de los flujos de la entrada y de la salida son iguales. En el ejemplo de la Figura V.11, las ecuaciones de balance estequiométrico correspondiente para el *pool* de metabolito intermediario vendrá dada por:

$$\begin{aligned} B &= v_1^{\rightarrow} + v_2^{\leftarrow} = v_2^{\rightarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow} \\ E &= v_2^{\rightarrow} + v_3^{\rightarrow} = v_2^{\leftarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_4^{\rightarrow} \end{aligned} \quad (\text{V.18})$$

Introduciendo en notación matricial tenemos:

$$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & \cdot & -1 \\ \cdot & 1 & \cdot & -1 & \cdot \end{pmatrix} \quad (\text{V.18a})$$

siendo más conveniente expresarla como:

$$0 = N \cdot v^{net} \quad (\text{V.19})$$

Cuando el átomo de carbono marcado es considerado, un balance de átomos puede ser escrito para cada *pool* de carbono intermediario. En esta situación el sistema de reacción presentado en la Figura V.13 puede ser interpretado como un sistema de transición de átomo de carbono, conforme las conversiones:

$$\begin{array}{lll}
v_1: A\#1 \rightarrow B\#1 & v_3: B\#1 \rightarrow F\#1 & v_4: E\#1 \rightarrow H\#1 \\
v_1: A\#2 \rightarrow B\#2 & v_3: B\#2 \rightarrow E\#1 & v_4: E\#2 \rightarrow H\#2 \\
v_2: B\#1 \rightarrow E\#1 & v_3: E\#1 \rightarrow E\#2 & v_5: B\#1 \rightarrow K\#1 \\
v_2: B\#2 \rightarrow E\#2 & v_3: E\#2 \rightarrow G\#1 & v_5: B\#2 \rightarrow K\#2
\end{array}$$

El balance de átomos de carbono para B#1 se construye de modo que: el flujo de entrada v_1 representa la cantidad de átomos marcados A#1 que es convertido para B#1 y el flujo al revés de v_2 a través de E#1 viene dado por $v_1^{\rightarrow} \cdot a_1 + v_2^{\leftarrow} \cdot e_1$. Por otro lado, los flujos de salida v_2 , v_3 y v_5 toma la cantidad de $(v_2^{\rightarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot b_1$ fuera de B#1. El sistema completo es asumido en estado isotopicamente estacionario y el siguiente conjunto de ecuaciones de balance para el átomo de carbono marcado vendrá dado como:

$$\begin{aligned}
b_1 : v_1^{\rightarrow} \cdot a_1 + v_2^{\leftarrow} \cdot e_1 &= (v_2^{\rightarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot b_1 \\
b_2 : v_1^{\rightarrow} \cdot a_2 + v_2^{\leftarrow} \cdot e_2 &= (v_2^{\rightarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot b_2 \\
e_1 : v_3^{\rightarrow} \cdot b_2 + v_2^{\rightarrow} \cdot b_1 &= (v_2^{\leftarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot e_1 \\
e_2 : v_3^{\rightarrow} \cdot e_1 + v_2^{\rightarrow} \cdot b_1 &= (v_2^{\leftarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot e_2
\end{aligned} \tag{V.20}$$

Escribiendo en forma matricial tenemos:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} v_1^{\rightarrow} & \cdot \\ \cdot & v_1^{\rightarrow} \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} a_1 \\ a_1 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} -v_2^{\rightarrow} - v_3^{\rightarrow} - v_5^{\rightarrow} & \cdot & v_2^{\leftarrow} & \cdot \\ \cdot & -v_2^{\rightarrow} - v_3^{\rightarrow} - v_5^{\rightarrow} & \cdot & v_2^{\leftarrow} \\ v_2^{\rightarrow} & v_3^{\rightarrow} & -v_2^{\leftarrow} - v_3^{\rightarrow} - v_4^{\rightarrow} & \cdot \\ \cdot & v_2^{\rightarrow} & v_3^{\rightarrow} & -v_2^{\leftarrow} - v_3^{\rightarrow} - v_4^{\rightarrow} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ e_1 \\ e_2 \end{pmatrix} \tag{V.20a}$$

Donde los átomos marcados de la entrada a_1 y a_2 son separados a través de los átomos intermediarios marcados. Esta ecuación tiene la siguiente estructura general:

$$0 = P^{imp}(v) \cdot x^{imp} + P(v) \cdot x = \left(\sum_i v_i \cdot P_i^{imp} \right) \cdot x^{imp} + \left(\sum_i v_i \cdot P_i \right) \cdot x \tag{V.21}$$

donde P_i y P_i^{imp} son llamados de matrices de transición de átomos. Para nuestro ejemplo, estas matrices son dadas como:

$$P_2^{\rightarrow} = \begin{pmatrix} -1 & . & . & . \\ . & -1 & . & . \\ 1 & . & . & . \\ . & 1 & . & . \end{pmatrix}, \quad P_2^{\leftarrow} = \begin{pmatrix} . & . & 1 & . \\ . & . & . & 1 \\ . & . & -1 & . \\ . & . & . & -1 \end{pmatrix}, \quad P_1^{inp} = \begin{pmatrix} 1 & . \\ . & 1 \\ . & . \\ . & . \end{pmatrix} \quad (V.22)$$

A través de la Ecuación V.22, tendremos una ecuación en función de v que viene dada por:

$$0 = P^{inp}(v).x^{inp} + P(v).x = \left(\sum_i v_i . P_i^{inp} \right) . x^{inp} + \left(\sum_i v_i . P_i \right) . x \quad (V.23)$$

Esta ecuación es la base para la simulación de experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C . Su solución esta condicionada a resolución por factorización matricial o métodos de iteración de sistemas de ecuación lineal (Wiechert *et al.*, 1996).

Cuando el sistema está en estado metabólicamente estacionario la cantidad absoluta de átomos marcados en la primera posición de B viene dado por $B.b_1$ de este modo $d/dt(B.b_1) = B.d/dt b_1$, su resolución está condicionada tomando la adición de la ecuación de balance de marcaje para el paso B#1 en la Ecuación V.20. Sin embargo, si el sistema no se encuentra en equilibrio isotópico se puede formular un sistema de ecuaciones diferenciales; en esta situación el tamaño absoluto del *pool* X_j desempeña una función que determina la capacidad de un *pool* de los átomos marcados.

La representación general de una matriz similar a la Ecuación V.21 puede ser obtenida a través de la construcción de una matriz I que aumenta el vector X a la dimensión de x , repitiendo sus entradas apropiadamente. En el ejemplo, la matriz vendrá dada por:

$$I.X \stackrel{def}{=} \begin{pmatrix} 1 & . \\ 1 & . \\ . & 1 \\ . & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B \\ E \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} B \\ B \\ E \\ E \end{pmatrix} \quad (V.24)$$

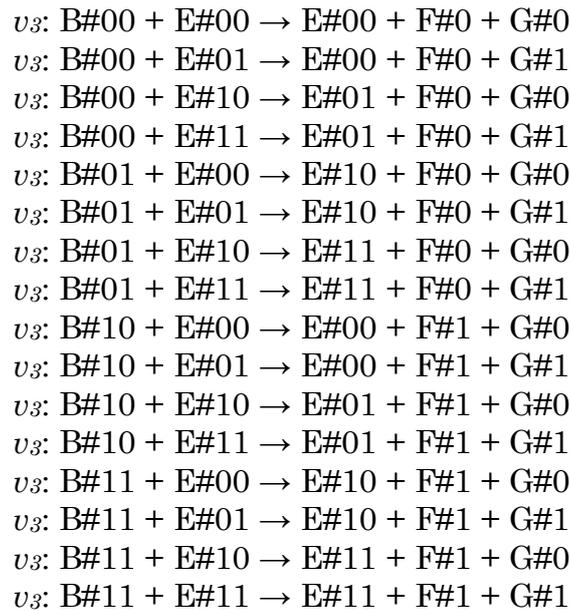
Poniendo todas las partes juntas, el sistema de ecuaciones del balance en estado no estacionario vendrá dado por:

$$diag(I.X) \frac{d}{dt} x = P^{inp}(v).x^{inp} + P(v).x \quad (V.25)$$

donde $diag(I.X)$ es la diagonal de la matriz construida a través del vector $I.X$.

V.3.1.2.2 Ecuaciones de balance para la composición isotopomérica

Cuando el modelo matemático considera la composición isotopomérica la situación resultante será más compleja porque el número de substratos implicados en un paso de reacción determinará el orden (algebraico) de la ecuación de la reacción. En el ejemplo el paso de la reacción v_3 tiene dos substratos de modo que en relación a composición isotopomérica todas las reacciones que pueden suceder será:



La probabilidad de dos isotopómeros con cantidades fraccionarias b_i y b_j que pueden ser encontradas en el paso v_3 viene dado por $b_i \cdot b_j$. Por lo tanto, el flujo total correspondiente del isotopómero será $v_3 \cdot b_i \cdot b_j$. El balance del isotopómero para los pasos bimoleculares resulta en términos bilineales con respecto al término x_i mientras que para los pasos monomoleculares v_1 , v_2 , v_4 y v_5 y los flujos de salida a través de cada *pool*, todos los términos en las ecuaciones correspondientes del balance son exactamente análogos a la Ecuación V.21 y a la Ecuación V.25 respectivamente. El sistema completo de ecuaciones entonces será:

$$\begin{aligned}
b_{00} &: v_1^{\rightarrow} \cdot a_{00} + v_2^{\leftarrow} \cdot e_{00} &= (v_2^{\rightarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot b_{00} \\
b_{01} &: v_1^{\rightarrow} \cdot a_{01} + v_2^{\leftarrow} \cdot e_{01} &= (v_3^{\rightarrow} + v_2^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot b_{01} \\
b_{10} &: v_1^{\rightarrow} \cdot a_{10} + v_2^{\leftarrow} \cdot e_{10} &= (v_3^{\rightarrow} + v_2^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot b_{10} \\
b_{11} &: v_1^{\rightarrow} \cdot a_{11} + v_2^{\leftarrow} \cdot e_{11} &= (v_3^{\rightarrow} + v_2^{\rightarrow} + v_5^{\rightarrow}) \cdot b_{11} \\
e_{00} &: v_2^{\rightarrow} \cdot b_{00} + v_3^{\rightarrow} \cdot (b_{00} + b_{10}) \cdot (e_{00} + e_{01}) &= (v_2^{\leftarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_4^{\rightarrow}) \cdot e_{00} \\
e_{01} &: v_2^{\rightarrow} \cdot b_{01} + v_3^{\rightarrow} \cdot (b_{00} + b_{10}) \cdot (e_{10} + e_{11}) &= (v_2^{\leftarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_4^{\rightarrow}) \cdot e_{01} \\
e_{10} &: v_2^{\rightarrow} \cdot b_{10} + v_3^{\rightarrow} \cdot (b_{01} + b_{11}) \cdot (e_{00} + e_{01}) &= (v_2^{\leftarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_4^{\rightarrow}) \cdot e_{10} \\
e_{11} &: v_2^{\rightarrow} \cdot b_{11} + v_3^{\rightarrow} \cdot (b_{01} + b_{11}) \cdot (e_{10} + e_{11}) &= (v_2^{\leftarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_4^{\rightarrow}) \cdot e_{11}
\end{aligned} \tag{V.26}$$

Los términos lineales en x se pueden todavía expresar con la notación matricial introducida en la Ecuación V.21. Por otro lado, los términos bilineales en x son representados introduciendo una matriz simétrica para cada ecuación del balance. Por ejemplo el paso e_{11} puede ser escrito como sigue:

$$e_{11} : 0 = \frac{1}{2} \cdot v_3^{\rightarrow} \cdot \begin{pmatrix} b_{00} \\ b_{01} \\ b_{10} \\ b_{11} \\ e_{00} \\ e_{01} \\ e_{10} \\ e_{11} \end{pmatrix}^T \begin{pmatrix} \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & 1 & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & 1 & 1 \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot \\ \cdot & 1 & \cdot & 1 & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & 1 & \cdot & 1 & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \end{pmatrix} \begin{pmatrix} b_{00} \\ b_{01} \\ b_{10} \\ b_{11} \\ e_{00} \\ e_{01} \\ e_{10} \\ e_{11} \end{pmatrix} + v_2^{\rightarrow} \cdot b_{11} - (v_2^{\leftarrow} + v_3^{\rightarrow} + v_4^{\rightarrow}) \cdot e_{11} \tag{V.27}$$

La matriz simétrica en esta ecuación será denotada por $Q_{3,11}^{\rightarrow}$ que indica el número del flujo y el *pool* específico. Todas las matrices semejantes $Q_{i,j}$ corresponde el mismo flujo de la variable v_i , pudiéndose entonces componer una matriz de tres dimensiones (*i.e.* un tensor) Q_i y el producto de un vector con el tensor puede ser definido como:

$$x^T \cdot Q_i \cdot x = x^T \cdot \begin{pmatrix} Q_{i,1} \\ Q_{i,2} \\ \vdots \\ Q_{i,n} \end{pmatrix} \cdot x \stackrel{\text{def}}{=} \begin{pmatrix} x^T \cdot Q_{i,1} \cdot x \\ x^T \cdot Q_{i,2} \cdot x \\ \vdots \\ x^T \cdot Q_{i,n} \cdot x \end{pmatrix} \tag{V.28}$$

Usando esta notación, las ecuaciones del balance de isotómeros se pueden finalmente escribir de forma similar a la Ecuación V.21 como:

$$\begin{aligned}
0 &= P^{inp}(v).x^{inp} + P(v).x + x^T.Q(v).x \\
&= \left(\sum_i v_i.P_i^{inp} \right).x^{inp} + \left(\sum_i v_i.P_i \right).x + x^T.\left(\sum_i v_i.Q_i \right).x
\end{aligned} \tag{V.29}$$

V.3.1.2.3 Determinación explícita de flujos

Asumiendo que los flujos v_1^{\rightarrow} y v_5^{\rightarrow} se pueden medir directamente y además los átomos marcados b_1 y b_2 sean conocidos, entonces los flujos intracelulares desconocidos restantes, v_2^{\rightarrow} y v_4^{\rightarrow} , deben ser determinados para reconstruir el estado entero del sistema. De las ecuaciones del balance (Ecuación V.20), las soluciones explícitas vendrán dadas como:

$$\begin{aligned}
v_2^{\leftarrow} &= v_1^{\rightarrow} \cdot \frac{b_1^2}{(b_2 - b_1).(b_2 + b_1 - 1)} \\
v_2^{\rightarrow} &= (v_1^{\rightarrow} + v_2^{\leftarrow} - v_5^{\rightarrow}). \frac{1 - b_2}{b_1}
\end{aligned} \tag{V.30}$$

Donde las direcciones del paso v_2 (reacción bidireccional) son identificadas a través de datos de marcaje.

La determinación de estos flujos pueden ser obtenidos también por la superposición gráfica a través de un mapa no lineal dado por:

$$\left(\frac{v_2^{\leftarrow}}{v_1^{\rightarrow}}, \frac{v_2^{\rightarrow}}{v_1^{\rightarrow} + v_2^{\leftarrow} - v_5^{\rightarrow}} \right) \xleftrightarrow{1-1} \left(\frac{b_1^2}{(b_2 - b_1)(b_2 + b_1 - 1)}, \frac{1 - b_2}{b_1} \right) \tag{V.31}$$

por lo cual tenemos por superposición de dos líneas de contorno la correspondencia entre flujos desconocidos y marcaciones medidas. También se puede usar una técnica similar también para la estimación de flujos y análisis de sensibilidad.

V.3.1.2.4 Reacciones de intercambio

Sea el par de flujos $v_i^{\rightarrow}, v_i^{\leftarrow}$ que representan la dirección del flujo delantero y su revés, respectivamente. La tasa de flujo neto v_i^{net} representa la diferencia entre los dos flujos y definida a través de la Ecuación V.18, el flujo de intercambio v_i^{xch} viene dado por la cantidad $v_i^{xch} = v_i^{\rightarrow} + v_i^{\leftarrow}$, cuando

$v_i^{xch} \rightarrow \infty$ (situación rápida de equilibrio) a la necesidad de la investigación del comportamiento del sistema. Sin embargo, esta cantidad no es conveniente para describir la irreversibilidad (*i.e.* $v_i^{\rightarrow} = 0$ o $v_i^{\leftarrow} = 0$) porque es dependiente de v_i^{net} . Otra definición que expresa la hipótesis de la irreversibilidad viene dada como:

$$v_i^{xch} = \min(v_i^{\rightarrow}, v_i^{\leftarrow}) \quad (V.32)$$

El par $(v_i^{\rightarrow}, v_i^{\leftarrow})$ se puede computar con (v_i^{net}, v_i^{xch}) y viceversa. Por otro lado, debe ser observado que v_i^{xch} es no negativo y no describe cierta dirección neta del flujo.

Usando las hipótesis fisiológicas para v^{xch} en relación a los pasos de las reacciones bioquímicos se puede entonces decir que:

1. Las hipótesis de la irreversibilidad se hacen generalmente cuando se saben las grandes diferencias de la energía libre de la situación *in vitro* (*i.e.* $\Delta G^0 \gg 0$). Por otro lado, la irreversibilidad se debe asumir siempre para los flujos que incorporan o que salen del sistema. La irreversibilidad del paso i puede ser expresada por $v_i^{xch} = 0$.
2. El rápido equilibrio es la contrapartida de la irreversibilidad. En este caso la reacción delantera y su revés ocurre con una alta tasa comparada con la tasa neta del flujo: $v_i^{xch} \gg v_i^{net}$.
3. Es útil para propósitos de simulación estudiar el efecto de la variación de v_i^{xch} , fijando v_i^{xch} a valores arbitrarios.

En las simulaciones, v^{net}, v^{xch} deben ser parametrizadas en el sistema coordinado donde v^{xch} denota el vector de todos los flujos del intercambio.

Las ecuaciones estequiométricas y las hipótesis consideradas para los flujos del intercambio imponen restricciones lineales ante estas coordenadas. La representación de estas restricciones pueden ser obtenidas a través la ecuación estequiométrica V.19 a una ecuación lineal más general restringida, dada por:

$$N^{cnstr} \begin{pmatrix} v^{net} \\ v^{xch} \end{pmatrix} = c^{cnstr} \quad (V.33)$$

V.3.1.2.5 Ecuaciones de medidas experimentales

Incorporar valores medidos experimentalmente (RMN y MS) requiere la introducción de las ecuaciones extras, denominadas “ecuaciones de medida”. Estas ecuaciones tiene la forma matricial, donde la matriz medida M expresa que componentes de un vector debe ser medido. Los vectores ε denotan los términos distribuidos del ruido $N(0, \Sigma)$ con esperanza 0 y matrices covarianza Σ ; esta matriz es siempre cuadrada, simétrica y definida positivamente; la raíz cuadrada $\sqrt{\Sigma}$ puede ser computada (usando la factorización de Cholesky) satisfaciendo la condición $\sqrt{\Sigma}^T = \sqrt{\Sigma} = \Sigma$ (Wiechert *et al.*, 1995; Wiechert *et al.*, 1997). Generalmente las matrices Σ son matrices diagonales, es decir, se asumen medidas independientes. La notación viene dada por:

$$\begin{aligned} \text{Ecuación de flujos medidos:} & \quad w = M_w \cdot v^{net} + \varepsilon_w \\ \text{Ecuación de átomos marcados o} & \quad y = M_y \cdot x + \varepsilon_y \\ \text{isotopómeros medidos:} & \\ \text{Ecuación del tamaño del } pool & \quad Y = M_Y \cdot X + \varepsilon_Y \\ \text{medido:} & \end{aligned} \quad (V.34)$$

La ecuación de medida del tamaño del *pool* se requiere solamente en el caso que el sistema esté en estado isotopicamente no estacionario. En esta situación la ecuación de medida para la marcación se debe ampliar además por un parámetro que considera del tiempo transcurrido.

V.3.1.2.6 Estimación de flujos

Cuando la red metabólica estudiada presenta elevada complejidad, el número de parámetros desconocidos resultante será demasíadamente grande; para esta situación la determinación de flujos metabólicos no se puede obtener a través de las Ecuaciones V.30 o por métodos gráficos (apartado V.1.3.2.3); la determinación de éstos flujos está condicionada a

través de una aproximación por regresión no lineal usando estimación por desvíos cuadrados. Sabiendo que x es siempre una función de v (Ecuación V.23), esta estimación puede ser solucionada a través de programación no lineal, como sigue (Wiechert *et al.*, 1995; Wiechert *et al.*, 1997):

$$\begin{aligned} \text{minimice} \quad & k(v) = \left\| w - M_v \cdot v^{net} \right\|_{\Sigma_v}^2 + \left\| y - M_x \cdot x(v) \right\|_{\Sigma_x}^2 \\ \text{restringido por} \quad & N^{cnstr} \begin{pmatrix} v^{net} \\ v^{xch} \end{pmatrix} = c^{cnstr} \end{aligned} \quad (\text{V.35})$$

$$\text{y} \quad v \geq 0$$

donde $\|\xi\|_{\Sigma}^2 = \xi^T \cdot \Sigma^{-1} \cdot \xi$ denota la norma del peso al cuadrado que corresponde a matriz covarianza Σ . Como disponemos solamente de flujos medidos, la determinación de flujos por estimación lineal a través de datos de flujos extracelulares puede ser obtenida directamente usando el teorema Gauss-Markov.

En casos que el sistema se encuentra en estado isotópicamente no estacionario, todos los tamaños del *pool* pueden ser medidos, debiendo también sean estimados a través de los datos medidos, es decir $k(v)$ en la Ecuación V.35 se convierte en $k(v; X)$ y la suma de los cuadrados tiene que ser extendido por el término $\|Y - M_x \cdot X\|_{\Sigma_x}^2$.

La solución de la Ecuación V.35 puede ser resuelta explícitamente como descrito en el apartado V.1.3.2.3. Sin embargo, la solución numérica general para la estimación de flujos plantea varios problemas como:

1. Las restricciones lineales tienen que ser resueltas. Esto se puede hacer con técnicas numéricamente estables apropiadas para la factorización de la matriz como por ejemplo el empleo de la metodología de descomposición de valores singulares (SVD).
2. Los flujos de intercambio (Ecuación V.35) son solamente las funciones diferenciales parciales. Este problema puede ser resuelto a través del algoritmo simplex Nelder Mead, el cual necesita de un largo tiempo de computación.
3. La restricción de la desigualdad $v \geq 0$ tiene que ser obedecida terminantemente. Una solución para superar este problema es

simplemente sustituir v_i por algún λ_i^2 que sea siempre positivo y minimizar sobre λ_i . Sin embargo, esto disminuirá perceptiblemente la estabilidad numérica.

4. En trabajos más antiguos, la minimización de $k(v)$ se encontró manualmente por ensayo y error. Un algoritmo sucesivo de la programación cuadrática que puede manejar simultáneamente las restricciones fue desarrollado por Siefke en 1995.
5. En muchos casos la complejidad computacional del problema de estimación de flujos en sistemas no estacionario ha sido superada por las simplificaciones en la red metabólica.

V.3.1.2.7 *Análisis estadística*

El análisis estadístico tiene como objetivo verificar la calidad de los datos medidos y de las estimaciones obtenidas. Varios métodos estadísticos establecidos pueden ser aplicados a este propósito (Wiechert *et al.*, 1997):

- La capacidad del modelo de describir el conjunto de datos medidos puede ser probada.
- Las redundancias en el conjunto de datos medidos se pueden utilizar para detectar los errores de medida.
- El análisis de sensibilidad del modelo de salida con respecto a los parámetros de la entrada se utiliza para estudiar su influencia.
- La sensibilidad de los parámetros estimados con respecto a las cantidades medidas demuestra cómo las estimaciones son influenciadas por las medidas simples.
- La matriz covarianza aproximada para los parámetros estimados se puede computar y a través del parámetro aproximado, las regiones de confianza pueden ser construidas.

Todas las sensibilidades así como la matriz covarianza se pueden computar cuando la derivada de $x(v)$ de la Ecuación V.21 con respecto a v

sea conocida. Puede ser computado por la diferenciación implícita como sigue:

$$0 = \left(\sum_i v_i \cdot P_i \right) \cdot \frac{\partial x}{\partial v_j} + (x^{inp} \cdot P_j \cdot x + P_j^{inp}) \quad (V.36)$$

Así $\partial x / \partial v$ se puede computar usando la misma factorización de la matriz que se ha utilizado para computar $x(v)$ en la Ecuación V.23. Una fórmula implícita similar de la diferenciación puede ser utilizada para un sistema de isotopómeros (Ecuación V.29).

El análisis de sensibilidad es solamente una aproximación al análisis estadístico porque el modelo originalmente no lineal es substituido por su linealización. Sin embargo, esta aproximación puede ocasionar errores de extrapolación, principalmente cuando son estimados flujos de intercambio. En casos cuando son aplicados métodos gráficos, las regiones no lineales de confianza se pueden derivar inmediatamente de la representación gráfica.

V.3.1.2.8 Simulación de experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C

La simulación de experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C es un proceso relativamente complejo, pues necesita de un procedimiento matemático adecuado; el modelo matemático resultante que describe la dependencia entre los flujos intracelulares y la distribución de las fracciones isotopoméricas en el estado estacionario necesita de una ecuación de balance para cada isotopómero en el sistema. En general, el sistema de ecuaciones son no lineales. Otro hecho relevante ocurre en relación al número de isotopómeros posibles: en moléculas compuesta por grandes cadenas de átomos de carbono, como por ejemplo el corismato hay la posibilidad de 1.024 isotopómeros, lo que conlleva también un tiempo de simulación relativamente largo (Wiechert, 2001).

Varios algoritmos iterativos fueron desarrollados con el objetivo de solucionar los sistemas de ecuaciones no lineales; se distinguen por su grado de especialización, por su modelización matemática, facilidad de empleo, facilidad de manejar el software y el funcionamiento de los algoritmos. Uno

de los primeros algoritmos descritos en la bibliografía fue desarrollado por Schmidt & Isaacs (1995); este algoritmo, llamado de “algoritmo evolucionario”, consiste en técnicas de optimización directas, es decir, no utilizan cálculo de derivadas; este algoritmo genera nuevas estimativas de los flujos independientes a cada iteración, hasta que un conjunto de flujos satisface a un determinado criterio; este criterio puede ser, por ejemplo, un error máximo. Schmidt *et al.* en 1997 utilizando el software Matlab/Simulink, consiguen por la primera vez la determinación de los parámetros necesarios para la simulación de la distribución de isotopómeros en el metabolismo de *E. coli*. Otros estudios relevantes, realizados por Sauer *et al.* (1997) y Klapa *et al.* (1999) se basan en la resolución de fórmulas explícitas para obtener la determinación de flujos metabólicos; sin embargo, se limitan a cierta topología de la red y además no hace el uso la información completa de las medidas experimentales. Por otro lado, estas metodologías son simples y pueden ser aplicadas muy rápidamente. Wiechert *et al.* en 1999, propusieron una solución analítica basada en cálculos matriciales y finalmente en el año de 2001, un grupo de investigadores liderado por Wiechert desarrollan un software que basado en sistemas matriciales, que resuelve las ecuaciones no lineales. El software denominado *¹³C-Flux*, genera automáticamente las ecuaciones modelo, permitiendo el análisis de la simulación y sensibilidad, y los cálculos de las estimaciones del flujo se evalúan estadísticamente. Este software se desarrolló en el sistema operativo de la plataforma Linux (Wiechert *et al.*, 2001).

También se han desarrollado algunas metodologías basadas en procedimientos de estimación directas de flujos (*i.e.* no iterativo), entre las cuales merece destacar las propuestas por Sauer *et al.*, 1997 y Klapa *et al.*, 1999 (citados en Wiechert, 2001). El procedimiento se basa en la derivación de fórmulas explícitas simples a través de ecuaciones de balance de isotopómeros en relación a los flujos intracelulares con el objetivo de obtener una tentativa de medidas cuantitativas. Este método presenta varias limitaciones como el tamaño de la red metabólica y ciertos tipos de experimentos de marcaje.

V.3.2 Estudio experimental

Dadas las limitaciones de las metodologías anteriormente usadas, particularmente en el MFA con restricciones de RMN, donde el uso de glicerol nos reduce críticamente el número de restricciones respecto al uso de glucosa como sustrato, se consideró la aplicación de una metodología distinta, de ^{13}C -MFA, basada en LC-MS/MS. El presente estudio investiga su aplicabilidad a nuestro modelo de estudio, comparándola con la metodología usada hasta ahora e intentando combinar los datos de marcaje obtenidos mediante RMN y MS

Experimentalmente, se partió del caso más sencillo: un cultivo operado en continuo usando glicerol como única fuente de carbono, a baja velocidad de crecimiento (es decir, limitado por carbono). En el caso de marcaje fraccional de aminoácidos proteínogénicos (análisis METAFoR, Szyperski, 1995), el experimento de marcaje se hace por 1 tiempo de residencia y se considera que la incorporación de ^{13}C a la proteína celular sigue una cinética de primer orden (Solà *et al.*, 2004). Para el ^{13}C -MFA, se determinaron los patrones de marcaje en metabolitos libres. Para asegurar que el estado estacionario isotópico (no solo metabólico) del sistema, el marcaje isotópico se realizó durante 4 tiempos de residencia, en los que se fue tomando muestra en cada estado estacionario con el fin de poder determinar a partir de que momento se podía considerar el estado estacionario isotópico. Para diseñar qué estrategia de marcaje (tipo de sustrato marcado) daría más información, se realizó hecha una simulación del experimento de marcaje. Paralelamente, también se realizó el análisis METAFoR en el mismo cultivo, para comprobar que la cinética de primer orden de incorporación de ^{13}C a biomasa se cumple.

V.3.2.1 Metodología computacional y construcción y modificaciones de la red metabólica

En este apartado se describe el software y la metodología utilizada para la simulación y optimización con el objetivo de maximizar la información obtenida a partir de los experimentos de marcaje isotópico. Así pues, dentro de las limitaciones experimentales y del programa utilizado, se propuso una red metabólica más sencilla con el objetivo de verificar experimentalmente la distribución de flujos en la vía de las pentosas fosfato en células creciendo sobre glicerol a baja velocidad de crecimiento, bajo condiciones de limitación por carbono. La construcción simplificada de la dicha red viene condicionada por los datos experimentales disponibles, ya que son necesarios datos de flujos metabólicos iniciales para que se puedan realizar los estudios de optimización y simulación de distribución del marcaje a través de la red metabólica.

V.3.2.1.1 ^{13}C -Flux

^{13}C -Flux es un programa desarrollado por un grupo de investigadores de la Universidad de Siegen, Metabolic Explorer GmbH e Instituto de Biotecnología de Jülich en Alemania.

Este software fue desarrollado bajo el sistema operacional Linux y utiliza métodos de objetivos orientados y herramientas CASE (Computer-Aided Software Engineering). *^{13}C -Flux* es un gran sistema de software que consiste en cerca de 100 clases de C++ (Wiechert *et al.*, 2001). Los pasos para su funcionamiento son:

V.3.2.1.1.1 Interfaz de la hoja de cálculo

^{13}C -Flux utiliza como entrada de datos una hoja que viene en formato específico denominado FTBL (Flux-TaBle-File); este archivo utiliza un esquema tabular donde son añadidos los siguientes datos:

- 1) Red metabólica y transición de átomos de carbono;

- 2) Especificación de la composición del sustrato;
- 3) Especificación de los flujos libres y valores de entrada para la simulación;
- 4) Restricciones de igualdad y desigualdad de los flujos netos;
- 5) Restricciones de igualdad y desigualdad de los flujos de intercambio;
- 6) Flujos netos extracelulares medidos directamente;
- 7) Datos de ^1H -RMN;
- 8) Datos de ^{13}C -RMN;
- 9) Datos de MS;
- 10) Otros datos de marcaje relevante.

V.3.2.1.1.2 *Arquitectura del software*

La arquitectura general del sistema esta presentada en la Figura V.14 y tiene como principales pasos:

- 1) Una vez obtenido los datos de entrada (input), el primer paso es verificar los errores. El programa *13C-Flux* puede detectar cerca de 50 errores diferentes, como por ejemplo la inconsistencia de la red metabólica o el número de átomos de carbono. Los errores son presentados con su posición detallada en la hoja de balance;
- 2) Si la entrada está libre de errores, se traduce a la estructura de datos jerárquica XML (**eXtensible Markup Language**) que se puede procesar fácilmente por el generador subsiguiente de la red;
- 3) Este generador produce todas las matrices y vectores necesarios para realizar los cálculos a través de algoritmos numéricos;

- 4) Los resultados obtenidos son presentados en un archivo de texto.

También cabe destacar que mientras que los datos de entrada proveen de un ambiente bien-estructurado de la hoja de balance, el conjunto de herramientas no funciona actualmente como un *loop* cerrado. Esto significa que todos los procedimientos tales como simulación, diseño y evaluación de los datos actualmente están puestos en ejecución como programas separados, los cuales producen un archivo de texto que contiene todas las informaciones relevantes. Este archivo de texto se debe procesar más a fondo por el usuario.

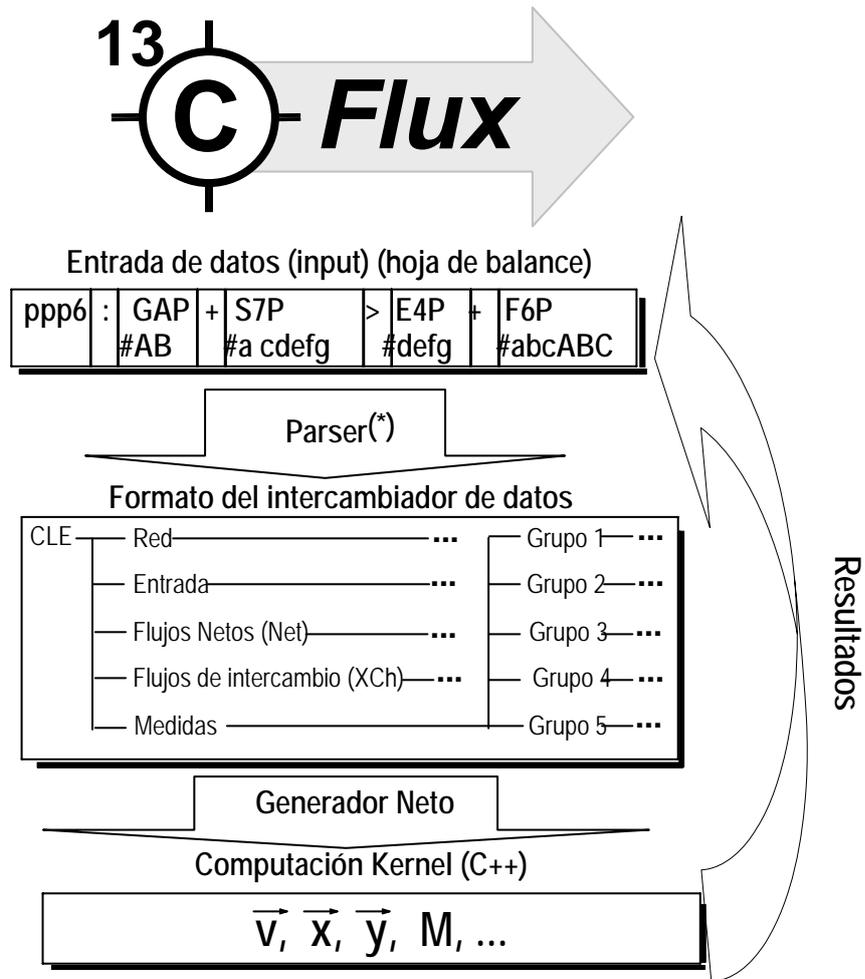


Figura V.14 Arquitectura del software *13C-Flux*. En el cuadro superior la red, la mezcla de entrada, las hipótesis de los flujos y las medidas experimentales que proveen en un sistema de hojas de balance. Esta información es comprobada para saber si hay errores y se traduce a un formato de intercambio de datos jerárquico. Entonces la red compuesta por los isotopómeros se genera con todos los vectores y matrices requeridos para formular las ecuaciones modelo. Finalmente, los resultados se transfieren de nuevo al nivel superior.

Referencia: Wiechert *et al.*, 2001.

(*) El termino Parser significa un programa computacional (o solamente un componente de un programa) que sirve para analizar la estructura gramatical de un input, que son segmentos del texto o símbolos que pueden ser manipulados (pt.wikipedia.org/wiki/Parser).

En este trabajo, se utilizó la versión 20050329 del programa *13C-Flux* en el sistema operativo SUSE Linux 10.1.

V.3.2.1.2 Red metabólica

La red metabólica utilizada para el estudio de optimización y simulación de experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C fue construida con base en la red metabólica descrita en el Capítulo IV (apartado IV.2); los cambios en la red metabólica fueron introducidos principalmente en consideración de la limitación del software utilizado y los datos experimentales disponibles. Se usaron tres variantes o modelos de red, que se distinguen el uno del otro porque van incluyendo de forma parcial o total las modificaciones que se especifican a continuación. Las reacciones fueron descritas tal y como se describe en el apartado V.3; se presentan en la sección de anexos, apartado A.II.3.

Así, la red metabólica original descrita en el Capítulo IV (apartado IV.2) se simplificó con base a las siguientes consideraciones: *i*) el substrato está constituido de una mezcla isotopomérica de glicerol y los enzimas responsables de las reacciones de la vía de asimilación de metanol están inactivos; *ii*) no se consideraron los cofactores NAD(P)H en todas aquellas ecuaciones de la red donde intervenían; *iii*) la reacción de asimilación de oxígeno no fue considerada en la red, pues la metodología utilizada solo utiliza transiciones de átomos de carbono, implicando la eliminación de las ecuaciones correspondientes a la fosforilación oxidativa; *iv*) las reacciones correspondientes a la vía fermentativa, es decir formación de acético y etanol no fueron consideradas en este modelo, ya que, según los datos experimentales disponibles (Solà, 2004), el metabolismo de *P. pastoris* creciendo en glicerol como fuente de carbono es esencialmente respiratorio, con la producción de acético y etanol mínima o nula; *v*) las reacciones de transporte de los metabolitos ACCOA y AKG fueron eliminadas, debido las limitaciones del método experimental utilizado, ya que la técnica de LC-MS no permite distinguir entre el *pool* mitocondrial y el citosólico de los metabolitos de la red presentes en estos dos compartimentos celulares (ello

debido a la menor información posicional de los átomos ^{13}C que se obtiene con LC-MS); *vi*) aunque los metabolitos piruvato y oxaloacetato estén presentes en la mitocondria y en el citoplasma, el *pool* de piruvato mitocondrial y citosólico fue considerado como un único *pool* pues el análisis de espectrometría de masas no los distingue y el oxaloacetato no fue medido experimentalmente por ser inestable; *vii*) fue añadida una ecuación de gluconeogénesis correspondiente a la formación de PEP a partir de OAA (*emp8*); *viii*) fueron añadidas tres nuevas ecuaciones en el ciclo de los TCA, la primera corresponde a la reacción de isomerización del citrato a isocitrato (*tcc3*); la segunda ecuación corresponde a la reacción de formación de succinil coenzima A (SUCCOA) (*tcc5*) que posteriormente es convertido a succinato (*tcc6*); la tercera reacción corresponde la reacción de entremezcla (*scrambling reactions*) de succinato a fumarato (*tcc7a* y *tcc7b*), el cual es posteriormente convertido a malato mediante una reacción de entremezcla (*tcc8a* y *tcc8b*); *ix*) con base a los datos de marcaje isotópico potencialmente obtenibles, los metabolitos citrato y isocitrato y ribulosa-5'-fosfato y xilulosa-5'-fosfato fueron considerados como un único *pool* de citrato/isocitrato y ribulosa/xilulosa-5-P, respectivamente *x*) en un modelo de red posterior (Modelo 3), también se incluyó las rutas la biosíntesis de algunos aminoácidos (sólo aquellos para los cuales se pudo obtener datos experimentales de marcaje isotópico) a partir de sus precursores. La Figura V.15 ilustra las tres variantes del modelo de red metabólica modificada; la estequiometría de reacciones implicadas en cada vía metabólica se encuentran descritas en la sección de anexos, apartado A.II.3.

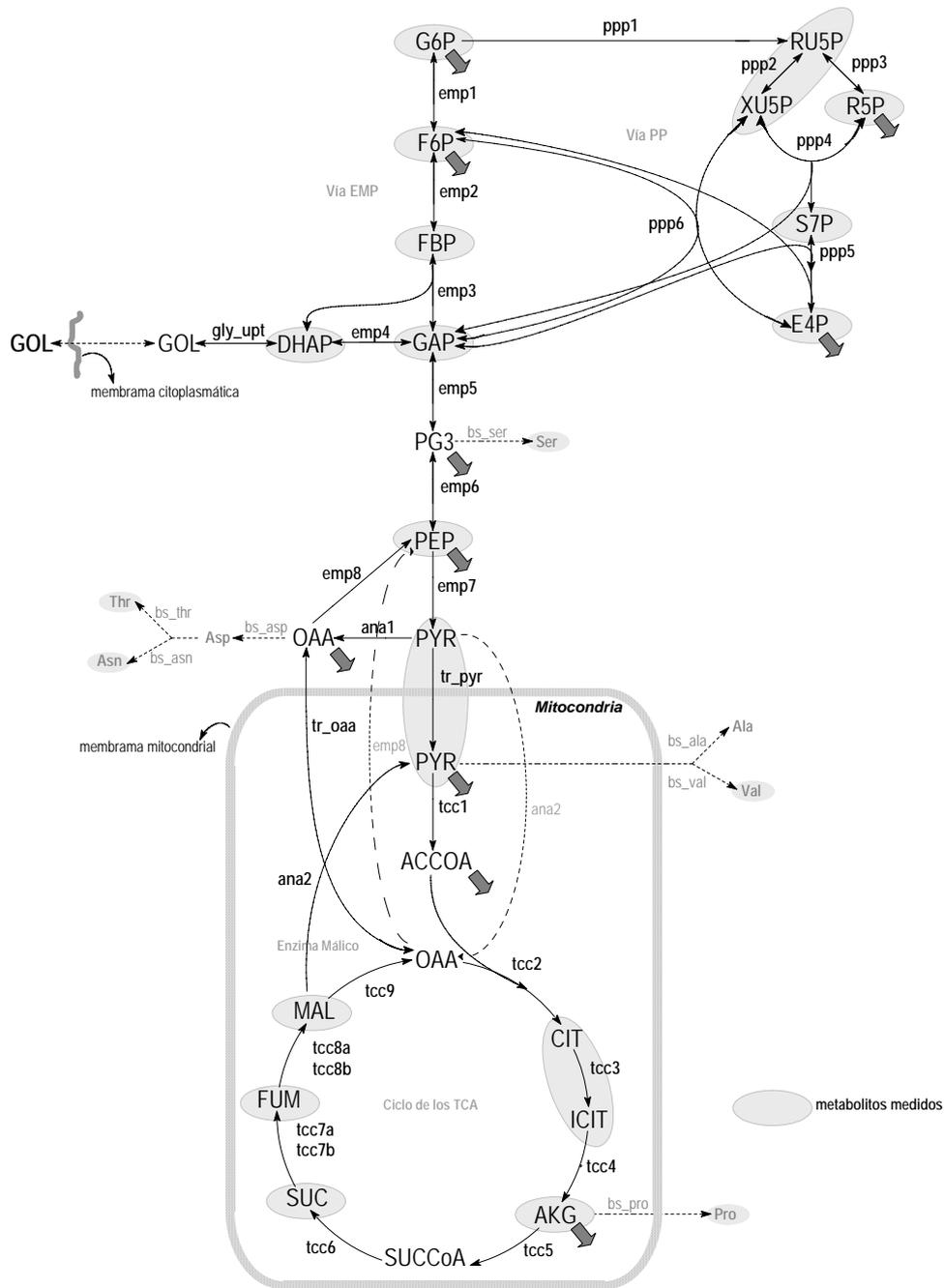


Figura V.15 Red metabólica modificada utilizada en los cálculos de flujos metabólicos a través de simulación de experimentos con marcaje isotópico de ^{13}C .

donde: representa los metabolitos o *pool* de metabolitos medidos experimentalmente por LC-MS/MS, las flechas en puntilleadas indican las reacciones utilizadas en otros modelos (Modelo 2 o Modelo 3).

Las flechas en gris representan los metabolitos precursores para la síntesis de biomasa.

V.3.2.1.3 Metodología computacional

En este apartado se describe los pasos necesarios para la optimización y simulación de la red metabólica descrita anteriormente. Las reacciones y transiciones de átomos implicados en cada reacción, los datos de flujos metabólicos y de la composición isotopomérica iniciales fueron escritas en un archivo de entrada en el formato ftbl que posteriormente se verificó mediante el programa *13C-Flux* para detectar posibles errores de sintaxis, errores en relación a designación del flujo (si este es libre, restringido o dependiente). A partir de este análisis se propuso una estrategia computacional de marcaje isotópico que posteriormente fue llevada a cabo en el laboratorio.

V.3.2.1.3.1 Creación del archivo de entrada

El procedimiento para la creación del archivo para la optimización y simulación de experimentos con ^{13}C puede ser dividido en 4 pasos:

a) Entrada de datos de la red metabólica

El primer paso para la optimización y simulación de flujos metabólicos consiste en poner los datos relacionados con la red metabólica investigada en un formato de archivo ftbl (Figura V.16(a)). En el primer bloque se describen las reacciones de la red metabólica; cada reacción debe tener un nombre único, como por ejemplo: *ppp1* (que corresponde al paso 1 de la vía de las PP). Una reacción puede tener el máximo de 2 sustratos (denominados educts) y 2 productos. Los sustratos y productos también deben tener nombres únicos. En la fila debajo de cada metabolito deben indicarse el número de átomos de carbono que componen cada metabolito; cada átomo de carbono es representado por una letra (conforme lo descrito en el apartado V.3). Cada átomo de carbono del sustrato tiene que ser parte de un producto. Un solo carbono no puede estar en más de un producto. Si un átomo de carbono puede ser incorporado diferentemente en un determinado conjunto de reacción, ambas las reacciones tienen que ser

escritas diferentemente (reacciones de entremezcla). Esto tiene que ser considerado más adelante en la sección de igualdades.

b) Designación de los flujos de intercambio

El próximo bloque consiste en poner todos los nombres de las reacciones de la red y asociar si el flujo correspondiente está restringido (C), libre (F) o dependiente (D) (Figura V.16(b)). Si el flujo está restringido o libre necesitan que se les designe un valor de entrada, ya que serán utilizados como puntos de partida para la simulación y para calcular los flujos dependientes. Los flujos restringidos son valores fijos y no son cambiados, mientras que los flujos libres y los dependientes serán ajustados durante la simulación. Para cada reacción que compone la red se tiene que considerar un flujo de intercambio. Los flujos de intercambio pueden tener un valor entre 0 y 1. Los flujos con un valor de 0 o próximo de 0 se consideran como unidireccionales.

c) Igualdades

En este bloque se pueden entrar relaciones que existan entre diferentes reacciones de la red; por ejemplo, cuando en una reacción la distribución o partición de carbonos puede ocurrir de dos maneras distintas (reacciones de entremezcla), o bien cuando se conoce o se quiere fijar el cociente entre dos reacciones (Figura V.16(c)).

d) Datos experimentales

En la sección denominada *Flux Measurements*, se entran los flujos medidos directamente, como por ejemplo el flujo de asimilación de glicerol y formación de CO₂. La distribución del sustrato marcado se entra en la sección correspondiente a la marcación de entrada (*label input*), (Figura V.16(d)); la composición del sustrato con y sin marcaje, la relación entre marcado y no marcado, se entra en la sección *Flux Measurements*. Finalmente, los resultados de las medidas de MS pueden ser incorporados

en el bloque denominado *Label Measurements*. Todos los grupos de cumómeros (isotopómeros de un dado metabolito con el mismo número de carbonos marcados) de un metabolito medido y sus isotopómeros correspondientes, además de su porcentual y desviaciones, también son entrados en este bloque (Figura V.16(e)). Antes de la realización de los experimentos en laboratorio los datos simulados se pueden entrar con la finalidad de verificar si la red metabólica y los datos simulados son coherentes.

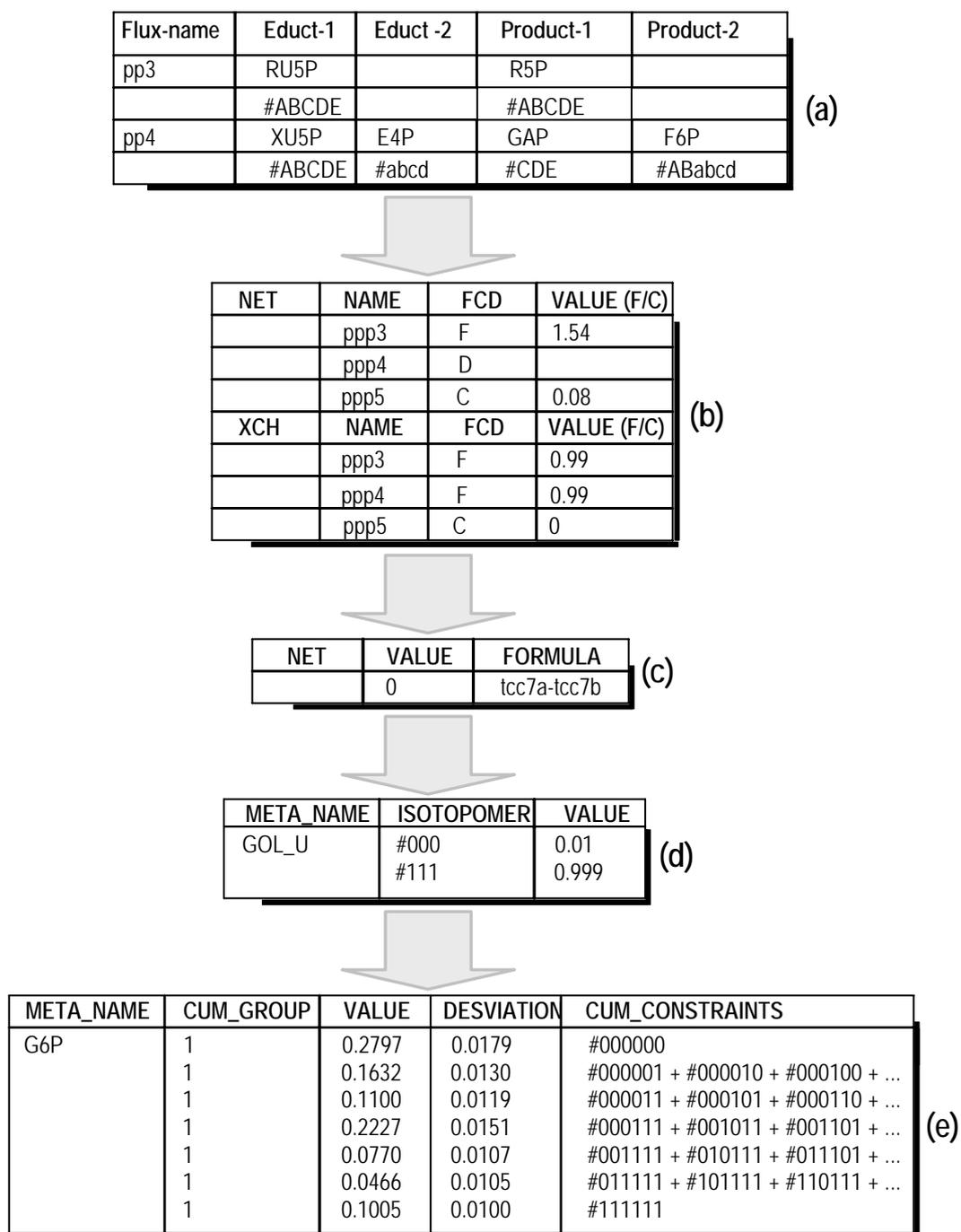


Figura V.16 Archivo FTBL del software *13C-Flux*.

donde: (a) reacciones metabólicas; (b) flujos netos y de intercambio; (c) Igualdades; (d) entrada del datos de marcaje del sustrato; (e) datos de marcaje experimentales.

Referencia: Adaptado del manual de instalación del software *13C-Flux* y de los datos obtenidos en este trabajo.

V.3.2.1.3.2 Verificación del archivo de entrada

A partir de los procedimientos descritos anteriormente se elabora el fichero de entrada, el cual debe ser verificado para comprobar que no contiene errores de sintaxis y corregirlos en caso que existan (comando: Ftbl2Flx). En el paso siguiente se comprueba si la red metabólica y datos entrados constituyen un sistema indeterminado (comando: CumoNet). A través de este comando el programa crea un archivo donde se especifica el número de flujos que deben ser fijados como libres o restringidos. Este archivo también incluye una lista de los flujos sugeridos para sean fijados. Si los flujos son redundantes tienen que ser fijados como dependientes. Si hay un exceso o falta de flujos libres y restringidos el programa no realizará la simulación. Cuando el programa puede resolver el sistema con los flujos dados inicialmente, el resultado total de los flujos es cero; si no es así, se notifica un error y se especifica la desviación. En este caso, los flujos libres tienen que ser ajustados manualmente hasta el resultado sea igual a cero. Antes de iniciar la simulación se tiene que comprobar la confiabilidad del sistema (comando: EstimateStat); el resultado de este análisis estadístico proporciona una lista de flujos que tienen que ser fijados como restringidos para garantizar una simulación confiable. El resultado del análisis estadístico es el último paso previo para la optimización y simulación de la red metabólica.

V.3.2.1.3.3 Estrategia de marcaje y simulación

El último paso antes de la realización de los experimentos en laboratorio, consiste en testar la red metabólica con relación principalmente a la mejor composición del substrato, en nuestro caso concreto, la composición isotopomérica de glicerol. En este estudio se consideró tres tipos de composición (glicerol sin marcaje, glicerol con los tres átomos de carbono marcados uniformemente ([U- $^{13}\text{C}_3$]glicerol), y glicerol con uno de los átomos de carbono específicamente marcado). Estos tres substratos fueron comparados a través de la metodología de análisis de superficie de respuesta en forma triangular (comando: EdTriangle). El programa *^{13}C -Flux* compara

la información del contenido de un experimento con estas mezclas y lo expresa en criterios a través de la metodología *D-optimality* (Möllney *et al.*, 1999). La etapa posterior consiste en la simulación (comando: CoolEvoAlpha) con los datos finales del experimento obtenidos en la etapa anterior. El residuo fue calculado de acuerdo con la Ecuación V.37, donde el mejor valor obtenido es cuando los flujos simulados están próximos a los datos experimentales. El residuo depende de los flujos libres asumidos, de las medidas experimentales, precisión de cada instrumento y de las mezclas del substrato. La simulación tiene que ser terminada manualmente y los flujos óptimos pueden ser extraídos del archivo que contiene el resultado y visualizados en Matlab. Se calcula la desviación estándar para los flujos libres y dependientes y sus valores están influenciados por el número de repeticiones de los experimentos, posición de marcaje del átomo de carbono y exactitud de las medidas experimentales.

$$k(v, x) = \sum_{i=1} \left(\frac{w - M_w v}{\sigma_{w,i}} \right)^2 + \sum_{i=1} \left(\frac{y - M_y x}{\sigma_{y,i}} \right)^2 \quad (\text{V.37})$$

donde: w y v son los flujos medidos y simulados; y y x representan las fracciones marcadas medidas y simuladas; M representa la matriz medida.

V.3.2.2 Resultados experimentales y computacional

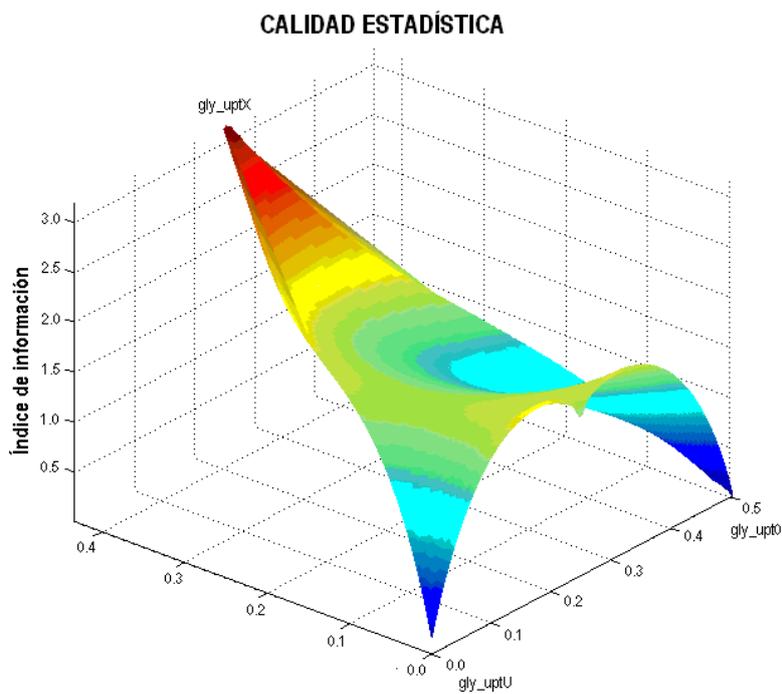
La próxima etapa de este trabajo consistió en analizar los primeros resultados computacionales, más concretamente los resultados obtenidos por la optimización de los datos iniciales de la red metabólica y a través de los resultados obtenidos fue propuesta una estrategia de marcaje del substrato que posteriormente fue llevada a cabo en laboratorio. Con los resultados obtenidos de los experimentos de fermentación y análisis por LC-MS de los metabolitos intermediarios y de aminoácidos libres, se calcularon los flujos metabólicos con base a tres variantes de modelos de red metabólica derivados de la red inicialmente presentada en el apartado V.3.2.1.2. Paralelamente, se realizaron análisis por ^{13}C -RMN de los aminoácidos proteinogénicos para realizar el análisis de flujos metabólicos con

restricciones derivadas del análisis METAFoR con el objetivo de comparar los resultados obtenidos por ambas metodologías.

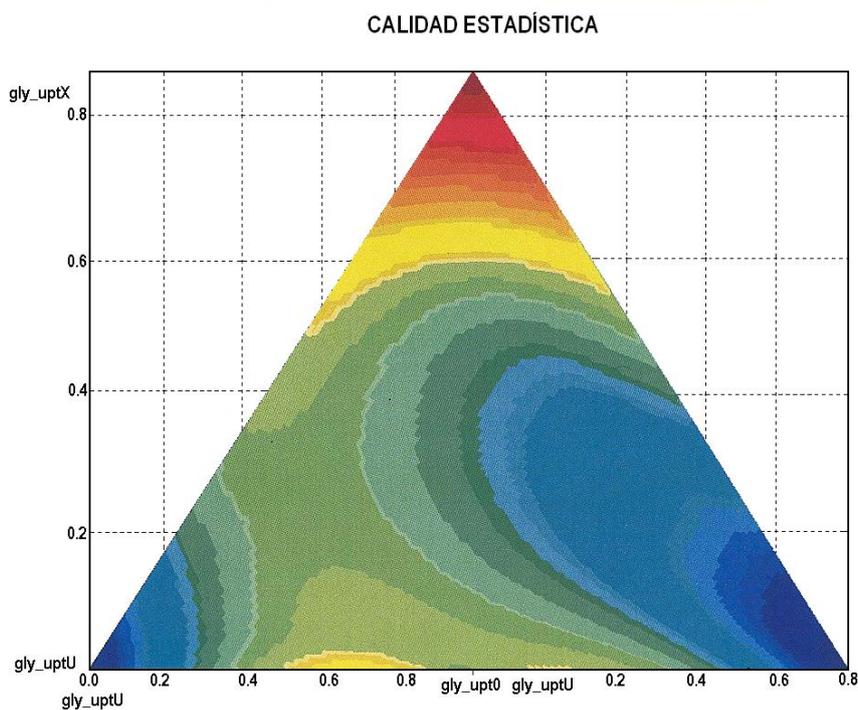
V.3.2.2.1 Selección & Optimización del substrato (Estrategia de marcaje)

Se seleccionó la mejor estrategia de marcaje del substrato con base a la metodología descrita en el apartado V.3.2.1.3.3; el contenido en información de los experimentos de marcaje simulados se compararon con el que se hubiera obtenido con base a un experimento de referencia realizado con una mezcla de glicerol 10% marcado uniformemente y 90% no marcado (mezcla usada en experimentos de marcaje realizados anteriormente por A. Solà (Solà *et al.* (2004) y Solà *et al.* (2007)). El resultado obtenido se expresó en un diagrama triangular en tres dimensiones (superficie de respuesta) y en dos dimensiones (curvas de nivel), (Figura V.17(a) y (b)). El resultado de la comparación de diferentes mezclas de entrada demostró que el experimento con glicerol 100% marcado en el primer átomo de carbono proporcionaría 3 veces más información que con la estrategia estándar basada en el marcaje uniforme del 10% de la fuente de carbono. Sin embargo, esta estrategia de marcaje resultaría en un experimento económicamente inviable.

El uso de un substrato menos marcado causa una rápida disminución en el contenido en información. No obstante, el contenido de información no disminuye constantemente conforme a la disminución del grado de marcaje, sino que muestra dos picos adicionales: La Figura V.18 demuestra que una mezcla de entrada con el 30% de glicerol marcado uniformemente nos proporciona 1,5 veces más información que la mezcla utilizada en los experimentos de A. Solà (Solà *et al.*, 2004), mientras que un experimento utilizando glicerol 70% marcado uniformemente nos proporcionaría incluso menos información. Considerando el elevado costo económico del ^{13}C -glicerol, se decidió realizar un experimento con una mezcla de glicerol 30% marcado uniformemente y glicerol 70% como mejor compromiso, ya que obtendríamos una mejora en la información obtenida sin incrementar excesivamente los costos económicos.



(a)



(b)

Figura V.17 Información relativa producida por todas las mezclas de las diferentes posiciones de marcaje, donde gly_uptU: representa glicerol sin marcaje, gly_upt0: glicerol 100% marcado uniformemente ($[U-^{13}C_3]$ glicerol) y gly_uptX: glicerol 100% marcado en el carbono 1 ($[1-^{13}C]$ glicerol). (a) Superficie de respuesta con las tres mezclas; (b) curva de nivel de la superficie de respuesta.

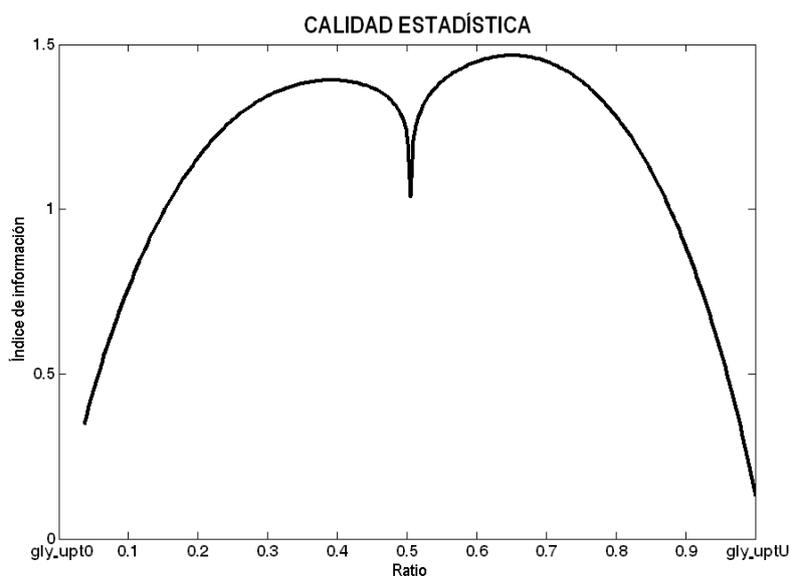


Figura V.18 Diagrama bidimensional comparativo de dos mezclas, el glicerol 100% marcado uniformemente (gly_upt0) contra el experimento de referencia (100% glicerol sin marcaje (gly_uptU)).

V.3.2.2.2 Cultivo en quimiostato y experimento de marcaje

En este apartado se describe los resultados experimentales obtenidos del cultivo operado en quimiostato de *P. pastoris* creciendo en glicerol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. El cultivo y experimento de marcaje fue realizado por Sandra Zinke. Una vez alcanzado el estado metabólico estacionario (después de 5 tiempos de residencia), se inició el experimento con el substrato marcado, de acuerdo con la estrategia de diseño experimental descrito anteriormente.

Las condiciones de cultivo (composición del medio de cultivo, parámetros del quimiostato como pH, temperatura etc.), así como las técnicas analíticas usadas para determinar los parámetros fisiológicos clásicos (concentración de biomasa, de substratos y productos) fue idéntica a la usada por A. Solà (Solà *et al.*, 2004) en sus cultivos en quimiostato y en las réplicas de los mismos realizadas en el presente trabajo (ver Capítulo II).

V.3.2.2.2.1 *Toma de muestras del quimiostato y análisis de parámetros fisiológicos clásicos*

Para la determinación de la biomasa (en peso seco) y de la concentración de sustratos y subproductos mediante HPLC (Solà *et al.*, 2004), se tomaron muestras regularmente durante la fase sin marcaje. Las muestras en la fase de marcaje fueron tomados después de 1, 2, 3 y 4 veces del tiempo de residencia, en las siguientes cantidades: 20 mL para los análisis de RMN, 5 mL para el análisis de LC-MS y 2 mL para medias en HPLC. Para evitar grandes perturbaciones del estado estacionario durante el proceso de marcaje, la biomasa fue determinada a través de la densidad óptica (OD) ya que requiere mucho menos volumen de muestra que el análisis de peso seco. Los datos fisiológicos obtenidos (biomasa, glicerol, acético y etanol) fueron análogos a los obtenidos previamente por A. Solà y en cultivos-réplica realizados en este trabajo. No obstante, debido a un fallo del espectrómetro de masas conectado a la salida de gases del reactor, no se pudieron obtener datos de CER y OUR, por lo que se asumieron las previamente disponibles para el posterior cálculo de flujos metabólicos.

El análisis de metabolitos intermediarios y aminoácidos libres en células de *P. pastoris* mediante cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), el procesado de las muestras de biomasa marcada para análisis de los patrones de marcaje en aminoácidos proteínogénicos mediante ^{13}C -RMN y la determinación del grado de enriquecimiento en ^{13}C del CO_2 se realizó tal y como se especifica en el Capítulo II.

V.3.2.2.3 *Análisis por LC-MS/MS*

V.3.2.2.3.1 *Determinación de la concentración celular de cofactores*

Los tamaños de los *pools* de los cometabolitos NAD(H)^+ , NADP(H)^+ y ATP, ADP y AMP se espera que sean constantes durante en células que se

encuentran en estado metabólico estacionario. La concentración celular de estos cofactores se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$c_{intr} = c_{extr} \frac{V_{extr}}{V_{intr}} = c_{extr} \frac{c_X V_S v_X + V_E + V_N}{c_X V_X v_X} \quad (V.38)$$

donde: V_{extr} y c_{extr} son volumen [mL] y concentración [mg/mL] de la fase inferior de la extracción, V_{intr} y c_{intr} de la fase superior, c_X el peso seco de la biomasa [mg/mL], V_S volumen de muestra [mL], v_X volumen específico de células [mL/g], V_E volumen de extracción [mL] y V_N volumen de neutralización [mL]. Los cálculos se realizaron con base a un volumen celular de $2,65 \cdot 10^{-11}$ mL, estimado por citometría de flujo (M. Maurer, University of Applied Life Science, Viena, 2007).

Los análisis revelaron que *pools* medidos de estos cofactores variaron de manera importante a lo largo de los diferentes tiempos de residencia del experimento de marcaje (Tabla V.6), en desacuerdo con el concepto de estado estacionario metabólico, en el cual la concentración de estos cofactores se mantienen constante. Una posible hipótesis para explicar esta observación es que, a pesar de que las concentraciones extracelulares de sustrato y subproductos y de biomasa fuesen estables, el cultivo no alcanzara el estado estacionario; otra hipótesis se basaría en una posible pérdida de metabolitos durante el proceso de parada del metabolismo (*quenching*) previo a la extracción de los metabolitos celulares. Es decir, que durante la etapa de parada del metabolismo mediante metanol una parte indeterminada de los metabolitos habrían salido al exterior de las células previamente a la etapa de lisis y extracción. Por otro lado, el tiempo entre la toma de la muestra y el *quenching* pueden tener un efecto sobre el metabolismo celular. Wittmann *et al.* (2005), demostraron que tomando una muestra y parando el metabolismo en un tiempo inferior o igual a 5 segundos en una fermentación con la levadura *S. cerevisiae* no alteraron en la distribución de flujos metabólicos del estado estacionario. En nuestro caso, durante la etapa de toma de muestra, la suspensión celular fue tomada del reactor a través de un tubo, mezclándose una cantidad exacta de la suspensión celular con metanol helado; pequeñas variaciones en el tiempo de realización de este paso (o

tiempos superiores a 5 segundos para completar la parada del metabolismo) podrían haber causado errores de medidas.

Otra posible causa de la variabilidad observada en las concentraciones de metabolitos podría estar asociada a posibles oscilaciones sincronizadas con el ciclo celular. Estudios previos (Wittmann *et al.*, 2005) mostraron un comportamiento oscilatorio de las concentraciones de los intermediarios de la glucólisis y ciclo de los TCA. Esta oscilación podría también tener efecto en el estado energético de la célula y variar las concentraciones del *pool* de los cofactores. Sin embargo las variaciones de *pool* de NAD(H)⁺ y de NADP(H)⁺ observadas en este experimento no refleja tal comportamiento cíclico. De todas maneras, la carga energética de adenilato (Tabla V.7) permanece estable en un rango de 0,7 a 0,8. Este valor se considera que corresponde a un estado energético bajo (Plantz *et al.*, 2006). Wiebe *et al.* (2007) observaron que la carga energética de adenilato para *S. cerevisiae* en condiciones aerobias y anaerobias en culturas operando en quimiostato es de 0,83, mientras que Ball & Atkinson, (1975), citado en Wiebe *et al.* (2007), obtuvieron en cultivos operados en discontinuo en condiciones aerobias y anaerobias una carga energética de adenilato de 0,8-0,9, este mismo rango de valores fue obtenido por Mashego *et al.*, (2005), (citado en Wiebe *et al.*, 2007) en cultivos operados en quimiostato en condiciones aerobias.

Tabla V.7. Resultado del pool de cofactores y de la energía de adenilato.

<i>Tempo de residencia</i>	<i>NAD(H)⁺</i> (μM)	<i>NADP(H)⁺</i> (μM)	<i>AMP</i> (μM)	<i>ADP</i> (μM)	<i>ATP</i> (μM)	<i>Adenilato*</i>
1	40,0	10,1	20,4	44,8	154,8	0,8
2	11,9	5,4	17,2	57,2	105,7	0,7
3	4,2	3,7	10,0	21,9	63,3	0,8
4	4,5	3,5	17,6	30,5	65,5	0,7

(*) Calculado de acuerdo con Atkinson & Walton (1967) que viene dada por:
 $(\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP}) / (\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})$

No obstante, las mayores variaciones de concentraciones de metabolitos en términos absolutos tienen lugar durante los tres primeros tiempos de residencia con marcaje ^{13}C ; (es decir, entre el 6º y 9º tiempo de residencia desde el inicio del continuo), mientras que las variaciones encontradas entre el tercer y cuarto tiempo de residencia son mucho menores, lo que podría sugerir que el estado estacionario metabólico – al menos para el metabolismo redox/energético- no se alcanza hasta los 7~8 tiempos de residencia aproximadamente. Cabe destacar que en experimentos recientes (Wiebe *et al.*, 2007) con la levadura *S. cerevisiae* creciendo en quimiostato a $0,1 \text{ h}^{-1}$, se observa que los *pools* de metabolitos del metabolismo central se estabilizan a 30 horas después de una perturbación o cambio en las condiciones de cultivo.

V.3.2.2.3.2 *Determinación y cuantificación de metabolitos del metabolismo central*

Se cuantificaron los siguientes metabolitos del metabolismo intermediario de *P. pastoris* mediante espectrometría de masas: G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, PYR, E4P, *pool* de RU5P/XU5P, R5P, S7P, SUC, MAL, FUM, AKG, *pool* de CIT/ICIT, ACO y PEP. La concentración de glioxilato en las muestras estuvo por debajo del límite de detección, lo que confirma la hipótesis previa (Solà, 2004) de que el ciclo del glioxilato está operativo solo a niveles muy bajos o nulos bajo las condiciones de cultivo utilizadas. En estos análisis no se calcularon concentraciones absolutas de metabolitos sino los porcentajes de los isotopómeros de los diferentes metabolitos. Para algunos de los metabolitos como por ejemplo E4P, RU5P/XU5P, G6P, F6P (glucólisis y ciclo de las PP) y ACO (ciclo de los TCA) se observó que, después de un aumento en el grado de enriquecimiento de ^{13}C durante los dos primeros tiempos de residencia, dichos valores se estabilizaron. En cambio, para otros metabolitos no hay un patrón común claro. Por ejemplo, se registró un aumento en la incorporación sostenida de ^{13}C en la molécula de piruvato en los primeros 3 tiempos de residencia, pero esta tendencia se invirtió en el 4 tiempo de residencia, mientras que para succinato (ciclo de los TCA) y FBP (glucólisis) la concentración de ^{13}C experimentó un aumento

significativo en el primer y segundo tiempo de residencia, para después disminuir durante el 3 y 4 tiempo de residencia (Figura V.20(a)). Además, para algunos metabolitos (MAL, AKG y PEP) no se observaron cambios significativos en patrones de marcaje a lo largo de los 4 tiempos de residencia. Finalmente, cabe destacar la inconsistencia aparente en los patrones de marcaje del PEP, el cual tiene un promedio porcentual de isotopómeros sin marcaje de un 88%, mientras que su precursor GAP y su sucesor PYR tienen un promedio de 53% y 65% respectivamente.

Así pues, de nuevo se observaron parcialmente variaciones importantes en los porcentajes de enriquecimiento de ^{13}C en los metabolitos. La pérdida parcial de metabolitos durante el proceso de *quenching* no permite explicar estas variaciones ya que en este caso no se midieron concentraciones absolutas sino cantidades relativas de estados de marcaje, asumiendo además que los metabolitos enriquecidos con ^{13}C tienen el mismo comportamiento que los metabolitos sin marcaje. Por ello, éstas variaciones en los patrones de marcaje entre tiempos de residencia apoyarían la hipótesis que el experimento no alcanzó el estado estacionario metabólico, es decir que la distribución de flujos a través de la red metabólica (o alguna parte de la misma, por ejemplo el ciclo de los TCA) requeriría más de 5 tiempos de residencia. Además, cabe resaltar que el cultivo para este experimento de marcaje fue realizado en condiciones limitantes de carbono, en el cual el substrato utilizado inicialmente (glicerol) no estaba enriquecido con ^{13}C y después de cierto intervalo de tiempo (5 tiempos de residencia) fue sustituido por un medio con glicerol marcado, por lo que se espera que el *pool* de metabolitos intracelulares alcanzó rápidamente el estado isotópico estacionario, pues el tamaño de dichos *pools* son relativamente pequeños (van Winden *et al*, 2001).

Otra posible explicación de estas pequeñas oscilaciones en los patrones de marcaje, sobretudo en metabolitos del ciclo de los TCA y rutas asociadas sería el hecho que los *pools* de dichos metabolitos fuesen relativamente pequeños, por lo que una degradación parcial de los mismos durante el proceso de extracción podría a su vez resultar en la desaparición de los cumómeros menos abundantes. La inconsistencia entre patrones de

marcaje de metabolitos próximos en la red metabólica (PEP vs GAP y PYR) podría indicar que el modelo de red metabólico asumido es incompleto, o bien existe microcompartimentalización de los *pools* de éstos metabolitos, es decir que el producto de un enzima pasa a la siguiente reacción enzimática sin mezclarse con el resto del *pool* de su especie. Ambos argumentos han sido previamente descritos como posibles fuentes de error en el cálculo de flujos metabólicos basados en experimentos de marcaje isotópico (van Winden *et al.*, 2001).

Por otro lado, el grado enriquecimiento de ^{13}C en el CO_2 osciló entre 12,3% y 16,1%, sin seguir una tendencia específica (15,8%, 13,07%, 16,1% y 12,3% para los tiempos de residencia 1, 2, 3 y 4, respectivamente). El valor promedio fue de $14,32\% \pm 1,77$, con una desviación estándar relativa del 12,4%, la cual revela que el método de cuantificación de la fracción ^{13}C del CO_2 no es muy precisa, seguramente debido al hecho que la cuantificación se realiza respecto a un patrón externo de CO_2 no marcado (la Figura V.19 presenta un ejemplo de los espectros de RMN obtenidos). Cabe señalar que estos valores de enriquecimiento están corregidos para la cantidad de carbonatos experimentalmente determinados en cada una de las muestras. No obstante, los resultados obtenidos y su exactitud sugieren que el grado de enriquecimiento del CO_2 permanece aproximadamente constante a lo largo de los 4 tiempos de residencia del experimento de marcaje.

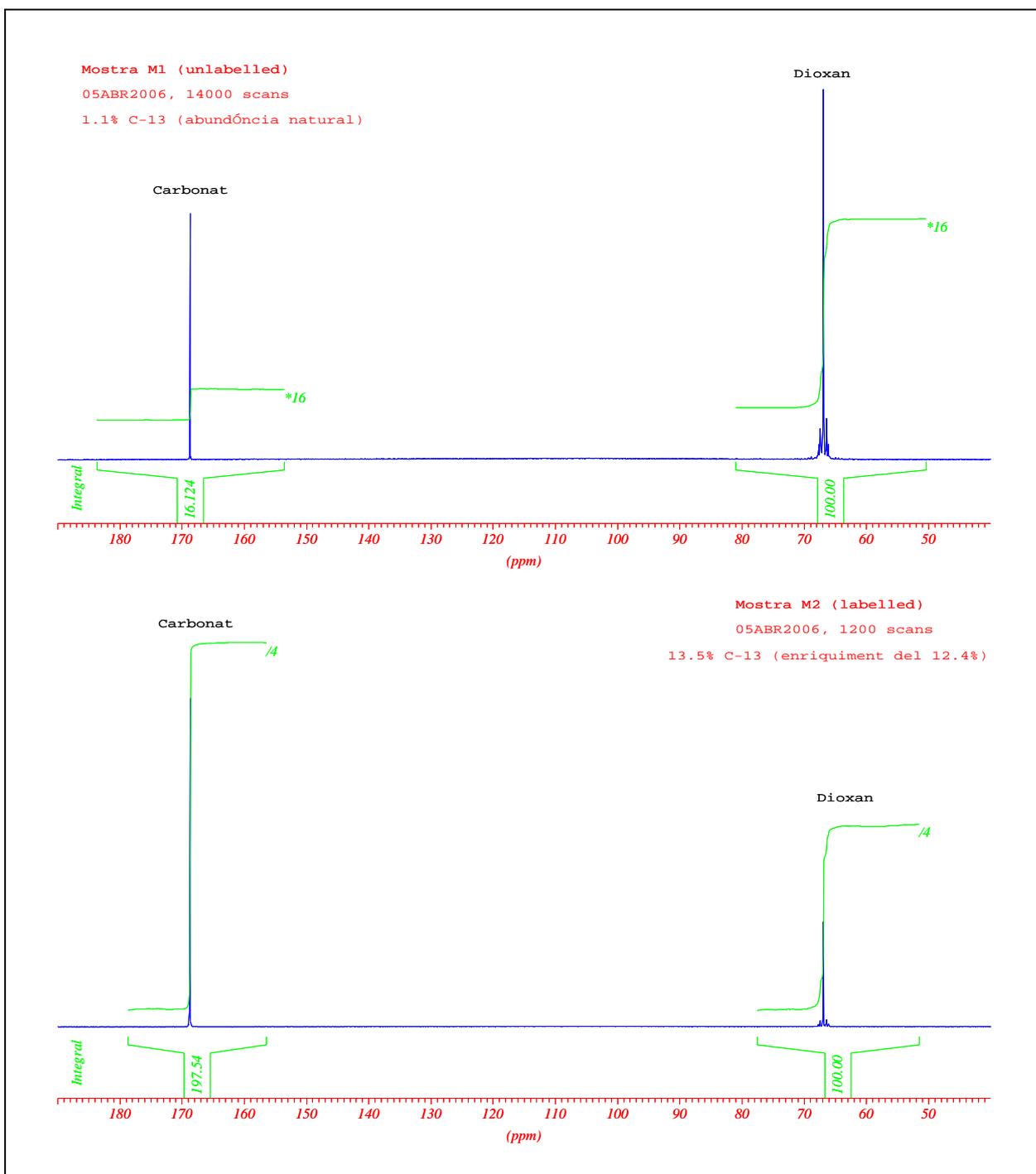


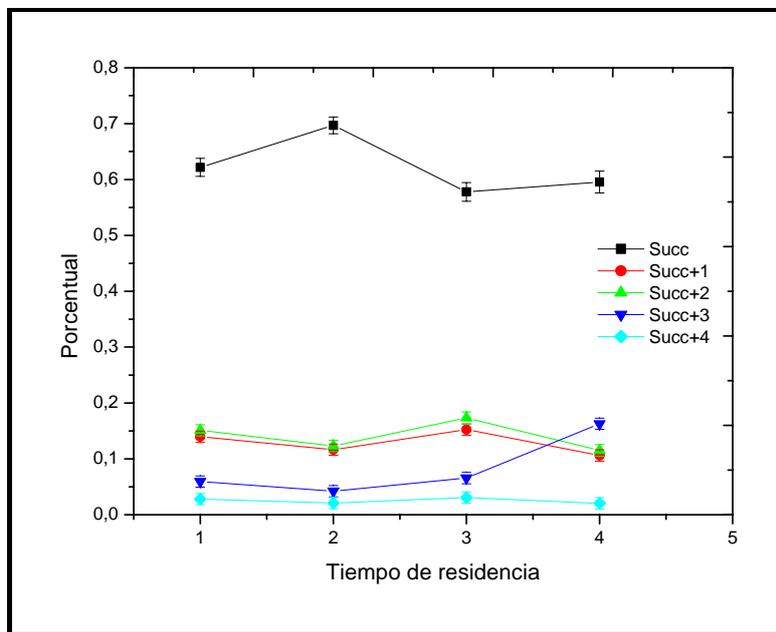
Figura V.19 Las dos muestras (sin – arriba y con marcaje ^{13}C – abajo) se prepararon de la misma manera, poniendo dentro del tubo de RMN 0,200 mL de solución 1M de dioxano en D_2O y añadiéndole 0,2 mL de la solución en KOH 10M. Los dos espectros de RMN de ^{13}C se registraron consecutivamente en las mismas condiciones. Los resultados indican que el anión carbonato de la muestra M2 contiene 13,5% de ^{13}C .

V.3.2.2.3.3 *Determinación y cuantificación de aminoácidos libres*

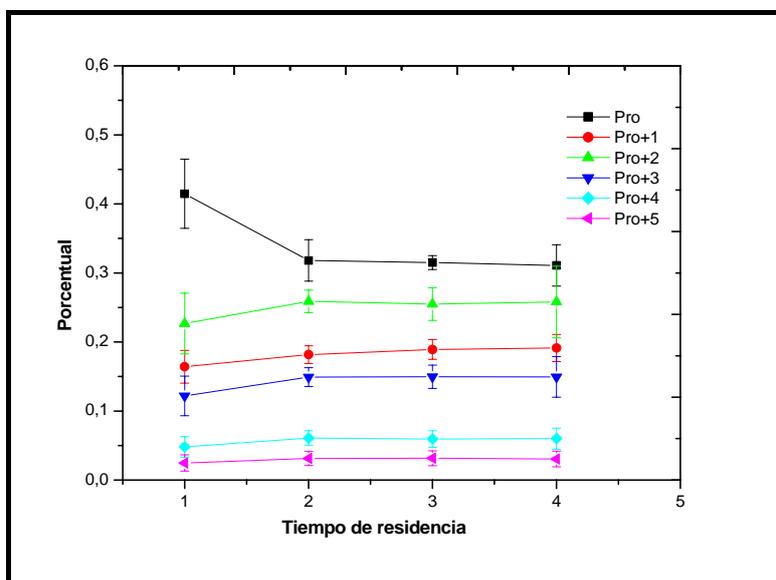
También se midieron la concentración de aminoácidos libres por MS con el objetivo de obtener mayor información para el análisis de la distribución de flujos metabólicos en el metabolismo celular de la levadura *P. pastoris*; a pesar de que la metodología que se empleó permitía, en principio, medir los 20 aminoácidos, en las muestras analizadas solo se pudieron medir los siguientes: valina, alanina, *pool* de treonina/homoserina, ácido aspártico, asparagina, serina y prolina. Al igual que con los metabolitos descritos en la sección anterior, se observaron algunas variaciones en los patrones de marcaje a lo largo de los 4 tiempos de residencia; en concreto, se observó que la fracción sin marcaje de moléculas de algunos de los aminoácidos analizados disminuye después de los dos primeros tiempos de residencia y permanece estable en los siguientes tiempos de residencia, mientras que para otros aminoácidos los patrones permanecieron estables durante los cuatro tiempos de residencia. Las fracciones de aminoácidos sin marcaje se situaron en un rango entre un 40 y 50%. Solamente la fracción no marcada de prolina se situó en un 30% (Figura V.20(b)) y la correspondiente de alanina permaneció estable en un 90%. Las fracciones sin marcaje de alanina y de valina presentan diferencias significativas a pesar de que ambos aminoácidos son sintetizados a partir del mismo precursor (piruvato mitocondrial); sin embargo, comparaciones directas entre las fracciones sin marcaje de estos dos aminoácidos no tiene mucho sentido en este caso pues el número de átomos de carbono (Val: 5, Ala: 3) son diferentes y la posición exacta del marcaje en la fracción marcada no puede ser determinado. En cambio, los aminoácidos Asn, Asp y *pool* de Thr/HSer tienen como precursor común el oxaloacetato citosólico y además estos aminoácidos están compuestos por cuatro átomos de carbono, por lo que es coherente que sus patrones de marcaje observados experimentalmente tengan comportamientos similares.

En general, se observó que los *pools* de aminoácidos generalmente son más estables (en términos de patrones de marcaje observados a lo largo de los 4 tiempos de residencia) que sus intermediarios. Esto puede reflejar

el hecho de que las vías de biosíntesis de los aminoácidos, además de ser esencialmente irreversibles en condiciones fisiológicas, tienen menos “conectividad” y posiblemente presenten menos sensibilidad a las perturbaciones en las condiciones ambientales de las células.



(a)



(b)

Figura V.20 Ejemplo de mediciones en espectrometría de masas.

(a) Fracciones marcadas y no marcadas de succinato (Succ: no marcado; Succ+1: con 1 átomo de carbono marcado; Succ+2 con 2 átomos de carbono marcado, etc.); (b) Fracciones marcadas y no marcadas de prolina (Pro: no marcado; Pro+1: con 1 átomo de carbono marcado; Pro+2 con 2 átomos de carbono marcado, etc.). Las barras de error presenta la desviación estándar de las cinco medidas.

V.3.2.2.4 Análisis de flujos metabólicos

En este apartado se describen los resultados del análisis de distribución de flujos metabólicos obtenidos basándose en los datos experimentales obtenidos por espectrometría de masas y por RMN.

V.3.2.2.4.1 Análisis de flujos metabólicos mediante datos de espectrometría de masas

La construcción de la red metabólica presentada en la Figura V.15 fue creada partiendo de la red metabólica descrita en el Capítulo IV. Sin embargo, los experimentos de marcaje isotópico basados en LC-MS presentan algunas desventajas respecto a los basados en RMN; concretamente, no se puede distinguir entre el *pool* de piruvato mitocondrial y citosólico y el oxaloacetato no puede ser medido por ser inestable; ello origina que, al utilizar los datos de marcaje experimentales obtenidos mediante LC-MS para el cuarto tiempo de residencia, los flujos calculados (usando la red metabólica descrita en la Figura V.15) para las reacciones de transporte (*tr_oaa* y *tr_pyr*) tengan asociados unas desviaciones muy altas y que en las reacciones anapleróticas (*ana1* y *ana2*) y gluconeogénicas (*emp8*) por lo menos uno de los metabolitos presente un patrón de marcaje desconocido (OAA).

Por lo tanto, dadas estas limitaciones, la red metabólica inicialmente propuesta (Figura V.15) fue readaptada (proponiéndose 3 posibles modelos alternativos) y se seleccionaron los datos iniciales con el objetivo de optimizar la calidad los resultados (flujos calculados). Concretamente, los modelos se diferenciaron uno del otro principalmente en relación al ciclo de los TCA, vías anapleróticas y las reacciones de transporte mitocondria/citoplasma. Además, en cada caso se consideró un conjunto de datos distinto (un ejemplo de la rutina utilizada en el programa *13C-Flux* esta descrita en la sección de rutinas, apartado R.5).

a) Modelo de red metabólica nº 1

El primer modelo estudiado (Figura V.21) consiste básicamente en la red descrita anteriormente (apartado V.3.2.1.2). Se excluyó la reacción de citrato a isocitrato (*tcc3*), pues el citrato e isocitrato solo podían ser medidos como un *pool* único de metabolitos. Además, se eliminó la reacción *tcc8a/tcc8c* (síntesis de malato a partir de fumarato) reformulando la ecuación *tcc7a/tcc7b* donde el malato es el producto de la reacción del succinato, lo que implica en la eliminación de la etapa intermediaria del succinato a fumarato. La razón de esta simplificación fue que los patrones de marcaje obtenidos para el fumarato no eran claros. Además los resultados de marcaje isotópico de succinato y de AKG también se excluyeron pues sus patrones de marcaje no se ajustaron con los padrones de marcaje de los otros metabolitos del ciclo de los TCA y por lo tanto, cuando dichos patrones son reajustados/adaptados durante el proceso de simulación presentan una alta desviación estándar. El transporte de succinato y AKG de la mitocondria al citoplasma y viceversa no se consideró en el modelo de red, lo que implica los patrones de marcaje de estos dos metabolitos no se ven afectados solamente por sus precursores o sucesores en el ciclo de los TCA. Los datos experimentales de PEP fueron excluidos pues no se correspondían con los de su precursor (GAP) y su derivado (piruvato) inmediatos en la red metabólica.

Tal y como cabía esperar, la desviación de los flujos simulados en las reacciones de transporte y en las reacciones de anaplerosis fue muy alta. La reacción de transporte del piruvato (*tr_pyr*) no puede ser determinada experimentalmente (debido a que no se pueden asignar los patrones de marcaje a un pool piruvato -citoplasmático o mitocondrial- en particular) y en la reacción de transporte del OAA (*tr_oaa*) dicho metabolito tampoco pudo ser medido. Además, las reacciones de anaplerosis también presentan baja calidad estadística pues todas ellas involucran los metabolitos PYR u OAA.

La distribución de flujos en este modelo (Figura V.21 y sección de anexos, apartado A.III.3.1) reveló que la vía de las pentosas fosfato presenta

poca actividad lo que implica en una baja generación de NADPH (generado en la rama oxidativa), hecho coherente con la baja demanda biosintética que conlleva una velocidad de crecimiento celular baja, valores similares a los obtenidos utilizando la metodología descrita anteriormente (MFA con restricciones derivadas del análisis METAFoR). No obstante, el análisis de sensibilidad de los flujos metabólicos (Figura V.22) a través de la vía de las pentosas presentó elevadas desviaciones estándar para algunas de sus reacciones (por ejemplo, la rama oxidativa, donde el producto de la reacción es el RU5P). Ello podría estar causado, al menos en parte, por el hecho que alguno de sus intermediarios no pueden ser medidos por separado; en particular, el metabolito RU5P es medido experimentalmente como un *pool* único de RU5P+XU5P, lo que implica directamente, además de la reacción *ppp1* (rama oxidativa), otras reacciones de la rama no oxidativa (*ppp2*, *ppp3* y *ppp5*).

Por el contrario, el flujo a través del ciclo de los TCA fue bajo en relación al calculado por la metodología descrita anteriormente (apartado V.2.3.2.1). Además, debido a los problemas de medida de los patrones de marcaje de los metabolitos piruvato y fosfoenolpiruvato, y ausencia de datos para oxaloacetato, el flujo de la reacción de anaplerosis de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato fue negativo (es decir, indicando gluconeogénesis), y el flujo de la reacción del enzima málico fue de una gran magnitud y en la dirección de síntesis de malato a partir de piruvato (-20%). Estos dos flujos son totalmente incoherentes con los resultados experimentales del análisis de cocientes de flujos mediante ¹³C-RMN (Solà *et al.*, 2004 y 2007), los cuales demuestran que la actividad de estos dos reacciones (piruvato carboxiquinasa y la enzima málica) es muy baja o prácticamente nula, bajo las condiciones de cultivo estudiadas. Por otro lado, el signo negativo del flujo de la reacción *emp8* indica formación de OAA a partir de PEP, por lo que se podría considerar un flujo anaplerótico paralelo al flujo de carbono desde PEP a OAA a través de combinación de las reacciones *emp7* y *ana1*.

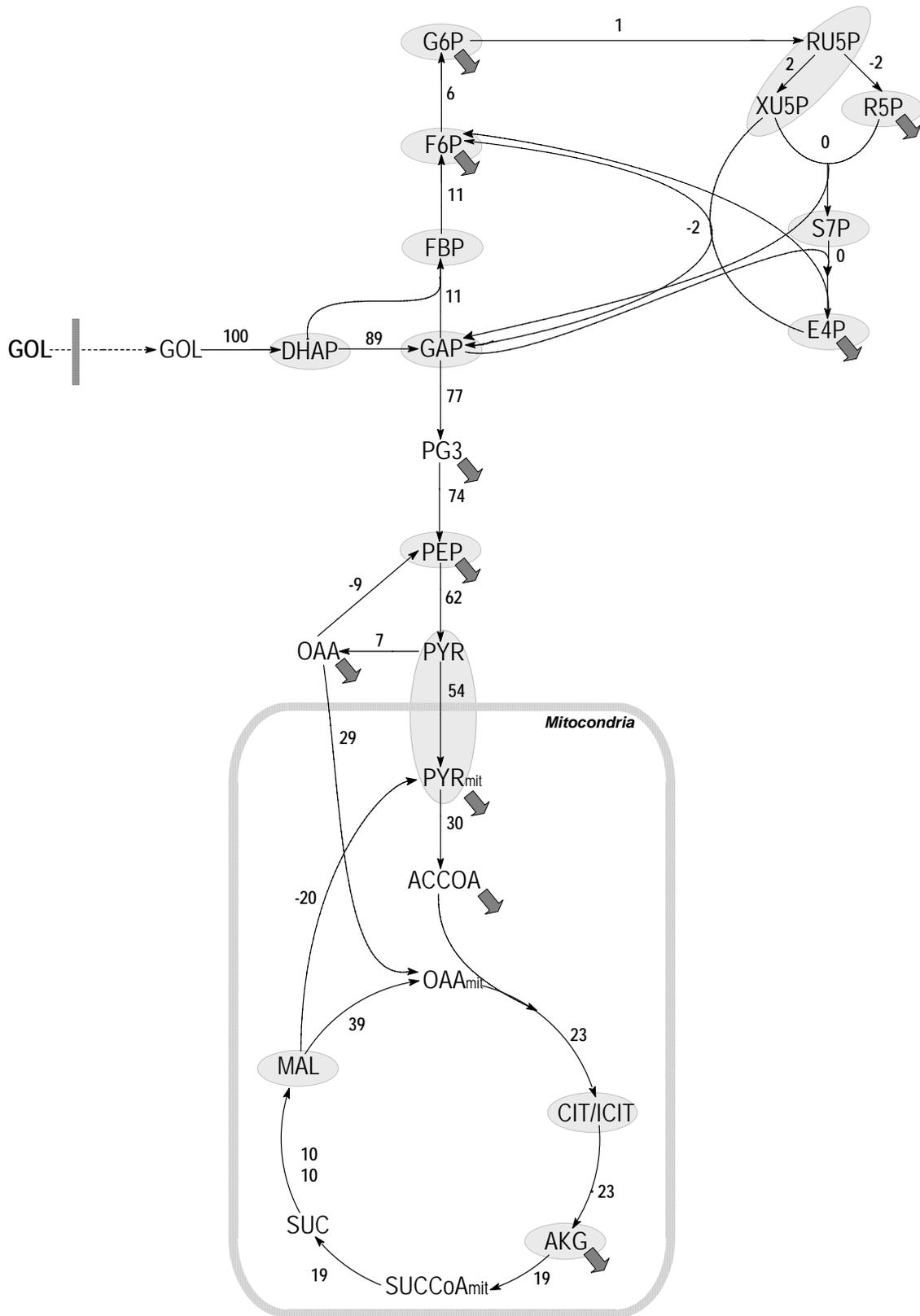


Figura V.21 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, conforme el modelo de red numero 1. Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

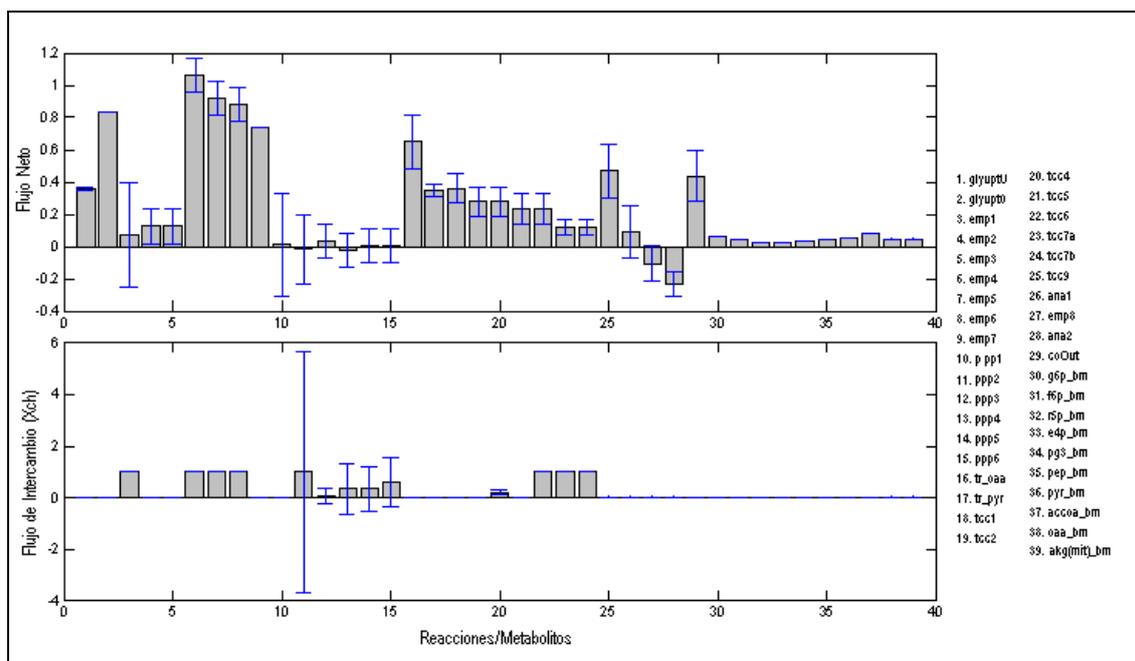


Figura V.22 Flujos netos y de intercambios (Xch) simulados. Los flujos netos son números absolutos en $[\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{biomas}}^{-1}]$.

b) Modelo de red metabólica nº 2

El siguiente modelo estudiado consiste básicamente en una adaptación a partir del modelo descrito por Zhang *et al.* (2003) para el análisis de flujos metabólicos basado en datos de marcaje isotópico de la levadura *S. cerevisiae* creciendo sobre glucosa o glicerol. En este modelo, no se consideraron las reacciones de transporte de piruvato citosólico hacia la mitocondria (*tr_pyr*), la reacciones de anaplerosis del OAA (*ana1* y transporte (*tr_ooa*)), la reacción de gluconeogénesis (*emp8*) y la reacción del enzima málico (*ana2*) (Figura V.23); al igual que en el Modelo 1, las reacciones *tcc3* y *tcc7a/tcc7b* y las medidas de los patrones de marcaje de SUC, AKG y PEP fueron excluidos. Por otro lado, se añadieron dos ecuaciones de acuerdo con Zhang *et al.* (2003): la primera corresponde a la formación de PEP a partir del oxaloacetato mitocondrial (gluconeogénesis) y la segunda a la formación de oxaloacetato mitocondrial a partir de piruvato. Cabe resaltar también que en este modelo el piruvato esta presente solamente en el citoplasma, es decir, como pool único. De esta manera se

intenta ajustar la estequiometría de la red a las limitaciones del análisis de metabolitos mediante LC-MS.

El resultado obtenido para la distribución de flujos (Figura V.23 y sección de anexos, apartado A.III.3.1), reveló que la vía de las pentosas fosfato presenta poca actividad, los valores de flujos asignados a esta vía fueron esencialmente los mismos que obtenidos en el Modelo 1. Sin embargo, los flujos a través del ciclo de los TCA presentaron valores con una magnitud significativamente superior a los obtenidos en el Modelo 1, correspondientes a un 50% del flujo entrante de glicerol. No obstante, la reacción de gluconeogénesis (síntesis de PEP a partir de OAA) todavía presenta un flujo significativo, del orden del 9%, en la dirección de gluconeogénesis y la reacción anaplerótica (síntesis de OAA a partir de piruvato) tiene un flujo cercano a cero. Por lo tanto, estos dos flujos todavía no concuerdan con los datos de cocientes de flujos metabólicos previamente obtenidos mediante ^{13}C -RMN.

El análisis de sensibilidad de los flujos metabólicos calculados presentó menores desviaciones estándar que con el Modelo 1 (Figura V.24); sin embargo, el residuo total empeoró ya que los patrones de marcaje simulados difirieron más de los experimentales que con el modelo anterior. Cabe manifestar que, de manera similar al hecho que los metabolitos SUC y AKG participan de vías metabólicas que no se consideraron en el Modelo 1 provocó una discrepancia entre los valores simulados y los datos de marcaje medidos experimentalmente, la eliminación de vías metabólicas activas en torno al piruvato/oxaloacetato en el Modelo 2 resulta en mayores valores en términos de residuo.

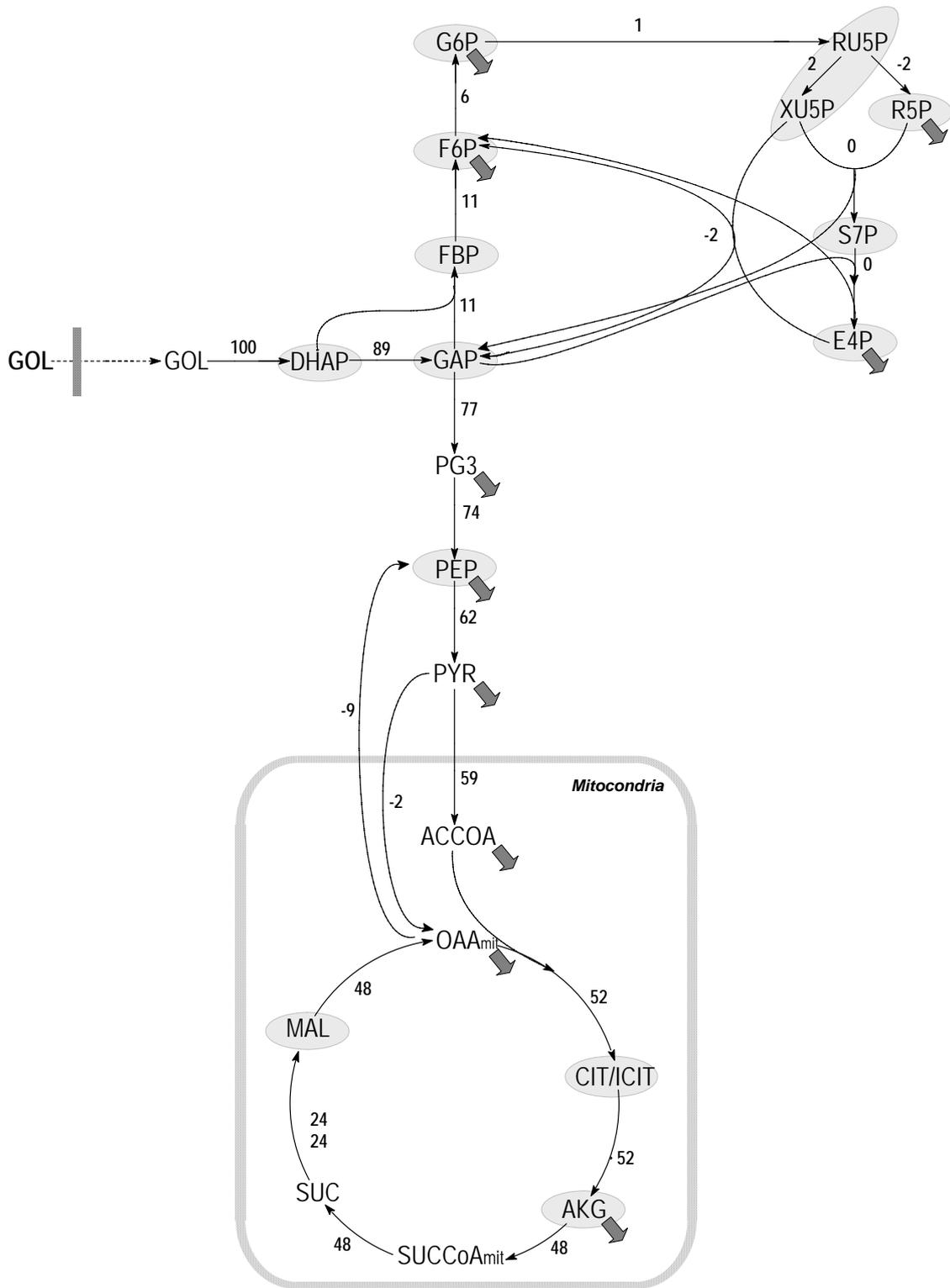


Figura V.23 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, conforme el modelo de red numero 2. Las unidades de flujo están en porcentaje en función del substrato utilizado.

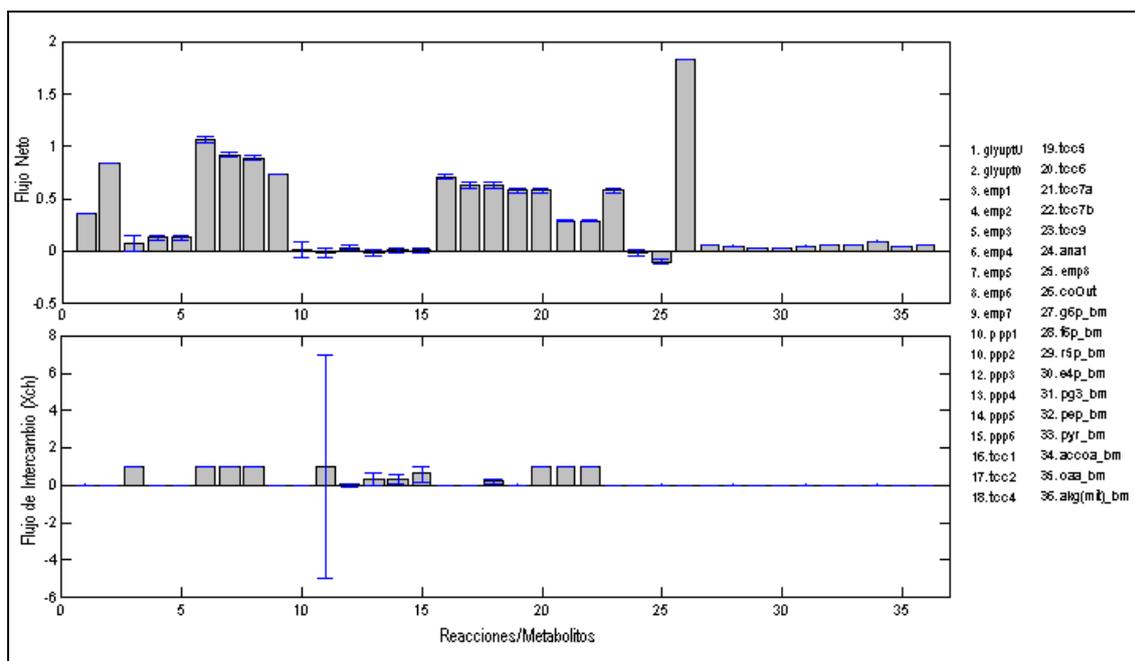


Figura V.24 Flujos netos y de intercambios (Xch) simulados. Los flujos netos son números absolutos en $[\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{biomas}}^{-1}]$.

c) Modelo de red metabólica nº 3

El tercer modelo estudiado consiste básicamente en el primer modelo extendido con algunas vías de biosíntesis de aminoácidos, permitiendo añadir los datos experimentales de patrones de marcaje de los aminoácidos disponibles (Figura V.25). Se excluyeron los datos experimentales para la alanina porque los resultados obtenidos después de la simulación revelaron que la desviación estándar de los patrones calculados para este aminoácido eran superiores a de los otros aminoácidos. Una explicación probable sería que el espectro de la alanina no está completo, pues faltaba el pico correspondiente al fragmento M+3 (tres átomos de carbono marcados). Además, se incorporó una ecuación de flujo a proteína y biomasa, donde la contribución relativa de cada uno de los aminoácidos (y por tanto, de sus precursores del metabolismo intermediario de *P. pastoris* según ecuación de formación de biomasa descrita en el Capítulo III) a la formación de proteína celular fue adaptado de la levadura *S. cerevisiae* (Förster *et al.*, 2003), ya que no existen datos experimentales sobre la composición aminoacídica promedio de la proteína celular de *P. pastoris*.

La distribución de flujos metabólicos en las vías de las pentosas fosfato, EMP y ciclo de los TCA (Figura V.25 y sección de anexos, apartado A.III.3.1), presentaron el mismo comportamiento que en los modelos 1 y 2. La reacción de gluconeogénica de OAA a PEP (*emp8*) presentó un flujo negativo (es decir, flujo de carbono hacia la formación de OAA), mientras que el transporte de oxaloacetato citosólico hacia la mitocondria es mayoritariamente de entrada (flujo neto positivo). La reacción correspondiente a la enzima málica presentó un valor positivo, contrastando con el valor obtenido del modelo de red número 1, y más acorde con los estudios previos con ^{13}C -RMN (Solà *et al.*, 2004). Los flujos para la formación de los aminoácidos provenientes de sus precursores presentaron valores muy bajos, próximos a cero.

La desviación estándar de los flujos simulados fueron muy altos para algunos flujos, principalmente en las reacciones de gluconeogénesis, anaplerosis y de transporte citoplasma-mitocondria (Figura V.26). Sin embargo, el residuo total después de la simulación presentó valores más bajos que en los otros dos modelos, seguramente debido a que se añadieron los flujos de carbono para la biosíntesis de proteínas/biomasa, para los cuales existen datos experimentales adicionales.

Con base en estos resultados, el tercer modelo también fue utilizado para comparar los resultados de flujos metabólicos de diversos tiempos de residencia (muestras 7, 8 y 9). En este estudio comparativo, solo se fueron cambiando los estados de marcaje de metabolitos centrales y de los aminoácidos, mientras que la red, las condiciones de los flujos y los flujos iniciales fueron siempre los mismos inicialmente establecidos para el Modelo 3. El resultado obtenido al final de la simulación reveló una pequeña diferencia en los residuos de cada una de las simulaciones, pero los flujos calculados fueron exactamente iguales a los obtenidos para la muestra 10. A pesar de las diferencias observadas en los patrones de marcaje del carbono a lo largo de diversos tiempos de residencia en los metabolitos centrales, la inclusión de datos de marcaje de aminoácidos y la eliminación de datos experimentales inconsistentes de algunos metabolitos, resultó en flujos metabólicos calculados esencialmente constantes a lo largo de los cuatro

tiempos de residencia. Esta observación fue confirmada a través del análisis de los datos experimentales obtenidos en paralelo mediante ^{13}C -RMN (ver apartado a continuación), los cuales sugiere que el cultivo está efectivamente en estado estacionario.

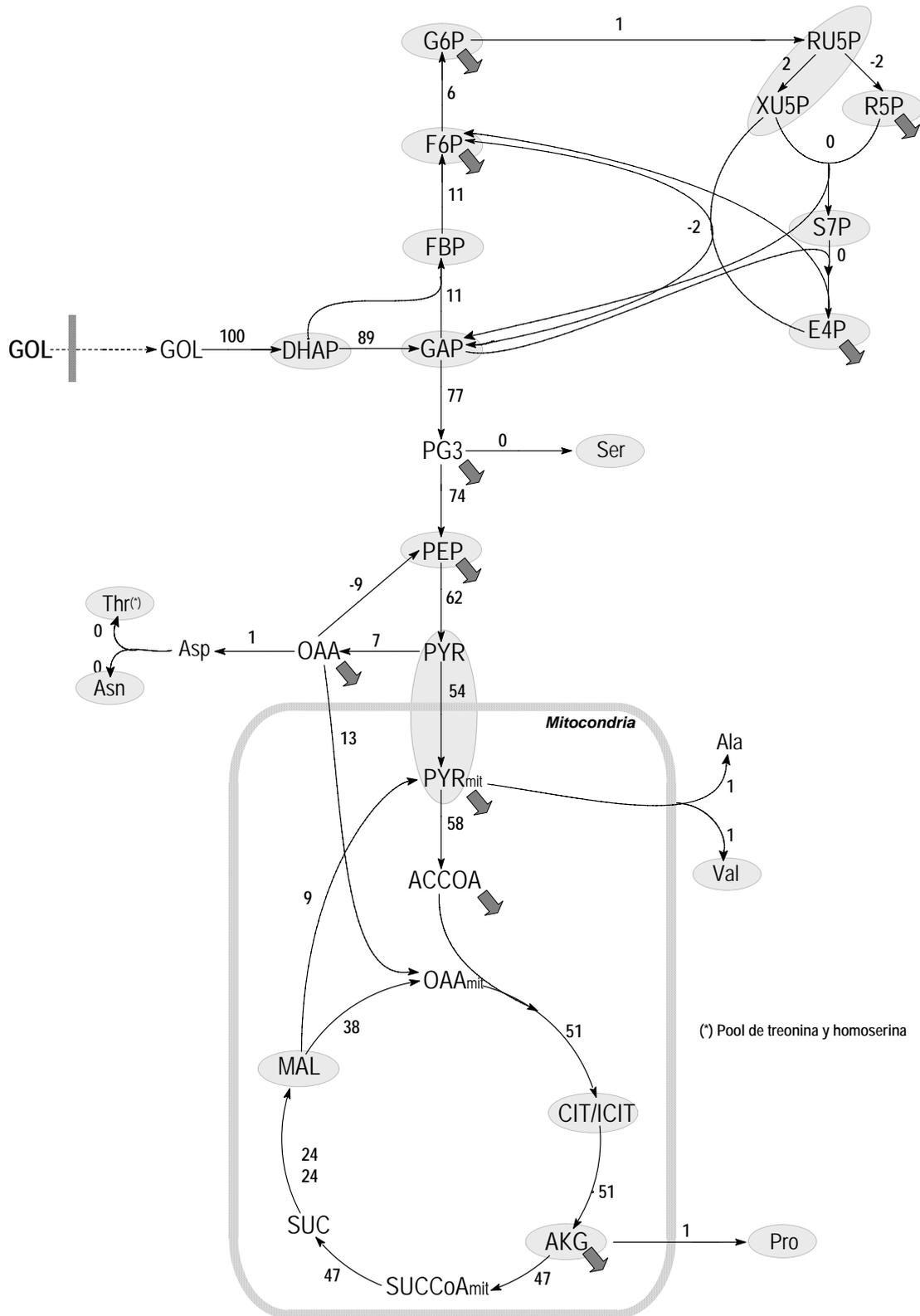


Figura V.25 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$, conforme el modelo de red numero 3. Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

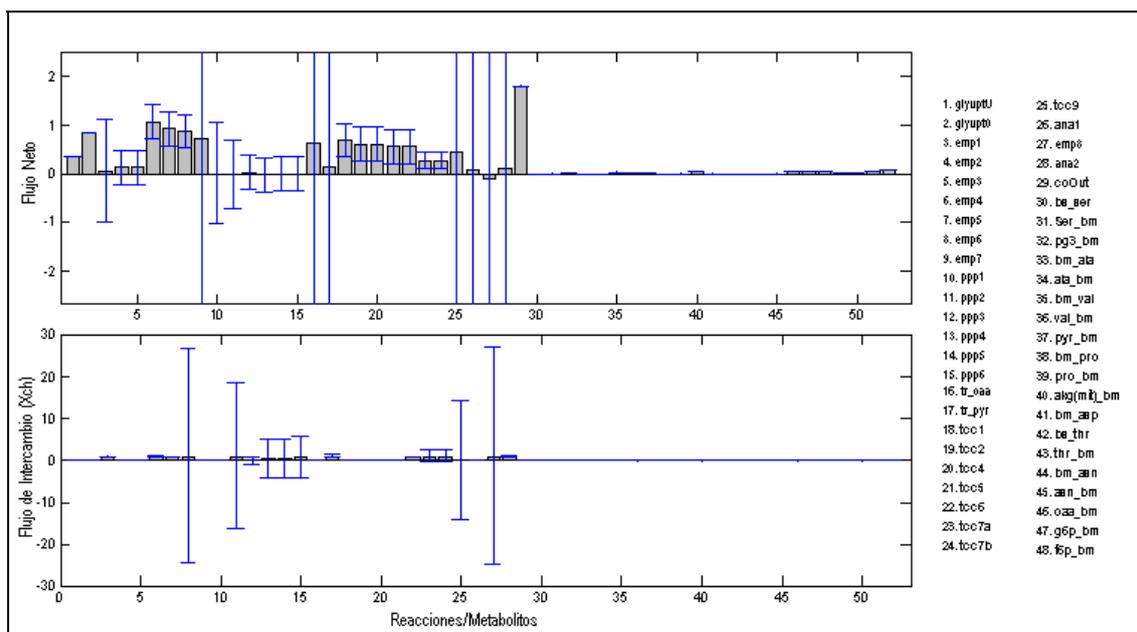


Figura V.26 Flujos netos y de intercambios (Xch) simulados. Los flujos netos son números absolutos en $[\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{biomas}}^{-1}]$.

V.3.2.2.4.2 Análisis de flujos metabólicos basados en datos de ^{13}C -RMN

Los análisis de ^{13}C -RMN fueron realizados con el objetivo de comparar los flujos obtenidos por espectrometría de masas con aquellos obtenidos mediante la metodología de análisis de flujos metabólicos con restricciones derivadas de datos de ^{13}C -RMN, descrita en apartados anteriores del presente estudio. Por tanto, el modelo de red metabólica utilizado en este análisis fue la misma descrita en el apartado V.3.2.1.2.

Los análisis de las muestras fueron realizados en el Laboratorio de RMN del VTT (Helsinki) según la metodología descrita anteriormente (Szyperski, 1995, Maaheimo *et al.*, 2001, Solà *et al.*, 2004). En una primera etapa, se obtuvieron a partir de los espectros de 2D-RMN las abundancias relativas de los fragmentos intactos C2 y C3 de los aminoácidos proteínogénicos (valores f). Por ejemplo, para el carbono β de la alanina. la fracción $f(1)$ representa el porcentaje de moléculas de Ala donde ambos átomos de carbono vecinos a su carbono β no están marcados, $f(2)$ y $f(2^*)$ representan las fracciones de moléculas en las cuales uno de los dos átomos de carbono próximo al carbono β está también marcado, donde $f(2^*)$ presenta

constante de acoplamiento mayor que $f(2)$, y $f(3)$ representa la fracción de moléculas de Ala en las cuales ambos los átomos de carbono vecinos están marcados (Figura V.27).

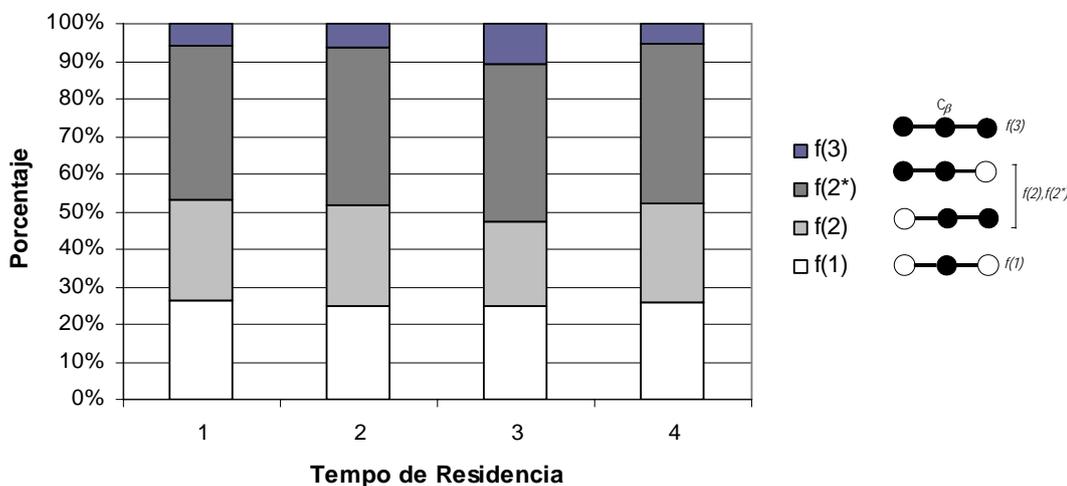


Figura V.27 Ejemplo de medida de RMN: valores f : centrados en el carbono β de Asp (Asp $C\beta$), corregidos según incorporación de ^{13}C siguiendo una cinética de primer orden. La fracción de $f(1)$ representa el porcentaje de moléculas de Asp con sus átomos de carbono vecinos no marcados; $f(2)$ y $f(2^*)$ representa el porcentaje de moléculas de Asp en las cuales uno de los dos átomos próximos al $C\beta$ está marcado y $f(3)$ cuando ambos átomos de carbono están marcados.

Las fracciones de isotómeros de cada uno de los aminoácidos proteinogénicos analizados en las diferentes etapas de marcaje (tiempo de residencia), que se encuentran en la sección de anexos, apartado A.VI, fueron comparadas con resultados previos de los experimentos hechos bajo mismas condiciones. Los datos obtenidos corregidos con un factor de corrección correspondiente al tiempo de residencia que considera el porcentaje de la nueva proteína formada y la incorporación de marcaje a la misma. Los resultados demuestran que los factores usados para la corrección (derivados de la hipótesis que la fracción de biomasa marcada (x_b) producida a partir del momento en el cual se empieza a alimentar el quimiostato con el medio conteniendo ^{13}C puede ser calculada a través de

una ecuación cinética de primer orden (de *wash-out*), que viene dada por: $x_b = 1 - e^{-Dt}$, (Sauer *et al.*, 1997) fueron aplicados correctamente para adaptar los datos a los tiempos de residencia correspondientes.

En una segunda etapa, se calcularon los cocientes de flujos metabólicos para algunas de las bifurcaciones claves de la red metabólica (ciclo de los TCA y rutas asociadas) con base a la metodología METAFoR desarrollada anteriormente (Maaheimo *et al.*, 2001, Solà *et al.*, 2004).

Los flujos metabólicos fueron calculados con base a los datos fisiológicos obtenidos experimentalmente para las condiciones de cultivo utilizadas (y reconciliados de acuerdo con la metodología descrita en el Capítulo III) y aplicando las restricciones derivadas de análisis de cocientes de flujos metabólicos (análisis METAFoR), presentados en la Tabla V.8. La distribución de flujos fue calculada a través de la metodología descrita en el apartado V.2.2.

Tabla V.8 Orígenes de los metabolitos intermediarios de la levadura *P. pastoris* en cultivos operadas en quimiostato y crecidas en glicerol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

<i>Metabolito</i>	Fracción del <i>pool</i> total (media \pm desviación estándar)*
Fracción de OAAcyt que proviene de PYRcyt (anaplerosis)	31 \pm 2
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (enzima málico) (límite superior)	6 \pm 3
Fracción de PYRmit que proviene de MALmit (enzima málico) (límite inferior)	0 \pm 2
Fracción de OAAmit que proviene de OAAcyt	26 \pm 4

(*) Datos en %.

Para el cálculo de los flujos metabólicos fueron utilizados los datos experimentales presentados en la Tabla V.9, los cuales corresponden a datos reconciliados de un cultivo réplica previamente realizado (ver Capítulo IV).

Tabla V.9 Tasas específicas de sustratos e productos obtenidas experimentalmente para el cultivo de glicerol a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

Medidas Experimentales	Flujo ($\text{mmolh}^{-1}\text{g}^{-1}\text{celulas}$)
Glicerol	-1,09
CO ₂	1,95
O ₂	-2,70
Biomasa	1,32
RQ	0,72

La distribución de flujos en la vía de las PP presentó valores muy bajos, próximos a cero, mientras que el ciclo de los TCA presentó elevada actividad. El flujo de transporte de oxaloacetato es mayoritariamente de entrada a la mitocondria y el enzima málico esta activo, pero a un nivel muy bajo (Figura V.28 y sección de anexos, apartado A.III.3.2). Cabe destacar que el error en la vía de las PP fue superior a de las otras vías, principalmente en la reacción *ppp2* (Figura V.29).

Así pues, los resultados obtenidos por las dos metodologías utilizadas son coherentes entre si y demuestran que la vía de las PP esta operando a niveles muy bajos, próximos a cero. Según Zhang *et al.* (2003), para la levadura *S. cerevisiae* esta vía esta operativa en niveles más altos, pero cabe manifestar que los cultivos de dicho estudio se realizaron a una velocidad de crecimiento mas alta ($\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$), por lo que las necesidades biosintéticas de NADPH son en principio mayores y, por lo tanto, se esperaría un flujo a través de la ruta oxidativa de las PP mayor que a una $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Cabe señalar también que los cálculos de flujos metabólicos de la vía de las PP usando los datos de cocientes de flujos (basados en ¹³C-RMN) como restricciones fueron determinados sin considerar el balance redox; esta observación es de gran importancia pues los resultados obtenidos mediante el MFA con restricciones derivadas de ¹³C-RMN para esta ruta metabólica no son muy fiables, pues la sensibilidad de este método es muy baja al no poder establecer ninguna restricción derivada de ¹³C-RMN para la ruta de las PP cuando el sustrato es glicerol (ver resultados presentados en el apartado V.2.3.2.1). En relación a los resultados obtenidos a través de la metodología clásica (ver Figura IV.4 del Capítulo IV y sección de anexos, apartado A.III.1), se observa una diferencia significativa en relación a la vía

de las pentosas: el flujo calculado mediante MFA clásico para la rama oxidativa (*ppp1*) presentó un valor superior al obtenido por las dos metodologías empleadas en este capítulo, concretamente un 16% ($0,12 \pm 0,06$ mmol h⁻¹g⁻¹_{biom}) (ver Capítulo IV) vs un 0-2 %, respectivamente (Figuras V.7, V.25 y V.28). Sin embargo, los cálculos de flujos metabólicos basados en la metodología de MFA con restricciones derivadas del análisis METAFoR (ver Figura V.7) indican que las necesidades biosintéticas de NADPH se satisfacen a través de las otras dos reacciones de la red generadoras de NADPH, asociadas al ciclo de los TCA: el flujo de formación de α -cetoglutarato a partir de isocitrato dependiente de NADPH y el de formación de acetato a partir de acetaldehído. Así, mientras que los cálculos de flujos metabólicos utilizando datos derivados de ¹³C-RMN y ¹³C-LC/MS, el NADPH proviene básicamente del ciclo del TCA, los cálculos de MFA clásico indican que la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato es la principal fuente de NADPH: frente a un flujo del 16% ($0,12 \pm 0,06$ mmol h⁻¹g⁻¹_{biom}) a través de la ruta oxidativa de las PP, el flujo a través de la reacción del TCA dependiente de NADPH es del 8% ($0,01 \pm 0,01$ mmol h⁻¹g⁻¹_{biom}) y del 2% ($0,06$ mmol \pm $0,01$ mmol h⁻¹g⁻¹_{biom}) a través de la reacción de formación de acetaldehído (ver Capítulo IV). Cabe destacar también que los errores asociados a cada flujo metabólico fueron menores utilizando la metodología de MFA clásica; sin embargo, los cálculos obtenidos mediante esta metodología están exclusivamente basados en datos experimentales sobre flujos extracelulares, es decir solo disponemos los datos de entrada de substratos y salida de productos y producción de biomasa; además el método utilizado está condicionado a infinitas soluciones, por lo que muchas veces la solución encontrada no satisface las observaciones experimentales.

Los análisis de RMN confirmaron que el transporte de oxaolacetato es bidireccional, tal y como se había demostrado anteriormente (Solà *et al.*, 2004), con un flujo neto muy bajo hacia el interior ($18,4 - 14,6 = 3,8\%$), mientras que el análisis de flujos por MS (Modelo 3) dan un flujo de entrada sensiblemente superior (13%). Cabe resaltar que los cálculos realizados por RMN para esta ecuación está restringido matemáticamente y que valores similares fueron obtenidos en los cálculos descritos anteriormente (apartado

V.2.3.2.1). El transporte de piruvato citosólico hacia la mitocondria presentó resultados similares en las dos metodologías de cálculo, y significativamente (3 veces) superiores a los cálculos realizados anteriormente y descritos en el apartado V.2.3.2.1. No obstante, cabe recordar que el modelo de red metabólica usado anteriormente posee una vía adicional de entrada de piruvato (vía *bypass* del piruvato).

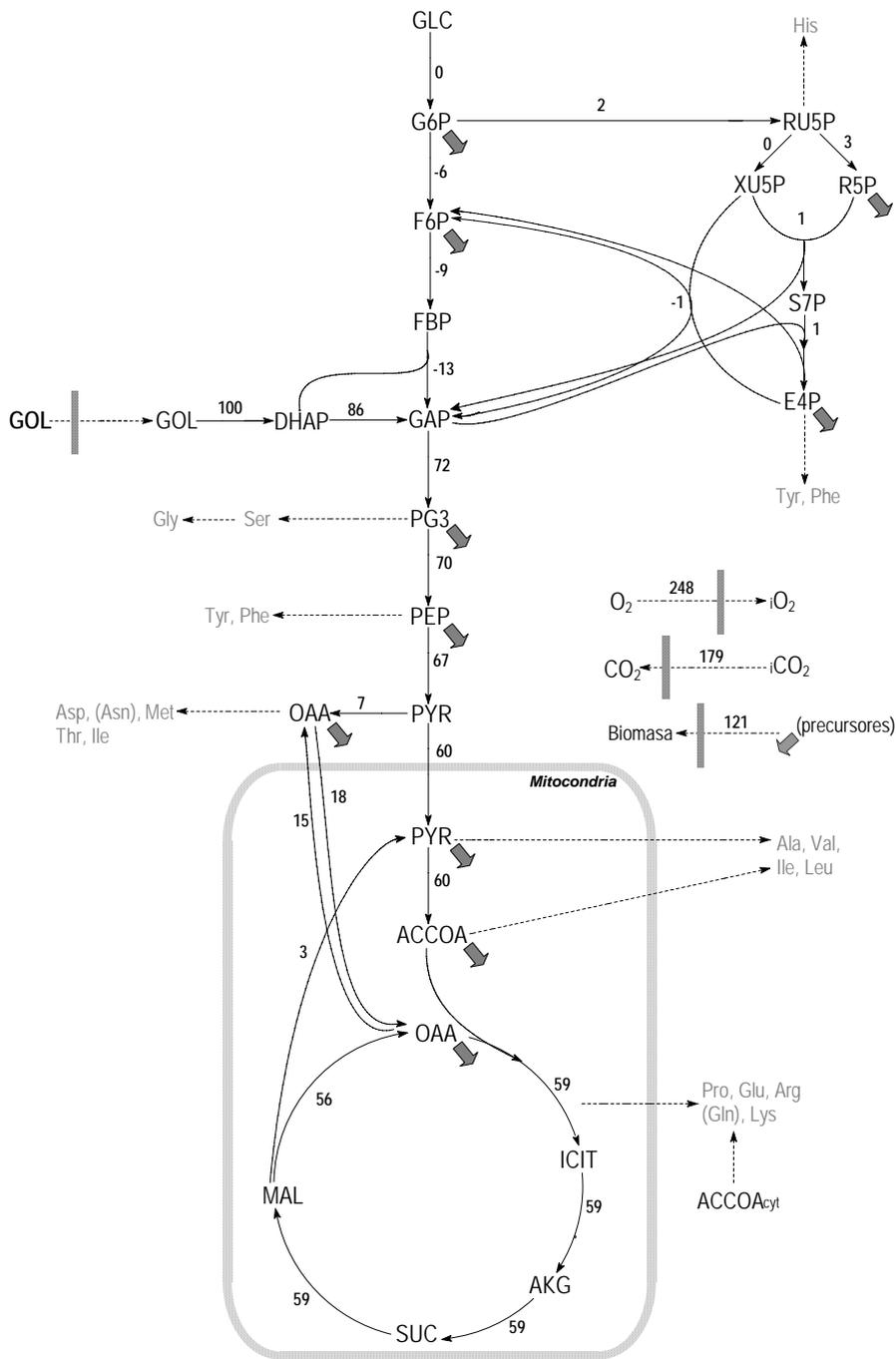


Figura V.28 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol en cultivo operado en quimiostato a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

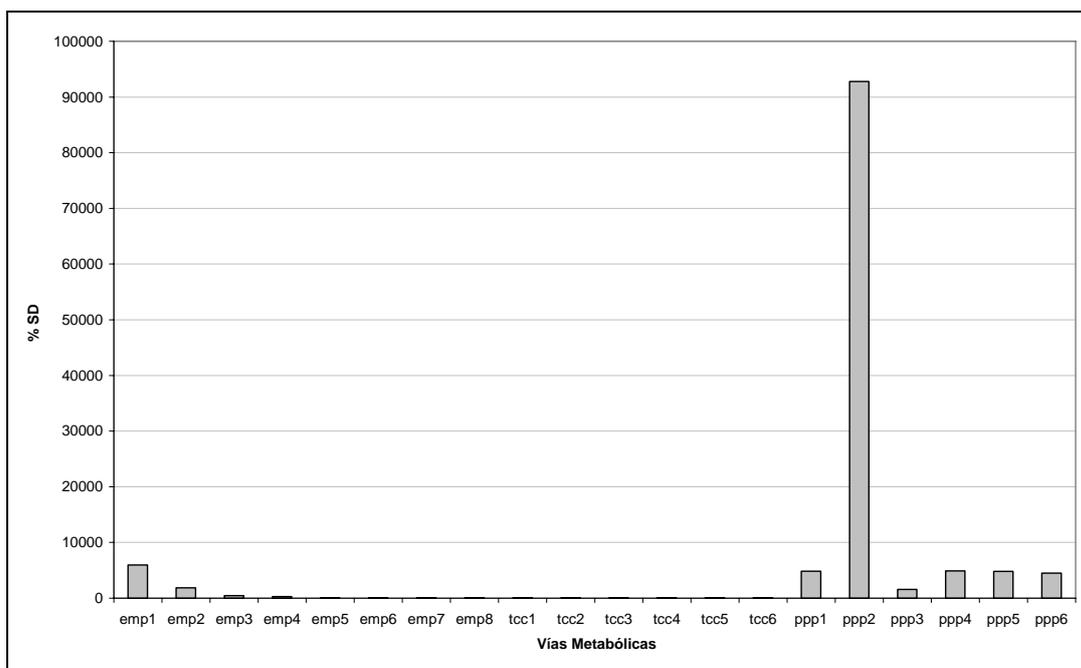


Figura V.29 Desviaciones estándar en relación al flujo metabólico calculado, para las reacciones de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (*emp*), de las pentosas fosfato (*ppp*) y ciclo de los TCA (*tcc*).

Con base a estos resultados, se concluye que el análisis de flujos metabólicos basados en la espectrometría de masas presenta poca sensibilidad en redes metabólicas que describen un modelo compartimentalizado, ya este método no permite distinguir/inferir los patrones de marcaje de determinados metabolitos localizados distintos compartimentos celulares (por ejemplo en el citoplasma y la mitocondria). Esta técnica presenta los resultados de patrones de marcaje “promedio” para un *pool* que puede estar constituido por una mezcla heterogénea de *pools* de un determinado metabolito como por ejemplo PYR_{mit} y PYR_{cyt} . Ello limita la capacidad de cálculo de flujos de transporte entre compartimentos celulares y vías metabólicas en las cuales participan dichos metabolitos (en el caso piruvato: las vías fermentativas y anapleróticas); además, algunos metabolitos clave no pueden ser determinados experimentalmente a través de esta técnica, como el oxaloacetato. Por otro lado, este método presenta alta sensibilidad en la vía de las pentosas, donde la mayoría de los metabolitos involucrados en esta vía son medidos experimentalmente, posibilitando así el cálculo de flujos metabólicos a través de dicha vía, lo que

nos es posible realizar con la metodología utilizada de MFA con restricciones derivadas de ^{13}C -RMN.

Globalmente, el presente estudio y otros estudios recientes (Kleijn *et al.*, 2007) sugieren que la combinación/integración de varias metodologías analíticas pueden mejorar de manera importante la riqueza en información y precisión del análisis de la distribución de flujos en redes metabólicas de elevada complejidad, como el caso estudiado en este trabajo.

CAPÍTULO VI

Análisis de Módulos Elementales

La sexta etapa de este trabajo consistió en un análisis estructural de la red a través de la metodología de módulos elementales. Este método permite determinar las subredes metabólicas independientes que pueden funcionar en estado estacionario en la red metabólica original. Trabajos recientes muestran que es posible, a partir del conocimiento de todos los flujos metabólicos de una red o incluso solo de una parte de la misma, asignar la contribución de cada subred metabólica a dicha red global para unas condiciones experimentales determinadas. Además, a través de este análisis también sería posible calcular directamente los flujos metabólicos asociados a cada módulo elemental. La asignación o cálculo de flujos metabólicos a través de módulos elementales puede constituir una valiosa herramienta para interpretar el significado fisiológico de las variaciones observadas en la distribución de flujos metabólicos, en una red de reacciones bioquímicas complejas, cuando las células crecen bajo distintas condiciones ambientales.

VI.1 Introducción

Desde un punto de vista biológico los módulos elementales (α_i) de un sistema consisten en un conjunto de reacciones, derivadas de la matriz estequiométrica de un sistema metabólico, que describen vías metabólicas estequiométricamente completas que no pueden ser descompuestas en subconjuntos más sencillos (y por tanto elementales) los cuales pueden

existir en una red metabólica. Dicho conjunto puede analizarse utilizando análisis convexo.

Para el análisis de módulos elementales se utiliza la suposición de que el sistema está operando en estado estacionario y que el vector velocidad de este sistema puede ser descrito por una combinación de módulos elementales (Poolman *et al.*, 2001 y Papin *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista fisiológico, un módulo elemental debe cumplir las siguientes condiciones (Poolman *et al.*, 2001):

- 1 Un módulo está formado por el conjunto de reacciones las cuales, si todas sus actividades son alteradas proporcionalmente, todos los flujos resultan también alterados en igual proporción, sin embargo, la concentración de todos los demás metabolitos y la tasa de todas las demás reacciones que no intervienen permanecerán inalteradas;
- 2 Un módulo elemental es simplemente un módulo que no puede ser decompuesto en dos o más módulos más sencillos y que todavía cumplan la condición anterior.

En otras palabras, un módulo elemental es simplemente un sistema que puede ser resumido como una vía metabólica independiente dentro de un sistema más complejo.

Shuster *et al.* (1999) definen módulo elemental como un conjunto mínimo de enzimas que pueden operar en estado estacionario con todas las reacciones irreversibles que prosiguen en el sentido determinado termodinámicamente.

Un análisis del concepto de módulos elementales indica que cumplen las propiedades (Papin *et al.*, 2004):

P1. Existe un conjunto **único** de módulos elementales para una determinada red metabólica;

P2. Cada módulo elemental consiste de un número mínimo de reacciones necesario para que exista una unidad funcional. Si alguna reacción en un módulo elemental fuera eliminada, ese módulo elemental no podrá operar como una unidad funcional.

Esta propiedad es denominada “independencia genética” o “de no descomposición”;

Por tanto el conjunto de ‘Módulos elementales’ es aquel grupo de todas las vías de una red metabólica que cumplen la propiedad *P2*.

VI.1.1 Modelización Matemática

Desde el punto de vista matemático los módulos elementales de un sistema pueden ser definidos como un conjunto de vectores de flujo normalizados capaces de satisfacer la siguiente ecuación (Shuster *et al.*, 2002 y Poolman *et al.*, 2004):

$$N \times \alpha = 0 \quad (\text{VI.1})$$

donde N es la matriz estequiométrica de un sistema, incluyendo sólo los metabolitos internos a fin de satisfacer la hipótesis del estado estacionario, y α es un vector columna de dimensión [$r \times 1$] (r , número de reacciones) definida en la región del espacio nulo. Éste último representa un módulo elemental particular tal que (Poolman *et al.*, 2004):

- 1 Ninguna combinación de elementos en α diferentes de cero puede ser puesto a cero y todavía cumplir la Ecuación VI.1;
- 2 Los elementos de α que corresponden a las reacciones irreversibles de N presentan sólo valores positivos, asegurando así de que las vías no violen restricciones termodinámicas. Para su representación se descompone el vector de flujos α , de la Ecuación VI.1, en dos subvectores α_{rev} y α_{irr} , denominados de flujos de reacciones reversibles e irreversibles, respectivamente.

La irreversibilidad, en este contexto, no significa excluir una etapa reversa, sin embargo esta etapa debe siempre tener una tasa más baja que la etapa inversa. La orientación de las reacciones debe ser definida de modo que:

$$\alpha_{irr} \geq 0 \quad (\text{VI.2})$$

Por supuesto las reacciones en la matriz estequiométrica deben ordenarse de forma coherente con los vectores α_{rev} y α_{irr} . De acuerdo con la relación (VI.2) el número de reacciones en N puede ser dividido en:

$$N = (N_{rev} \quad N_{irr}) \quad (VI.3)$$

La desigualdad del vector VI.2 implica delimitar el espacio nulo de N en una cierta región del espacio accesible para el vector de flujo. Además una desigualdad concreta tal que $v_i \geq 0$, incluida en la relación VI.2 junto con la Ecuación VI.1, define también una delimitación para el espacio nulo de N . La intersección de las posibles soluciones a las ecuaciones anteriores define un espacio conocido como cono poliédrico convexo. Para el análisis de un cono poliédrico convexo, se requieren herramientas matemáticas del campo del análisis convexo. Éstas son más complejas que las herramientas habituales de álgebra lineal puesto que tiene que tener en cuenta las desigualdades mencionadas (Shuster *et al.*, 2002).

En ciertos casos de análisis '*in silico*' se consideran, además de las restricciones de direccionalidad, restricciones de capacidad de los flujos. Estas restricciones pueden especificarse de manera sencilla como en la Ecuación VI.4, donde β_j y γ_j pueden tomar cualquier valor entre cero e infinito. Su signo dependerá de las consideraciones de direccionalidad requeridas.

$$\beta_j \leq b_j \leq \gamma_j \quad (VI.4)$$

Por ejemplo, si el flujo representa una entrada a la red, los valores posibles del flujo se extienden desde $\beta_j = -\infty$ hasta $\gamma_j = 0$. En cambio si el flujo representara una salida los valores posibles de flujo se extenderían desde $\beta_j = 0$ hasta $\gamma_j = +\infty$. Si el flujo de metabolito pudiera darse en ambas direcciones, es decir un flujo bidireccional, los valores posibles de flujo se extenderían desde $\beta_j = -\infty$ hasta $\gamma_j = +\infty$ con lo que se permite un flujo sin restricciones de dirección (Schilling *et al.*, 2000).

VI.1.1.1 Definiciones y propiedades matemáticas de los módulos elementales

El análisis de módulos elementales presenta dos importantes definiciones matemáticas y tres propiedades (Shuster *et al.*, 2002):

Definición 1. Un módulo de flujo M , se define como el conjunto:

$$M = \{ \alpha \in \mathcal{R}^r : \alpha = \lambda \alpha^*, \lambda > 0 \} \quad (\text{VI.5})$$

donde α^* es un vector r -dimensional (diferente del vector nulo), que cumple las siguientes condiciones:

C1. Satisface la condición de estado estacionario y por tanto cumple la Ecuación VI.1;

C2. α^* contiene un subvector α^{*irr} , que cumple la desigualdad VI.1, en el cual los componentes de α^{*irr} corresponden a las reacciones irreversibles.

Definición 2. Un módulo de flujo M representado por α^* es denominado de módulo de flujo elemental si, y solamente si, α^* cumple la siguiente condición:

C3. α^* No puede ser descompuesto. Es decir no puede ser representado como una combinación lineal positiva tal como:

$$\alpha^* \neq \lambda_1 \alpha' + \lambda_2 \alpha''; \quad \lambda_1, \lambda_2 > 0 \quad (\text{VI.6})$$

Por medio de dos vectores de flujo α' y α'' (diferentes al vector nulo) que cumplan las siguientes propiedades:

- i.** α' y α'' obedecen las restricciones impuestas por (C1) y (C2);
- ii.** Ambos α' y α'' contienen elementos nulos en los mismos lugares que α^* , y cada uno incluyen al menos un componente nulo adicional, es decir

$$S(\alpha^*) \subset S(\alpha') \quad , \quad S(\alpha^*) \subset S(\alpha'') \quad (\text{VI.7})$$

Por tanto y por simplicidad nos referiremos a los módulos elementales por sus apropiados vectores representantes de acuerdo con las condiciones anteriores.

La condición (C3) está relacionada con la propiedad de los 'vectores generadores' de conos en punta que establece que dichos vectores no pueden ser descompuestos en otros dos vectores que pertenezcan al mismo cono. En

algunos casos puede ser necesario trabajar con conos no en punta. En estos casos es necesario añadir algún vector apuntando al interior del cono para completar el conjunto de vectores generadores. Aunque en principio estos vectores podrían ser descompuestos como combinación de otros vectores, es posible escogerlos de forma que no lo sean atendiendo a la propiedad de simplicidad definida por la posición de los ‘ceros’ (condición C3, *ii*). Esto implica que la descomposición de un modo en otros dos no puede incluir enzimas (pasos, reacciones) adicionales.

Para hallar grupos de vectores generadores de conos convexos, se han venido desarrollando distintos algoritmos aunque la literatura al respecto es escasa. Estos utilizan la metodología del análisis convexo en la que se busca solucionar un sistema de ecuaciones homogéneas y de desigualdades lineales.

Por ejemplo el algoritmo propuesto por Nožička *et al.* (1974) y los más difíciles propuestos por Chernikov (1968) permiten encontrar el conjunto mínimo de vectores generadores en el sentido de que engendran el cono (es decir pueden extenderse hacia cualquier parte del cono), mientras que cualquier subgrupo de los mismos no puede. Si todas las reacciones fueran irreversibles, este conjunto correspondería a los lados del cono. Además en este caso representaría un conjunto completo de módulos elementales (Schuster & Hilgetag, 1994).

En el caso de existir reacciones reversibles estos métodos habitualmente no proporcionan todos los que cumplen la Definición 2. Sin embargo es posible escoger un conjunto mínimo de vectores generadores llamados ‘base convexa’ (Schilling *et al.* 2000). Sin embargo este conjunto no será único. Esto representa un inconveniente si se pretende escoger un conjunto de vectores generadores con significado biológico. Una posibilidad propuesta por algunos investigadores consiste en descomponer las reacciones reversibles en dos reacciones de sentido opuesto irreversibles. En este caso, una vez hallados los módulos elementales hay que suprimir aquellos formados únicamente por una reacción y su inversa. En algunos casos la base convexa no contiene todas las vías metabólicas significativas desde un punto de vista bioquímico.

El algoritmo más utilizado actualmente utiliza todos los conjuntos de módulos elementales y fue modificado por Schuster *et al.* en 2000 (Schuster *et al.*, 2002) hallándose implementado en diversos paquetes de software entre los cuales se halla el utilizado en éste trabajo.

Los módulos elementales tienen la importante propiedad de que cada distribución de flujo posible puede ser expresada como una superposición de tales módulos, es decir, cada vector que se encuentra en el cono puede ser descrito como una combinación lineal no negativa de vectores de la base convexa y, opcionalmente además por otro vector α

Las propiedades matemáticas implicadas en la resolución de módulos elementales son:

Propiedad 1. Todos los vectores e que cumplen las condiciones (C1) y (C2) o representan módulos elementales o son combinaciones lineales positivas de vectores que representan módulos elementales, dado por:

$$\alpha = \sum_l \eta_l m_l, \quad \eta_l > 0 \quad (\text{VI.8})$$

donde el sumatorio previo presenta al menos dos índices diferentes l , y todos los m_l presentan componentes nulos, dónde α los tiene y también incluirán por lo menos un componente nulo adicional cada uno. Así tenemos:

$$S(\alpha) \subset S(m_l) \quad (\text{VI.9})$$

Además, todos los m_l que cumplen la Ecuación VI.8 representan módulos elementales reversibles si y solo si, α representa un módulo de flujo reversible.

Propiedad 2. Para cualquier par de vectores, α^* y α^{**} , donde α^* representa un módulo de flujo elemental y α^{**} representa un módulo de flujo conteniendo componentes nulos allí dónde α^* también tenga componentes nulos:

$$S(\alpha^*) \subseteq S(\alpha^{**}) \quad (\text{VI.10})$$

entonces α^{**} representa el mismo módulo elemental que α^* o el mismo módulo elemental que $-\alpha^*$, lo cual implica que $S(\alpha^*) = S(\alpha^{**})$.

Propiedad 3. Para dos sistemas de reacción Σ_a y Σ_b difiriendo solamente en que algunas reacciones sean reversibles en Σ_b mientras que en Σ_a son

irreversibles, todos los módulos elementales de Σ_a son también módulos elementales en Σ_b , la cual puede incluir módulos elementales adicionales.

El concepto de módulo elemental está íntimamente relacionado con el de 'vía extrema', descrito a continuación, y ambos conceptos se utilizan actualmente para analizar las propiedades de las redes metabólicas.

VI.1.2 Vías Extremas

Las vías extremas son vectores que también pueden utilizarse para describir el flujo de metabolitos de una red bioquímica y que caracterizan la funcionalidad de la red (Wiback *et al.*, 2003). Como se ha mencionado anteriormente a fin de restringir el espacio de soluciones a aquellas con significado bioquímico se establecen restricciones en forma de desigualdad que limitan tanto la dirección como los valores máximos posibles de los flujos. Debido a estas restricciones no se pueden usar los métodos tradicionales del álgebra lineal en estos sistemas. En su lugar es necesario utilizar el análisis convexo para estudiar el espacio de soluciones del sistema. El análisis convexo indica que el espacio de soluciones para un sistema de ecuaciones lineales y desigualdades queda restringido al delimitado por un cono poliédrico con su vértice en el origen. A esta región del espacio se la denomina 'cono de flujo C'. Todas las posibles soluciones al sistema operando en estado estacionario quedan restringidas al interior del espacio del cono. A fin de identificar de manera única dicho cono es necesario identificar un conjunto de 'aristas extremas' del cono o vectores 'generadores' (\mathbf{p}_i) (parecidas a las aristas de una pirámide), denominadas 'Vías Extremas' en el contexto de los sistemas metabólicos.

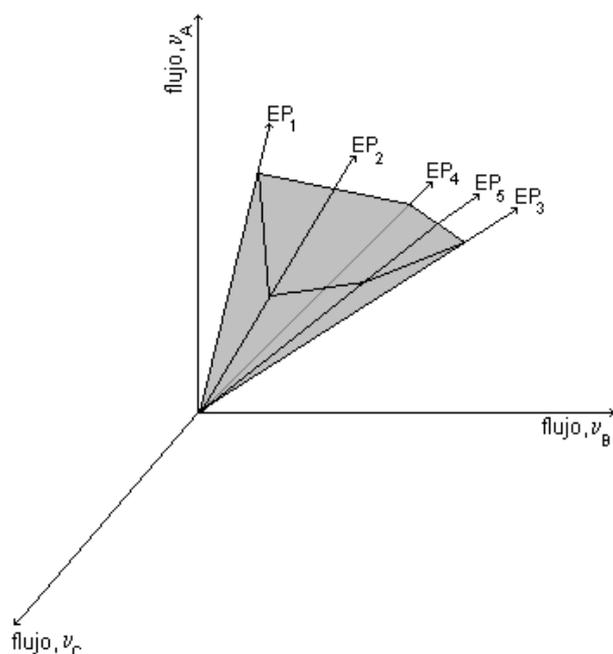


Figura VI.1 Representación esquemática de un cono convexo correspondiente a cinco vías extremas. Las vías extremas (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ y EP₅) permiten describir la solución en el espacio para los tres flujos indicados (v_A , v_B , v_C). EP₄ se encuentra en el plano formado por los flujos v_A y v_B , consecuentemente, el flujo v_C no participa de la vía extrema. EP₃, EP₄ y EP₅ están muy próximas y representan vías diferentes de la red, sin embargo, con resultados parecidos. Todos los puntos dentro del cono convexo pueden ser representados como una combinación lineal positiva de las vías extremas.

Referencia: Papin *et al.*, 2002.

Las ‘Vías Extremas’ (p_i) corresponden a un conjunto mínimo de vectores, en forma de base convexa, obtenido a partir de una matriz estequiométrica N y de las restricciones en forma de desigualdad, cuyo espacio de soluciones se halla incluido en el espacio cónico convexo. Es decir cada vía extrema cumple la Ecuación VI.1. Es decir el espacio delimitado por el cono contiene todas las posibles distribuciones de flujos en estado estacionario de una red metabólica definida (Figura VI.1), (Wiback *et al.*, 2003; Papin *et al.* 2002, <http://genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.327702>).

Las características de las vías extremas presentan tres propiedades importantes (Papin *et al.*, 2004):

P1. Existe un único conjunto de vías extremas para una cierta red metabólica;

P2. Cada vía extrema consiste de un número mínimo de reacciones necesario para que constituyan una unidad funcional;

P3. Las 'Vías Extremas' son subconjuntos linealmente independientes dentro de los módulos elementales, y por tanto no pueden ser representadas por una combinación lineal positiva de otra vía extrema.

Las vías extremas también pueden ser clasificadas conforme a los tipos de flujos metabólicos implicados en cada una de ellas siendo clasificadas en tres tipos (Palsson, 2003):

Tipo I. Este tipo de vía presenta flujos con intercambio a través de los límites del sistema, correspondientes a metabolitos que no son cofactores. Estas vías representan directamente las vías metabólicas primarias. Estas vías están relacionadas también con la conversión de substratos en metabolitos y productos, es decir, son vías que simplemente conectan una entrada a una salida (Figura VI.2).

Tipo II. En este tipo de vías incluyen flujos sin intercambio a través de los límites del sistema pero con intervención de cofactores o compuestos considerados moneda energética, tal como el ATP o el NADH entre otros. Estas vías generan ciclos fútiles, en los cuales se disipa la energía metabólica en términos de la energía libre (Figura VI.2).

Tipo III. El tercer grupo incluye los tipos de vías que consisten básicamente en ciclos internos que no tienen flujos de intercambio a través de los límites del sistema ni utilizan compuestos donadores de energía para su operación. Principalmente suelen ser el resultado de la interacción entre una serie de reacciones reversibles, como por ejemplo una reacción y otra reacción reversa por separado. Desde el punto de vista termodinámico estos ciclos no mostrarían ninguna actividad porque no hay ninguna fuente de energía. Por tanto pueden ser eliminados de la base convexa (Figura VI.2) (y por la misma razón de los módulos elementales si fuera el caso) sin tener que recurrir a métodos de optimización bilineal.

Estos tres casos están constituidos por vías extremas que están en el extremo del cono que determina el espacio de flujo.

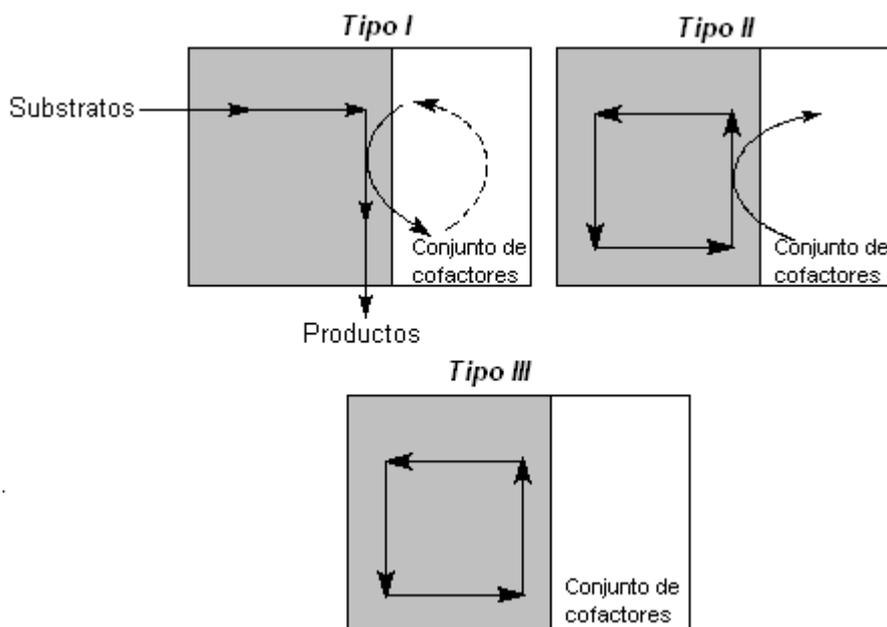


Figura VI.2 Tipos de vías extremas. Tipo I - representa vías metabólicas primarias; Tipo II. Ciclos fútiles (flujos de intercambio sólo con consumo de cofactores); Tipo III. Reacciones en ciclo (flujos en reacciones que no estarían activas).

Referencia: Papin *et al.*, 2002.

VI.1.2.1 Descripción Matemática

Se considera la región de espacio delimitada por un cono poliédrico convexo denominado, cono de flujo C , en el que los vectores representados son flujos metabólicos que están en estado estacionario. Todas las soluciones posibles, y por lo tanto las distribuciones de flujos en las que el sistema puede operar en estado estacionario, se hallan confinadas en el interior del cono.

Como se ha mencionado, para describir un cono convexo es necesario identificar el conjunto de 'aristas extremas' o 'vectores generadores (p_i)' del espacio delimitado por el cono. En este contexto, el estado de un sistema metabólico queda completamente definido por el vector formado por los valores de los flujos de las vías metabólicas en un estado determinado. Cada

vector generador corresponde a una vía particular o al conjunto de flujos que satisfacen la Ecuación VI.1 y las restricciones de desigualdad del sistema.

Cada punto (v), definido por el vector de flujos, dentro del cono puede ser escrito a su vez como una combinación lineal no negativa de vías extremas (Schilling *et al.*, 2001) tal como:

$$C = \left\{ v : v = \sum_{i=1}^k \alpha_i p_i, \quad \alpha_i \geq 0 \quad \forall i \right\} \quad (\text{VI.11})$$

donde el vector α_i corresponde al vector de factores o pesos que describen la contribución de cada vía extrema a los flujos representados. Sus valores deben ser positivos o cero debido a que las reacciones que describen el sistema se han definido como irreversibles y por tanto su combinación en vías extremas también lo son.

Así el conjunto de vías extremas es análogo al concepto de ‘base’ o ‘sistema de coordenadas’ que puede ser utilizado para describir una posición en el espacio que representa.

El cono de flujo en R^n puede ser considerado geoméricamente como la intersección entre el espacio nulo correspondiente a la Ecuación VI.1 y el espacio de los vectores que cumplen las desigualdades de las Ecuaciones VI.2 y VI.4. El espacio vectorial descrito por la Ecuación VI.2 es positivo en el espacio dimensional n_I , mientras el espacio vectorial descrito por la Ecuación VI.4 se refiere a una región del espacio de dimensión n_E . Así, el espacio de flujos puede ser descrito como un subconjunto convexo de R^n (Schilling *et al.*, 2000).

$$C = (R^{n_I} + x R^{n_E}) \cap (\text{Nul } N) \quad (\text{VI.12})$$

Los flujos que forman parte del cono contienen todos los puntos del espacio nulo cuyas coordenadas son positivas, (con excepción de los flujos de intercambio restringidos para que sean negativos).

Según las propiedades descritas para las vías extremas es posible definir un teorema fundamental para calcular las vías extremas. Este es dado por:

Teorema. Un flujo de cono convexo determinado por las Ecuaciones VI.1 y VI.3 se genera por vectores sistemáticamente independientes. Además, estos

vectores (de aristas extremas) son únicos (a excepción de cuando son multiplicados por un escalar positivo). Estos vectores obtenidos son llamados ‘vías extremas’ (Schilling *et al.*, 2000).

Matemáticamente este Teorema puede ser descrito como:

Sean $\{p_1, \dots, p_k\}$ vías independientes que generan los conjuntos cónicos c' y c'' múltiplos positivos de p_j , tenemos:

$$p_j = c' + c'' \quad (\text{VI.13})$$

Para que la Ecuación V.13 sea verdadera, considerando c' y c'' como dos vías y combinaciones lineales positivas de una vía extrema, tendremos:

$$c' = \sum_{i=1}^k \zeta_i p_i \quad y \quad (\text{VI.14})$$

$$c'' = \sum_{i=1}^k \lambda_i p_i \quad \text{para } \zeta_i, \lambda_i \geq 0$$

En la cual tendremos:

$$p_j = c' + c'' = \sum_{i=1}^k (\zeta_i + \lambda_i) p_i \quad (\text{VI.15})$$

A través de la Ecuación VI.15 se verifica que para que p_i sea sistemáticamente independientes, todos los ζ_i y λ_i deben ser iguales a cero, excepto para ζ_j y λ_j . Esto implica que c' y c'' sean múltiplos de p_j demostrando que el conjunto de vías extremas es única.

El algoritmo que describe el número de vías extremas para una red bioquímica fue desarrollado por Schilling *et al.* en 2000, y viene siendo utilizado y implementado en varios paquetes computacionales (Schilling *et al.*, 2000).

VI.1.2.2 Comparación entre módulos elementales y vías extremas

En un análisis comparativo, se puede decir que las propiedades I y II ($P1$ y $P2$) de las dos metodologías son iguales.

Sin embargo, los algoritmos para calcular módulos elementales y vías extremas difieren en relación a la forma en cómo son consideradas las reacciones internas. Estas pueden ser reversibles e irreversibles el caso de

los módulos elementales mientras que en el análisis de vías extremas todas las reacciones reversibles internas son escritas como dos reacciones por separado, obteniéndose así un par de reacciones en que cada una tiene sentidos opuestos. En el cálculo de módulos elementales el efecto del direccionamiento de esas reacciones es tenido en cuenta a través una serie de reglas específicas durante el cálculo de dichos módulos.

Las vías extremas corresponden a las aristas de un cono poliédrico convexo, y para satisfacer la exigencia de la independencia sistémica, el número de vías extremas obtenidos en estos cálculos deben ser menores o iguales al número de módulos elementales, utilizándose la misma red bioquímica. Consecuentemente, las vías extremas no son un conjunto que incluya todas las vías genéticamente independientes a través de una red metabólica. Por ello una combinación de varias puede dar lugar a un módulo elemental. Las tasas de cada reacción implicada definen los extremos del espacio convexo de la solución de una red bioquímica, correspondiendo así a los vectores de base convexa.

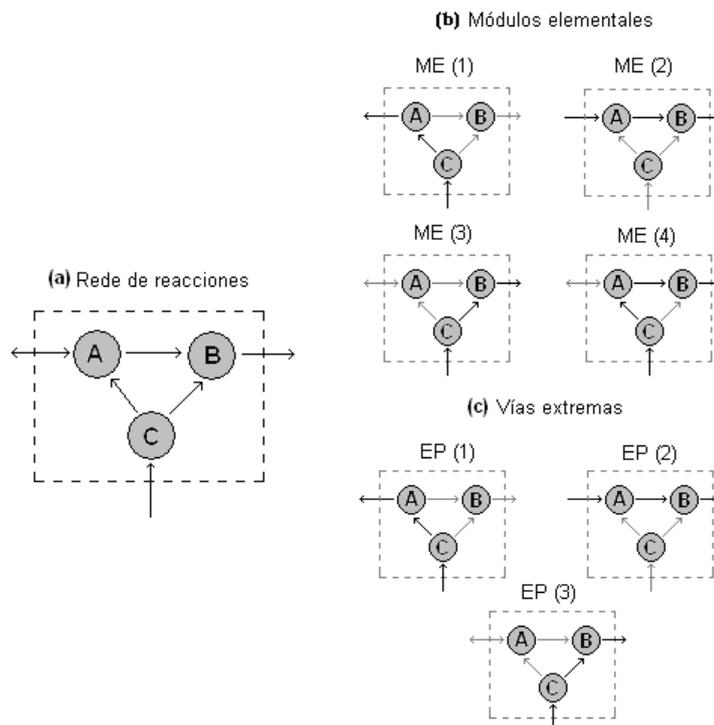


Figura VI.3 Ejemplo de una red bioquímica simple y sus vías extremas y módulos elementales. La red metabólica consiste en tres metabolitos, tres reacciones internas y tres reacciones de intercambio con el ambiente **(a)**, hay también cuatro módulos elementales (EM) **(b)** y tres vías extremas (EP) **(c)**. La diferencia entre los dos conjuntos de vías implica el uso del flujo externo que es reversible con el metabolito A. El módulo elemental EM (4) es una combinación lineal positiva de las vías extremas EP (1) y EP (2), sin embargo el flujo de intercambio con el exterior del metabolito A es reversible y la suma de las dos vías extremas obtiene un flujo nulo. Este ejemplo demuestra las características principales que diferencia las dos metodologías de cálculo.

Referencia: Papin *et al.*, 2004.

Por otro lado, los módulos elementales presentan un número mayor de combinaciones de vías metabólicas independientes que las vías extremas, incluyendo vías adicionales de la red, que se encuentran con criterios específicos aplicados al algoritmo de cálculo (Propiedad III de módulos elementales) (Papin *et al.*, 2004).

La Figura VI.3 ilustra los posibles módulos elementales y vías extremas de una pequeña red metabólica. Cabe resaltar, que en la Figura VI.3 las vías extremas EP1 y EP2 pueden ser combinadas para describir un

módulo elemental EM4. Esas combinaciones lineales de vías extremas satisfacen la condición de independencia genética de los módulos elementales.

Actualmente están disponibles algunos paquetes computacionales que utilizan el algoritmo descrito por Schuster *et al.* (2000) para calcular módulos elementales y de Schilling *et al.* (2000) para cálculos de vías extremas. Entre estos programas podemos citar el Metatool, FluxAnalyzer, Jarnac, Gepasi y ScrumPy (Poolman *et al.*, 2004).

VI.1.3 Cálculo de flujos en los módulos elementales

De acuerdo con Poolman *et al.* (2004) el término *flujos de los módulos elementales* se refiere a un valor numérico asociado a un cierto módulo elemental, el cual permite definir una tasa de entrada de substrato y salida de productos del modulo en cuestión.

Considerando un sistema con m módulos elementales y n reacciones, los módulos elementales pueden ser representados por una matriz E de dimensiones $[n \times m]$, y para cada uno de esos módulos podemos también atribuirle un flujo de módulo elemental definido como un vector columna α de dimensión m . Los elementos de la columna j de E (E_j), representan la contribución relativa (quizás cero), de cada una de las reacciones asociada a un módulo elemental dado. En estado estacionario, el flujo metabólico llevado por una reacción particular es la suma de los flujos atribuidos a los módulos elementales del sistema multiplicado por estos valores. Los elementos de E_j son adimensionales y los de α son designados por unidades de flujo. Además, los elementos de α que correspondan a módulos elementales irreversibles deben ser positivos. Si los flujos metabólicos fueran representados por el vector fila v la tasa de la reacción i podría escribirse como:

$$v_i = \sum_{j=1}^{j=m} E_{ij} \alpha_j \quad (\text{VI.16})$$

A través de la Ecuación VI.16 podemos obtener una expresión para todo el sistema, tal como:

$$v^T = E \alpha \quad (\text{VI.17})$$

Para calcular los flujos de módulos elementales es necesario el conocimiento de v . En este caso la Ecuación VI.17 deberá ser reordenada para que sea posible obtener α , sin embargo, no siempre es posible aislar α , debido a la posibilidad de que haya más módulos elementales que reacciones y por tanto la matriz E no sea cuadrada. Otra implicación de la Ecuación VI.17 es el hecho de no ser posible obtener α sino sólo un vector $\hat{\alpha}$ que corresponde la “mejor estimación” de α . En este contexto es necesario definir una función f , tal que:

$$\hat{\alpha} = F(E, v) \quad (\text{VI.18})$$

Generalmente no es posible determinar todos los flujos en un sistema experimental, entonces \hat{w} será función, de otro término, que será dado por:

$$\hat{\alpha} = f(E, v_0) \quad (\text{VI.19})$$

donde v_0 corresponde al vector de flujos determinados experimentalmente.

Substituyendo $\hat{\alpha}$ en la Ecuación VI.17, podemos calcular una estimación del vector de flujo del sistema \hat{v} , que puede venir dado por:

$$\hat{v}^T = E \hat{\alpha} \quad (\text{VI.20})$$

A través de la Ecuación VI.20 podemos verificar que comparando las tasas calculadas con las tasas medidas experimentalmente se proporciona una medida de consistencia. La falta de consistencia implicará en la presencia de errores, principalmente ocasionado por errores experimentales en las medidas de flujo, o también por la deficiencia en el método utilizado para calcular $\hat{\alpha}$ o incluso una mala descripción de la red.

Otro hecho relevante es que se podría determinar $\hat{\alpha}$ sin ser necesario medir todas las tasas de reacción del sistema, bastando sustituir $\hat{\alpha}$ en la Ecuación VI.17, esto permitiría calcular una estimación de aquellas tasas que no fueron medidas experimentalmente.

La Ecuación VI.17 representa en general un sistema indeterminado de ecuaciones lo que atribuye al vector α un número infinito de soluciones.

Sustituyendo $\hat{\alpha}$ en la Ecuación VI.17 y utilizando el método de la pseudoinversa de Moore-Penrose en E , obtenemos:

$$\hat{\alpha} = E^{\#} v \quad (\text{VI.21})$$

En un sistema biológico no todos los flujos son medidos experimentalmente. Eso implica que v deberá ser dividido en dos partes, donde v_0 corresponde a los flujos medidos experimentalmente y v_x los flujos no medidos, así como para E .

$$v = [v_0, v_x]$$

$$E = \begin{bmatrix} E_0 \\ E_x \end{bmatrix} \quad (\text{VI.22})$$

Los flujos medidos experimentalmente podrán ser rescritos como:

$$\hat{\alpha} = E_0^{\#} v_0^T \quad (\text{VI.23})$$

La Ecuación VI.23 tiene las siguientes propiedades:

- i. Si el sistema es determinado, tendremos $E_0^{\#} = E_0^{-1}$ el sistema será resuelto a través de un sistema de ecuaciones lineales;
- ii. Si el sistema es sobredeterminado, $\hat{\alpha}$ representa la solución por mínimos cuadrados;
- iii. Si el sistema es indeterminado, la Ecuación VI.21 generará una solución de norma mínima, que minimiza $\sqrt{\sum \hat{\alpha}_i^2}$.

El número de los elementos en \hat{w} depende solamente del número de módulos elementales en el sistema, sin que consideremos el número de elementos en v_0 . $\hat{\alpha}$ puede ser sustituido en la Ecuación VI.23 para obtener:

$$[\hat{v}_0, \hat{v}_x] = \hat{\alpha}^T \begin{bmatrix} E_0 \\ E_x \end{bmatrix} \quad (\text{VI.24})$$

Obteniéndose así un nuevo cálculo de las tasas medidas experimentalmente \hat{v}_0 y una estimación de tasas no medidas \hat{v}_x . La Ecuación VI.24 puede ser por tanto utilizada también para calcular flujos desconocidos de una red metabólica.

Por comparación con v_0 podemos obtener una estimación del error, que será dada por la siguiente ecuación:

$$\varepsilon = \frac{|\hat{v}_0 - v_0|}{|v_0|} \quad (\text{VI.25})$$

Por ejemplo si el valor de ε es 0 significará que no hay error, sin embargo, si el valor encontrado fuera 1 significa que el error obtenido es de igual magnitud al valor de los flujos medidos experimentalmente.

La Ecuación VI.21 posee las siguientes propiedades:

- i. Exactitud: A través de la Ecuación VI.21, podemos obtener \hat{w} , sin considerar el método utilizado y recalculando todos los flujos del sistema. Si sustituimos \hat{v}_0 en la Ecuación VI.21 obtenemos:

$$\hat{v}_0^T = E_0 E_0^T v_0^T \quad (\text{VI.26})$$

pero, para toda matriz M , $MM^\#$ será una matriz identidad generalizada de M , así:

$$\hat{v}_0 = v_0 \quad (\text{VI.27})$$

- ii. Nulidad: Como la Ecuación VI.21 representa la solución de norma mínima, cuando un ciclo no ocurre o no es permitido termodinámicamente se le atribuye como contribución un flujo cero.
- iii. Continuidad: La matriz $E_0^\#$ es independiente de los flujos medidos experimentalmente. Por tanto sí hay pequeños cambios en los valores de v_0 , también los habrá en los de $E_0^\# v_0$.
- iv. Cálculo computacional: La pseudoinversa de M ($M^\#$) existe para cualquier matriz y puede ser calculada a través de la metodología de descomposición de valores singulares (SVD). Dicho cálculo se encuentra implementado en varios paquetes computacionales comunes como Matlab.

VI.1.4 α -spectrum

Según Wiback *et al.* (2003) y de una manera análoga a como se ha descrito con los coeficientes α para los módulos elementales, se puede definir un coeficiente α de una vía extrema que permita reconstruir un vector de flujo asociado a dicha vía extrema. Generalmente también la determinación de los valores de los coeficientes α , para un determinado conjunto de flujos metabólicos y las correspondientes vías extremas del sistema, suele

presentar infinitas soluciones. La determinación de un rango de posibles valores de α que contenga las posibles soluciones en estado estacionario del sistema viene dado por la ecuación (Figura VI.4(a)):

$$E \cdot \alpha = v$$

$$\alpha_j \geq 0 \quad \text{si } E_j \text{ es irreversible, } j = 1, \dots, e \quad (\text{VI.28})$$

donde E es la matriz de los vectores de vías extremas, α es el vector de coeficientes asignado a dichas vías y v es la distribución de flujos de la red. Los coeficientes (α_i) para cada vía extrema individual (p_i) definidos para la red se maximizan o minimizan a la vez utilizando estrategias de programación lineal (LP) dejando todos los demás coeficientes de la vía extrema ($\alpha_j, \forall j = 1, \dots, n_p, j \neq i$) libres, lo que conlleva definir un rango de valores posibles para los coeficientes α y con ellos un "espectro α " (α -spectrum) (Figura VI.4 (b)).

Los rangos de los valores α_i pueden ser computados como:

Max α_i

$$\text{sujeto a } v = E \cdot \alpha, \quad i = 1 \dots n_p, \quad 0 \leq \alpha_i \leq 1,$$

Min α_i

$$(\text{VI.29})$$

$$\text{sujeto a } v = E \cdot \alpha, \quad i = 1 \dots n_p, \quad 0 \leq \alpha_i \leq 1,$$

donde v es el vector de flujos, α_i es el coeficiente correspondiente a la vía extrema, p_i y n_p es el número total de vías extremas. Ello implica resolver $2 \times n_p$ problemas de programación lineal obteniendo todos máximos y mínimos del rango de los coeficientes α . Por tanto dicha aproximación delimita los valores máximos y mínimos de los coeficientes α posibles para cada vía extrema para la reconstrucción del vector de flujos v . Dichos resultados se pueden representar en una grafica en dos dimensiones con la vía extrema en el eje x y el rango de α -coeficientes en el eje y . Los valores α_i pueden ser normalizados a la unidad utilizando los valores de v_{max} en p_i y por lo tanto, los α -coeficientes corresponden a una fracción de la capacidad máxima de la vía extrema. Por tanto el rango del eje 'y' será de 0 a 1. Algunas vías extremas no siempre son usadas para la reconstrucción de una distribución de flujo en particular, mientras que otras pueden tener un rango de α -coeficientes posible para unas determinadas condiciones. En algunos casos, los α -coeficientes se hallan restringidos a valores distintos de

cero y la vía extrema es siempre utilizada para una determinada distribución de flujos. Por otro lado cada valor α_i individual puede no variar independientemente de los valores del resto de α -coeficientes y sólo hay ciertas combinaciones de las vías dentro de un α -spectrum que son válidos.

Una medida de la amplitud de un α -spectrum puede ser definido como:

$$\text{amplitud del espectro} = \sum_{i=1}^{np} (\alpha_{\text{Max},i} - \alpha_{\text{Min},i}), \quad (\text{VI.30})$$

donde $\alpha_{\text{Max},i}$ y $\alpha_{\text{Min},i}$ son los coeficientes máximos y mínimos posibles para cada vía extrema (p_i).

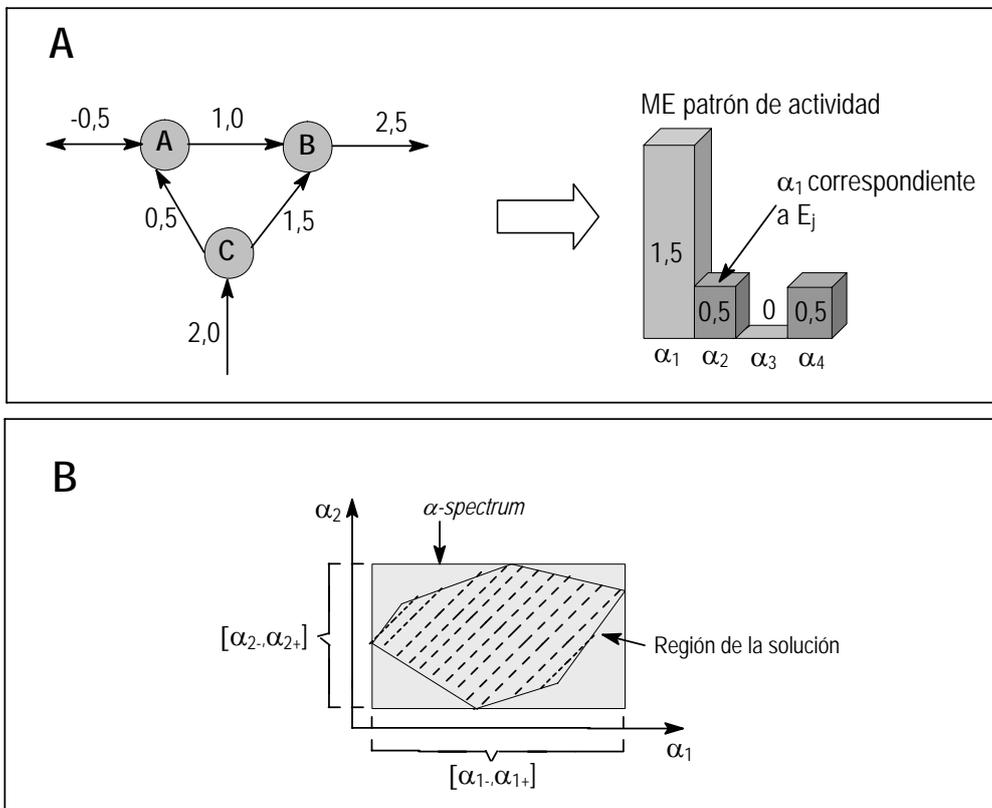


Figura VI.4 Un vínculo entre distribución de flujos y patrón de actividad de módulos elementales. (a) una posible translación de una distribución de flujo entre un patrón de actividad de módulo elemental. (b) proyección esquemática en dos dimensiones del α -spectrum. El polígono punteado es la proyección de la región de soluciones de la Ecuación VI.28, y el rectángulo es la proyección del α -spectrum (el α -spectrum es una superestimación de la región de la solución). El rango de posibles valores para las actividades de módulos elementales 1 y 2 son los intervalos en corchetes.

Referencia: Llaneras & Picó, 2007.

VI.1.4.1 Intervalo aproximado de un α -spectrum para módulos elementales

Como se ha descrito la traducción de una distribución de flujos metabólicos en un patrón de actividad de vías extremas en general no es único (es decir, no existe una solución única para la Ecuación VI.28, sino un rango de soluciones). El valor máximo y mínimo para cada α_j se puede calcular, y con los rangos que obtienen se determina la región que contiene la solución (Figura VI.4(b)). Este conjunto de rangos y la región definida es lo que llamamos α -spectrum. Una modificación del método en Wiback *et al.* (2003) permite calcular idéntico espectro del rango de soluciones posible y aplicarlo también cuando se utilizan los módulos elementales en lugar de vías extremas (es decir debido a la proximidad de los conceptos de módulo elemental y de vía extrema el método se puede aplicar en ambos casos). Ello permite a su vez representar *a priori* el intervalo posible de flujos metabólicos o espectro de flujos (Llaneras & Picó, 2007). Evidentemente dicho rango coincidirá con el de las vías extremas en los casos en que coincidan los módulos elementales con las vías extremas. La determinación de dicho rango se describe como:

$$\begin{aligned}
 & \forall \alpha_{j,l} = 1, \dots, e \\
 & \text{Min}\{\alpha_j\} \text{ sujeto :} \\
 & E.\alpha \geq v_{\min} \quad E.\alpha \leq v_{\max} \\
 & \alpha_j \geq 0 \quad \text{si } E_j \text{ irreversible } j = 1, \dots, e \\
 & \text{Max}\{\alpha_j\} \text{ sujeto :} \\
 & E.\alpha \geq v_{\min} \quad E.\alpha \leq v_{\max} \\
 & \alpha_j \geq 0 \quad \text{si } E_j \text{ irreversible } j = 1, \dots, e
 \end{aligned} \tag{VI.31}$$

donde α_j es la actividad de cada modo elemental, y v_{\max} y v_{\min} son vectores que contienen los valores máximos y mínimos asignados a cada flujo. En primer lugar, la Ecuación VI.28 ha sido adaptada para el intervalo de representación de flujos; la igualdad se ha sustituido por dos desigualdades. Esto implica que todos los valores $[v_{\min}, v_{\max}]$ son tenidos en cuenta. Por lo tanto, la región de las posibles soluciones se define, por una parte por las dos desigualdades y por el otro, por restricciones no negativas para cada módulo elemental irreversible. Es importante señalar que esta región contiene todos los patrones de actividad de módulos elementales que cumpla la Ecuación

VI.28 para cualquiera de las distribuciones de flujo en el intervalo de representación ($[v_{min}, v_{max}]$). Una vez que la región de las posibles soluciones se ha formulado, el mínimo y el máximo α_j para cada valor pueden ser calculados utilizando una rutina de optimización. Como todas las restricciones son desigualdades lineales, la resolución esta condicionada a la utilización de la programación lineal. Así, 2×e problemas de programación lineal deben ser resueltos para obtener los rangos, $[\alpha^{min}, \alpha^{max}]$ para cada uno de los α_j , que definen el α -spectrum (Llaneras & Picó, 2007).

Las ventajas que proporciona la aproximación por intervalos para el cálculo del α -spectrum puede ser resumido como:

- 1 El α -spectrum puede ser calculado, incluso cuando la distribución de flujos es parcialmente desconocida - se asigna un intervalo a cada flujo desconocido, como por ejemplo, $[0, \infty]$, $[-\infty, \infty]$ o $[0, v^{max}]$. Por lo tanto, el computo del α -spectrum contiene todos los patrones de actividad de módulos elementales que corresponden a una distribución de flujo compatible con los conocidos (Figura VI.5).
- 2 Es posible considerar el error intrínseco ejercido por las medidas experimentales en el cálculo del α -spectrum (Figura VI.5). El error de cada flujo medido debe estar en un intervalo, asumiendo un rango de error en torno a los valores de medida (por ejemplo, $[0,9 v^{medido}, 1,1 v^{medido}]$). Por lo tanto, el cálculo del α -spectrum será menos preciso, puesto que Ecuación VI.28 es sustituida por dos desigualdades, pero resulta más fiable.
- 3 Sólo si la región de flujo definida a través del intervalo de representación de flujos ($[v^{min}, v^{max}]$) contiene una distribución de flujos consistente el problema de programación lineal a resolver tiene solución. Así, puesto que una distribución de flujos inconsistente es necesariamente incierta, es conveniente definir una *banda de error* alrededor de la distribución de flujos medidos, que incluya al menos la solución consistente más próxima. El tamaño de esta banda debe basarse el rango de fiabilidad de las mediciones.
- 4 Un representación de flujos por medio de intervalos se puede utilizar para representar un rango de comportamientos o un conjunto estados

pseudo-estacionarios significativos. En este caso, el α -spectrum calculado representará el rango de patrones de actividad de los módulos elementales que se puede utilizar para describir la gama de comportamientos analizados. Este enfoque puede ser usado para obtener modelos cinéticos reducidos en los cuales sólo se consideran las vías metabólicas activas en un determinado conjunto de circunstancias.

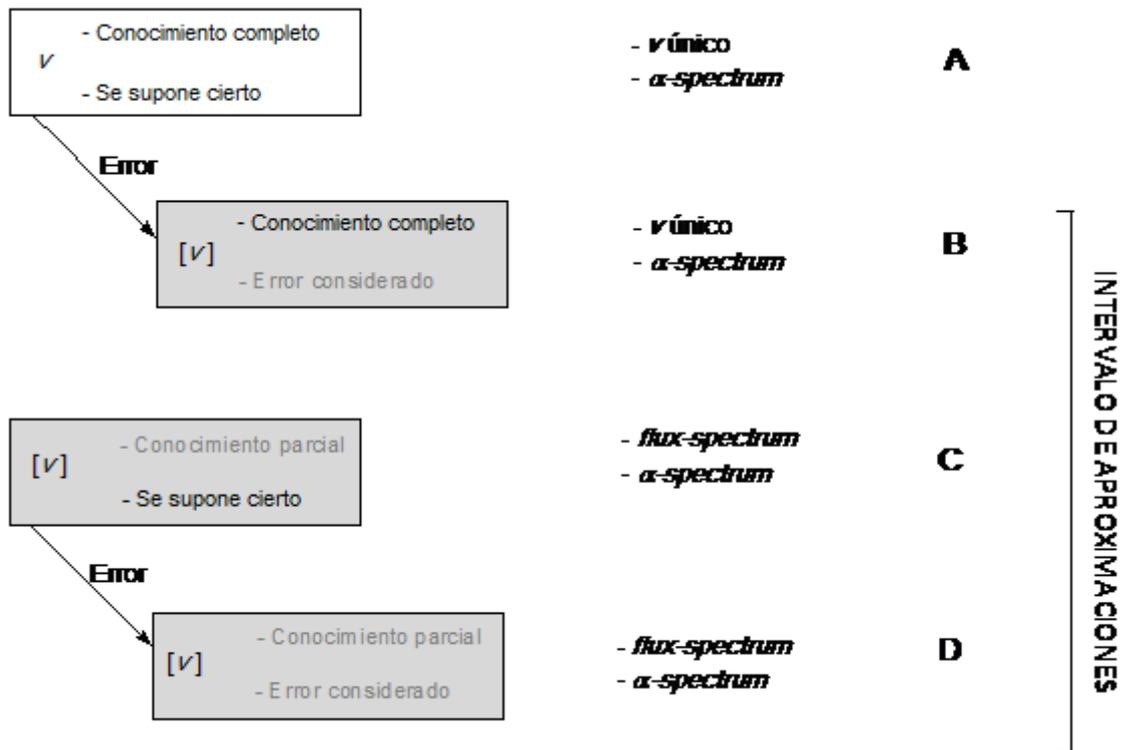


Figura VI.5 Aplicaciones del $flux$ -spectrum y α -spectrum. Dependiendo de las hipótesis asumidas acerca del grado de conocimiento y el nivel de error, la distribución de flujos se puede clasificar como: (A) completo y asumidas como ciertas, (B) completo, pero se suponen inciertas, (C) parcial y se asumen ciertas, y (D) parcial y inciertas. En el caso A, el α -spectrum puede ser calculado con anterioridad a los métodos existentes. En los casos B, C y D, una nueva aproximación debe ser usada para calcular el α -spectrum. Además, en los casos C y D, donde los flujos no se pueden calcular con el MFA, el $flux$ -spectrum puede ser utilizado.

Referencia: Llaneras & Picó, 2007.

VI.1.4.2 Cálculo de flujos no medidos: aproximaciones del espectro de flujos (flux-spectrum)

Aunque los flujos intracelulares pueden ser medidos *in vivo* a partir de experimentos con trazadores isotópico, hay varias situaciones en las que estas técnicas son insuficientes o inadecuadas. En estos casos, el MFA es una herramienta muy útil para complementar las medidas *in vivo*. Básicamente, la metodología del MFA nos proporciona la determinación de flujos mediante el uso de un modelo estequiométrico, un reducido conjunto de flujos medidos y el balance de masa en torno de los metabolitos intracelulares (Stephanopoulos *et al.*, 1998). El punto de partida para el análisis de flujos metabólicos es la Ecuación VI.32 dada por: $S \times v = 0$, $v_i \geq 0$ (para más detalles ver Capítulo IV). Esta ecuación es por lo general indeterminada donde tenemos $n - m$ grados de libertad, pero se pueden agregar restricciones adicionales por ejemplo si se miden algunos flujos intracelulares. Particionando la Ecuación VI.32 entre flujos medidos (m) y desconocidos (u) la ecuación fundamental del MFA puede ser escrita como:

$$S_{u \times v} u = -S_{m \times v} v_m \quad (\text{VI.33})$$

la Ecuación VI.33 puede ser utilizada para estudiar la determinación y la redundancia del sistema (Klamt *et al.*, 2002). Cuando el sistema es determinado y no redundante, la solución única es calculado mediante la inversa de la matriz de S_u . Si el sistema es determinado y redundante, las redundancias pueden ser utilizadas para calcular no sólo las mejores estimaciones, pero también para mejorar las medidas. En este caso, la inversa de la matriz S_u no puede ser calculada, siendo utilizada por ello la pseudoinversa (solución por mínimos cuadrados). Por último, si el sistema es indeterminado, donde la mayoría de los flujos no pueden ser calculados se requiere la utilización de métodos de optimización (ver Capítulo IV).

En sistemas indeterminados la distribución completa de flujos no puede ser calculada mediante el MFA. Llaneras & Picó (2007) propusieron un método que permite el cálculo de los posibles rangos de valores posibles para cada uno de los flujos no calculables, lo que resulta en una región de posibles soluciones. Esta región es denominada espectro de flujos o *flux-*

spectrum. Estos rangos se pueden obtener a partir de la solución de una serie de problemas mín-máx de programación lineal, que vendrá dado por:

$$\begin{aligned}
 & \forall v_{uj}, j = 1, \dots, n_u \\
 & \text{Min}\{v_{uj}\} \text{ sujeto :} \\
 & S_u \cdot v_u = -S_m v_m \quad v_i \geq 0 \\
 & \text{Max}\{v_{uj}\} \text{ sujeto :} \\
 & S_u \cdot v_u = -S_m v_m \quad v_i \geq 0
 \end{aligned} \tag{VI.34}$$

donde cada v_{uj} representa un flujo desconocido, n_u el número de flujos desconocidos y v_i son las reacciones irreversibles. Cuando el flujo real de la distribución no es totalmente determinado, las mediciones disponibles (Ecuación VI.33) y las restricciones de irreversibilidad definen la actual región de distribución de flujo existente. Para obtener una estimación de los flujos desconocidos, es posible calcular los valores máximos y mínimos (en la región) para cada flujo v_{uj} mediante una rutina de optimización. Como todas las restricciones son desigualdades lineales, la programación lineal puede ser utilizada para este propósito. Los rangos obtenidos ($[v^{min}, v^{max}]$ para cada v_{uj}) definen el *flux-spectrum*.

Si los flujos no pueden ser calculados a través de la Ecuación VI.33, la metodología del *flux-spectrum* puede ser utilizada para calcular los límites de sus posibles valores. En muchas ocasiones se encuentra prácticamente un único valor de flujo, como resultado de un rango bastante estrecho. La amplitud del rango obtenido depende de la cantidad de flujos de desconocidos, el número de reacciones irreversibles y el número de medidas. La disponibilidad de nuevas restricciones - sea flujos medidos o reacciones irreversibles - permite obtener límites más estrictos. Cuando el número de medidas independientes es igual a $n-m$, el sistema es determinado, y el *flux-spectrum* conlleva a una única solución que puede ser calculada directamente a partir de la Ecuación VI.33.

Además, también es posible calcular el *flux-spectrum* cuando los flujos medidos se hallan representados por un intervalo (Figura VI.5). Esto implica la resolución de un conjunto de problemas de programación lineal, donde la restricción de igualdad ha sido sustituida por dos desigualdades:

$$\begin{aligned}
& \forall v_{ij}, j = 1, \dots, n_u \\
& \text{Min}\{v_{ij}\} \text{ sujeto :} \\
& S_u \cdot v_u \geq (-S_m v_m)^{\min} \quad S_u \cdot v_u \leq (-S_m v_m)^{\max} \quad v_i \geq 0 \\
& \text{Max}\{v_{ij}\} \text{ sujeto :} \\
& S_u \cdot v_u \geq (-S_m v_m)^{\min} \quad S_u \cdot v_u \leq (-S_m v_m)^{\max} \quad v_i \geq 0
\end{aligned} \tag{VI.35}$$

donde $(-S_m v_m)^{\min}$ y $(-S_m v_m)^{\max}$ son los valores máximo y mínimo para el producto $-S_m v_m$. Con el fin de obtener estos extremos es necesario combinar los valores máximos y mínimos para cada v_m teniendo en cuenta los signos de los elementos de la matriz S_m .

Con esta ampliación el *flux-spectrum* puede ser utilizado no sólo cuando el sistema es indeterminado, sino también cuando el sistema obtenido es determinado. De hecho, el *flux-spectrum* representa una variante de la metodología del MFA clásico, que a pesar de basarse en las mismas hipótesis (Ecuaciones VI.32 y 33), presenta algunas ventajas adicionales:

- 1 El *flux-spectrum* proporciona una estimación de los flujos no medidos y incluso cuando el sistema es indeterminado y la Ecuación VI.33. no se puede utilizar para calcular directamente la distribución completa de flujo.
- 2 Es posible considerar los errores intrínsecos de las medidas experimentales e incluso el conocimiento cualitativo (Por ejemplo, valores mínimos o máximos para determinadas medidas) en el cálculo de flujos no medidos. En este caso, las restricciones sobre el problema son más amplias. Por lo tanto, el rango de los valores obtenidos para cada flujo será mayor que en los casos que se asumen las medidas sin errores.
- 3 La representación de los flujos por intervalos provee de un método para afrontar la inconsistencia. Sólo los casos en que el intervalo de flujos $[v^{\min}, v^{\max}]$ contiene una distribución de flujo consistente, los problemas de programación lineal tienen una solución.
- 4 El *flux-spectrum* permite incluir restricciones de reversibilidad, restringiendo más la gama de la estimación de flujos. Eso será útil cuando el sistema es indeterminado o cuando los errores de los flujos

medidos se han tenido en cuenta. Además, estas restricciones proporcionan un método para detectar inconsistencias incluso cuando el sistema no es redundante.

VI.2 Estudio Experimental

VI.2.1 *FluxAnalyzer*

FluxAnalyzer es un programa desarrollado por investigadores del Instituto Max Planck en Alemania con el objetivo de calcular flujos metabólicos y módulos elementales, su principal ventaja en relación a otros programas se halla, sobre todo en la utilización del entorno Windows, así como ser desarrollado como una ‘toolbox’ para el programa comercial Matlab. Otra ventaja está en su interfaz gráfica integrada, siendo posible visualizar, a través de un dibujo de la red metabólica hecha por el propio usuario, los flujos metabólicos calculados, así como los diagramas, gráficos y matrices obtenidas en los cálculos (Klamt *et al.*, 2003).

Además de calcular flujos metabólicos utilizando la metodología del MFA, el *FluxAnalyzer* permite también calcular y visualizar módulos elementales y vías extremas tanto para redes metabólicas simples como para redes complejas (Klamt *et al.*, 2003).

El procedimiento utilizado para calcular módulos elementales esta basado en el algoritmo iterativo descrito por Shuster *et al.* (2000). Un algoritmo similar es utilizado para resolver cálculos de vías extremas, utilizando la metodología descrita por Schilling *et al.* (2000).

El cálculo del análisis combinatorio realizado por el *FluxAnalyzer* para obtener módulos elementales viene dado por la Ecuación VI.36

$$\alpha \leq \alpha_{\max} = \binom{q}{m+1} = \frac{q!}{(q-m-1)!(m+1)!} = \frac{q(q-1)(q-2)\dots(q-m)}{(m+1)!} \quad (\text{VI.36})$$

donde α_{\max} es el límite superior para el número α de módulos elementales (asumiendo rango completo de la matriz estequiométrica E y el número de metabolitos $m <$ número de las reacciones q).

VI.2.2 Metodología de cálculo

Para calcular los módulos elementales y vías extremas se utilizó la versión 5.0 del programa *FluxAnalyzer*. Cada una de las reacciones reversibles fue re-escrita en dos reacciones de sentidos opuestos, lo que resultó en un total de 68 reacciones bioquímicas para la red metabólica descrita en el Capítulo IV (apartado IV.2) y anexo (apartado A.II). El objetivo de considerar las reacciones reversibles como dos reacciones independientes de sentidos opuestos, tiene como finalidad obtener todas las combinaciones posibles de subredes metabólicas, como combinaciones lineales positivas. Aunque en principio se podrían considerar todas las reacciones como reversibles, se consideran como reacciones irreversibles aquellas que se sabe están muy desplazadas del equilibrio y cuya reversibilidad requeriría utilizar concentraciones de productos muy elevadas. Ello ayuda a disminuir el número de posibles soluciones al sistema. La consideración de reacciones reversibles es necesaria en aquellos casos en que se conoce que las reacciones se hallan habitualmente cercanas al equilibrio y pueden funcionar en ambas direcciones dando flexibilidad a la red. También en muchas ocasiones puede haber formación y consumo simultaneo de un determinado sustrato, siendo muy común en reacciones de transporte entre compartimentos celulares.

El análisis estructural de la red metabólica (identificación de módulos elementales) fue realizado utilizando las dos metodologías disponibles (Módulos elementales descrito por Shuster *et al.* (1994) y Vías Extremas descrito por Schilling *et al.* (2000)).

En todos los casos el número de subredes obtenidas fueron las mismas para ambas las metodologías debido a las restricciones impuestas.

VI.2.3 Análisis estructural

La red metabólica global descrita en este trabajo presentó inicialmente un total de 994 módulos, Éste número de módulos fue reducido al seleccionar solamente los módulos significativos de acuerdo con cada condición de cultivo.

Una primera simplificación consistió en eliminar las reacciones que no están operativas en cada condición de cultivo:

Así, en los cultivos cuya fuente de carbono fue glucosa o glicerol no fueron considerados las reacciones correspondientes a asimilación de metanol (*meth_upt*, *form_out*, *formoh_out*, *tr_xyl*, *tr_form*, *tr_gap*, *tr_dha*, *vm1-5*) y la reacción del enzima málico (*ana3*), ya que estudios realizados por A. Solà (2004) demostraron que dicho enzima no es operativo en las mencionadas condiciones de cultivo.

En todas las condiciones se eliminaron los módulos conteniendo las reacciones *ace_out* y *eth_out*, pues no hay formación de acético y etanol.

Además de estas simplificaciones, en cada condición de cultivo no fueron consideradas las siguientes reacciones:

- 1 Crecimiento sobre glucosa: no fueron considerados los módulos conteniendo la reacción correspondiente a gluconeogénesis (reacciones reversas de la vía EMP) y las reacciones referentes a asimilación y formación de glicerol (*gly* y *gly_upt/gly_out*);
- 2 Crecimiento sobre glicerol: no fueron considerados los módulos conteniendo las reacciones referentes a asimilación y formación de glucosa (*emp1* y *glu_upt/glu_out*);
- 3 Crecimiento sobre metanol: no fueron considerados los módulos conteniendo las reacciones referentes a asimilación y formación de glucosa (*emp1* y *glu_upt/glu_out*) y las reacciones correspondientes a formación de formato y formaldehído (*form_out* y *formoh_out*);

- Crecimiento sobre mezclas de glicerol y metanol: no fueron considerados los módulos conteniendo las reacciones referentes a asimilación y formación de glucosa (*emp1* y *glu_upt/glu_out*) y las reacciones correspondientes a formación de formato y formaldehído (*form_out* y *formoh_out*).

El número de módulos elementales obtenidos para cada condición de cultivo fue reducido también al eliminar aquellos que intervenían en la formación de ciclos fútiles (ciclos que no tienen significados biológicos). Estos ciclos corresponden normalmente a pares de reacciones reversibles.

El número de módulos elementales obtenido finalmente para cada condición se presenta en la Tabla VI.1.

Tabla VI.1 Número de Módulos Elementales operativo en cada condición de cultivo.

<i>Condiciones de cultivo</i>	<i>Número de Reacciones Eliminadas</i>	<i>Módulos Elementales (a)</i>	<i>Número de Ciclos Fútiles Eliminados (b)</i>	<i>Número Total de Módulos Elementales (a - b)</i>
Glucosa	19	32	12	20
Glicerol	19	19	12	7
Metanol	9	36	12	24
Mezclas	8	71	12	59

Las reacciones que componen cada módulo elemental no están presentadas en la memoria.

La Figuras VI.6 presentan un ejemplo de módulos elementales para tres situaciones distintas de cultivo.

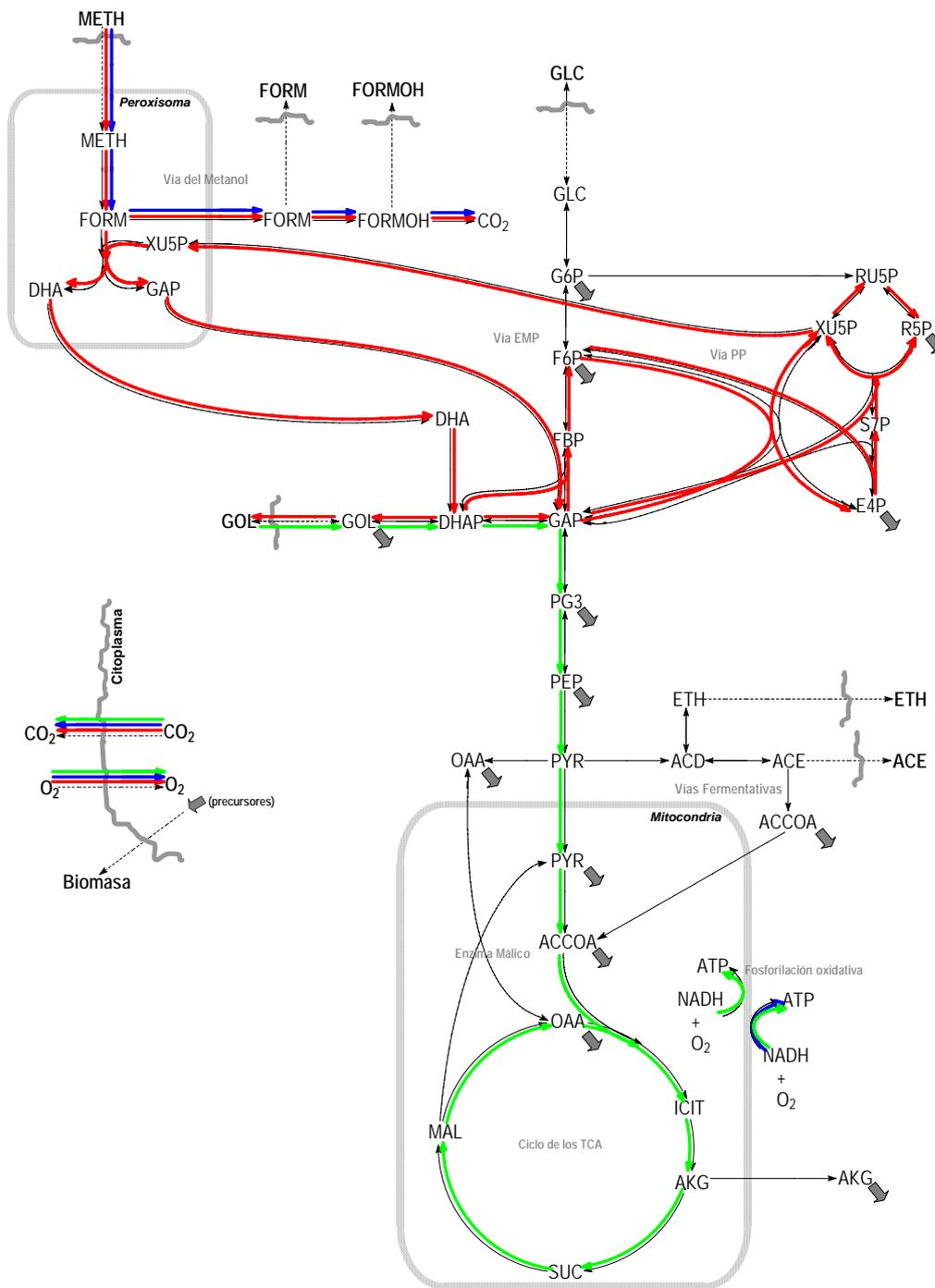


Figura VI.6 Ejemplo de modulo elemental para tres diferentes situaciones de cultivo, donde las líneas en verde representan un módulo elemental de un cultivo operado con glicerol, las líneas en rojo representan un módulo elemental de un cultivo operado con metanol y las líneas en azul representan un módulo elemental de un cultivo operado con mezclas de glicerol/metanol.

VI.2.4 Cálculo de flujos asociados a los módulos elementales

El cálculo de flujos metabólicos a través de la utilización de módulos elementales es una metodología nueva que ha sido recientemente aplicada por la primera vez por Poolman *et al.* (2004) con la finalidad de verificar los principales módulos elementales que componen la red metabólica de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus*, y los flujos metabólicos asignados a estos módulos. Se trata de una metodología que todavía no está bien definida y cuya aplicación al presente caso demostró presentar distintas soluciones.

En el presente trabajo se intentó el cálculo de flujos metabólicos asociados a los módulos elementales identificados en el apartado anterior utilizando la metodología de Poolman *et al.* (2004).

Así, a partir de los módulos elementales obtenidos anteriormente fue generada una matriz estequiométrica (E) de n flujos metabólicos por m módulos elementales para cada condición de cultivo. Fueron eliminadas las columnas correspondientes a los módulos eliminados descritos anteriormente. La matriz estequiométrica obtenida fue normalizada con relación al substrato utilizado. Para las mezclas glicerol/metanol fue considerada la suma entre estos dos substratos.

Se utilizaron dos metodologías distintas para calcular los flujos asociados a los módulos elementales:

1) la primera metodología consistió en calcular directamente el flujo (α) a través de la Ecuación VI.21 (apartado VI.1.3);

2) la otra metodología empleada consistió en utilizar la optimización por mínimos cuadrados no negativos, a través de la función *lsqnonneg* contenida en el software Matlab, tal y como se describe en el Capítulo II, apartado II.2.2.1.

Como alternativa a estas metodologías de cálculo, también se probaron otras dos estrategias alternativas con el objetivo de obtener los flujos asociados a los módulos elementales, estas alternativas consistieron en:

3) En la tercera tentativa fue generado un vector (v) con j flujos medidos experimentalmente (CO_2 , O_2 , biomasa, glicerol, glucosa y metanol), las filas correspondientes a flujos únicamente internos, es decir los flujos no medidos experimentalmente, fueron eliminados.

4) En la cuarta tentativa fue generado un vector (v) con k flujos metabólicos obtenidos en los cálculos anteriores a través del empleo de la metodología del MFA.

Los resultados obtenidos con estos dos grupos de metodologías no fueron satisfactorios. Concretamente, cuando los flujos fueron calculados a través de la Ecuación VI.21 (primera metodología), algunos de los flujos de los módulos elementales fueron negativos. Tal y como se ha explicado anteriormente (apartado VI.2.2) todas las reacciones que componen cada uno de los módulos fueron descritas como unidireccionales, lo que debería resultar en flujos a través de dichos módulos siempre positivos. Por otro lado, cuando fue aplicada la técnica de optimización (segunda metodología), la mayoría de los flujos fue igual a cero.

Para la verificación de los resultados, y al margen de las consideraciones anteriores, los valores de flujo obtenidos fueron utilizados para recalcular los valores experimentales medidos (Ecuación VI.17). Ninguna de las metodologías empleadas permitió reconstruir los valores medidos dentro del margen de error experimental. Por tanto los resultados obtenidos no pueden considerarse satisfactorios (los resultados de estas comprobaciones no se han incluido en la memoria). Las soluciones encontradas con las distintas metodologías probablemente se corresponden con mínimos locales que solamente se aproximan a la solución del sistema. Para intentar encontrar una mejor solución se pasó a incluir nuevas restricciones derivadas de la información de flujos relativos obtenida mediante la metodología del marcaje de ^{13}C .

VI.2.5 Cálculo de flujos asociados a los módulos elementales incluyendo restricciones de ^{13}C

Como se ha mencionado anteriormente para poder analizar y comparar el estado fisiológico de una célula en estado estacionario se necesita establecer una serie de variables que permitan determinar el estado del sistema metabólico. En primera aproximación los valores de los flujos de las distintas reacciones (el vector de flujos) que constituyen el sistema metabólico parecen servir apropiadamente a dicho propósito y de hecho se han utilizado ampliamente. Sin embargo a medida que dejamos de utilizar sistemas metabólicos simplificados para pasar a utilizar sistemas metabólicos de tamaños reales debemos enfrentarnos a la inclusión, y por tanto a la posible variación en distintos estados, de un elevado número de variables lo que dificulta enormemente su interpretación por el observador humano. Por ello se intentan utilizar variables derivadas o alternativas que permitan una mejor comprensión de las variaciones que tienen lugar en el metabolismo celular al cambiar de un estado a otro.

Como se ha descrito previamente, la caracterización de las capacidades y características estructurales de una determinada red metabólica se puede llevar a cabo a través de aplicación de los conceptos conocidos como 'módulos elementales de flujo' (EFMs, elementary flux modes) y/o de las 'vías extremas' (EPas: Extreme Pathways). Aunque detrás del desarrollo de estos conceptos se halla su aplicación a la mejora en la comprensión del funcionamiento de redes metabólicas de cualquier tamaño y en último término las derivadas de la reconstrucción metabólica a partir de genomas enteros, encontramos su aplicación más habitual a redes de tamaño moderado debido al enorme incremento de EFMs y EPas a medida que se utilizan redes más complejas (fenómeno conocido también como explosión combinatoria). A pesar de ello los diferentes EFMs o EPas parecen ser una excelente herramienta en el análisis y caracterización de las capacidades de las redes metabólicas.

Desde un punto de vista teórico cualquier distribución de flujos en estado estacionario puede ser reconstruida a partir de la combinación lineal de los flujos correspondientes a los distintos EFMs o EPas de la red subyacente. Sin embargo no todos los estados de distribución de flujo posibles *a priori* desde el punto de vista teórico de los EFMs o EPas, tienen porque ser necesariamente alcanzables por una red metabólica real. Principalmente porque en su determinación se tienen en cuenta solamente consideraciones estequiométricas y termodinámicas globales (sentido de los flujos) dejando aparte otras, como por ejemplo las cinéticas, debido principalmente a la insuficiencia de datos. Por otro lado es de esperar que no todos los EFMs o EPas contribuyan de igual manera a un determinado estado fisiológico de distribución de flujos.

En el contexto de la comparación de distintos estados fisiológicos de distribución de flujos sería muy interesante poder llevar a cabo una redistribución de dichos flujos entre los distintos EFMs o EPas que permitiera determinar los módulos de flujo dominantes en cada caso. Ello permitiría alcanzar una mejor comprensión de la adaptación de una determinada red metabólica a unas condiciones de operación determinadas y significaría un avance importante hacia la determinación de posibles mejoras a través de la manipulación de las condiciones operacionales o de la aplicación de la ingeniería genética o metabólica.

En el siguiente apartado se explorará la aplicación de estos conceptos a la red metabólica principal utilizada en este trabajo. Dicha red metabólica, aunque simplificada, pretende representar las características principales de la red metabólica real subyacente en *P. pastoris*. Asimismo pretende servir de paso intermedio hacia el estudio de redes metabólicas más complejas, como sería el caso de una red derivada del conocimiento de las capacidades metabólicas de *P. pastoris* a partir de la secuenciación y anotación de su genoma. Las reacciones metabólicas incluidas en esta fase derivan del conocimiento actual de las principales reacciones bioquímicas conocidas de este organismo o en su defecto de las derivadas por analogía de las conocidas de *S. cerevisiae*. Dicha información se deriva de la bibliografía actual y

representa al paso previo a una reconstrucción futura más completa a partir del genoma de *P. pastoris*.

VI.2.5.1 Expresión de la contribución de cada módulo al vector de flujos

La definición de la contribución de cada EFM o EPa a un determinado vector de flujos se lleva a cabo habitualmente a través del valor de los factores (α_i) utilizados para obtener la combinación lineal de EFMs o EPas que reconstruye el vector de flujos metabólicos. Sin embargo el valor de los factores obtenidos no es independiente del factor de escala asignado durante la normalización de los módulos. Los módulos se suelen normalizar de manera que el menor valor utilizado en los coeficientes estequiométricos sea 1. Cuando alguna de las reacciones estequiométricas presenta valores muy pequeños toda la reacción se normaliza por un factor elevado. Este hecho tiene un impacto significativo cuando se utiliza una sola reacción estequiométrica para representar la síntesis de biomasa. Así por ejemplo, si para la generación de 1 carbono mol de biomasa se consumen cantidades milimolares de cualquier metabolito intracelular, toda la reacción se reescala a un orden de magnitud 3 veces superior. En consecuencia cuando se calcula el factor de la contribución de un módulo al vector de flujos su valor numérico resulta proporcionalmente disminuido. Por otro lado el conocimiento del valor de dicho factor puede no dar una idea clara de la contribución de su módulo correspondiente al vector de flujos. Desde un punto de vista vectorial los módulos elementales son vectores que presentan distintos ángulos con respecto al vector de flujos y dicha orientación en ese caso no se tendría en cuenta. Una alternativa podría ser utilizar el producto del módulo correspondiente por su factor, puesto que el resultado sería independiente del factor de escala del módulo y la suma de todos los vectores así calculados debe ser igual al vector de flujos. Sin embargo se pasaría de usar un solo número para comparar distintos estados a utilizar un vector completo.

Como alternativa, en este trabajo se considerará la longitud del vector de flujos como una de las características básicas que definen un determinado estado metabólico además de la relación de determinados flujos entre ellos. En este contexto se utilizará, para valorar la contribución de un determinado módulo a un vector de flujos, su contribución a la longitud de dicho vector. Es decir la proyección geométrica del vector de un módulo (producto del módulo por su factor) sobre el vector de flujos o también la componente del vector de un módulo sobre el vector de flujos. Dicha proyección presenta la ventaja de que la suma de las proyecciones de todos los módulos que intervienen para generar un determinado vector de flujos es igual a la longitud (norma del vector o módulo) del vector de flujos y por tanto puede expresarse en porcentaje. El proceso es idéntico al utilizado para calcular el efecto de varias fuerzas en la fuerza resultante sobre un objeto. En notación vectorial dicha contribución se calcula como:

$$\|p_{vi}\| = \left\| \left(\frac{p_i \cdot v}{v \cdot v} \right) v \right\|; \quad p_i = E_i \alpha_i \quad (\text{VI.37})$$

donde p_i representa el producto del módulo E_i por su correspondiente factor α y $p_i \cdot v$ y $v \cdot v$ representan los productos escalares de los correspondientes vectores de flujo v y el flujo p_i asignado al módulo E_i y p_{vi} es la proyección del vector p_i sobre el vector v . La contribución se expresa finalmente como el porcentaje de la norma euclidiana del vector p_{vi} sobre la norma del vector v .

VI.2.5.2 Inclusión de la información de las relaciones entre flujos (cocientes de flujos) en el cálculo de los flujos y distribución de flujos para el cultivo operado con glucosa a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$

Como se describe en la primera parte de esta memoria, es interesante incluir la información derivada del marcaje de la fuente de carbono con ^{13}C en el cálculo de flujos metabólicos. En el presente trabajo, dicha información está disponible en forma de relaciones entre flujos lo que provee de restricciones al rango de soluciones posible. En principio, dadas una serie de restricciones en forma de cocientes de flujos es posible añadir una nueva

ecuación por cada cociente de flujo disponible al sistema de ecuaciones formado por los balances en estado estacionario de cada uno de los metabolitos participantes. Por ejemplo, usando el sistema metabólico descrito anteriormente para *P. pastoris* (incluyendo los balances de los equivalentes de reducción en forma de NADH y NADPH por separado para el citoplasma y la mitocondria) se tiene un sistema de 53 ecuaciones y 54 incógnitas de rango 50. Para el caso de los cultivos en glucosa se dispone de información a cerca de 4 cocientes de flujos (aunque uno de ellos es solo sobre el límite superior). Si se añaden 4 ecuaciones suplementarias haciendo uso de los 4 cocientes de flujos disponibles se tiene un sistema de 57 ecuaciones con 54 incógnitas de rango 54 que 'a priori' parecería fácilmente resoluble. No obstante hay que recordar que los datos experimentales y los cocientes de flujo presentan una un error experimental lo que ya limita de entrada la precisión de cualquier solución encontrada. Una primera solución al sistema puede hallarse resolviendo el sistema lineal por mínimos cuadrados, teniendo en cuenta la precisión de los datos experimentales, tal como se halla implementado en la subrutina de Matlab '*lsq*' (caso A Tabla VI.2). Desde el punto de vista del ajuste a los datos experimentales, este caso se halla una buena aproximación a los mismos tanto de los flujos de entrada-salida como de los cocientes de flujos. Las desviaciones entre valores calculados y experimentales son menores al 1% en todos los casos excepto para el coeficientes de flujo correspondiente al OAAcyt proveniente del PYRcyt que llega a ser del 13%. Sin embargo en la solución encontrada quedan invertidos los flujos correspondientes a la entrada de ACCOA a la mitocondria que se convierte en un flujo de salida y de la vía de salida de CO₂ a través del formaldehído que se convierte en entrada. Si se eliminan las reacciones correspondientes a la formación de CO₂ a través del formaldehído, sólo se halla una buena aproximación, entre los flujos de entrada/salida y los cocientes de flujos con sus correspondientes experimentales, si se permite que los balances de NADH y NADPH no se cumplan (caso B Tabla VI.2). En ese caso se calcula una producción excesiva de NADH citoplasmático concurrente con un déficit de los demás equivalentes de reducción. El balance global de equivalentes de reducción sin embargo si se cumple. Aún así el flujo de entrada de ACCOA a la

mitocondria sigue siendo negativo. Una posibilidad en la obtención de dichos resultados reside en que no se han especificado restricciones de dirección de flujo para estos casos. En el caso de especificar restricciones de dirección de flujo, como se ha descrito en capítulos anteriores, y buscar una solución por mínimos cuadrados no negativos usando la función '*lsqnonneg*' de Matlab (caso C Tabla VI.2), se obtiene una buena aproximación entre los flujos de entrada y salida con desviaciones entre el 1,9 y el 3,9% respecto a los experimentales pero no se consiguen buenas aproximaciones para los cocientes de flujos calculados para la generación de OAAcyt proveniente del PYRcyt (desviación del 41%) así como del PYRmit proveniente del MALmit (desviación del 500%).

TablaVI.2 Porcentaje de error obtenido entre los valores experimentales y los calculados para cada una de las metodologías empleadas en este apartado Para el cultivo operado con glucosa a $\mu=0,16 \text{ h}^{-1}$. A: Sistema metabólico completo sin restricciones de direccionalidad. B: Sistema metabólico reducido sin restricciones de direccionalidad. C: Sistema reducido con restricciones de direccionalidad. D: Sistema usando módulos elementales.

Substratos/productos Cocientes de flujos	% error sobre los datos experimentales			
	A	B	C	D
O ₂ (E)	0,50	0,62	3,90	0,40
GLC(E)	0,07	0,04	3,70	1,20
CO ₂ (E)	0,42	0,28	1,90	0,96
BIOM	0,12	0,28	1,90	13,90
OAAcyt que proviene de PYRcyt	13,20	2,20	40,80	4,10
PYRmit que proviene de MALmit	0,00	0,00	510,20	32,40
OAAmt que proviene de OAAcyt	0,00	0,00	0,00	3,40
PEP derivado de la PPP (límite superior)	0,00	55,00	1,80	14,20
Módulos principales	-	6 y 13	13 y 6	13 y 6

Puesto que el número de flujos metabólicos calculados es sensiblemente mayor que el de módulos elementales determinados para este sistema cuando la fuente de carbono es glucosa, es fácil calcular la contribución de dichos módulos a los flujos calculados a partir de la

Ecuación VI.17 y aplicando un método de solución por mínimos cuadrados no negativos usando la función ‘*lsqnonneg*’ de Matlab para calcular α como ya se ha explicado. Alternativamente existe otra metodología alternativa que permitiría calcular a la vez la contribución de los módulos elementales y los flujos metabólicos. A partir de la consideración de que cualquier distribución de flujos que se halle en estado pseudoestacionario en un determinado momento puede describirse como una combinación lineal no negativa del conjunto de EFMs (Papin *et al.*, 2004). (Esto es igualmente cierto para las EPas). Es decir:

$$v = \sum_{n=1}^i \alpha_n \cdot e_n; \quad \text{para } \alpha_n \geq 0 \quad (\text{VI.38})$$

Donde e_n representa al n -ésimo EFM o EPa. En este punto se considera también que, desde este punto de vista la identificación del grado de operatividad de ciertas EPas o EFMs, puede no resultar igual de informativo para el observador humano el uso de EPas. Por ello se prefiere la determinación de los EFM principales a las correspondientes EPas. En este apartado se intentara analizar una aproximación que utiliza EFM para reconstruir el vector de flujos mientras que la que utiliza EPas será presentada en otra parte.

Desafortunadamente, desde un punto de vista matemático y sin establecer otras restricciones, la descomposición de los flujos metabólicos en las correspondientes contribuciones de cada módulo no es necesariamente única. Es decir puede existir más de una combinación lineal de EFMs que describa la misma distribución de flujos en estado estacionario. Ello será así incluso incorporando las restricciones derivadas de ^{13}C puesto que estas restringen solo relaciones entre flujos individuales.

Como se ha comentado previamente un primer análisis de las posibles contribuciones de las EPas a la distribución de flujos en estado estacionario fue introducida por Wiback (Wiback *et al.*, 2003) y aplicada inicialmente a una simplificación del metabolismo central del eritrocito para distintas condiciones. El estudio definió el ‘espectro- α ’ o (α -spectrum) como el rango de valores admisibles de contribución de las distintas EP en la distribución

de flujos. Uno de los inconvenientes encontrados fue que el rango de valores asignado a la contribución de una determinada EP no era independiente del valor asignado a las otras EP. Un estudio similar de asignación de rangos de valores de flujo para los EFMs también ha sido presentado aunque en ese caso se determinan también rangos de valores permisibles de flujos metabólicos lo que en si mismo también es interesante (Llaneras & Picó 2006).

En otra aproximación, propuesta por Poolman (Poolman *et al.*, 2004), se asignan valores de flujo a los diferentes EFMs a partir del conjunto valores de flujo observables y la utilización de un algoritmo que combina la pseudoinversa de Moore-Penrose (que en el caso de un sistema indeterminado provee la solución de norma mínima) junto con un proceso iterativo para eliminar las soluciones con contribuciones de EFMs que pudieran ser negativas, asignándoles valores nulos. La aplicación del método a resultados experimentales de *L. rhamnosus* permite observar la variación en la contribución de los diferentes módulos a medida que la fermentación avanza. Sin embargo el algoritmo de eliminación de las contribuciones de EFMs que pudieran ser negativas no garantiza su funcionamiento en todos los casos.

Para afrontar el hecho de que generalmente existen múltiples combinaciones de EFMs posibles para reconstruir un determinado vector de flujos en estado estacionario, Schwartz (Schwartz & Kanehisa, 2005 y Schwartz & Kanehisa, 2006) propuso una alternativa distinta a las anteriores. En este caso añadió una nueva condición a las anteriormente descritas que consiste en que el vector α , que contiene los factores de peso que definen las contribuciones de cada vector de flujo debe ser el menor de los vectores posibles (tener norma mínima). Es decir debe cumplir:

$$v = \sum_{n=1}^j \alpha_n \cdot e_n; \quad \text{para } \alpha_n \geq 0 \quad \forall_n \in [1:m] \tag{VI.39}$$

$$\min \sum_{n=1}^j \alpha_n^2$$

Lo que se define como un problema de solución por medio de programación cuadrática. Aplicando este método con a una red metabólica

con cinética simulada Schwartz (Schwartz & Kanehisa, 2006) halla que solo un pequeño subconjunto de soluciones, del espacio de soluciones posible, es realmente accesible incluso permitiendo una variación amplia de los parámetros cinéticos del modelo.

En el presente apartado se intentaran obtener las contribuciones de flujos aportadas por cada EFM siguiendo una aproximación similar a la de Schwartz (Schwartz & Kanehisa, 2006) pero incluyendo las restricciones de cocientes de flujos derivadas de los resultados de marcaje con ^{13}C . Dichas restricciones se incorporaran de idéntica forma a la descrita previamente en esta memoria para el Capítulo V (Ecuaciones V.2 a V.7 y Tabla V.4 para los cocientes de flujos relevantes). Como variación, en este caso se han separado cada uno de los sumatorios de la Ecuación V.7 convirtiendo cada uno de ellos en una restricción por separado. Además se añade una nueva restricción para la norma mínima del vector de contribuciones de los módulos. Así la función objetivo a minimizar es en realidad un sistema de ecuaciones tal como:

$$\begin{aligned}
\min_{\alpha} = & \left[\begin{aligned}
& = \sum \frac{R_{mb}^2}{\sigma_{mb}^2} \\
& = \frac{\left(\frac{R_a + |R_a|}{2} \right)^2}{\sigma_a^2 \left(\frac{\partial R_a}{\partial a} \right)^2} \\
& = \frac{R_b^2}{\sigma_b^2 \left(\frac{\partial R_b}{\partial b} \right)^2} \\
& = \frac{\left(\frac{R_c + |R_c|}{2} \right)^2}{\sigma_c^2 \left(\frac{\partial R_c}{\partial c} \right)^2} \\
& = \frac{\left(\frac{R_d + |R_d|}{2} \right)^2}{\sigma_d^2 \left(\frac{\partial R_d}{\partial d} \right)^2} \\
& = \frac{R_e^2}{\sigma_e^2 \left(\frac{\partial R_e}{\partial e} \right)^2} \\
& = norm(\alpha)
\end{aligned} \right] \tag{VI.40}
\end{aligned}$$

donde R_n representa el residual de cada una de las ecuaciones de restricción V.2 a V.6 y se utilizaron en cada caso aquellas en las que se disponía de valores experimentales. En caso contrario fueron eliminadas del vector anterior; R_{mb} representa el residual de las ecuaciones de balance de los metabolitos y α el factor de contribución de los módulos elementales para reconstruir el vector de flujos. Dichas contribuciones deberán ser a su vez todas positivas puesto que todos los módulos elementales hallados son unidireccionales al incluir al menos una reacción irreversible; Norm α representa la longitud del vector α lo que implica seleccionar la solución con menor vector α . Para minimizar dicha función multiobjetivo se ha utilizado la subrutina *'goalattain'* implementada en la *'toolbox'* de optimización de Matlab. Así el método varía las contribuciones de cada módulo elemental para reconstruir el vector de flujos metabólicos de manera que se minimicen los errores resultantes de las ecuaciones de balance derivadas de las

estequiometrias, las diferencias entre los cocientes de flujos medidos y calculados y todo ello a partir de un vector de contribuciones que deberá ser el menor posible para que, en caso de existir más de una solución, se escoja siempre la que utilice el vector más pequeño. Ello resulta tanto en la menor contribución posible de los módulos así como en la utilización del menor número de módulo posible. Además se evita la posibilidad de que dos módulos idénticos pero de dirección opuesta funcionen a la vez sin consumo de energía ya que en dicho caso se les asignaría contribución cero. Debido a la posibilidad de que existan múltiples mínimos locales, el proceso de minimización se repite automáticamente 12 veces, empezando la búsqueda a partir de una modificación aleatoria de una primera posible solución al sistema, hallada sin utilizar las restricciones de los cocientes de flujos. Durante el procedimiento se selecciona la solución con menor norma de los residuales (para más detalles ver sección de rutinas, apartado R5).

Para cada caso experimental se definieron las reacciones de entrada/salida como irreversibles y de acuerdo con la direccionalidad medida en los mismos.

La determinación de los EFMs del sistema metabólico estudiado se lleva a cabo en este caso mediante la utilización de la *Toolbox* de Matlab y *Fluxanalyzer* versión 7.0a (Klamt *et al.*, 2003, Klamt *et al.*, 2007).

La aplicación de esta metodología al caso de la glucosa descrito al principio de esta sección (caso D Tabla VI.2), muestra que se obtienen aproximaciones razonables de los valores experimentales, tanto para los valores de entrada/salida como para los cocientes de flujos sin presentar las inversiones en ciertos flujos que se han observado en las aproximaciones previas. La mayor desviación (32%) se observa en el caso del cociente de flujos del piruvato mitocondrial proveniente del malato que no obstante se halla lejos del 500% observado usando la metodología previa que incluía restricciones de dirección. Así mismo los balances de NADH y NADPH tanto para el citoplasma como para la mitocondria se cumplen con una tolerancia de menor de $2 \cdot 10^{-5}$. Ello es debido a que todos los módulos elementales ya cumplían por si solos los balances de NADH y NADPH.

En este caso el procedimiento halla una decena de mínimos prácticamente sin variación entre ellos en términos de la norma de los residuales. Para el conjunto de los casos la variación en los flujos metabólicos calculados (en términos de desviación estándar) es menor en un porcentaje de $1 \cdot 10^{-3}\%$ mientras que para la contribución calculada de los módulos elementales es menor del 5% para los módulos de mayor contribución. La aplicación de la metodología de los módulos elementales resulta determinar por métodos de optimización los valores de la contribución de cada uno de los módulos. En este caso representa determinar unas 5 veces menos valores que si se realizara el cálculo directamente por optimización de los flujos elementales. Lo que ciertamente contribuye a disminuir el número de posibles alternativas de solución.

Las contribuciones de los módulos elementales a la norma del vector de flujos, en los casos en que se han incluido restricciones de dirección (casos C y D), muestran los módulos 13 y 6 como principales (Figura VI.7). El módulo 13 está dedicado a la conversión de glucosa en biomasa mientras que el módulo 6 convierte la glucosa en CO_2 . Juntos contribuyen mayoritariamente a la conversión de sustratos en productos. Otros módulos, como el 7 y el 8, participan minoritariamente (menos del 3%) y seguramente contribuyen a ajustar los cocientes de flujos, aunque si se tienen en cuenta las desviaciones experimentales, su contribución se puede incluir generalmente dentro del error experimental.

A la vista de los resultados se puede concluir que, al menos en el caso de los cultivos en glucosa analizados, la metodología de ajuste de flujos metabólicos por medio de los módulos elementales proporciona los mejores resultados en cuanto a la relación entre los valores experimentales disponibles y los calculados (Figura VI.8). Por otro lado la aplicación de las tres primeras aproximaciones para el cálculo de flujos metabólicos no puede aplicarse de igual forma en los casos en que no se dispone de suficientes cocientes de flujos como para añadir el número de ecuaciones necesario para compensar los grados de libertad iniciales del sistema metabólico.

Cabe destacar también que la distribución de flujos metabólicos utilizando esta metodología (caso D, Figura VI.8 y anexos, apartado A.III.4)

presentó resultados similares a los obtenidos con las otras metodologías presentadas en esta memoria (Capítulo IV y V). Se han observado pequeñas diferencias en algunos puntos de la red metabólica, principalmente en relación al transporte de ACCOA. En este caso, utilizando la metodología del ^{13}C -MFA (Figura V.6 y apartado A.III.2), el flujo neto de entrada de ACCOA a la mitocondria es de 17% ($0,25 \pm 0,23 \text{ mmolh}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$) mientras que utilizando la metodología descrita en este apartado *es de un 1%* ($0,01 \text{ mmolh}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}$). El error relacionado a esta reacción (*tr_accoa*) es de aproximadamente 100% de manera que el valor hallado se encuentra dentro de los límites estadísticos. Hacer notar también que el pequeño valor del transporte de ACCOA del citoplasma a la mitocondria comporta valores muy bajos o cercanos a cero en las reacciones relacionadas con la vía fermentativa. La reacción correspondiente al enzima málico (*ana3*) presenta valores más altos que en las otras dos metodologías estudiadas en el presente trabajo, sin embargo su valor se encuentra dentro de los límites obtenidos experimentalmente.

En los cálculos de distribución de flujos metabólicos utilizando la metodología descrita en este capítulo no han sido calculadas las desviaciones estándar para cada flujo metabólico. La metodología utilizada en este trabajo (metodología FIM; para más detalles ver Capítulo IV, apartado IV.1.1.4.1) no presentó resultados coherentes (márgenes de errores muy superiores a los flujos calculados).

En el siguiente apartado se aplicara dicha metodología que parte de los módulos elementales a los resultados obtenidos utilizando glicerol y mezclas de glicerol:metanol de los que también se dispone de valores experimentales de cocientes de flujos aunque en menor número que en el caso de glucosa.

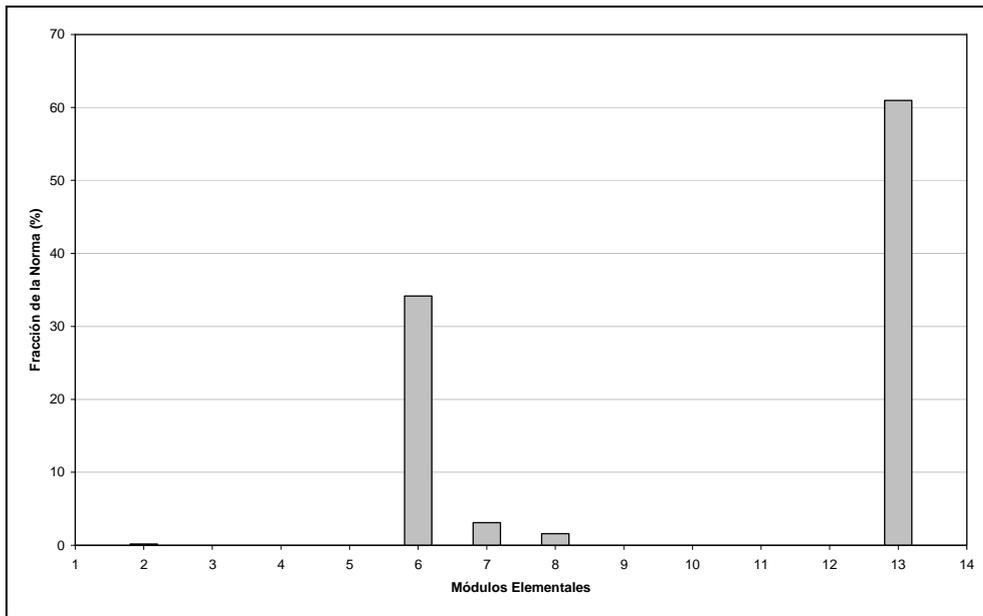


Figura VI.7 Contribución de cada módulo elemental a la distribución de flujos metabólicos, utilizando glucosa como fuente de carbono a $\mu=0,16 \text{ h}^{-1}$.

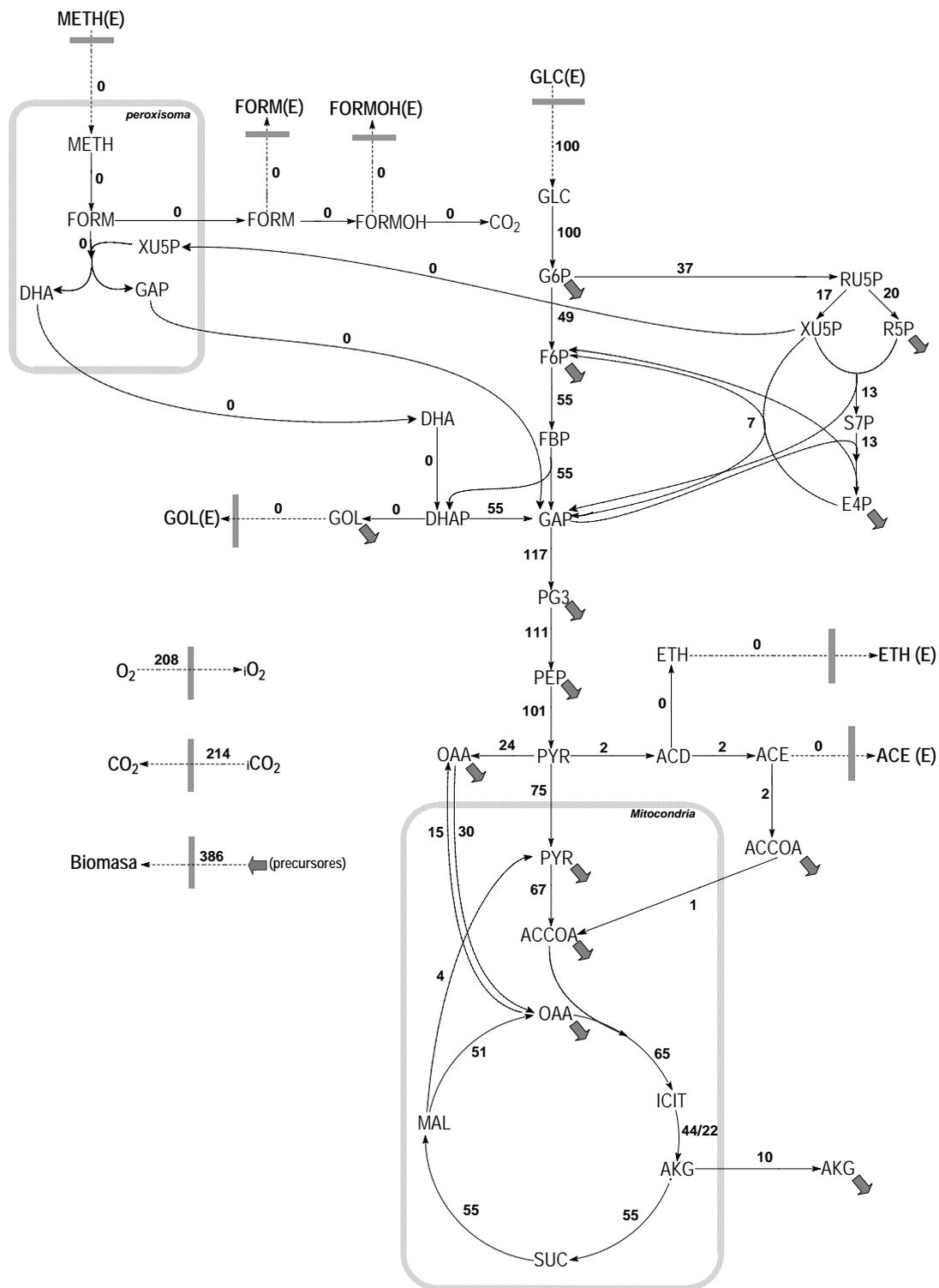


Figura VI.8 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glucosa en cultivo operado en quimiostato a una velocidad de crecimiento igual a 0,16 h⁻¹. Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

VI.2.5.3 Aplicación del método de cálculo de flujos metabólicos a través de los módulos elementales a cultivos con glicerol y mezclas glicerol/metanol como fuente de carbono

La aplicación de la metodología de asignación de contribuciones de los módulos elementales en el caso de los cultivos llevados a cabo con glicerol como fuente de carbono permite identificar también un número muy reducido de módulos principales de manera similar a lo observado en los casos previos para la glucosa. En este caso también se ha partido de un número bajo de módulos elementales del orden de 5 veces menor que el número de flujos. Hay que remarcar que en este caso solo se dispone de 3 cocientes de flujos para complementar los balances de componentes en comparación con los 4 disponibles para la glucosa. Por ello la posibilidad de hallar más de una solución puede parecer *a priori* mayor.

De los resultados obtenidos en primer lugar, y desde un punto de vista general, se observa una baja variación en los flujos calculados para las distintas soluciones. Sin embargo en el caso de la velocidad de crecimiento correspondientes a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ se observa una variación mayor (de orden del 30%-50%) en los flujos de la rama correspondiente a la entrada de ACCOA mitocondrial mientras que para la velocidad de crecimiento correspondientes a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ se observa una variación similar para las reacciones correspondientes a la vía de las pentosas fosfato (Figuras VI.10 y VI.11). Desde el punto de vista de los módulos se observa una variación pequeña en los módulos principales (<3%) mientras que en los módulos de pequeña contribución puede llegar a ser del 60% de los mismos aunque con un bajo impacto en la solución final.

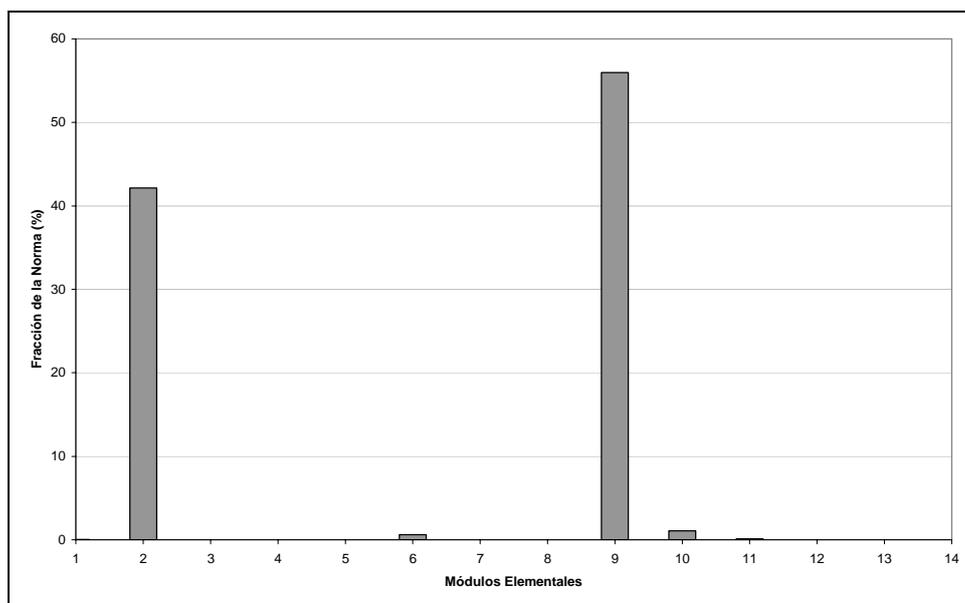
Desde el punto de vista de los valores calculados se puede resaltar el hecho de que el módulo del vector de flujos aumenta al aumentar la velocidad de reacción. Así para las velocidades de crecimiento correspondientes a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$ y $0,16 \text{ h}^{-1}$ el módulo del vector de flujos aumenta de 4,8 a 10,3. En segundo lugar se observa una disminución de la actividad relativa del ciclo de los TCA al aumentar la velocidad de crecimiento como nuestra la disminución de la relación entre la reacción de

conversión de succinato a malato respecto a la reacción de síntesis de biomasa que pasa de tener un valor de 0,27 a un valor de 0,06. Los módulos con mayor contribución a la norma del vector de flujos son el 1 el 9 y el 6 para la primera velocidad y el 11 el 9 y el 3 para la segunda (Figura VI.9 (a) y (b)). El modo 9 representa la metabolización del glicerol directamente a CO₂ a través del ciclo de los TCA y representa el segundo en contribución al modulo del vector de flujos en ambos casos. Dicho modo pasa a tener una contribución a la norma del vector de flujos del 35% a tener un valor del 11% reflejando la mencionada disminución relativa de la actividad del ciclo de los TCA. Los cambios en estos valores están de acuerdo con el cambio en el rendimiento global biomasa substrato (disminución de la relación entre los moles de carbono consumidos globalmente y los carbono-mol de biomasa generados). El cambio del modo principal 1 al módulo principal 11 al incrementarse la velocidad de crecimiento refleja una disminución en el uso de la vía de entrada de ACCOA a la mitocondria. Tanto los módulos principales 1 y 11 como los terciarios 6 y 3 son módulos con generación de biomasa. A la velocidad de 0,05 h⁻¹ se combinan 2 módulos que utilizan las reacciones *tr_oaa1* y *tcc6* en distintas proporciones para regenerar el OAA mitocondrial. En cambio a la velocidad de 0,16 h⁻¹ el módulo principal de generación de biomasa utiliza exclusivamente la reacción *tcc6* mientras que el secundario utiliza exclusivamente la reacción *tr_oaa1* mientras que todo el malato se convierte en piruvato a través de la reacción *ana3*. Dichos cambios reflejan los cambios observados en los cocientes de flujos.

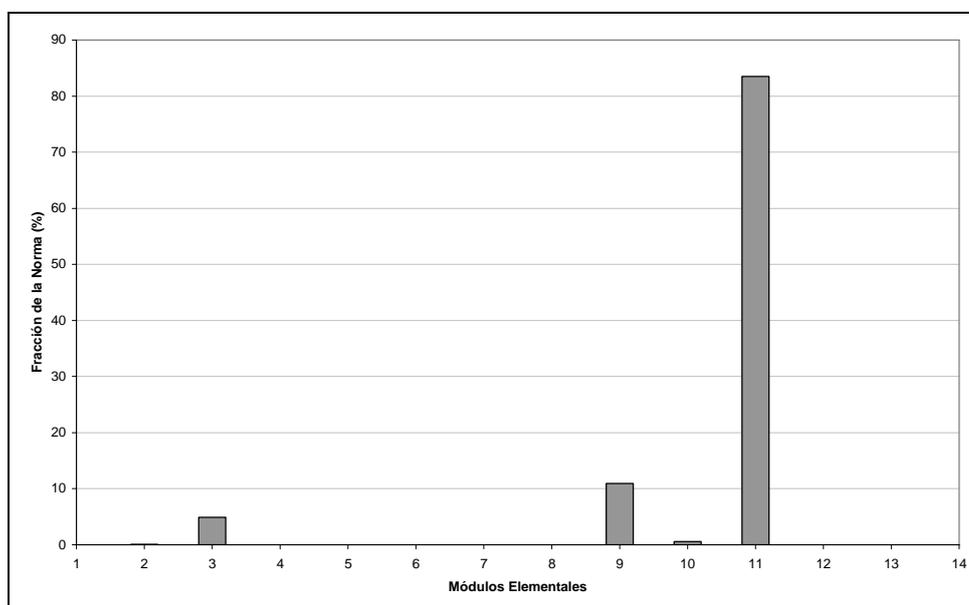
La distribución de flujos metabólicos obtenida a través del análisis de módulos elementales para los cultivos operados con glicerol a $\mu=0,05$ h⁻¹ (Figura VI.10) reveló que la vía de las pentosas fosfato presenta poca actividad principalmente en la rama oxidativa, donde el flujo es del 1% (0,01 mmolh⁻¹g⁻¹_{biom}). No obstante, la distribución de flujos en esta vía presentó resultados próximos a los obtenidos utilizando la metodología de ¹³C-MFA (RMN) (Resultados similares a los obtenidos para los dos cultivos realizados a $\mu=0,05$ h⁻¹, apartados V.2.3.2.1, V.3.2.2.4.2, A.III.2 y A.III.3.2) y por ¹³C-MFA (LC/MS) (apartado V.3.2.2.4.1 y A.III.3). Resultados similares también fueron obtenidos para la distribución de flujos en el ciclo de los TCA en

relación a la metodología de ^{13}C MFA (RMN). Se observa también que el transporte de piruvato (*tr_pyr*) hacia la mitocondria es relativamente menor mientras que el transporte de acetil-CoA (*tr_accoa*) hacia la mitocondria presenta un mayor valor en comparación con la metodología de ^{13}C MFA (RMN).

En relación al cultivo realizado con glicerol a alta velocidad de crecimiento ($\mu=0,16 \text{ h}^{-1}$) (Figura VI.11) se observa que la vía de las PP presenta menor actividad en relación a los cálculos obtenidos utilizando la metodología de ^{13}C -MFA (RMN) (apartados V.2.3.2.2 y A.III.2) y valores cercanos a los obtenidos utilizando la metodología clásica (apartados IV.3.2 y A.III.1). El ciclo de los TCA presentó valores próximos a los obtenidos utilizando la metodología clásica, estos valores de flujos fueron relativamente mayores que los obtenidos utilizando la metodología de ^{13}C -MFA (RMN). En síntesis los resultados calculados en este capítulo son relativamente cercanos a los obtenidos utilizando la metodología clásica del MFA.



(a)



(b)

Figura VI.9 Contribución de cada módulo elemental a la distribución de flujos metabólicos, para los cultivos operados con glicerol como fuente de carbono. (a) $\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$; (b) $\mu=0,16 \text{ h}^{-1}$.

Una vez aplicado este método a los datos provenientes de experimentos utilizando una sola fuente de carbono se aplicó a experimentos en los que la fuente de carbono era una mezcla de glicerol:metanol, en las distintas proporciones ya vistas en otros capítulos, y para las 2 mismas velocidades de crecimiento. Estos casos se caracterizan por presentar un

número de módulos elementales del orden de cinco veces mayor que en los casos anteriores. Además no se dispone de cuatro restricciones provenientes de cocientes de flujos sino que solamente se dispone de los valores de 2 cocientes de flujos así como estimaciones de los límites superior e inferior de un tercero. Todo ello aumenta la incertidumbre de la solución encontrada.

Desde el punto de vista del ajuste logrado entre los valores calculados y los datos experimentales de consumo de substratos, producción de productos y de cociente de flujos, se observan muy buenos ajustes con errores alrededor de 3%-5% en todos los casos exceptuando el valor del cociente de flujo referente a la relación referente al PYRmit proveniente del MALmit donde los errores obtenidos son del orden del valor calculado, aunque los valores experimentales de dicho cociente también presentan un elevado error experimental.

La norma del vector de los valores residuales que se minimiza presenta una variación despreciable en el valor obtenido en las distintas optimizaciones. Desde el punto de vista de la variación observada en los flujos metabólicos calculados para obtener dicho mínimo, por un lado se ha observado muy poca variación en la solución encontrada en los casos de velocidades de crecimiento bajas mientras que en los de velocidad de crecimiento elevada, dicha variación se ve incrementada respecto a los casos anteriores en alrededor en un orden de magnitud. La variación observada en los valores de la contribución de los módulos elementales también se incrementa en alrededor de un orden de magnitud en todos los casos. Todo ello refleja la mayor incertidumbre derivada de la disminución de restricciones disponible así como el aumento en el número de módulos elementales a utilizar.

Desde el punto de vista general se observa también que el vector de flujos metabólicos aumenta su norma con la velocidad de crecimiento igual que se había observado en los casos anteriores y como era de esperar. Respecto a la contribución calculada de los módulos al vector de flujos metabólicos, en general se puede decir que el número de módulos elementales seleccionados como principales, se duplica respecto a los casos anteriores al tiempo que la contribución de cada uno de ellos disminuye.

También se observa una disminución relativa de la actividad del ciclo de los TCA relativa a la síntesis de biomasa al incrementar la velocidad de crecimiento. Dichos cambios podrían reflejar el aumento relativo de la energía invertida en mantenimiento al disminuir la velocidad de crecimiento (Figuras VI.10 y VI.11).

En relación a la distribución de flujos con las otras metodologías descritas en este trabajo (Figura VI.10 y VI.11), se observa que la distribución de flujos en la vía de las PP presenta valores más bajos (actividad más baja) que en las otras metodologías. En relación al ciclo de los TCA y vía del metanol, los resultados obtenidos reflejan una mayor similitud con los resultados obtenidos utilizando la metodología clásica, sin embargo las reacciones de transporte presentaron valores iguales a los obtenidos con ^{13}C -MFA (RMN). Resaltar que estos valores están dentro de los límites de las desviaciones estándar de cada flujo calculado a través de esta metodología.

Los módulos seleccionados como principales también se pueden agrupar, como en casos anteriores, entre los que llevan a la producción de biomasa y los que metabolizan las fuentes de carbono a CO_2 . El incremento en número refleja también el aumento de posibilidades de conversión de los substratos en biomasa o CO_2 . A pesar de las incertidumbres existentes mencionadas, se observa un patrón de cambio de unos módulos a otros al cambiar la relación existente entre la velocidad de consumo de un substrato respecto a otro al cambiar su proporción en el medio de cultivo. Es decir, al disminuir la proporción de glicerol en el medio de cultivo respecto a la de metanol, disminuye también su velocidad de consumo mientras que aumenta la de metanol. Dichos cambios se reflejan en la relación ente los módulos seleccionados como principales. Así cuando disminuye o aumenta el consumo relativo de un substrato respecto del otro, disminuye o aumenta la contribución de los módulos que reflejan en su estequiometría cambios en la misma dirección.

La asignación de flujos a los módulos elementales es una metodología que se encuentra en sus inicios y no dispone todavía de una metodología establecida. Sin embargo el establecimiento de un método objetivo de

asignación de flujos puede facilitar mucho el análisis del comportamiento de los sistemas metabólicos al disminuir el número de variables a observar y permitir ver cambios en la interacción entre distintas vías metabólicas. Así en los casos analizados, se pasa de observar variaciones en alrededor de media centena de flujos metabólicos a analizar la variación de entre 3 a 12 módulos elementales principales que reflejan los cambios subyacentes en la actividad y regulación de las vías metabólicas implicadas. La información disponible al analizar los casos presentados no permite asegurar que los flujos metabólicos calculados o la asignación de la contribución de los módulos elementales a dichos flujos sean los valores ciertos. No obstante las tendencias calculadas están de acuerdo con los valores experimentales obtenidos.

Aunque la asignación de contribuciones a los módulos elementales pudiera tener más de una solución válida, el hecho de establecer una metodología objetiva para escoger una solución concreta (vector de contribuciones de norma mínima) permite establecer un marco de comparación de resultados, de utilidad para comparar distintos casos experimentales. Ciertamente debería validarse que dicha selección refleja la realidad en los sistemas metabólicos. En su defecto debería hallarse una metodología de asignación de contribuciones de flujos alternativa que reflejara dicha realidad. El siguiente paso para avanzar en esta dirección podría ser introducir consideraciones termodinámicas para realizar dicha selección. Para ello los resultados obtenidos deberán compararse con datos de flujos reales más completos obtenidos con otra metodología. Quizás a partir de experimentos realizados con marcaje ^{13}C obtenidos en distintas condiciones experimentales.

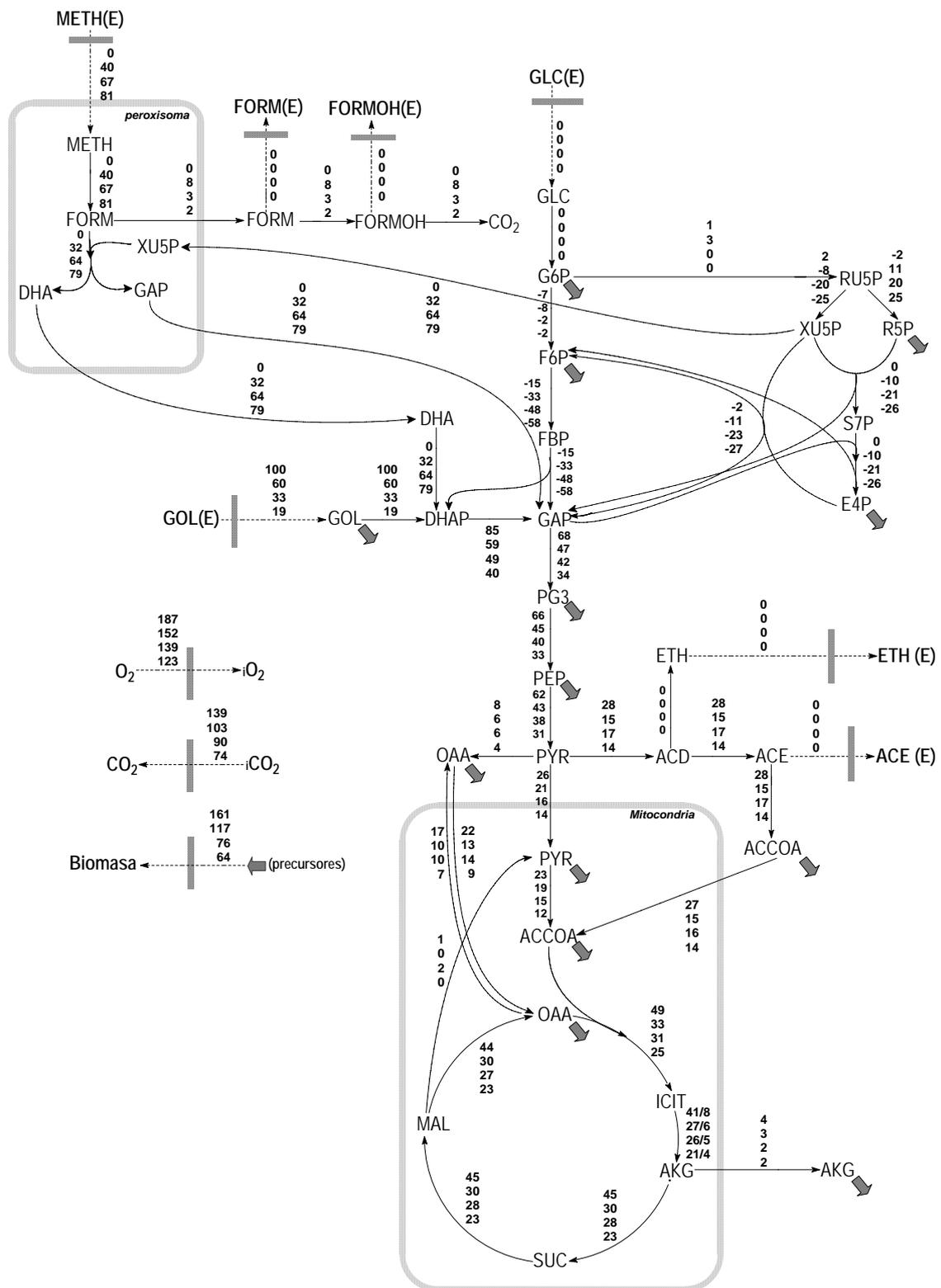


Figura VI.10 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol y mezclas de glicerol:metanol en cultivos operados en quimiostato a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$. Los valores están en orden decreciente de concentración de glicerol, es decir glicerol:metanol (100:0); glicerol:metanol (80:20) y glicerol:metanol (60:40); glicerol:metanol (40:60).

Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

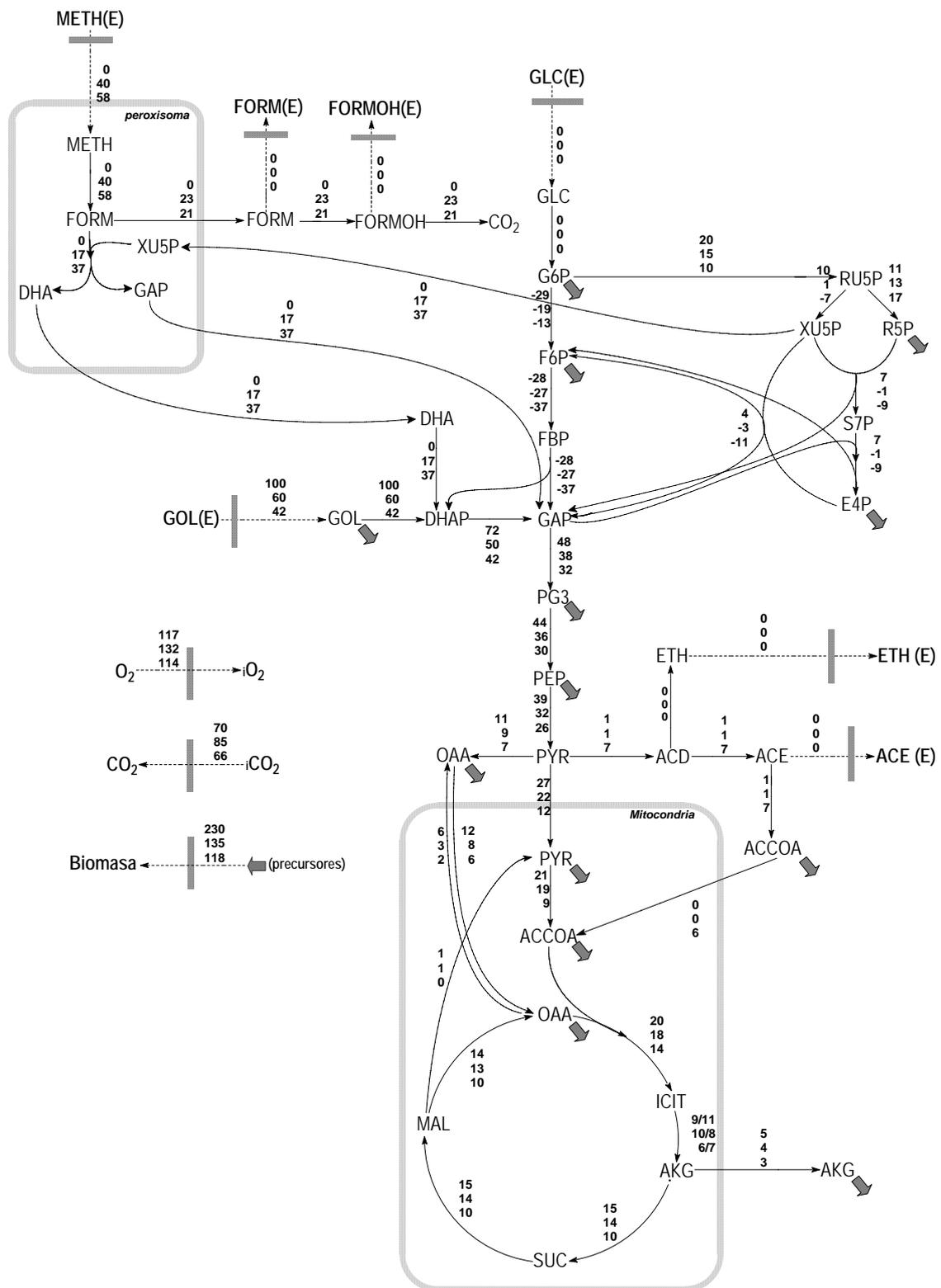


Figura VI.11 Flujo de carbono en el metabolismo central de *P. pastoris* en condiciones aerobias en glicerol y mezclas de glicerol:metanol en cultivos operados en quimiostato a una tasa de dilución igual a $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$. Los valores están en orden decreciente de concentración de glicerol, es decir glicerol:metanol (100:0); glicerol:metanol (60:40) y glicerol:metanol (40:60). Las unidades de flujo están en porcentaje en función del sustrato utilizado.

CAPÍTULO VII

Conclusiones y Sugerencias para trabajos futuros

VII.1 Conclusiones finales

El presente estudio ha establecido un conjunto de metodologías para el análisis y modelización del metabolismo celular en el Grupo de Ingeniería de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada de la UAB, investigando su aplicabilidad en análisis del metabolismo central de la levadura *P. pastoris*.

El primer objetivo específico de este trabajo fue definir un modelo estequiométrico de la red de reacciones bioquímicas del metabolismo central del carbono de la levadura *Pichia pastoris*. El grado de detalle en su descripción debía ser el mínimo necesario para representar los flujos de carbono más significativos en las distintas condiciones experimentales sin utilizar un excesivo grado de complejidad. Ello permitiría un estudio del metabolismo mediante distintas aproximaciones al análisis de flujos metabólicos (MFA), el análisis estructural de la red mediante módulos elementales, así como la combinación de estas dos clases de herramientas analíticas.

Con base a los resultados obtenidos es posible obtener dos tipos de conclusiones, una referente al metabolismo y fisiología de *P. pastoris* y la segunda a las metodologías utilizadas.

- A pesar de las limitaciones intrínsecas del análisis clásica de flujos metabólicos, MFA, (por ejemplo, en las reacciones bidireccionales sólo permite calcular el flujo neto) y las limitaciones impuestas por la falta

de conocimientos sobre la fisiología y metabolismo de *P. pastoris* (por ejemplo, no se ha podido reconstruir una red de reacciones metabólicas a partir de la secuencia de su genoma, desconociendo también los requerimientos exactos de su metabolismo redox), se concluye que el MFA ha permitido estimar por primera vez la distribución de flujos metabólicos a través del metabolismo central del carbono de *P. pastoris*, incluyendo las rutas de asimilación del metanol, proporcionando así una herramienta para la comprensión de las interacciones entre metabolismo central y las condiciones de cultivo. Aunque la red metabólica utilizada en este trabajo es prácticamente idéntica a la utilizada para la levadura *S. cerevisiae* (a excepción de las reacciones correspondientes al metabolismo del metanol) los resultados de distribución de flujos metabólicos a través de esta red obtenidos mediante MFA para los cultivos operados con glucosa (usados como cultivos de referencia) permitió validar el modelo estequiométrico, además de mostrar la coherencia/validez de los cálculos, los cuales mostraron que el metabolismo de *P. pastoris* en condiciones respiratorias (quimiostato limitado por carbono) es muy similar al de *S. cerevisiae*. La validez de los datos obtenidos mediante MFA clásico se vio reforzada por su coherencia con los resultados del análisis de cocientes de flujos metabólicos (análisis METAFoR) basado en experimentos de marcaje isotópico, previamente realizados por A. Solà (Solà, 2004). Sin embargo, en los cultivos operados con glicerol, metanol o mezclas de glicerol/metanol, donde se añadió al modelo estequiométrico las reacciones del metabolismo del metanol, los resultados obtenidos mediante MFA no pudieron compararse totalmente con los resultados previamente obtenidos a través del análisis METAFoR, debido principalmente a la falta de datos METAFoR para la vía de las pentosas fosfato. No obstante, el modelo estequiométrico descrito y flujos metabólicos calculados con base al mismo reflejaron el importante impacto del metanol en la redirección de flujos metabólicos en cultivos con substratos mixtos. Así pues, cabe concluir que, si bien el MFA clásico es una herramienta de cálculo que está limitada a redes metabólicas relativamente poco complejas, nos

permite una primera aproximación del análisis cuantitativo de la red metabólica.

- El análisis de flujos metabólicos utilizando restricciones derivadas de experimentos de marcaje isotópico con ^{13}C combinado con RMN, ^{13}C -RMN, (análisis METAFoR) reveló que esta metodología de análisis presenta alta sensibilidad para la determinación de distribución de flujos metabólicos referente al ciclo de los TCA y vías asociadas (vías fermentativas y reacciones de transporte entre el citoplasma y la mitocondria). Sin embargo, el reducido número de restricciones (cocientes de flujos) derivadas de datos de ^{13}C -RMN (particularmente para el caso en que el sustrato es glicerol o glicerol/metanol), conlleva una reducción significativa de la sensibilidad del análisis de flujos a través de algunos módulos de la red metabólica (vías de las PP y las vías del metabolismo del metanol), donde no es posible obtener con exactitud la distribución de flujos. A través de estas observaciones se concluye que esta metodología presenta potencial aplicación para la determinación de flujos metabólicos para redes metabólicas de complejidad relativamente baja (en términos de número de reacciones y de compartimentos celulares) debido al reducido número de restricciones derivadas del análisis METAFoR (caso extremo: el protocolo de marcaje isotópico utilizado para el análisis METAFoR no es aplicable al caso en que el sustrato único tenga un solo átomo de carbono, como es el caso del metanol). Globalmente, esta metodología presentó diferencias significativas en la distribución de flujos en relación a la metodología clásica del MFA en los cultivos operados con glicerol y mezclas de glicerol/metanol, principalmente en la vía de las PP.
- El análisis de flujos metabólicos utilizando datos derivados de ^{13}C -LC-MS (^{13}C -MFA) presenta poca sensibilidad en redes metabólicas compartimentalizadas, pues este método no permite distinguir los *pools* de metabolitos de un compartimiento dado, concretamente la mitocondria y el citoplasma. Sin embargo, este método presenta alta sensibilidad para la determinación de la vía de las pentosas fosfato

(vía de las PP). Ello permitiría la posibilidad de combinar distintas técnicas y metodologías para mejorar la exactitud del análisis de flujos metabólicos en redes metabólicas (o subredes de las mismas) basado en datos de experimentos con marcaje isotópico. Así, para el caso de estudio en el cual se han aplicado paralelamente las dos técnicas de análisis con trazadores isotópicos (cultivo con glicerol como substrato único), los datos de distribución de flujos metabólicos para la vía de las PP obtenidos mediante ^{13}C -MFA (es decir, con datos derivados de LC-MS) son coherentes con los obtenidos previamente mediante el MFA con restricciones derivadas de ^{13}C -RMN.

- El análisis de módulos elementales permite identificar cuales son las vías (subredes) más importantes que constituyen una red metabólica, proporcionando así una base para visualizar e interpretar más fácilmente las variaciones en la distribución de los flujos metabólicos a través de la misma cuando las células son sometidas a distintas condiciones ambientales (o manipulaciones genéticas).
- La combinación de datos de cocientes de flujos metabólicos obtenidos por ^{13}C -RMN y el análisis por módulos elementales nos permite determinar cuales son las principales vías metabólicas activas y la distribución de flujos metabólicos en pequeñas subredes dentro de la red metabólica en estudio, lo que implica en predecir cuales son las vías clave para el metabolismo central y a través de este análisis es posible determinar la distribución completa de flujos metabólica en la red metabólica en estudio. Los resultados obtenidos revelaron que este es un método prometedor y puede ser utilizado también como herramienta complementaria con las otras metodologías descritas en este trabajo.

VII.2 Sugerencias para trabajos futuros

Con base en los resultados obtenidos y a través de las observaciones descritas en otros trabajos de investigación, se proponen los siguientes trabajos de investigación:

- Mejorar la estructura de la red metabólica a partir de la secuencia del genoma de *P. pastoris*, en estado avanzado de anotación.
- Análisis sistemático de la composición elemental y de los constituyentes macromoleculares de la levadura *P. pastoris* para todas las condiciones de cultivo teniendo en cuenta el contenido de fósforo y agua.
- Incluir en el modelo estequiométrico una ecuación de biosíntesis de nuestro producto de interés (proteína recombinante), a partir de sus precursores (aminoácidos) en la relación estequiométrica que marque la composición aminoacídica de la proteína.
- Estudio comparativo y selección de técnicas de *quenching* y extracción de metabolitos para su análisis mediante LC-MS más adecuadas para *P. pastoris*. Mejorar las técnicas de análisis mediante LC-MS con el fin de obtener una información más completa (por ejemplo, poder cuantificar todos los aminoácidos).
- Realización de un diseño experimental y optimización de marcaje isotópico (a través del software *¹³C-Flux*) para cultivos de *P. pastoris* en otras condiciones de cultivo utilizadas en este estudio (glicerol a elevada velocidad de crecimiento y mezclas glicerol/metanol), con el objetivo de determinar mediante ¹³C-MFA la distribución flujos metabólicos, especialmente en la vía de las pentosas y poder así verificar la coherencia de los resultados obtenidos mediante MFA clásico y MFA con restricciones derivadas de ¹³C-RMN bajo las mismas condiciones.
- Integrar restricciones derivadas de datos de ¹³C-RMN en el software *¹³C-Flux* (u otras que combinen datos RMN y MS).

- Introducir consideraciones termodinámicas para el cálculo de módulos elementales y utilizar la metodología del *flux-spectrum* de acuerdo con Llaneras & Picó, 2007.
- En relación al análisis de módulos elementales, futuras investigaciones deberían dirigirse a revisar la metodología de asignación de flujos y las contribuciones de flujo por las distintas vías metabólicas posibles a fin de facilitar la interpretación de las variaciones observadas en el metabolismo en respuesta a los cambios experimentales y con ello a la mejora en la predicción de los efectos resultantes de su modificación o de la modificación del sistema metabólico por ingeniería genética.

CAPÍTULO VIII

Bibliografía

Atkinson, D. & Walton, G. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.*, 242, 3239-3241.

Babel, W., Brinkmann, U., Muller, R.H. (1993). The auxiliary substrate concept—an approach for overcoming limits of microbial performances. *Adv. Biotechnol.*, 13, 211–242.

Bakker B.M., Overkamp K.M, van Maris A.J.A, Kötter P., Luttik, M.A.H, van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *S. cerevisiae*. *FEMS Microbiol., Rev.* 25, 15-37.

Blank L.M. & Sauer U. (2004). TCA cycle activity on *Saccharomyces cerevisiae* is a function of the environmentally determined specific growth and glucose uptake rates. *Microbiology*, 150, 1085-1093.

Boles, E., de Jong-Gubbels, P., Pronk, J.T. (1998). Identification and Characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. *J. Bacteriol.*, 180, 2875-2882.

Brinkmann, U., Mueller, R.H., Babel, W. (1990). The growth ratelimiting reaction in methanol-assimilating yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 261–266.

Bruinenberg, P. M., van Dijken, J. P., Scheffers, W. A. (1983). A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 953-964.

Bruinenberg P.G., Blaauw M., Veenhuis M., Ab G. (1989). Purification and some properties of malate synthase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiol. Let.*, 61, 11-16.

Burton, K. A. (1956). Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Biochem. J.*, 62, 315-323.

Çalik P., Çalik G., Takaç S., Özdamar T.H. (1999). Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: effects of the oxygen transfer rate. *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 151-167.

Cerioti, G. (1955). Determination of nucleic acids in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 214, 59.

Christensen, B. & Nielsen, J. (1999). Isotopomer analysis using GC-MS. *Metabolic Eng.*, 1, 282-290.

Cos, O. (2005). Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. Barcelona: Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona. 323 p. Tesis Doctoral.

Cregg, J.M. & Madden, K.R. (1989). Use of site-specific recombination to generate selectable markers. *Mol. Gen. Genet.*, 219, 320-323.

Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.*, 11, 905-911.

Cregg, J.M. (1999). Expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression, ed. Fernandez, J.M. & Hoeffler, J.P. Academic Press. San Diego. 157-191.

Dass, C. (1998). Analysis of phosphorylated proteins by mass spectrometry, in: *Mass Spectrometry of Biological Materials* (Larsen, B. S., & McEwen, C. N., eds.) pp.247 –279, Marcel Dekker Inc., New York.

Dauner, M. & Sauer, U. (2000). GC-MS analysis of aminoacids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol. Prog.*, 26, 642-649.

Dauner, M., Bailey, J.E., Sauer, U. (2001). Metabolic flux analysis with a comprehensive isotopómero model in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 76, 144-156.

de Graaf, A. A., Striegel, K., Wittig, R. M., Laufer, B.; Schmitz, G., Wiechert, W., Sprenger, G. A., Sahm, H. (1999). Metabolic state of *Zymomonas mobilis* in glucose-, fructose-, and xylose-fed continuous cultures as analysed by ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy. *Arch. Microbiol.*, 171, 371-385.

de Koning W. & van Dam K. (1992). A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal Biochem.*, 204,118-23

del Río Portilla, F. (2003). Análisis estructural de proteínas por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. *Educación Química*. 14 (1), 60-63.

Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-355.

Efstathiou, C.E. (2006). Estimation of type I error probability from experimental Dixon's "Q" parameter on testing for outliers within small size data sets. *Talanta*, 69, 1068-1071.

Egli T., Käppeli O., Fiechter A. (1982). Mixed substrate growth of methylotrophic yeasts in chemosta culture: influence of the dillution rate on the utilization of a mixture of glucose and methanol. *Arch. Microbiol.*, 13, 8-13.

Egli, T., Bosshard, C., Hamer, G. (1986). Simultaneous utilization of methanol–glucose mixtures by *Hansenula polymorpha* in chemostat: influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1735–1741.

Flores, C-L., Rodríguez, C., Petit, T., Gacendo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 507-509.

Fiaux, J., Çakar, Z.P., Sonderegger, M., Wüthrich, K., Szyperski, T., Sauer, U. (2003). Metabolic-Flux Profiling of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Eukaryotic Cell*, 2, 170-180.

Fischer, E. & Sauer, U., (2003). Metabolic flux profiling of Escherichia coli mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur. J. Biochem.*, 270, 880–891.

Fischer, E. & Sauer, U. (2005). Large-scale *in vivo* flux analysis. shows rigidity and suboptimal performance of *Bacillus subtilis* metabolism. *Nat. Genet.*, 37, 636-640.

Fischer, E., Zamboni, N., Sauer, U. (2004). High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography–mass spectrometry derived ¹³C constraints. *Anal. Biochem.*, 325, 308-316.

Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B. Ø., Nielsen, J. (2003). Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. *Genome Res.*, 13, 244-253.

Fredlund, E., Blank, L.M., Schnürer, J., Sauer, U., Passoth, V. (2004). Oxygen and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Appl. Env. Microbiol.* 70, 5905-5911.

Gancedo, C. & Serrano, R. (1989). Energy-yielding metabolism, In: The Yeast, ed. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Academic Press. 2nd edition. London. 3, pp. 205-259.

Garrido, B.J. (2003). Aplicación de la resonancia magnética nuclear de sistemas paramagnéticos a la determinación de propiedades estructurales y dinámicas de las proteínas rusticianina y calbindina D_{9k}. Valencia: Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia. 424 p. Tesis Doctoral.

Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 741-750.

Gombert, A.K., Nielsen, J. (2000). Mathematical modelling of metabolism. *Cur. Opin. Biotechnol.*, 11, 180-186.

Gombert, A.K. (2001). Análise de redes metabólicas em *Saccharomyces cerevisiae*. São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 122 p. Tesis Doctoral.

Gombert, A.K., Moreira dos Santos, M., Christensen, B., Nielsen, J. (2001). Network Identification and Flux Quantification in the Central Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under Different Conditions of Glucose Repression. *J. Bacteriol.*, 183, 441-1451.

Harber, W. & Veenhuis, M. (1989). Metabolism of one-carbon compounds, In: *The Yeast*, ed. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Academic Press. 2nd edition. London. 3, 289-316.

Hartner F.S. & Glieder A. (2006). Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb. Cell Fact.*, 5(39), 1-21.

Inan M. & Meagher M.M. (2001). The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*. *J. Biosc. Bioeng.* 92, 337-341.

Jones E.W. & Fink G.R. (1982). Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In: *Molecular Biology of the yeast Saccharomyces*. Metabolism and gene expression. Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Jørgensen, H., Nielsen, J., Villadsen, J., Mølgaard, H. (1995). Metabolic flux distributions in *Penicillium crysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 117-131.

Joshi, M., Seidel-Morgenstern, A., Kremling, A. (2006). Exploiting the bootstrap method for quantifying parameter confidence intervals in dynamical systems. *Metabolic Engin.*, 8, 447-455.

Jungo, C., Rérat, C., Marison, I.W., von Stokar, U. (2006) Quantitative characterization of the regulation of the expression of recombinant avidin in a *Pichia pastoris* Mut⁺ strain. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 936-944.

Jungo, C., Marison, I., von Stockar, U. (2007) Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *J. Biotechnol.*, 128, 824-837.

Kaiser, C.R. (2000). RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, 23 (2), 231-236.

Klapa, M. I., Aon, J-C., Stephanopoulos, G. (2003). Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, 270, 3525-3542.

Klamt, S., Schuster, S., Gilles, E.D. (2002). Calculability analysis in underdetermined metabolic networks illustrated by a model of the central metabolism in purple nonsulfur bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 734–751.

Klamt, S., Stelling, J., Ginkel, M., Dieter, E. (2003). FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps. *Bioinformatics*, 19, 261–269.

Klamt, S., Saez-Rodriguez, J., Gilles, E.D. (2007). Structural and functional analysis of cellular Networks with *CellNetAnalyzer*. *BMC Syst. Biol.*, 19, 1:2.

Kleijn, R.J., Geertman, J-M.A., Nfor, B.K, Ras, C., Schipper, D., Pronk, J. T., Heijnen, J.J., van Maris, A.J.A, van Winden, W.A. (2007) Metabolic flux analysis of a glycerol-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain based on GC-MS, LC-MS and NMR-derived ¹³C-labelling data. *FEMS Yeast Res.*, 7, 216–231.

Kocková-Kratochvílová A. (1990). Yeasts and yeast-like organisms. Weinheim, Germany: VCH Press. 528 p.

Kremling, A., Fischer, S., Gadkar, K., Doyle, F.J., Sauter, T., Bullinger, E., Allgöwer, F., Gilles, E.D. (2004). A Benchmark for Methods in Reverse Engineering and Model Discrimination: Problem Formulation and Solutions. *Genome Res.*, 14, 1773-1785.

Kurtzman, C.P. (1984). *Pichia* Hansen, In: The yeast a taxonomic study, ed. Kreger-van Rij, N.J.W. Elsevier Science Publishers. 3rd edition. Amsterdam. 295-378.

Kunze, M., Kragler, F., Binder, M., Hartig, A., Gurvitz, A. (2002). Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur. J. Biochem.*, 269, 915-922.

Lange, H.C. & Heijnen, J.J. (2001). Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 75, 334-344.

Lehninger, A.L. (1993). Bioquímica. Ediciones Omega. Segunda Edición. Barcelona. 1117 p.

Lin Cereghino, J. & Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 45-66.

Llaneras, F. & Picó, J. (2007). An interval approach for dealing with flux distributions and elementary modes activity patterns. *J. Theor. Biol.*, 246, 290-308.

López, P.C. (2002). Matlab[®] y sus aplicaciones en la ciencias y la ingeniería. Prentice Hall. Madrid. 632p.

Lowry, O H., Rosebrough, N.J., Farr, A L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Maaheimo, H., Fiaux, J., Çakar, Z.P., Bailey, J.E., Sauer, U., Szyperski, T. (2001). Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional (13)C labeling of common amino acids. *Eur. J. Biochem.*, 268, 2464-2479.

Malloy, C. R. S, Dean Sherrysll A., Mark, F. Jeffrey, H. (1988). Evaluation of Carbon Flux and Substrate Selection through Alternate Pathways Involving the Citric Acid Cycle of the Heart by ^{13}C NMR Spectroscopy*. *The J. Biol. Chem.*, 263, 6964-6971.

Marx, A., de Graaf, A.A., Wiechert, W., Eggeling, L., Sahm, H. (1995). Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 111-129.

Minning, S., Schimidt-Dannert, C., Schmid, R.D. (1998). Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *J. Biotechnol.*, 66, 147-156.

Montgomery, D.C. & Runger, G.C. (1999). Applied statistics and probability for engineers, 2nd ed. John Wiley. New York, 817p.

Moreira dos Santos, M., Gombert, A.K., Christensen B., Olsson L., Nielsen J. (2003). Identification of in vivo enzyme activities in the cometabolism of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by using ^{13}C -labeled substrates. *Eukaryot Cell*, 2, 599-608.

Müller, R.H., Uhlenhut, J.G., Babel, W. (1985). Flow of ^{14}C -methanol via assimilatory and dissimilatory sequences with yeast in presence of glucose. *Arch. Microbiol.*, 143, 77-81.

Murray W.D., Duff S.J.B., Beveridge T.J. (1990). Catabolite Inactivation in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *App. Env. Microbiol.*, 56, 2378-2383.

Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 143, 203-218.

Nielsen, J. (2003). It is all about metabolic fluxes. *J. Bacteriol.*, 185, 7031-7035.

Nöh, K., Wahl, A., Wiechert, W. (2006). Computational tools for isotopically instationary ^{13}C labeling experiments under metabolic steady state conditions. *Metabolic Engin.*, 8, 554–577.

Olazarán, M.G., Treviño, L.L.E., van Wormhoudt, A., Saavedra, J.S., Salvadó, J.M.V. (2001). Efecto de la expresión en *Pichia pastoris* de una serinproteasa sobre enzimas peroxisomales. *Ciencia UANL*. 4, 448-453.

Ortigueira, M.D. (2002). Introdução ao MatLab. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova Lisboa. Lisboa. 68p.

Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 34-50.

Oura, E. (1983). Biomass from carbohydrates. In: Biotechnology, a comprehensive treatise in 8 volumes, ed. Rehm, H-J., Reed, G., Verlag Chemie. Weinheim, 3, 4-14.

Palsson, B. Ø. (2003). Extreme pathway analysis: Basic concepts. <http://systemsbiology.uscd.edu>.

Papin, J.A., Price, N.D., Palsson, B.Ø. (2002). Extreme pathway lengths and reaction participation in genome-scale metabolic networks. *Genome Research*. <http://genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.327702>.

Papin, J.A., Stelling, J., Price, N.D., Klant, S., Schuster, S., Palsson, B.Ø. (2004). Comparison of network-based analysis methods. *TRENDS in Biotechnol.*, 22, 400-405.

Penninckx, M. (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Tech.*, 26, 737-742.

Pitkänen, J-P., Aristidou, A., Salusjärvi, L., Ruohonen, L., Penttilä, M. (2003). Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. *Metabolic Eng.*, 5, 16-31

Plantz, B.A., Sinha, J., Villarete, L., Nickerson, K.W., Schlegel, V.L. (2006). *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 297-305.

Poolman, M.G., Fell, D.A., Lightfoot, D. (2001). Elementary modes of metabolism, and software for their determination and analysis. *ICSB: 2nd International Conference on Systems Biology*. California, USA.

Poolman, M.G., Venakatesh, K.V., Pidcock, M.K., Fell, D.A. (2004). A method for the determination of flux in elementary modes, and its application to *Lactobacillus rhamnosus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 601-612.

Prinz, B., Schultchen, J., Rydzewski, R., Holz, C., Boettner, M., Stahl, U., Lang, C. (2004). Establishing a versatile fermentation and purification procedure for human proteins expressed in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* for structural genomics. *J. Struct. Funct. Genomics*, 5, 29–44.

Rorabacher, D.B. (1991). Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values. of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. *Anal. Chem.*, 63, 139-146.

Russell, J.B. (1998). *Química General*. McGraw-Hill. México. 980p.

Sauer, U. (2006). Metabolic networks in motion: ¹³C-based flux analysis. *Mol. Syst. Biol.*, 9-10.

Sauer U., Hatzimanikatis V., Bailey JE., Hochuli M., Szyperski T., Wüthrich K. (1997). Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nat. Biotechnol.*, 15, 448 – 452.

Schilling, C.H., Letscher, D., Palsson, B. Ø. (2000). Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. *J. Theor. Biol.*, 203, 229–248.

Schmidt, K., Nørregaard, L.C., Pedersen, B., Meissner, A., Duus, J. Ø., Nielsen, J. Ø., Villadsen, J. (1999). Quantification of intracellular metabolic fluxes from fractional enrichment and ^{13}C - ^{13}C coupling constraints on the isotopomer distribution in labeled biomass components. *Metabolic Eng.*, 1, 166-179.

Schuster, R. & Schuster, S. (1993). Refined algorithm and computer program for calculating all nonnegative fluxes admissible in steady states of biochemical reaction systems with or without some flux rates fixed. *Comp. Appl. Biosci.*, 9, 79–85

Schuster, S., Hilgetag, C., Woods, J.H., Fell, D.A. (1996). Elementary modes of functioning in biochemical networks, in *Computation in Cellular and Molecular Biological Systems*, R. Cuthbertson, M. Holcombe and R. Paton (Eds), Singapore: World Scientific, 151–165.

Schuster, S., Dandekar, T., Fell, D.A. (1999). Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *TIBTECH*, 17, 53-60.

Schuster, S., Fell, D.A., Dandekar, T. (2000). A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat. Biotechnol.*, 18, 326-332.

Schuster, S. & Hilgetag, C. (1994). On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *J. Biol. Syst.*, 2, 165–182.

Schuster, S., Hilgetag, C., Woods, J.H, Fell, D.A. (2002). Reaction routes in biochemical reaction systems: Algebraic properties, validated calculation procedure and example from nucleotide metabolism. *J. Math. Biol.*, 45, 153-181.

Schwartz, J.M. & Kanehisa, M. (2005). A quadratic programming approach for decomposing steady-state metabolic flux distributions onto elementary modes. *Bioinformatics*, 21, 204–205.

Schwartz J.M. & Kanehisa M. (2006). Quantitative elementary mode analysis of metabolic pathways: the example of yeast glycolysis. *BMC Bioinformatics* ,7, 186.

Shimizu, H. (2002). Metabolic Engineering-integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess systems engineering. *J. Biosci. Bioeng.*, 94 (6), 563-573.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. (1991). Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, Inc. 5th Edition. USA. 419 p.

Solà, A. (2004). Estudi del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris*. Barcelona: Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona. 310 p. Tesis Doctoral.

Solà, A., Maaheimo, H., Ylönen, K., Ferrer, P., Szyperski, T. (2004). Amino acid biosynthesis and metabolic flux profiling of *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.*, 271, 2462-2470.

Solà A., Jouhten P., Maaheimo H., Sánchez-Ferrando, F., Szyperski T., Ferrer P. (2007). Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates. *Microbiology*, 153, 281-290.

Sreekrishna K. & Kropp K.E. (1996). *Pichia pastoris*, In: Nonconventional Yeast in Biotechnology. A Handbook., Edited by Wolf, K., Editor. Springer Verlag. Berlin. pp. 203-253.

Steffan, J.S. & McAlister-Henn, L. (1992). Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase. *J Biol Chem.*, 267, 24708-24715.

Stephanopoulos, G., Aristidou, A., Nielsen, J. (1998). Metabolic Engineering Principles and Methodologies. Academic press. San Diego. 725 p.

Stryer, L. (1995). Biochemistry. W. H. Freeman, 4th ed., New York. 1064 p.

Sulyok, M., Berthiller, F., Krska., R., Schuhmacher, R. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 20, 2649-2659.

Szyperski, T. (1995). Biosynthetically direct fractional ^{13}C -labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 232, 433-448.

Szyperski, T., Bailey, J. E., Wüthrich, K. (1996). Detecting and dissecting metabolic fluxes using biosynthetic fractional ^{13}C labeling and two-dimensional NMR spectroscopy. *Trends Biotechnol.*, 14, 453-459.

Szyperski, T. (1998). ^{13}C -NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Quarterly Reviews of Biophysics.* 31, 41-106.

Szyperski, T., Glaser, R.W., Hochuli, M., Fiaux, J., Sauer, U., Bailey, J.E. and Wüthrich, K. (1999). Bioreaction network topology and metabolic flux ratio analysis by biosynthetic fractional ^{13}C labeling and two-dimensional NMR spectroscopy. *Metabolic Eng.*, 1, 189-197.

Torres, F.A.G. & Moraes, L.M.P. (2000). Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 12, 20-22.

UNILEVER (1987). Process of preparing a catalase-free oxidase containing yeast, and the use thereof. *Eur. Pat. Appl.*, 242007.

Vallino, J.J. & Stephanopoulos, G. (1990). Flux determinations in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentations, In: *Frontiers in Bioprocessing*, Edited by Sikdar, S.K., Bien, M., Todd, P. CRC Press. Boca Raton, FL., 205-219.

van der Heijden, R.T.J.M., Heijnen, J.J., Hellinga, C., Romein, B., Luyben, K.Ch.A.M. (1994a). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 3-10.

van der Heijden, R.T.J.M., Romein, B., Heijnen, J.J., Hellinga, C., Luyben, K.Ch.A.M. (1994b). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 11-20.

van Gulik, W.M. & Heijnen, J.J. (1995). A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 681-698.

van Gulik, W.M., de Laat, W.T.A.M., Vinke, J.L., Heijnen, J.J. (2000). Application of metabolic flux analysis for the identification of metabolic bottlenecks in the biosynthesis of penicillin-G. *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 602-618.

van Winden, W., Verheijen, P., Heijnen, S., (2001). Possible Pitfalls of Flux Calculations Based on ¹³C-Labeling. *Metabolic Eng.*, 3, 151-162.

van Winden, W., van Dam, J.C., Ras, C., Kleijn, R.J., Vinke, J.L., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., (2005). Metabolic-flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D based on mass isotopomer measurements of ¹³C-labeled primary metabolites. *FEMS Yeast Res.*, 5, 559–568.

Vanrolleghem, P.A., Jong-Gubbels, P., van Gulik, W.M., Pronk, J.T., van Dijken, J.P., Heijnen, S. (1996). Validation of a metabolic network for *Saccharomyces cerevisiae* using mixed substrate studies. *Biotechnol. Prog.*, 12, 434-448.

Vasconcellos, A. M. H, Neto, A.L.C, Valle A.B.F, Panek A. D., Quinto, G.F., Oliveira, M. L. C.; Operti, M. S.; Chaloub, R.M.; Leão, M.H.M.R. (1996). Cursos práticos em Bioquímica, 6ª Edição, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da UFRJ 342p.

Verduyn, C. (1991). Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Ant. van Leeuwenhoek*, 60, 325 – 353.

Wahlbom, C.F, Eliasson, A., Hahn-Hägerdal, B. (2001). Intracellular fluxes in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cultivated anaerobically at different dilution rates and feed concentrations. *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 289-296.

Wang, N.S. & Stephanopoulos, G. (1983). Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2177-2208.

Waterham, H. R., de Vries, Y., Russel, K. A., Xie, W., Veenhuis M., Cregg, J. M. (1996). The *Pichia pastoris* *PER6* gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 2527–2536.

Wegner, G.H. (1983). Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. US Patent 4414329.

Wiback, S.J., Mahadevan, R., Palsson B. Ø. (2003). Reconstructing metabolic flux vectors from extreme pathways: defining the α -spectrum *J. Theor. Biol.*, 224, 313-324

Wiebe, M.G., Rintala, E., Tamminen, A., Simolin, H., Salusjärvi, L., Toivari, M., Kokkonen, J.T., Kiuru, J., Ketola, R.A., Jouhten, P., Huuskonen, A., Maaheimo, H., Ruohonen, L., Penttilä, M. (2007). Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. *FEMS Yeast Res.*, 1-15.

Wiechert, W., Möllney, M., Petersen, S., de Graaf, A.A. (2001). A universal framework for ^{13}C metabolic flux analysis. *Metabolic Eng.*, 3, 265-283.

Wiechert W. & Nöh K. (2005). From stationary to instationary metabolic flux analysis. *Adv Biochem. Eng. Biotechnol.*, 92, 145–172.

Wiechert, W., de Graaf, A.A., Marx, A. (1995). In vivo stationary flux analysis ^{13}C NMR isotope labeling experiments. *Comp. Appl. Biotechnol.*, 14-17.

Wiechert, W. & de Graaf A.A. (1996). In vivo stationary flux analysis by ^{13}C labeling experiments. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 54, 109-154.

Wiechert, W., Siefke, C., de Graaf A.A., Marx, A. (1997). Bidirectional reaction steps in metabolic networks: Part II: Flux estimation and statistical analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 118-135.

Wiechert, W. (2001). ^{13}C metabolic flux analysis. *Metabolic Eng.*, 3, 195-206.

Wiechert, W. (2003). ¹³C-FLUX Web Page. http://www.simtec.mb.uni-siegen.de/software_13cflux.0.html.

Wilkins, C.L. (1997). Mass Spectrometry. In Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry; Settle, FA, Ed.; Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, Section V.

Wittmann, C. & Heinzle, E. (2001). Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*: A novel approach for metabolic flux analysis. *Eur. J. Biochem.*, 268, 2441-2455.

Wittmann, C., Hans, M., van Winden, W.A., Ras, C., Heijnen, J.J. (2005). Dynamics of intracellular metabolites of glycolysis and TCA cycle during cell-cycle-related oscillation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 89, 839-847.

Wolf, K. (1996). Non conventional yeasts in biotechnology: A handbook, Springer-Verlag, London, 560p.

Yokoyama, S. (2003). Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 39–43.

Zagoya, J.C.D. & Gomez, J.J.H. (1995). Bioquímica, Ediciones McGraw-Hill. Segunda Edición. México. 750 p.

Zamboni, N., Fischer, E., Sauer, U. (2005). FiatFlux – a software for metabolic flux analysis from ¹³C-glucose experiments. *BMC Bioinformatics*, 6, 1-8.

Zinke, S. (2007). Metabolic flux analysis of *Pichia pastoris* carbon metabolism combining MS- and NMR-derived ¹³C-labeling data. Vienna: University of Applied Sciences. 60p. Diploma Student Bioengineering.

Zhang, H., Shimizu, K., YAO, S. (2003). Metabolic flux analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose, glycerol or acetate by ¹³C-labeling experiments. *Biochem. Eng. J.*, 16, 211-220.

A. Anexos

A.I Datos de composición de la biomasa para *Pichia pastoris* crecida en glucosa

Tabla A.I.1 Composición elemental de los constituyentes de la biomasa.

<i>Macromolécula</i>	<i>Fórmula elemental</i>
Proteína ^a	CH _{1,581} N _{0,275} O _{0,318} S _{0,003}
Carbohidratos ^b	CH _{1,667} O _{0,833}
Ácidos Grasos ^b	CH _{1,873} N _{0,010} O _{0,149} P _{0,010}
RNA ^b	CH _{1,232} N _{0,389} O _{0,737} P _{0,105}
DNA ^b	CH _{1,255} N _{0,378} O _{0,612} P _{0,102}
Fosfato	HPO ₄
Sulfato	SO ₄
Agua	H ₂ O
Metales	M

a. Lange & Heijnen (2001).

b. Kocková-Kratochvílová (1990).

por 100 g	
Proteínas	40,17
Carbohidratos	38,60
RNA	0,25
DNA	1,14
Lípidos	0,29
Cenizas	19,23

Composición lipídica (Vanrollehem *et al.*, 1996)

Ácido palmitoleico	0,109 mmol
Ácido linoleico	0,044 mmol
Ácido oleico	0,065 mmol
Glicerol	0,722 mmol
	0,29 mmol

Composición elemental	C	H	O	N	P	S	(C)mol
Proteína (Lange & Heijnn, 2001)	1,0000	1,5810	0,3180	0,2750	0,0000	0,0033	22,62 (g/Cmol)
Polisacarídeos (Kocková-Kratochvílová, 1990)	1,0000	1,6667	0,8333	0,0000	0,0000	0,0000	27,00 (g/Cmol)
RNA (Kocková-Kratochvílová, 1990)	1,0000	1,2320	0,7370	0,3890	0,1050	0,0000	33,73 (g/Cmol)
DNA (Kocková-Kratochvílová, 1990)	1,0000	1,2550	0,6120	0,3780	0,1020	0,0000	31,50 (g/Cmol)
Ácido palmitoleico	1,0000	1,8125	0,1250	0,0000	0,0000	0,0000	15,81 (g/Cmol)
	16,0000	29,0000	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	253,00 (g/mol)
Ácido oleico	1,0000	1,8333	0,1111	0,0000	0,0000	0,0000	15,61 (g/Cmol)
	18,0000	33,0000	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	281,00 (g/mol)
Glicerol	1,0000	2,6667	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	30,67 (g/Cmol)
	3,0000	8,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	92,00 (g/mol)

En 100 g biomasa:
Composición elemental:

Composición elemental	g	C	H	O	N	P	S	
Proteína	40,17	1,775	2,806	0,565	0,488	0,000	0,006	1,775 (C)mol
Polisacáridos	38,60	1,430	2,383	1,191	0,000	0,000	0,000	1,430 (C)mol
RNA	0,25	0,007	0,0090	0,0054	0,0028	0,001	0,000	0,007 (C)mol
DNA	1,14	0,036	0,0453	0,0221	0,0136	0,004	0,000	0,036 (C)mol
Ácido palmitoleico	0,12	0,008	0,0141	0,0010	0,0000	0,000	0,000	0,490 mmol
Ácido oleico	0,14	0,009	0,0160	0,0010	0,0000	0,000	0,000	0,490 mmol
Glicerol	0,03	0,001	0,0025	0,0010	0,0000	0,000	0,000	0,320 mmol
Composición elemental en 100 g de biomasa	80,440	3,266	5,277	1,786	0,505	0,004	0,006	

Composición bioquímica de
1Cmol de biomasa:

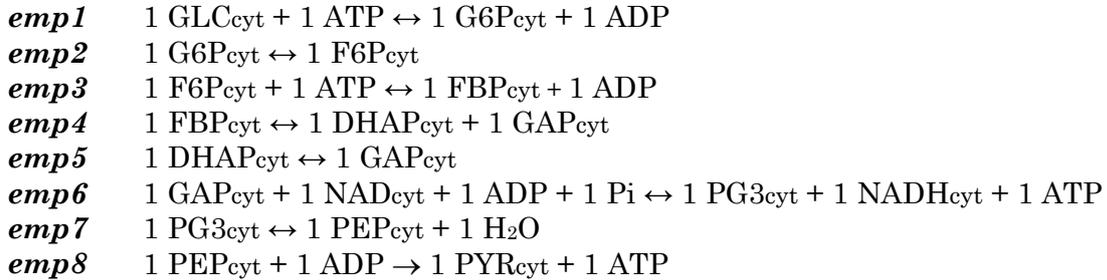
Proteína	0,54359 Cmol
Polisacáridos	0,43777 Cmol
RNA	0,00223 Cmol
DNA	0,01105 Cmol
Ácido palmitoleico	0,00015 mol
Ácido oleico	0,00015 mol
Glicerol	0,00001 mol

Proteína	0,54359 Cmol
Polisacáridos	0,43777 Cmol
RNA + DNA	0,01327 Cmol
Ácido grasos	0,00030 mol
Glicerol	0,00001 mol

A.II Reacciones bioquímicas

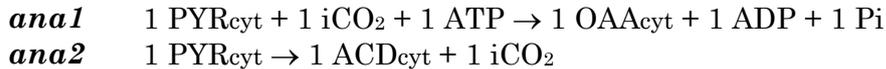
A.II.1 Reacciones utilizadas en la red metabólica para MFA

Vía Embden Meyerhof Parnas

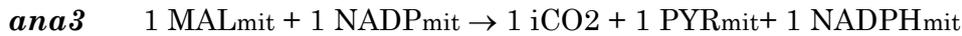


Vías anapleróticas

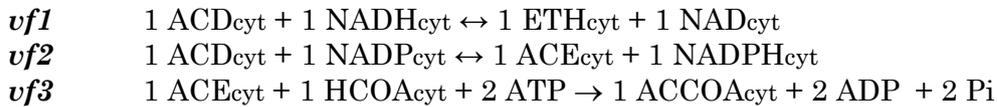
Punto de ramificación del Piruvato



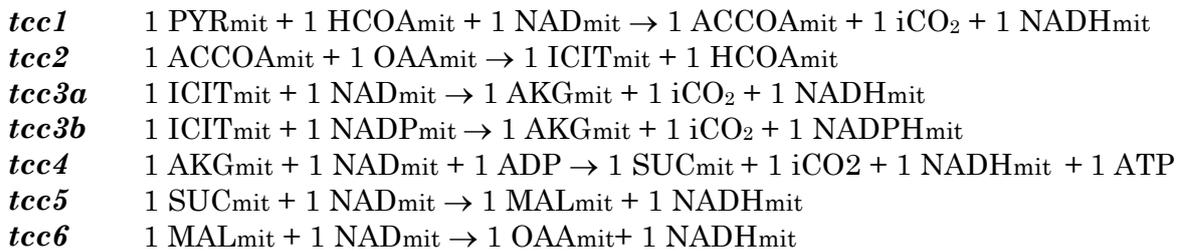
Enzima málico



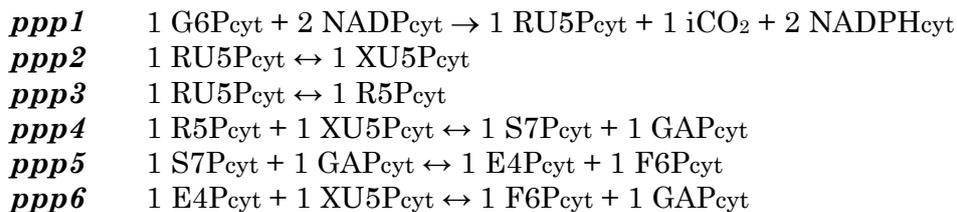
Vías Fermentativas



Ciclo de los TCA



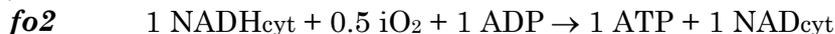
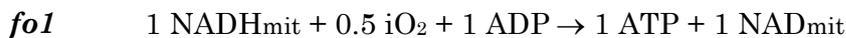
Vía de las Pentosas Fosfato



Vía de asimilación y formación del Glicerol

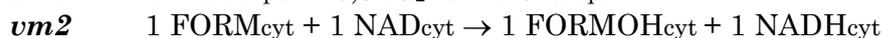
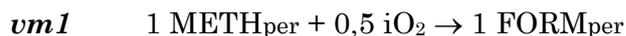


Fosforilación Oxidativa¹

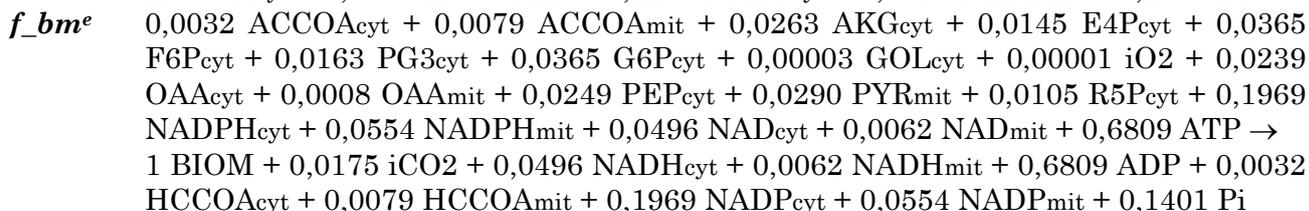
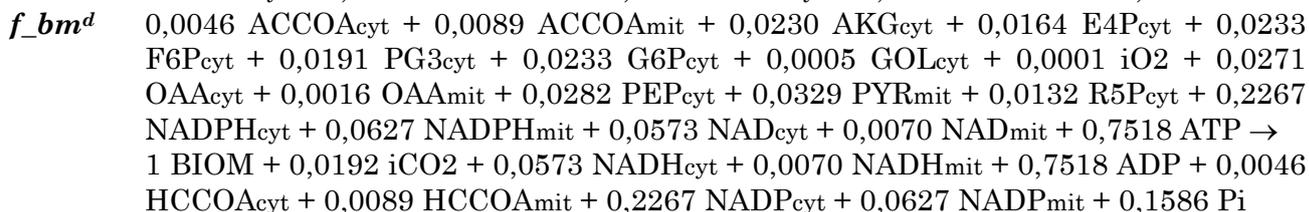
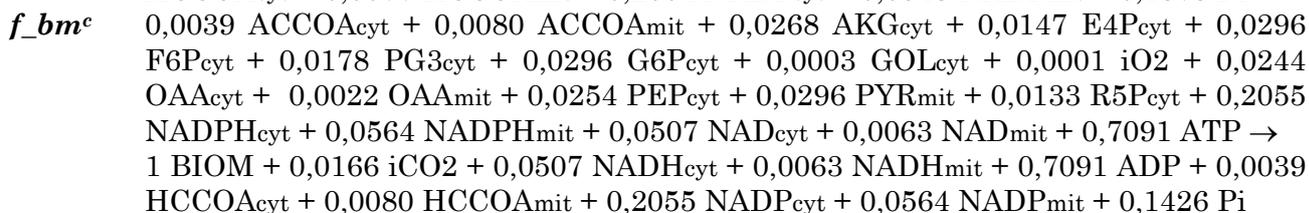
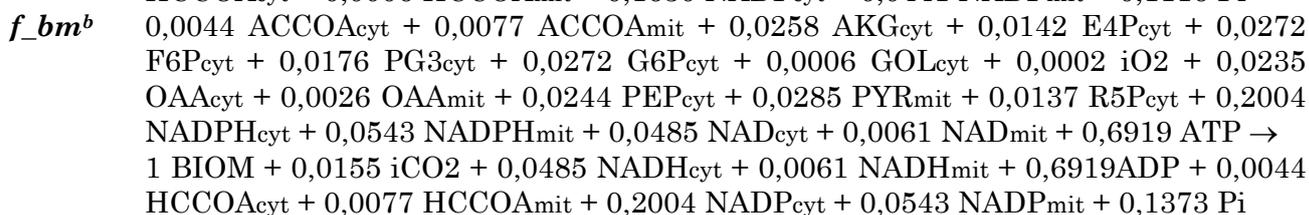
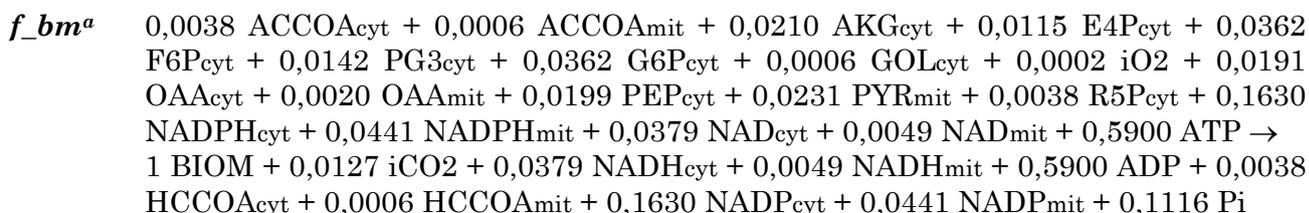


1. PO-ratio = 1

Vías de asimilación de Metanol



Formación de Biomasa²



f_bmf 0,0045 ACCOAcyt + 0,0080 ACCOAmitt + 0,0267 AKGcyt + 0,0147 E4Pcyt + 0,0259 F6Pcyt + 0,0179 PG3cyt + 0,0259 G6Pcyt + 0,0006 GOLcyt + 0,0002 iO2 + 0,0243 OAAcyt + 0,0023 OAAmitt + 0,0253 PEPcyt + 0,0295 PYRmitt + 0,0136 R5Pcyt + 0,2066 NADPHcyt + 0,0562 NADPHmitt + 0,0505 NADcyt + 0,0063 NADmitt + 0,7050 ATP → 1 BIOM + 0,0164 iCO2 + 0,0505 NADHcyt + 0,0063 NADHmitt + 0,7050 ADP + 0,0045 HCCOAcyt + 0,0080 HCCOAmitt + 0,2066 NADPcyt + 0,0562 NADPmitt + 0,1423 Pi

Reacciones de transporte

glu_apt 1 GLC(E) → 1 GLCcyt
gly_apt 1 GOL(E) → 1 GOLcyt
meth_apt 1 METH(E) → 1 METHper
o2_apt 1 O2(E) → 1 iO2
co2_out 1 iCO2 → 1 CO2(E)
gly_out 1 GOLcyt → 1 GOL(E)
glu_out 1 GLCcyt → 1 GLC(E)
ace_out 1 ACEcyt → 1 ACE(E)
eth_out 1 ETHcyt → 1 ETH(E)
form_out 1 FORMcyt → 1 FORM(E)
formoh_out 1 FORMOHcyt → 1 FORMOH(E)
tr_oaa 1 OAAcyt ↔ 1 OAAmitt
tr_accoa 1 ACCOAcyt → 1 ACCOAmitt
tr_pyr 1 PYRcyt → 1 PYRmitt
tr_akg 1 AKGmitt → 1 AKGcyt
tr_xyl 1 XU5Pcyt → 1 XU5Pper
tr_form 1 FORMper → 1 FORMcyt
tr_gap 1 GAPper → 1 GAPcyt
tr_dha 1 DHAper → 1 DHAcyt

Consumo de ATP para mantenimiento

atp 1 ATP → 1 ADP + 1 Pi

2. Componentes de la Biomasa

Polisacáridos

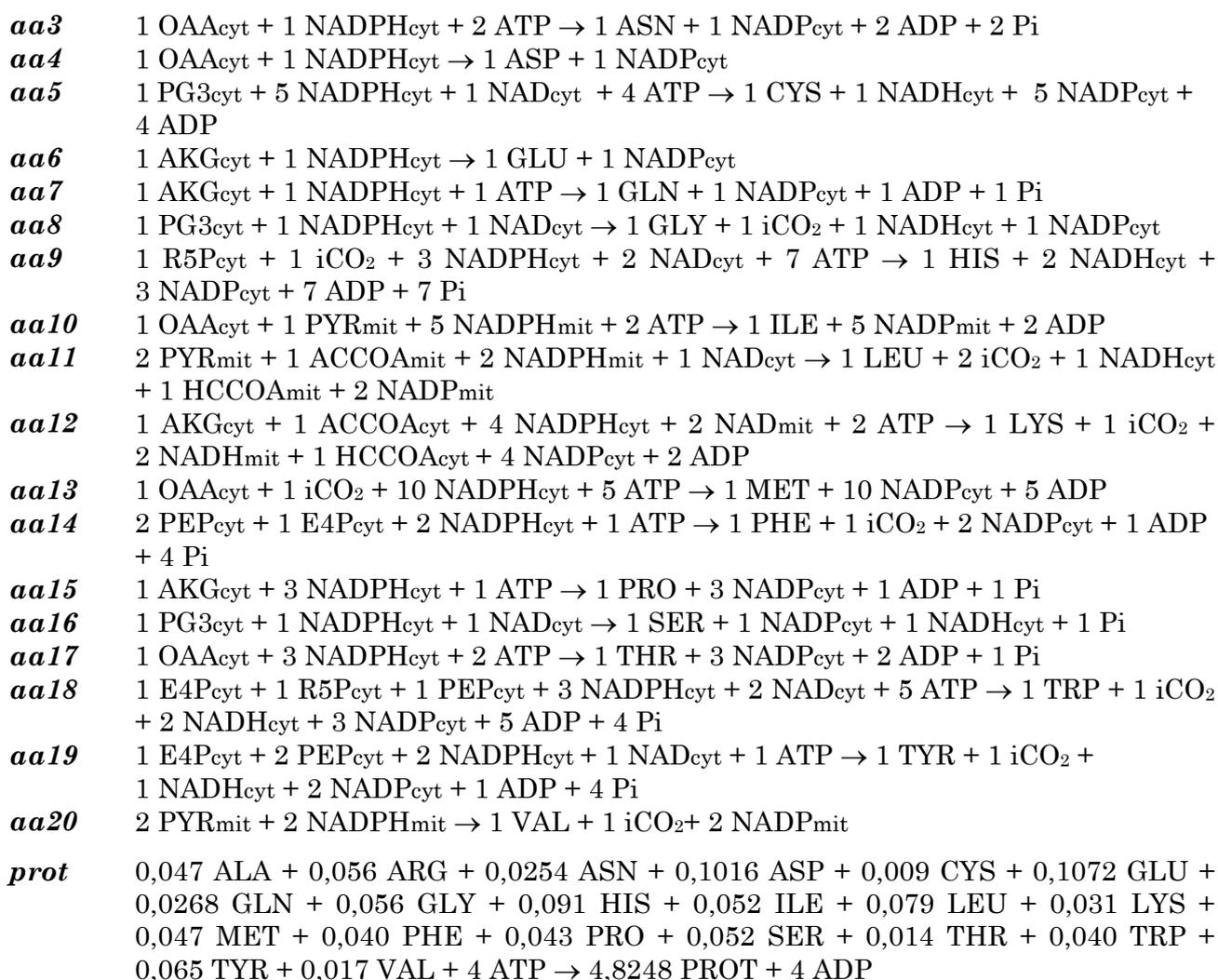
pol1 0,16667 G6Pcyt + 0,16667 ATP → 1 TREGLY + 0,16667 ADP
pol2 0,16667 F6Pcyt + 0,16667 ATP → 1 MANNO + 0,16667 ADP

Ácidos Grasos

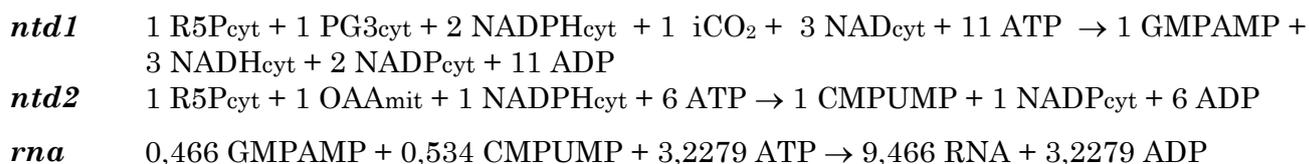
fat1 8 ACCOAcyt + 1 iO2 + 15 NADPHcyt + 15 ATP → 1 PAL + 8 HCCOAcyt + 15 NADPcyt + 15 ADP
fat2 9 ACCOAcyt + 1 iO2 + 17 NADPHcyt + 17 ATP → 1 OLE + 9 HCCOAcyt + 17 NADPcyt + 17 ADP
fat(1-2) 0,5 PAL + 0,5 OLE → 1 FAT

Aminoácidos y proteínas

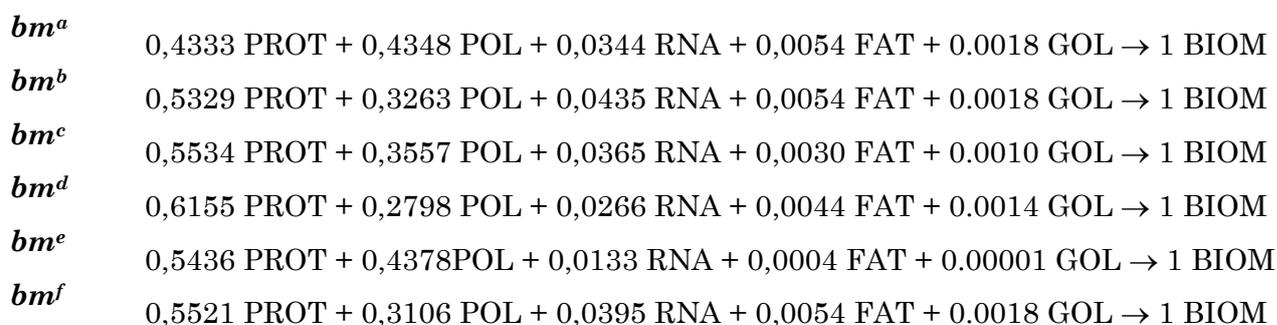
aa1 1 PYRmitt + 1 NADPHmitt → 1 ALA + 1 NADPmitt
aa2 1 AKGcyt + 1 iCO2 + 3 NADPHcyt + 1 NADPHmitt + 1 NADcyt + 7 ATP → 1 ARG + 1 NADHcyt + 3 NADPcyt + 1 NADPmitt + 7 ADP



Nucleótidos y RNA



Ecuación de biomasa

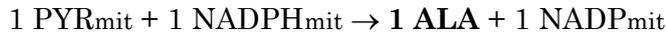


donde:

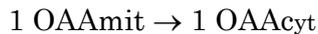
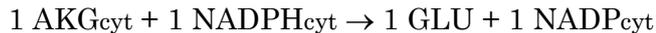
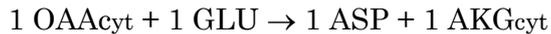
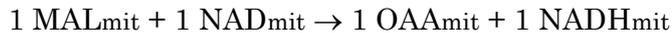
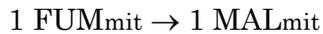
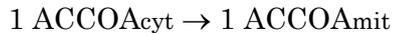
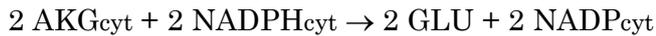
- (a) 80% Glicerol y 20% Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)
- (b) 60% Glicerol y 40% Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)
- (c) 40% Glicerol y 60% Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)
- (d) 100% Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)
- (e) 100% Glucosa ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)
- (f) 40% Glicerol y 60% Metanol ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)

A.II.1.1 Ecuaciones de biosíntesis de aminoácidos

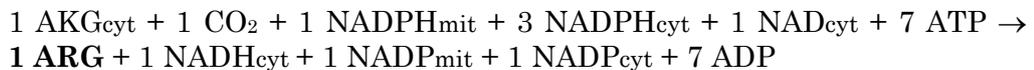
aa1 *Biosíntesis de la Alanina*



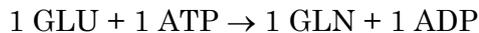
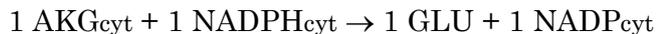
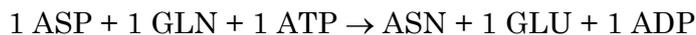
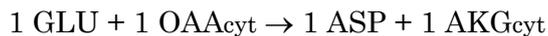
aa2 *Biosíntesis de la Arginina*



Suma de las ecuaciones:



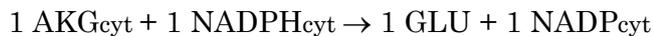
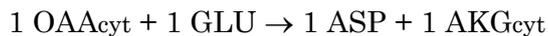
aa3 *Biosíntesis de la Asparagina*



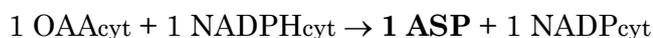
Suma de las ecuaciones:



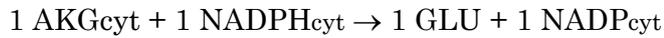
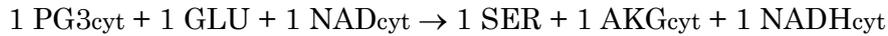
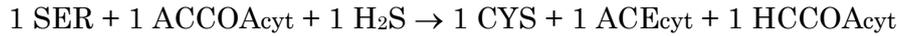
aa4 *Biosíntesis del Aspártico*



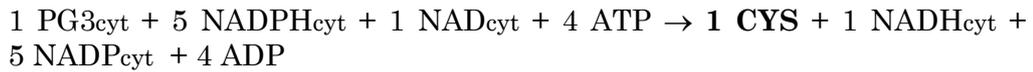
Suma de las ecuaciones:



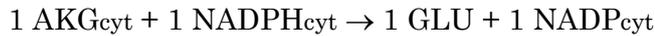
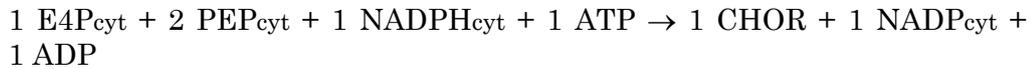
aa5 Biosíntesis de la Cisteína



Suma de las ecuaciones:



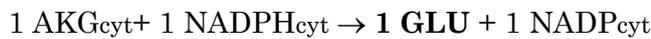
aa6 Biosíntesis de la Fenilalanina



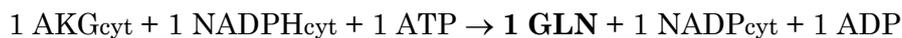
Suma de las ecuaciones:



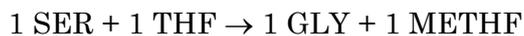
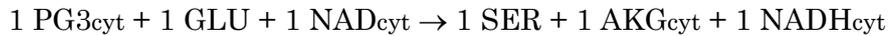
aa7 Biosíntesis del Glutámico



aa8 Biosíntesis de la Glutamina

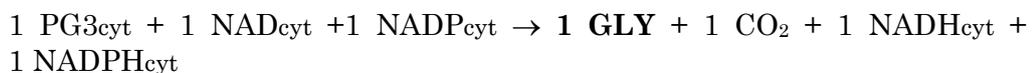


aa9 Biosíntesis de la Glicina

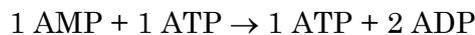
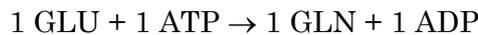
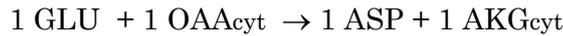
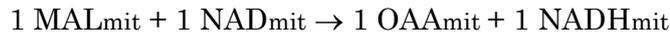
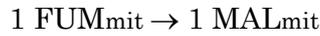
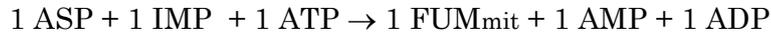
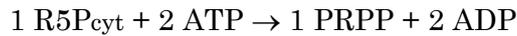
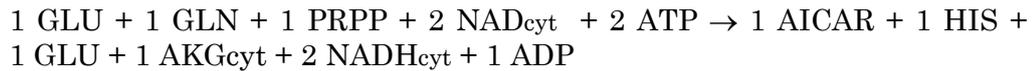


*esta reacción también está descrita usando NADH

Suma de las ecuaciones:

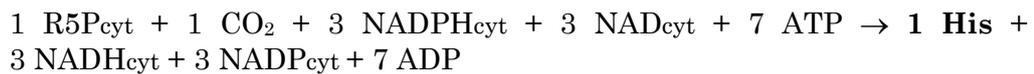


aa10 Biosíntesis de la Histidina

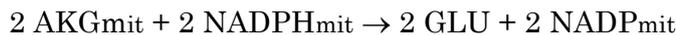
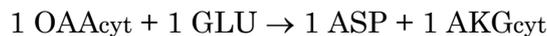


*esta reacción también está descrita usando NADH

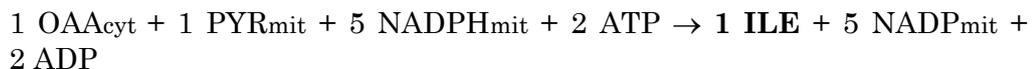
Suma de las ecuaciones:



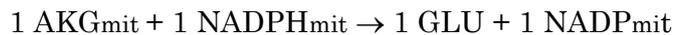
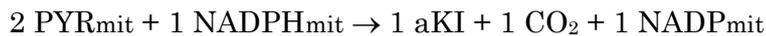
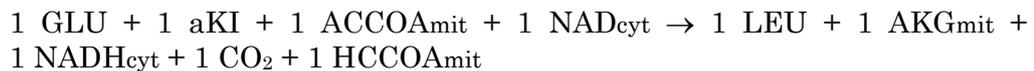
aa11 Biosíntesis de la Isoleucina



Suma de las ecuaciones:



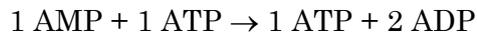
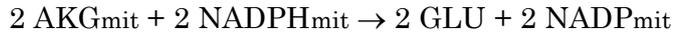
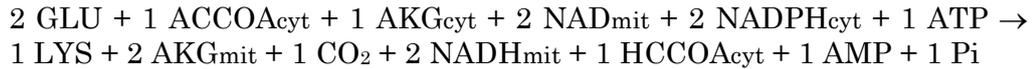
aa12 Biosíntesis de la Leucina



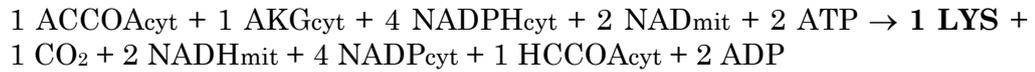
Suma de las ecuaciones:



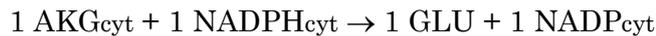
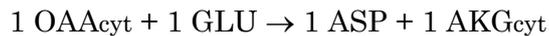
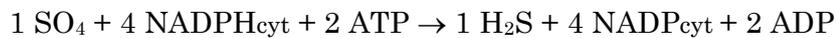
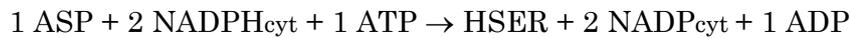
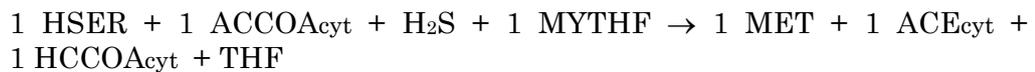
aa13 Biosíntesis de la Lisina



Suma de las ecuaciones:

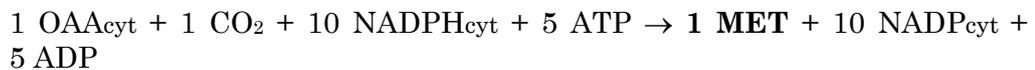


aa14 Biosíntesis de la Metionina

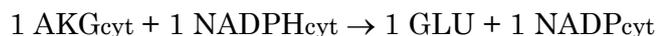
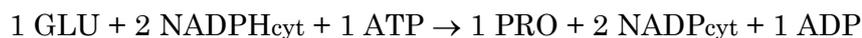


*esta reacción también está descrita usando NADH

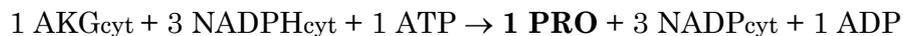
Suma de ecuaciones:



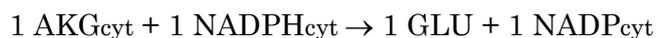
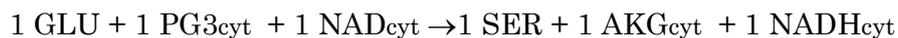
aa15 Biosíntesis de la Prolina



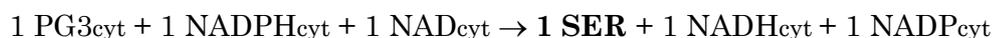
Suma de las ecuaciones:



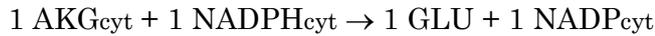
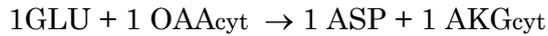
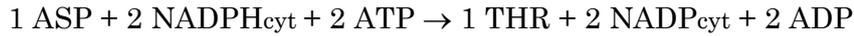
aa16 Biosíntesis de la Serina



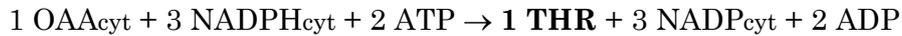
Suma de las ecuaciones:



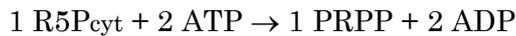
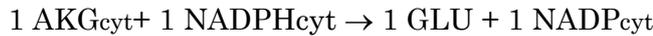
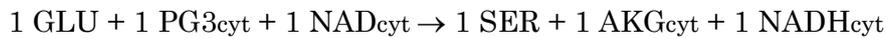
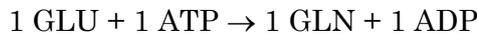
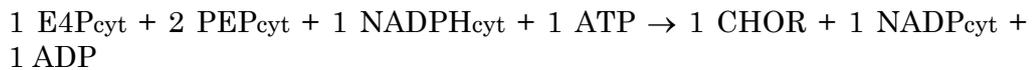
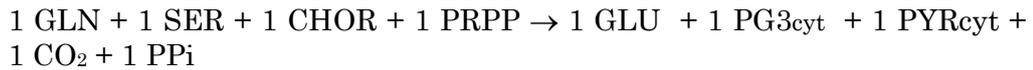
aa17 Biosíntesis de la Treonina



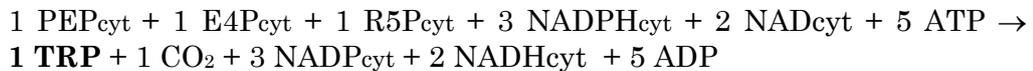
Suma de las ecuaciones:



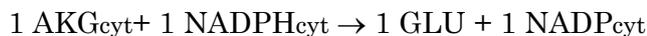
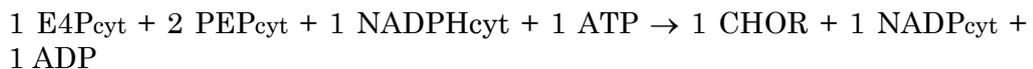
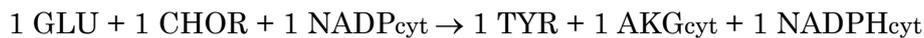
aa18 Biosíntesis del Triptófano



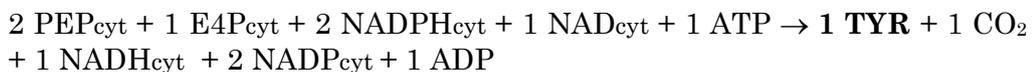
Suma de las ecuaciones:



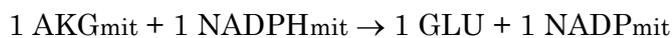
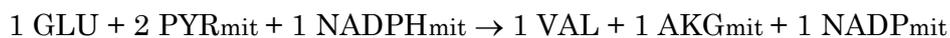
aa19 Biosíntesis de la Tirosina



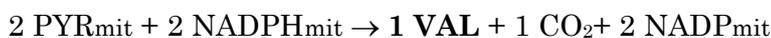
Suma de las ecuaciones:



aa20 Biosíntesis de la Valina



Suma de las ecuaciones:



A.II.2 Reacciones utilizadas en la red metabólica para MFA con restricciones derivadas de ¹³C-RMN

Vía Embden Meyrholff Parnas

<i>emp1</i>	1 GLC _{cyt} ↔ 1 G6P _{cyt}
<i>emp2</i>	1 G6P _{cyt} ↔ 1 F6P _{cyt}
<i>emp3</i>	1 F6P _{cyt} ↔ 1 FBP _{cyt}
<i>emp4</i>	1 FBP _{cyt} ↔ 1 DHAP _{cyt} + 1 GAP _{cyt}
<i>emp5</i>	1 DHAP _{cyt} ↔ 1 GAP _{cyt}
<i>emp6</i>	1 GAP _{cyt} ↔ 1 PG3 _{cyt}
<i>emp7</i>	1 PG3 _{cyt} ↔ 1 PEP _{cyt}
<i>emp8</i>	1 PEP _{cyt} → 1 PYR _{cyt}

Vías anapleróticas

Punto de ramificación del Piruvato

<i>ana1</i>	1 PYR _{cyt} + 1 iCO ₂ → 1 OAA _{cyt}
<i>ana2</i>	1 PYR _{cyt} → 1 ACD _{cyt} + 1 iCO ₂

Enzima málico

<i>ana3</i>	1 MAL _{mit} → 1 iCO ₂ + 1 PYR _{mit}
-------------	--

Vías Fermentativas

<i>vf1</i>	1 ACD _{cyt} ↔ 1 ETH _{cyt}
<i>vf2</i>	1 ACD _{cyt} ↔ 1 ACE _{cyt}
<i>vf3</i>	1 ACE _{cyt} → 1 ACCO _{cyt}

Ciclo de los TCA

<i>tcc1</i>	1 PYR _{mit} → 1 ACCO _{mit} + 1 iCO ₂
<i>tcc2</i>	1 ACCO _{mit} + 1 OAA _{mit} → 1 ICIT _{mit}
<i>tcc3</i>	1 ICIT _{mit} → 1 AKG _{mit} + 1 iCO ₂
<i>tcc4</i>	1 AKG _{mit} → 1 SUC _{mit} + 1 iCO ₂
<i>tcc5</i>	1 SUC _{mit} → 1 MAL _{mit}
<i>tcc6</i>	1 MAL _{mit} → 1 OAA _{mit}

Vía de las Pentosas Fosfato

<i>ppp1</i>	1 G6P _{cyt} → 1 iCO ₂ + 1 RU5P _{cyt}
<i>ppp2</i>	1 RU5P _{cyt} ↔ 1 XU5P _{cyt}
<i>ppp3</i>	1 RU5P _{cyt} ↔ 1 R5P _{cyt}
<i>ppp4</i>	1 R5P _{cyt} + 1 XU5P _{cyt} ↔ 1 GAP _{cyt} + 1 S7P _{cyt}
<i>ppp5</i>	1 GAP _{cyt} + 1 S7P _{cyt} ↔ 1 E4P _{cyt} + 1 F6P _{cyt}
<i>ppp6</i>	1 E4P _{cyt} + 1 XU5P _{cyt} ↔ 1 F6P _{cyt} + 1 GAP _{cyt}

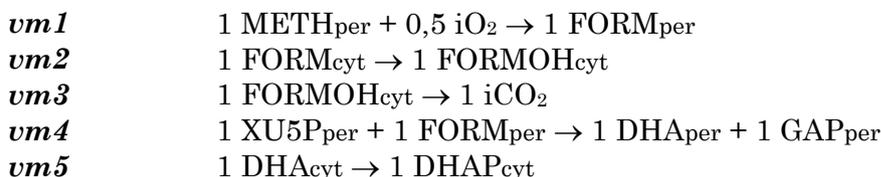
Vía de asimilación y formación del Glicerol

<i>gly</i>	1 DHAP _{cyt} ↔ 1 GOL _{cyt}
------------	--

Formación de Biomasa¹



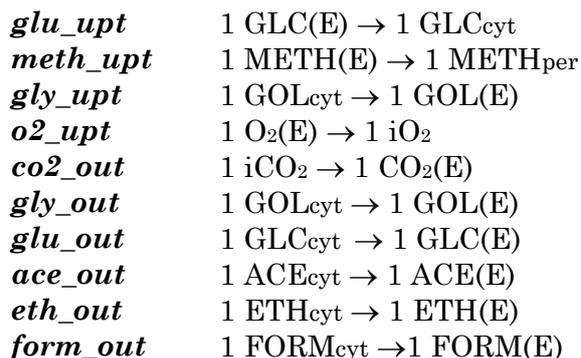
Vías de asimilación de Metanol



Consumo de oxígeno



Reacciones de transporte

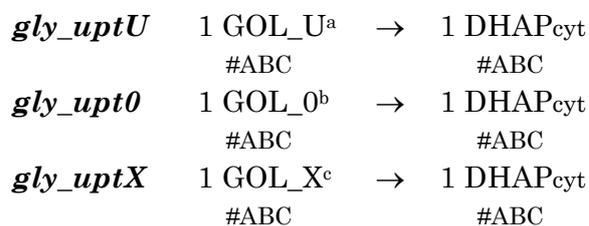


formoh_out 1 FORMOH_{cyt} → 1 FORMOH(E)
tr_oaa1 1 OAA_{cyt} → 1 OAA_{mit}
tr_oaa2 1 OAA_{mit} → 1 OAA_{cyt}
tr_accoa 1 ACCOA_{cyt} → 1 ACCOA_{mit}
tr_pyr 1 PYR_{cyt} → 1 PYR_{mit}
tr_akg 1 AKG_{mit} → 1 AKG_{cyt}
tr_xyl 1 XU5P_{cyt} → 1 XU5P_{per}
tr_form 1 FORM_{per} → 1 FORM_{cyt}
tr_gap 1 GAP_{per} → 1 GAP_{cyt}
tr_dha 1 DHA_{per} → 1 DHA_{cyt}

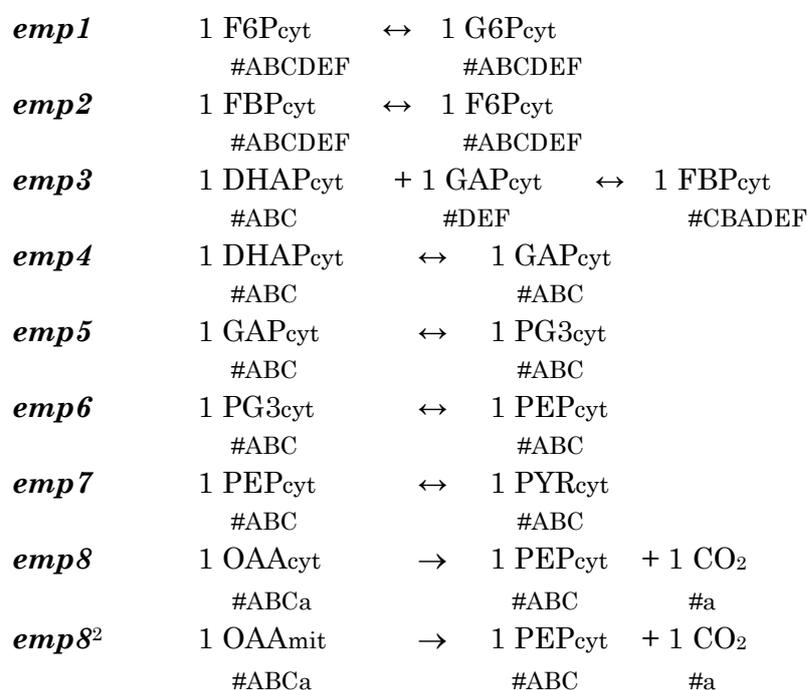
donde: (a) 80% Glicerol y 20% Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)
 (b) 60% Glicerol y 40% Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)
 (c) 40% Glicerol y 60% Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)
 (d) 100% Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)
 (e) 100% Glucosa ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)
 (f) 40% Glicerol y 60% Metanol ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)

A.II.3 Reacciones utilizadas en la red metabólica para simulación y optimización de ¹³C-MFA con el programa ¹³C-Flux

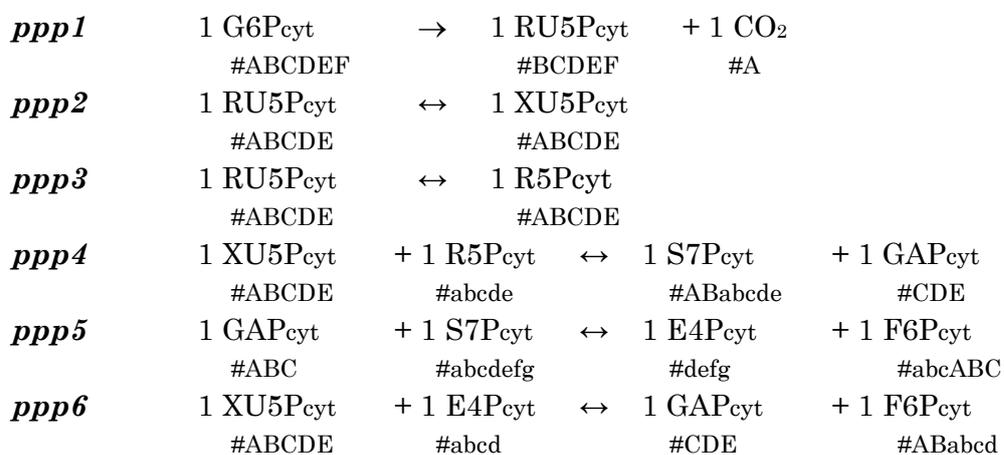
Mezcla de sustratos



Vía Embden Meyrholff Parnas



Vía de las Pentosas Fosfato



Ciclo de los TCA

<i>tcc1</i>¹	1 PYR _{mit} #ABC	→	1 ACCOAMit #BC	+ 1 CO ₂ #A
<i>tcc1</i>²	1 PYR _{cyt} #ABC	→	1 ACCOAMit #BC	+ 1 CO ₂ #A
<i>tcc2</i>	1 ACCOAMit #AB	+ 1 OAMit #abcd	→	1 CITmit #dcbaBA
<i>tcc4</i>	1 CITmit #ABCDEF	→	1 AKGmit #ABCEF	+ 1 CO ₂ #D
<i>tcc5</i>	1 AKGmit #ABCDE	→	1 SUCCoAMit #BCDE	+ 1 CO ₂ #A
<i>tcc6</i>	1 SUCCoAMit #ABCD	→	1 SUCmit #ABCD	
<i>tcc7a</i>	1 SUCmit #ABCD	→	1 MALmit #ABCD	
<i>tcc7b</i>	1 SUCmit #ABCD	→	1 MALmit #DCBA	
<i>tcc8a</i>	1 FUMmit #ABCD	→	1 MALmit #ABCD	
<i>tcc8b</i>	1 FUMmit #ABCD	→	1 MALmit #DCBA	
<i>tcc9</i>	1 MALmit #ABCD	→	1 OAMit #ABCD	

Vías anapleróticas

Punto de ramificación del Piruvato

<i>ana1</i>¹	1 PYR _{cyt} #ABC	+ 1 CO ₂ #a	→	1 OAA _{cyt} #ABCa
<i>ana1</i>²	1 PYR _{cyt} #ABC	+ 1 CO ₂ #a	→	1 OAMit #ABCa

Enzima málico

<i>ana2</i>^{1,3}	1 MALmit #ABCD	→	1 PYRmit #ABC	+ 1 CO ₂ #D
----------------------------------	-------------------	---	------------------	---------------------------

Reacciones de transporte

<i>tr_pyr</i>^{1,3}	1 PYR _{cyt} #ABC	→	1 PYRmit #ABC	
<i>tr_oaa</i>	1 OAA _{cyt} #ABCD	↔	1 OAMit #ABCD	

co2_out	1 CO ₂	→	1 CO ₂ (E)
	#A		#A

Flujos para la formación de biomasa

g6p_bm	1 G6P _{cyt}	→	1 G6P_BM
	#ABCDEF		#ABCDEF
f6p_bm	1 F6P _{cyt}	→	1 F6P_BM
	#ABCDEF		#ABCDEF
r5p_bm	1 R5P _{cyt}	→	1 R5P_BM
	#ABCDE		#ABCDE
e4p_bm	1 E4P _{cyt}	→	1 E4P_BM
	#ABCD		#ABCD
pg3_bm	1 PG3 _{cyt}	→	1 PG3_BM
	#ABC		#ABC
pep_bm	1 PEP _{cyt}	→	1 PEP_BM
	#ABC		#ABC
pyr_bm ^{1,3}	1 PYR _{mit}	→	1 PYR_BM
	#ABC		#ABC
pyr_bm ²	1 PYR _{cyt}	→	1 PYR_BM
	#ABC		#ABC
accoa_bm	1 ACCOA _{mit}	→	1 ACCOA_BM
	#AB		#AB
oaa_bm	1 OAA _{cyt}	→	1 OAA_BM
	#ABCD		#ABCD
akg_bm	1 AKG _{mit}	→	1 AKG_BM
	#ABCDE		#ABCDE
co2_bm ^{1,2}	1 CO ₂	→	1 CO ₂ _BM
	#A		#A

Biosíntesis de aminoácidos³

Familia Fosfoglicerato

Síntesis de la Serina

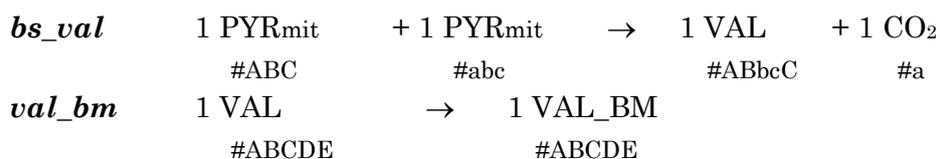
bs_ser	1 PG3 _{cyt}	→	1 SER
	#ABC		#ABC
ser_bm	1 SER	→	1 SER_BM
	#ABC		#ABC

Familia del Piruvato

Síntesis de la Alanina

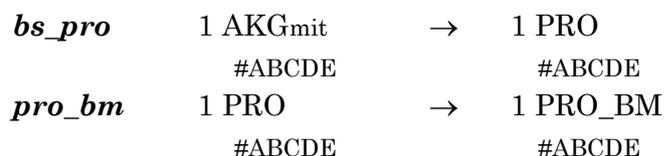
bs_ala	1 PYR _{mit}	→	1 ALA
	#ABC		#ABC
ala_bm	1 ALA	→	1 ALA_BM
	#ABC		#ABC

Síntesis de la Valina



Familia del α -cetoglutarato

Síntesis de la Prolina

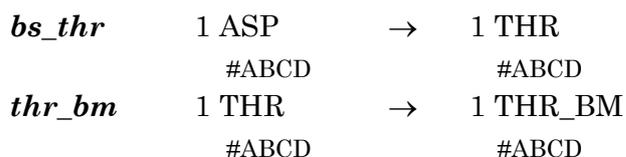


Familia del Oxaloacetato

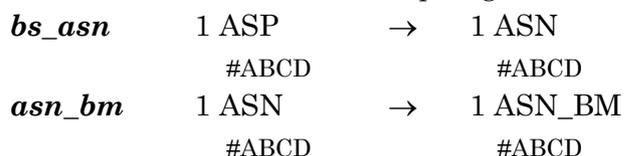
Síntesis del Aspartato



Síntesis de la Treonina



Síntesis de la Asparagina



donde:

- (a) Glicerol sin marcaje
- (b) Glicerol 100% uniformemente marcado ([U-¹³C₃]glicerol)
- (c) Glicerol 100% marcado en el carbono 1 (1-¹³C]glicerol)
- (1) Reacción utilizada en el Modelo 1
- (2) Reacción utilizada en el Modelo 2
- (3) Reacción utilizada en el Modelo 3

A.III Flujos metabólicos

A.III.1 Flujos metabólicos obtenidos por MFA clásico

Glucosa ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	1,51 \pm 0,05	100
<i>emp2</i>	0,77 \pm 0,16	51
<i>emp3</i>	0,87 \pm 0,08	58
<i>emp4</i>	0,88 \pm 0,08	58
<i>emp5</i>	0,88 \pm 0,06	59
<i>emp6</i>	1,87 \pm 0,06	124
<i>emp7</i>	1,77 \pm 0,06	118
<i>emp8</i>	1,63 \pm 0,06	108
<i>ana1</i>	0,51 \pm 0,02	34
<i>ana2</i>	0,05 \pm 0,14	3
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,41	0
<i>vf2</i>	0,06 \pm 0,27	4
<i>vf3</i>	0,06 \pm 0,10	4
<i>tcc1</i>	1,07 \pm 0,14	71
<i>tcc2</i>	1,06 \pm 0,06	71
<i>tcc3a</i>	0,91 \pm 0,08	60
<i>tcc3b</i>	0,15 \pm 0,03	10
<i>tcc4</i>	0,89 \pm 0,06	59
<i>tcc5</i>	0,89 \pm 0,06	59
<i>tcc6</i>	0,89 \pm 0,05	59
<i>ppp1</i>	0,53 \pm 0,14	35
<i>ppp2</i>	0,30 \pm 0,09	20
<i>ppp3</i>	0,24 \pm 0,05	16
<i>ppp4</i>	0,19 \pm 0,05	12
<i>ppp5</i>	0,19 \pm 0,05	13
<i>ppp6</i>	0,11 \pm 0,05	8
<i>gly</i>	0,00 \pm 0,12	0
<i>fo1</i>	4,52 \pm 0,36	300
<i>fo2</i>	2,16 \pm 0,35	144
<i>f_bm</i>	5,74 \pm 0,29	381
<i>glu_upt</i>	1,51 \pm 0,04	100
<i>o2_upt</i>	3,35 \pm 0,34	223
<i>co2_out</i>	3,35 \pm 0,17	222
<i>gly_out</i>	0,00 \pm 0,12	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,37	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,41	0
<i>tr_oaa</i>	0,36 \pm 0,02	24
<i>tr_accoa</i>	0,04 \pm 0,10	3
<i>tr_pyr</i>	1,07 \pm 0,12	71
<i>tr_akg</i>	0,16 \pm 0,01	10

Glicerol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>emp2</i>	-0,18 \pm 0,04	-26
<i>emp3</i>	-0,18 \pm 0,02	-19
<i>emp4</i>	-0,18 \pm 0,02	-21
<i>emp5</i>	0,91 \pm 0,03	76
<i>emp6</i>	0,75 \pm 0,05	62
<i>emp7</i>	0,72 \pm 0,05	60
<i>emp8</i>	0,68 \pm 0,05	56
<i>ana1</i>	0,17 \pm 0,01	7
<i>ana2</i>	0,05 \pm 0,10	0
<i>ana3</i>	0,07 \pm 0,01	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,23	0
<i>vf2</i>	0,06 \pm 0,13	2
<i>vf3</i>	0,06 \pm 0,01	2
<i>tcc1</i>	0,49 \pm 0,06	45
<i>tcc2</i>	0,52 \pm 0,05	45
<i>tcc3a</i>	0,51 \pm 0,06	37
<i>tcc3b</i>	0,01 \pm 0,01	8
<i>tcc4</i>	0,48 \pm 0,05	42
<i>tcc5</i>	0,47 \pm 0,05	43
<i>tcc6</i>	0,40 \pm 0,04	43
<i>ppp1</i>	0,12 \pm 0,06	16
<i>ppp2</i>	0,07 \pm 0,04	12
<i>ppp3</i>	0,05 \pm 0,02	6
<i>ppp4</i>	0,04 \pm 0,02	6
<i>ppp5</i>	0,04 \pm 0,02	9
<i>ppp6</i>	0,02 \pm 0,02	8
<i>gly</i>	1,09 \pm 0,03	96
<i>fo1</i>	2,36 \pm 0,25	212
<i>fo2</i>	1,91 \pm 0,18	167
<i>f_bm</i>	1,77 \pm 0,09	159
<i>gly_upt</i>	1,09 \pm 0,03	100
<i>o2_upt</i>	2,14 \pm 0,21	191
<i>co2_out</i>	1,57 \pm 0,08	142
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,14	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,23	0
<i>tr_oaa</i>	0,13 \pm 0,01	3
<i>tr_accoa</i>	0,05 \pm 0,01	0
<i>tr_pyr</i>	0,46 \pm 0,05	49
<i>tr_akg</i>	0,04 \pm 0,00	4

Glicerol ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,08	0
<i>emp2</i>	-0,47 \pm 0,07	-18
<i>emp3</i>	0,00 \pm 0,05	0
<i>emp4</i>	-0,11 \pm 0,05	-4
<i>emp5</i>	2,40 \pm 0,05	90
<i>emp6</i>	2,32 \pm 0,09	87
<i>emp7</i>	2,23 \pm 0,09	84
<i>emp8</i>	2,09 \pm 0,09	79
<i>ana1</i>	0,66 \pm 0,02	25
<i>ana2</i>	0,55 \pm 0,16	21
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,01	0
<i>vf1</i>	0,23 \pm 0,38	9
<i>vf2</i>	0,24 \pm 0,22	9
<i>vf3</i>	0,10 \pm 0,00	4
<i>tcc1</i>	0,72 \pm 0,09	27
<i>tcc2</i>	0,65 \pm 0,09	24
<i>tcc3a</i>	0,36 \pm 0,10	13
<i>tcc3b</i>	0,31 \pm 0,02	12
<i>tcc4</i>	0,53 \pm 0,09	20
<i>tcc5</i>	0,50 \pm 0,09	19
<i>tcc6</i>	0,51 \pm 0,07	19
<i>ppp1</i>	0,38 \pm 0,12	14
<i>ppp2</i>	0,33 \pm 0,08	13
<i>ppp3</i>	0,10 \pm 0,04	4
<i>ppp4</i>	0,14 \pm 0,04	5
<i>ppp5</i>	0,32 \pm 0,04	12
<i>ppp6</i>	0,25 \pm 0,04	10
<i>gly</i>	2,56 \pm 0,08	96
<i>fo1</i>	2,60 \pm 0,43	98
<i>fo2</i>	4,84 \pm 0,30	182
<i>f_bm</i>	6,04 \pm 0,30	227
<i>gly_upt</i>	2,66 \pm 0,08	100
<i>o2_upt</i>	3,64 \pm 0,36	137
<i>co2_out</i>	2,31 \pm 0,12	87
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,08	0
<i>ace_out</i>	0,07 \pm 0,22	3
<i>eth_out</i>	0,12 \pm 0,38	4
<i>tr_oaa</i>	0,60 \pm 0,01	23
<i>tr_accoa</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>tr_pyr</i>	0,87 \pm 0,07	33
<i>tr_akg</i>	0,13 \pm 0,01	5

Metanol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>emp2</i>	0,01 \pm 0,01	0
<i>emp3</i>	-3,48 \pm 0,04	-59
<i>emp4</i>	-3,37 \pm 0,04	-58
<i>emp5</i>	2,81 \pm 0,01	48
<i>emp6</i>	3,68 \pm 0,01	63
<i>emp7</i>	3,57 \pm 0,02	61
<i>emp8</i>	3,45 \pm 0,02	59
<i>ana1</i>	1,31 \pm 0,00	22
<i>ana2</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf2</i>	0,16 \pm 0,00	3
<i>vf3</i>	0,20 \pm 0,00	3
<i>tcc1</i>	1,94 \pm 0,02	33
<i>tcc2</i>	2,19 \pm 0,02	37
<i>tcc3a</i>	1,92 \pm 0,03	33
<i>tcc3b</i>	0,00 \pm 0,01	0
<i>tcc4</i>	1,76 \pm 0,03	30
<i>tcc5</i>	1,71 \pm 0,03	29
<i>tcc6</i>	1,53 \pm 0,02	26
<i>ppp1</i>	0,06 \pm 0,01	1
<i>ppp2</i>	2,15 \pm 0,02	37
<i>ppp3</i>	-2,00 \pm 0,01	-34
<i>ppp4</i>	-1,93 \pm 0,01	-33
<i>ppp5</i>	-1,80 \pm 0,01	-31
<i>ppp6</i>	-1,76 \pm 0,01	-30
<i>gly</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>fo1</i>	9,01 \pm 0,12	154
<i>fo2</i>	3,91 \pm 0,13	67
<i>f_bm</i>	1,77 \pm 0,08	30
<i>vm1</i>	6,00 \pm 0,10	102
<i>vm2</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>vm3</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>vm4</i>	6,02 \pm 0,05	103
<i>vm5</i>	6,13 \pm 0,05	105
<i>gly_upt</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>meth_upt</i>	5,85 \pm 0,10	100
<i>o2_upt</i>	9,71 \pm 0,16	166
<i>co2_out</i>	4,17 \pm 0,11	71
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>tr_oaa</i>	0,96 \pm 0,00	16
<i>tr_accoa</i>	0,23 \pm 0,00	4
<i>tr_pyr</i>	2,07 \pm 0,02	35
<i>tr_akg</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>tr_xyl</i>	5,93 \pm 0,05	101
<i>tr_form</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>tr_gap</i>	6,07 \pm 0,05	104
<i>tr_dha</i>	6,07 \pm 0,05	104

80G20M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>emp2</i>	-0,16 \pm 0,03	-11
<i>emp3</i>	-0,12 \pm 0,01	-8
<i>emp4</i>	-0,11 \pm 0,01	-8
<i>emp5</i>	0,81 \pm 0,02	55
<i>emp6</i>	0,74 \pm 0,03	49
<i>emp7</i>	0,71 \pm 0,03	48
<i>emp8</i>	0,68 \pm 0,03	46
<i>ana1</i>	0,13 \pm 0,00	9
<i>ana2</i>	0,00 \pm 0,08	0
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,18	0
<i>vf2</i>	0,01 \pm 0,09	1
<i>vf3</i>	0,02 \pm 0,01	1
<i>tcc1</i>	0,50 \pm 0,05	34
<i>tcc2</i>	0,51 \pm 0,05	34
<i>tcc3a</i>	0,43 \pm 0,05	29
<i>tcc3b</i>	0,06 \pm 0,00	4
<i>tcc4</i>	0,45 \pm 0,05	30
<i>tcc5</i>	0,45 \pm 0,05	30
<i>tcc6</i>	0,44 \pm 0,05	30
<i>ppp1</i>	0,12 \pm 0,05	8
<i>ppp2</i>	0,08 \pm 0,04	5
<i>ppp3</i>	0,04 \pm 0,01	3
<i>ppp4</i>	0,04 \pm 0,01	3
<i>ppp5</i>	0,05 \pm 0,01	4
<i>ppp6</i>	0,04 \pm 0,01	3
<i>gly</i>	0,92 \pm 0,03	62
<i>fo1</i>	2,28 \pm 0,26	154
<i>fo2</i>	1,79 \pm 0,22	121
<i>f_bm</i>	1,54 \pm 0,08	104
<i>vm1</i>	0,58 \pm 0,01	39
<i>vm2</i>	0,07 \pm 0,11	5
<i>vm3</i>	0,07 \pm 0,05	5
<i>vm4</i>	0,51 \pm 0,01	34
<i>vm5</i>	0,51 \pm 0,01	34
<i>gly_upt</i>	0,91 \pm 0,03	61
<i>meth_upt</i>	0,58 \pm 0,01	39
<i>o2_upt</i>	2,36 \pm 0,24	159
<i>co2_out</i>	1,44 \pm 0,07	97
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,10	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,18	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,09	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,15	0
<i>tr_oaa</i>	0,09 \pm 0,00	6
<i>tr_accoa</i>	0,01 \pm 0,01	1
<i>tr_pyr</i>	0,54 \pm 0,05	36
<i>tr_akg</i>	0,04 \pm 0,00	3
<i>tr_xyl</i>	0,51 \pm 0,01	34
<i>tr_form</i>	0,07 \pm 0,02	5
<i>tr_gap</i>	0,51 \pm 0,01	34
<i>tr_dha</i>	0,51 \pm 0,01	34

60G40M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>emp2</i>	-0,14 \pm 0,03	-8
<i>emp3</i>	-0,03 \pm 0,01	-2
<i>emp4</i>	-0,01 \pm 0,01	-1
<i>emp5</i>	0,64 \pm 0,01	37
<i>emp6</i>	0,68 \pm 0,03	39
<i>emp7</i>	0,66 \pm 0,03	38
<i>emp8</i>	0,63 \pm 0,03	36
<i>ana1</i>	0,12 \pm 0,00	7
<i>ana2</i>	0,00 \pm 0,09	0
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,20	0
<i>vf2</i>	0,02 \pm 0,11	1
<i>vf3</i>	0,02 \pm 0,01	1
<i>tcc1</i>	0,47 \pm 0,06	27
<i>tcc2</i>	0,49 \pm 0,06	28
<i>tcc3a</i>	0,41 \pm 0,06	24
<i>tcc3b</i>	0,07 \pm 0,00	4
<i>tcc4</i>	0,44 \pm 0,06	25
<i>tcc5</i>	0,44 \pm 0,06	25
<i>tcc6</i>	0,44 \pm 0,06	25
<i>ppp1</i>	0,13 \pm 0,05	7
<i>ppp2</i>	0,09 \pm 0,04	5
<i>ppp3</i>	0,05 \pm 0,01	3
<i>ppp4</i>	0,05 \pm 0,01	3
<i>ppp5</i>	0,07 \pm 0,01	4
<i>ppp6</i>	0,06 \pm 0,01	4
<i>gly</i>	0,63 \pm 0,02	36
<i>fo1</i>	2,22 \pm 0,29	127
<i>fo2</i>	1,80 \pm 0,24	103
<i>f_bm</i>	1,39 \pm 0,07	79
<i>vm1</i>	1,14 \pm 0,02	65
<i>vm2</i>	0,17 \pm 0,12	10
<i>vm3</i>	0,17 \pm 0,05	10
<i>vm4</i>	0,96 \pm 0,02	55
<i>vm5</i>	0,96 \pm 0,02	55
<i>gly_upt</i>	0,61 \pm 0,02	35
<i>meth_upt</i>	1,14 \pm 0,02	65
<i>o2_upt</i>	2,65 \pm 0,27	152
<i>co2_out</i>	1,41 \pm 0,07	80
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,11	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,20	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,10	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,16	0
<i>tr_oaa</i>	0,07 \pm 0,00	4
<i>tr_accoa</i>	0,02 \pm 0,01	1
<i>tr_pyr</i>	0,51 \pm 0,06	29
<i>tr_akg</i>	0,04 \pm 0,00	2
<i>tr_xyl</i>	0,96 \pm 0,02	55
<i>tr_form</i>	0,17 \pm 0,02	10
<i>tr_gap</i>	0,96 \pm 0,02	55
<i>tr_dha</i>	0,96 \pm 0,02	55

60G40M ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>emp2</i>	-0,73 \pm 0,03	-15
<i>emp3</i>	-0,80 \pm 0,05	-17
<i>emp4</i>	-0,71 \pm 0,05	-15
<i>emp5</i>	2,58 \pm 0,05	54
<i>emp6</i>	2,37 \pm 0,04	50
<i>emp7</i>	2,29 \pm 0,04	48
<i>emp8</i>	2,11 \pm 0,04	44
<i>ana1</i>	0,75 \pm 0,01	16
<i>ana2</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf2</i>	0,05 \pm 0,00	1
<i>vf3</i>	0,06 \pm 0,00	1
<i>tcc1</i>	1,25 \pm 0,05	26
<i>tcc2</i>	1,23 \pm 0,05	26
<i>tcc3a</i>	0,88 \pm 0,05	19
<i>tcc3b</i>	0,33 \pm 0,01	7
<i>tcc4</i>	0,98 \pm 0,05	21
<i>tcc5</i>	0,91 \pm 0,05	19
<i>tcc6</i>	0,93 \pm 0,05	20
<i>ppp1</i>	0,64 \pm 0,02	14
<i>ppp2</i>	0,46 \pm 0,02	10
<i>ppp3</i>	0,08 \pm 0,01	2
<i>ppp4</i>	0,00 \pm 0,01	0
<i>ppp5</i>	0,08 \pm 0,01	2
<i>ppp6</i>	0,00 \pm 0,01	0
<i>gly</i>	2,84 \pm 0,07	60
<i>fo1</i>	4,96 \pm 0,25	104
<i>fo2</i>	7,46 \pm 0,15	157
<i>f_bm</i>	6,30 \pm 0,24	133
<i>vm1</i>	1,92 \pm 0,04	40
<i>vm2</i>	1,06 \pm 0,04	22
<i>vm3</i>	0,81 \pm 0,04	17
<i>vm4</i>	0,50 \pm 0,04	10
<i>vm5</i>	0,60 \pm 0,04	13
<i>gly_upt</i>	2,83 \pm 0,07	59
<i>meth_upt</i>	1,92 \pm 0,04	40
<i>o2_upt</i>	7,34 \pm 0,19	155
<i>co2_out</i>	4,07 \pm 0,17	86
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>tr_oaa</i>	0,45 \pm 0,01	9
<i>tr_accoa</i>	0,04 \pm 0,00	1
<i>tr_pyr</i>	1,41 \pm 0,04	30
<i>tr_akg</i>	0,19 \pm 0,01	4
<i>tr_xyl</i>	0,45 \pm 0,04	9
<i>tr_form</i>	1,41 \pm 0,04	30
<i>tr_gap</i>	0,51 \pm 0,04	11
<i>tr_dha</i>	0,49 \pm 0,04	10

40G60M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>emp2</i>	-0,13 \pm 0,04	-6
<i>emp3</i>	-1,07 \pm 0,01	-48
<i>emp4</i>	-1,05 \pm 0,01	-47
<i>emp5</i>	1,13 \pm 0,02	51
<i>emp6</i>	1,22 \pm 0,04	55
<i>emp7</i>	1,18 \pm 0,04	53
<i>emp8</i>	1,13 \pm 0,04	51
<i>ana1</i>	0,38 \pm 0,00	17
<i>ana2</i>	0,00 \pm 0,12	0
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,25	0
<i>vf2</i>	0,03 \pm 0,14	2
<i>vf3</i>	0,04 \pm 0,01	2
<i>tcc1</i>	0,68 \pm 0,08	31
<i>tcc2</i>	0,72 \pm 0,07	33
<i>tcc3a</i>	0,62 \pm 0,07	28
<i>tcc3b</i>	0,05 \pm 0,00	2
<i>tcc4</i>	0,56 \pm 0,07	25
<i>tcc5</i>	0,55 \pm 0,07	25
<i>tcc6</i>	0,51 \pm 0,07	23
<i>ppp1</i>	0,11 \pm 0,07	5
<i>ppp2</i>	0,62 \pm 0,05	28
<i>ppp3</i>	-0,49 \pm 0,02	-22
<i>ppp4</i>	-0,49 \pm 0,02	-22
<i>ppp5</i>	-0,46 \pm 0,02	-21
<i>ppp6</i>	-0,46 \pm 0,02	-21
<i>gly</i>	0,54 \pm 0,01	24
<i>fo1</i>	2,95 \pm 0,38	134
<i>fo2</i>	1,99 \pm 0,32	90
<i>f_bm</i>	1,37 \pm 0,07	62
<i>vm1</i>	1,71 \pm 0,03	77
<i>vm2</i>	0,13 \pm 0,15	6
<i>vm3</i>	0,13 \pm 0,06	6
<i>vm4</i>	1,57 \pm 0,02	71
<i>vm5</i>	1,57 \pm 0,02	71
<i>gly_upt</i>	0,50 \pm 0,01	23
<i>meth_upt</i>	1,71 \pm 0,03	77
<i>o2_upt</i>	3,40 \pm 0,34	154
<i>co2_out</i>	1,61 \pm 0,08	73
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,14	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,25	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,13	0
<i>formoh_out</i>	0,02 \pm 0,21	1
<i>tr_oaa</i>	0,28 \pm 0,00	13
<i>tr_accoa</i>	0,05 \pm 0,01	2
<i>tr_pyr</i>	0,74 \pm 0,08	33
<i>tr_akg</i>	0,07 \pm 0,00	3
<i>tr_xyl</i>	1,57 \pm 0,02	71
<i>tr_form</i>	0,13 \pm 0,03	6
<i>tr_gap</i>	1,57 \pm 0,02	71
<i>tr_dha</i>	1,57 \pm 0,02	71

40G60M ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,08	0
<i>emp2</i>	-0,71 \pm 0,09	-14
<i>emp3</i>	-1,22 \pm 0,03	-24
<i>emp4</i>	-1,19 \pm 0,03	-24
<i>emp5</i>	2,47 \pm 0,05	49
<i>emp6</i>	2,30 \pm 0,09	46
<i>emp7</i>	2,17 \pm 0,09	43
<i>emp8</i>	1,99 \pm 0,09	39
<i>ana1</i>	0,83 \pm 0,02	17
<i>ana2</i>	0,00 \pm 0,24	0
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,52	0
<i>vf2</i>	0,04 \pm 0,28	1
<i>vf3</i>	0,03 \pm 0,00	1
<i>tcc1</i>	0,93 \pm 0,15	18
<i>tcc2</i>	0,89 \pm 0,15	18
<i>tcc3a</i>	0,49 \pm 0,15	10
<i>tcc3b</i>	0,30 \pm 0,02	6
<i>tcc4</i>	0,52 \pm 0,15	10
<i>tcc5</i>	0,49 \pm 0,15	10
<i>tcc6</i>	0,43 \pm 0,15	9
<i>ppp1</i>	0,59 \pm 0,15	12
<i>ppp2</i>	0,77 \pm 0,11	15
<i>ppp3</i>	-0,15 \pm 0,04	-3
<i>ppp4</i>	-0,20 \pm 0,04	-4
<i>ppp5</i>	-0,16 \pm 0,04	-3
<i>ppp6</i>	-0,23 \pm 0,03	-5
<i>gly</i>	2,35 \pm 0,07	47
<i>fo1</i>	2,94 \pm 0,77	58
<i>fo2</i>	8,03 \pm 0,64	159
<i>f_bm</i>	6,07 \pm 0,30	121
<i>vm1</i>	2,80 \pm 0,05	56
<i>vm2</i>	1,55 \pm 0,31	31
<i>vm3</i>	1,48 \pm 0,14	29
<i>vm4</i>	1,26 \pm 0,04	25
<i>vm5</i>	1,29 \pm 0,04	26
<i>gly_upt</i>	2,29 \pm 0,07	45
<i>meth_upt</i>	2,75 \pm 0,05	55
<i>o2_upt</i>	6,97 \pm 0,71	138
<i>co2_out</i>	3,48 \pm 0,17	69
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,08	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,28	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,52	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,28	0
<i>formoh_out</i>	0,04 \pm 0,42	1
<i>tr_oaa</i>	0,58 \pm 0,01	11
<i>tr_accoa</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>tr_pyr</i>	1,13 \pm 0,15	22
<i>tr_akg</i>	0,22 \pm 0,01	4
<i>tr_xyl</i>	1,23 \pm 0,04	24
<i>tr_form</i>	1,55 \pm 0,06	31
<i>tr_gap</i>	1,28 \pm 0,04	25
<i>tr_dha</i>	1,28 \pm 0,04	25

(*) en $[\text{mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}] \pm \text{error}$.

(**) % en relación al sustrato (s) utilizado (s).

donde:

80G20M: glicerol:metanol (80:20)

60G40M: glicerol:metanol (60:40)

40G60M: glicerol:metanol (40:60)

A.III.2 Flujos metabólicos obtenidos mediante restricciones derivadas de ¹³C-RMN

Glucosa ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	1,50 \pm 0,05	100
<i>emp2</i>	0,75 \pm 0,10	50
<i>emp3</i>	0,83 \pm 0,05	55
<i>emp4</i>	0,90 \pm 0,05	60
<i>emp5</i>	0,90 \pm 0,27	60
<i>emp6</i>	1,91 \pm 0,26	127
<i>emp7</i>	1,82 \pm 0,26	121
<i>emp8</i>	1,67 \pm 0,26	111
<i>ana1</i>	0,40 \pm 0,02	27
<i>ana2</i>	0,28 \pm 0,12	18
<i>ana3</i>	0,04 \pm 0,02	2
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,12	0
<i>vf2</i>	0,27 \pm 0,01	18
<i>vf3</i>	0,27 \pm 0,23	18
<i>tcc1</i>	0,86 \pm 0,15	57
<i>tcc2</i>	1,06 \pm 0,11	71
<i>tcc3</i>	1,05 \pm 0,11	70
<i>tcc4</i>	0,88 \pm 0,11	58
<i>tcc5</i>	0,86 \pm 0,11	58
<i>tcc6</i>	0,81 \pm 0,10	54
<i>ppp1</i>	0,54 \pm 0,10	36
<i>ppp2</i>	0,29 \pm 0,06	19
<i>ppp3</i>	0,25 \pm 0,03	17
<i>ppp4</i>	0,19 \pm 0,03	12
<i>ppp5</i>	0,18 \pm 0,03	12
<i>ppp6</i>	0,10 \pm 0,03	7
<i>gly</i>	0,00 \pm 0,28	0
<i>c_o2</i>	3,36 \pm 0,34	224
<i>f_bm</i>	5,74 \pm 0,29	383
<i>glu_upt</i>	1,50 \pm 0,05	100
<i>gly_out</i>	0,00 \pm 0,28	0
<i>o2_upt</i>	3,36 \pm 0,34	224
<i>co2_out</i>	3,34 \pm 0,17	223
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,23	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,12	0
<i>tr_oaa1</i>	0,50 \pm 0,05	33
<i>tr_oaa2</i>	0,24 \pm 0,04	16
<i>tr_accoa</i>	0,25 \pm 0,23	17
<i>tr_pyr</i>	0,99 \pm 0,15	66
<i>tr_akg</i>	0,16 \pm 0,01	11

Glicerol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>emp2</i>	-0,07 \pm 0,07	-6
<i>emp3</i>	-0,14 \pm 0,01	-13
<i>emp4</i>	-0,16 \pm 0,01	-15
<i>emp5</i>	0,93 \pm 0,02	85
<i>emp6</i>	0,75 \pm 0,05	69
<i>emp7</i>	0,73 \pm 0,05	67
<i>emp8</i>	0,69 \pm 0,05	63
<i>ana1</i>	0,09 \pm 0,01	8
<i>ana2</i>	0,22 \pm 0,03	20
<i>ana3</i>	0,01 \pm 0,00	1
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>vf2</i>	0,22 \pm 0,01	20
<i>vf3</i>	0,22 \pm 0,08	20
<i>tcc1</i>	0,35 \pm 0,02	32
<i>tcc2</i>	0,55 \pm 0,07	50
<i>tcc3</i>	0,55 \pm 0,07	50
<i>tcc4</i>	0,51 \pm 0,07	47
<i>tcc5</i>	0,51 \pm 0,07	47
<i>tcc6</i>	0,50 \pm 0,07	46
<i>ppp1</i>	0,00 \pm 0,10	0
<i>ppp2</i>	-0,01 \pm 0,07	-1
<i>ppp3</i>	0,01 \pm 0,03	1
<i>ppp4</i>	0,01 \pm 0,03	1
<i>ppp5</i>	0,01 \pm 0,03	1
<i>ppp6</i>	-0,01 \pm 0,04	-1
<i>gly</i>	1,09 \pm 0,03	100
<i>c_o2</i>	2,14 \pm 0,21	196
<i>f_bm</i>	1,77 \pm 0,09	162
<i>gly_upt</i>	1,09 \pm 0,03	100
<i>o2_upt</i>	2,14 \pm 0,21	196
<i>co2_out</i>	1,57 \pm 0,08	144
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,08	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>tr_oaa1</i>	0,25 \pm 0,02	23
<i>tr_oaa2</i>	0,19 \pm 0,02	17
<i>tr_accoa</i>	0,22 \pm 0,08	20
<i>tr_pyr</i>	0,38 \pm 0,02	35
<i>tr_akg</i>	0,04 \pm 0,00	4

Glicerol ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>emp2</i>	-1,55 \pm 0,06	-56
<i>emp3</i>	-0,92 \pm 0,03	-33
<i>emp4</i>	-1,02 \pm 0,03	-37
<i>emp5</i>	1,72 \pm 0,05	63
<i>emp6</i>	1,09 \pm 0,05	40
<i>emp7</i>	1,00 \pm 0,05	37
<i>emp8</i>	0,88 \pm 0,05	32
<i>ana1</i>	0,26 \pm 0,01	10
<i>ana2</i>	0,24 \pm 0,04	9
<i>ana3</i>	0,01 \pm 0,00	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>vf2</i>	0,24 \pm 0,01	9
<i>vf3</i>	0,24 \pm 0,04	9
<i>tcc1</i>	0,25 \pm 0,02	9
<i>tcc2</i>	0,43 \pm 0,04	16
<i>tcc3</i>	0,43 \pm 0,04	16
<i>tcc4</i>	0,30 \pm 0,04	11
<i>tcc5</i>	0,30 \pm 0,04	11
<i>tcc6</i>	0,29 \pm 0,04	11
<i>ppp1</i>	1,33 \pm 0,09	48
<i>ppp2</i>	0,85 \pm 0,06	31
<i>ppp3</i>	0,48 \pm 0,03	18
<i>ppp4</i>	0,46 \pm 0,03	17
<i>ppp5</i>	0,46 \pm 0,03	17
<i>ppp6</i>	0,39 \pm 0,03	14
<i>gly</i>	2,75 \pm 0,08	100
<i>c_o2</i>	3,56 \pm 0,36	129
<i>f_bm</i>	6,05 \pm 0,30	220
<i>gly_upt</i>	2,75 \pm 0,08	100
<i>o2_upt</i>	3,56 \pm 0,36	129
<i>co2_out</i>	2,37 \pm 0,12	86
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,05	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>tr_oaa1</i>	0,27 \pm 0,03	10
<i>tr_oaa2</i>	0,12 \pm 0,02	4
<i>tr_accoa</i>	0,22 \pm 0,04	8
<i>tr_pyr</i>	0,38 \pm 0,02	14
<i>tr_akg</i>	0,13 \pm 0,01	5

80G20M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>emp2</i>	-0,34 \pm 0,03	-22
<i>emp3</i>	-0,31 \pm 0,01	-20
<i>emp4</i>	-0,32 \pm 0,01	-20
<i>emp5</i>	0,81 \pm 0,02	51
<i>emp6</i>	0,65 \pm 0,02	41
<i>emp7</i>	0,62 \pm 0,02	39
<i>emp8</i>	0,58 \pm 0,02	36
<i>ana1</i>	0,11 \pm 0,01	7
<i>ana2</i>	0,17 \pm 0,03	11
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,01	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>vf2</i>	0,17 \pm 0,01	10
<i>vf3</i>	0,16 \pm 0,04	10
<i>tcc1</i>	0,25 \pm 0,02	16
<i>tcc2</i>	0,32 \pm 0,05	20
<i>tcc3</i>	0,32 \pm 0,05	20
<i>tcc4</i>	0,27 \pm 0,05	17
<i>tcc5</i>	0,27 \pm 0,05	17
<i>tcc6</i>	0,26 \pm 0,05	17
<i>ppp1</i>	0,28 \pm 0,04	18
<i>ppp2</i>	0,21 \pm 0,03	13
<i>ppp3</i>	0,08 \pm 0,02	5
<i>ppp4</i>	0,05 \pm 0,02	3
<i>ppp5</i>	0,05 \pm 0,02	3
<i>ppp6</i>	0,02 \pm 0,02	1
<i>gly</i>	0,94 \pm 0,03	60
<i>c_o2</i>	2,38 \pm 0,24	150
<i>vm1</i>	0,63 \pm 0,01	40
<i>vm2</i>	0,50 \pm 0,02	31
<i>vm3</i>	0,50 \pm 0,07	31
<i>vm4</i>	0,14 \pm 0,00	9
<i>vm5</i>	0,18 \pm 0,00	12
<i>f_bm</i>	1,85 \pm 0,08	117
<i>gly_apt</i>	0,95 \pm 0,03	60
<i>meth_apt</i>	0,63 \pm 0,01	40
<i>o2_apt</i>	2,70 \pm 0,24	171
<i>co2_out</i>	1,70 \pm 0,07	108
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>tr_oaa1</i>	0,12 \pm 0,01	8
<i>tr_oaa2</i>	0,05 \pm 0,01	3
<i>tr_accoa</i>	0,09 \pm 0,04	6
<i>tr_pyr</i>	0,30 \pm 0,01	19
<i>tr_akg</i>	0,05 \pm 0,00	3
<i>tr_xyl</i>	0,14 \pm 0,00	9
<i>tr_form</i>	0,50 \pm 0,01	31
<i>tr_gap</i>	0,14 \pm 0,00	9
<i>tr_dha</i>	0,18 \pm 0,00	12

60G40M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>emp2</i>	-0,09 \pm 0,05	-4
<i>emp3</i>	-0,93 \pm 0,01	-42
<i>emp4</i>	-0,93 \pm 0,01	-42
<i>emp5</i>	1,10 \pm 0,01	50
<i>emp6</i>	0,94 \pm 0,03	42
<i>emp7</i>	0,91 \pm 0,03	41
<i>emp8</i>	0,86 \pm 0,03	39
<i>ana1</i>	0,12 \pm 0,01	6
<i>ana2</i>	0,41 \pm 0,03	19
<i>ana3</i>	0,01 \pm 0,01	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>vf2</i>	0,41 \pm 0,01	19
<i>vf3</i>	0,41 \pm 0,09	18
<i>tcc1</i>	0,28 \pm 0,01	13
<i>tcc2</i>	0,61 \pm 0,10	28
<i>tcc3</i>	0,61 \pm 0,10	27
<i>tcc4</i>	0,56 \pm 0,10	25
<i>tcc5</i>	0,55 \pm 0,10	25
<i>tcc6</i>	0,54 \pm 0,10	24
<i>ppp1</i>	0,03 \pm 0,07	1
<i>ppp2</i>	0,38 \pm 0,05	17
<i>ppp3</i>	-0,36 \pm 0,03	-16
<i>ppp4</i>	-0,38 \pm 0,03	-17
<i>ppp5</i>	-0,39 \pm 0,03	-17
<i>ppp6</i>	-0,41 \pm 0,03	-19
<i>gly</i>	0,73 \pm 0,02	33
<i>c_o2</i>	3,15 \pm 0,27	142
<i>vm1</i>	1,48 \pm 0,02	67
<i>vm2</i>	0,30 \pm 0,04	14
<i>vm3</i>	0,30 \pm 0,11	14
<i>vm4</i>	1,18 \pm 0,01	53
<i>vm5</i>	1,30 \pm 0,01	58
<i>f_bm</i>	1,70 \pm 0,07	77
<i>gly_upt</i>	0,74 \pm 0,02	33
<i>meth_upt</i>	1,48 \pm 0,02	67
<i>o2_upt</i>	3,90 \pm 0,27	176
<i>co2_out</i>	2,10 \pm 0,07	95
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,09	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,07	0
<i>tr_oaa1</i>	0,31 \pm 0,04	14
<i>tr_oaa2</i>	0,23 \pm 0,03	10
<i>tr_accoa</i>	0,34 \pm 0,09	15
<i>tr_pyr</i>	0,33 \pm 0,01	15
<i>tr_akg</i>	0,05 \pm 0,00	2
<i>tr_xyl</i>	1,18 \pm 0,01	53
<i>tr_form</i>	0,30 \pm 0,02	14
<i>tr_gap</i>	1,18 \pm 0,01	53
<i>tr_dha</i>	1,30 \pm 0,01	58

60G40M ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>emp2</i>	-2,24 \pm 0,06	-48
<i>emp3</i>	-1,93 \pm 0,03	-42
<i>emp4</i>	-1,93 \pm 0,03	-42
<i>emp5</i>	1,94 \pm 0,05	42
<i>emp6</i>	1,42 \pm 0,04	31
<i>emp7</i>	1,31 \pm 0,04	28
<i>emp8</i>	1,15 \pm 0,04	25
<i>ana1</i>	0,34 \pm 0,02	7
<i>ana2</i>	0,10 \pm 0,05	2
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>vf2</i>	0,10 \pm 0,02	2
<i>vf3</i>	0,10 \pm 0,05	2
<i>tcc1</i>	0,54 \pm 0,02	12
<i>tcc2</i>	0,56 \pm 0,06	12
<i>tcc3</i>	0,56 \pm 0,06	12
<i>tcc4</i>	0,39 \pm 0,06	9
<i>tcc5</i>	0,39 \pm 0,06	8
<i>tcc6</i>	0,39 \pm 0,05	8
<i>ppp1</i>	2,08 \pm 0,08	45
<i>ppp2</i>	1,70 \pm 0,05	37
<i>ppp3</i>	0,38 \pm 0,03	8
<i>ppp4</i>	0,29 \pm 0,03	6
<i>ppp5</i>	0,29 \pm 0,03	6
<i>ppp6</i>	0,20 \pm 0,03	4
<i>gly</i>	2,77 \pm 0,08	60
<i>c_o2</i>	6,39 \pm 0,73	138
<i>vm1</i>	1,85 \pm 0,04	40
<i>vm2</i>	0,64 \pm 0,04	14
<i>vm3</i>	0,64 \pm 0,12	14
<i>vm4</i>	1,21 \pm 0,01	26
<i>vm5</i>	1,09 \pm 0,01	24
<i>f_bm</i>	6,32 \pm 0,32	137
<i>gly_upt</i>	2,78 \pm 0,08	60
<i>meth_upt</i>	1,85 \pm 0,04	40
<i>o2_upt</i>	7,32 \pm 0,73	158
<i>co2_out</i>	4,07 \pm 0,20	88
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,08	0
<i>tr_oaa1</i>	0,28 \pm 0,03	6
<i>tr_oaa2</i>	0,09 \pm 0,01	2
<i>tr_accoa</i>	0,07 \pm 0,05	2
<i>tr_pyr</i>	0,72 \pm 0,02	15
<i>tr_akg</i>	0,16 \pm 0,01	4
<i>tr_xyl</i>	1,21 \pm 0,01	26
<i>tr_form</i>	0,64 \pm 0,03	14
<i>tr_gap</i>	1,21 \pm 0,01	26
<i>tr_dha</i>	1,09 \pm 0,01	24

40G60M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>emp2</i>	-0,05 \pm 0,05	-3
<i>emp3</i>	-1,01 \pm 0,01	-47
<i>emp4</i>	-1,01 \pm 0,01	-47
<i>emp5</i>	0,73 \pm 0,01	34
<i>emp6</i>	0,60 \pm 0,03	28
<i>emp7</i>	0,58 \pm 0,03	27
<i>emp8</i>	0,54 \pm 0,03	25
<i>ana1</i>	0,06 \pm 0,01	3
<i>ana2</i>	0,36 \pm 0,02	17
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,00	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>vf2</i>	0,36 \pm 0,02	17
<i>vf3</i>	0,36 \pm 0,11	17
<i>tcc1</i>	0,08 \pm 0,01	4
<i>tcc2</i>	0,42 \pm 0,10	20
<i>tcc3</i>	0,43 \pm 0,10	20
<i>tcc4</i>	0,39 \pm 0,10	18
<i>tcc5</i>	0,40 \pm 0,10	18
<i>tcc6</i>	0,39 \pm 0,10	18
<i>ppp1</i>	0,01 \pm 0,07	1
<i>ppp2</i>	0,44 \pm 0,05	21
<i>ppp3</i>	-0,43 \pm 0,02	-20
<i>ppp4</i>	-0,45 \pm 0,02	-21
<i>ppp5</i>	-0,45 \pm 0,02	-21
<i>ppp6</i>	-0,47 \pm 0,02	-22
<i>gly</i>	0,46 \pm 0,01	21
<i>c_o2</i>	2,61 \pm 0,35	122
<i>vm1</i>	1,68 \pm 0,03	79
<i>vm2</i>	0,32 \pm 0,04	15
<i>vm3</i>	0,32 \pm 0,11	15
<i>vm4</i>	1,36 \pm 0,01	63
<i>vm5</i>	1,28 \pm 0,01	60
<i>f_bm</i>	1,37 \pm 0,07	64
<i>gly_upt</i>	0,46 \pm 0,01	21
<i>meth_upt</i>	1,68 \pm 0,03	79
<i>o2_upt</i>	3,45 \pm 0,34	161
<i>co2_out</i>	1,56 \pm 0,08	73
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,09	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,07	0
<i>tr_oaa1</i>	0,16 \pm 0,02	7
<i>tr_oaa2</i>	0,13 \pm 0,02	6
<i>tr_accoa</i>	0,35 \pm 0,11	16
<i>tr_pyr</i>	0,12 \pm 0,01	6
<i>tr_akg</i>	0,03 \pm 0,00	2
<i>tr_xyl</i>	1,36 \pm 0,01	63
<i>tr_form</i>	0,32 \pm 0,03	15
<i>tr_gap</i>	1,36 \pm 0,01	63
<i>tr_dha</i>	1,28 \pm 0,01	60

40G60M ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>emp2</i>	-1,34 \pm 0,03	-27
<i>emp3</i>	-1,98 \pm 0,02	-40
<i>emp4</i>	-1,98 \pm 0,02	-40
<i>emp5</i>	1,87 \pm 0,04	38
<i>emp6</i>	1,39 \pm 0,03	28
<i>emp7</i>	1,28 \pm 0,03	26
<i>emp8</i>	1,12 \pm 0,02	23
<i>ana1</i>	0,33 \pm 0,02	7
<i>ana2</i>	0,29 \pm 0,02	6
<i>ana3</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>vf1</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>vf2</i>	0,29 \pm 0,01	6
<i>vf3</i>	0,29 \pm 0,02	6
<i>tcc1</i>	0,33 \pm 0,02	7
<i>tcc2</i>	0,54 \pm 0,03	11
<i>tcc3</i>	0,54 \pm 0,03	11
<i>tcc4</i>	0,38 \pm 0,03	8
<i>tcc5</i>	0,38 \pm 0,03	8
<i>tcc6</i>	0,38 \pm 0,03	8
<i>ppp1</i>	1,18 \pm 0,04	24
<i>ppp2</i>	1,30 \pm 0,03	26
<i>ppp3</i>	-0,12 \pm 0,02	-2
<i>ppp4</i>	-0,20 \pm 0,01	-4
<i>ppp5</i>	-0,20 \pm 0,01	-4
<i>ppp6</i>	-0,29 \pm 0,01	-6
<i>gly</i>	2,23 \pm 0,07	45
<i>c_o2</i>	5,71 \pm 0,71	116
<i>vm1</i>	2,70 \pm 0,05	55
<i>vm2</i>	0,91 \pm 0,02	19
<i>vm3</i>	0,91 \pm 0,06	19
<i>vm4</i>	1,79 \pm 0,01	36
<i>vm5</i>	1,63 \pm 0,01	33
<i>f_bm</i>	6,08 \pm 0,30	123
<i>gly_upt</i>	2,23 \pm 0,07	45
<i>meth_upt</i>	2,70 \pm 0,05	55
<i>o2_upt</i>	7,06 \pm 0,71	143
<i>co2_out</i>	3,40 \pm 0,17	69
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,06	0
<i>ace_out</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>eth_out</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>form_out</i>	0,00 \pm 0,03	0
<i>formoh_out</i>	0,00 \pm 0,04	0
<i>tr_oaa1</i>	0,28 \pm 0,03	6
<i>tr_oaa2</i>	0,11 \pm 0,01	2
<i>tr_accoa</i>	0,26 \pm 0,02	5
<i>tr_pyr</i>	0,51 \pm 0,02	10
<i>tr_akg</i>	0,16 \pm 0,01	3
<i>tr_xyl</i>	1,79 \pm 0,01	36
<i>tr_form</i>	0,91 \pm 0,04	19
<i>tr_gap</i>	1,79 \pm 0,01	36
<i>tr_dha</i>	1,63 \pm 0,01	33

(*) en $[\text{mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}] \pm \text{error}$.

(**) % en relación al sustrato (s) utilizado (s).

donde:

80G20M: glicerol:metanol (80:20)

60G40M: glicerol:metanol (60:40)

40G60M: glicerol:metanol (40:60)

A.III.3 Flujos metabólicos obtenidos mediante simulación y optimización mediante ¹³C- MFA

A.III.3.1 Usando datos experimentales obtenidos por LC-MS/MS

Modelo 1 (Glicerol $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)	
Reacciones	% \pm SD*
<i>glyupt0</i>	100 \pm 0
<i>emp1</i>	6 \pm 6
<i>emp2</i>	11 \pm 1
<i>emp3</i>	11 \pm 1
<i>emp4</i>	89 \pm 0
<i>emp5</i>	77 \pm 0
<i>emp6</i>	74 \pm 0
<i>emp7</i>	62 \pm 0
<i>emp8</i>	-9 \pm 1
<i>ana1</i>	7 \pm 2
<i>ana2</i>	-20 \pm 0
<i>tcc1</i>	30 \pm 0
<i>tcc2</i>	23 \pm 0
<i>tcc4</i>	23 \pm 0
<i>tcc5</i>	19 \pm 1
<i>tcc6</i>	19 \pm 1
<i>tcc7a</i>	10 \pm 1
<i>tcc7b</i>	10 \pm 1
<i>tcc9</i>	39 \pm 0
<i>ppp1</i>	1 \pm 43
<i>ppp2</i>	-2 \pm 13
<i>ppp3</i>	2 \pm 5
<i>ppp4</i>	-2 \pm 6
<i>ppp5</i>	0 \pm 46
<i>ppp6</i>	0 \pm 46
<i>tr_pyr</i>	54 \pm 0
<i>tr_oaa</i>	29 \pm 0
<i>co2_out</i>	37 \pm 0
<i>g6p_bm</i>	5 \pm 0
<i>f6p_bm</i>	3 \pm 0
<i>r5p_bm</i>	2 \pm 0
<i>e4p_bm</i>	2 \pm 0
<i>pg3_bm</i>	3 \pm 0
<i>pep_bm</i>	4 \pm 0
<i>pyr_bm</i>	4 \pm 0
<i>accoa_bm</i>	7 \pm 0
<i>oaa_bm</i>	4 \pm 0
<i>akg_bm</i>	4 \pm 0

Modelo 2 (Glicerol $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)	
Reacciones	% \pm SD*
<i>glyupt0</i>	100 \pm 0
<i>emp1</i>	6 \pm 1
<i>emp2</i>	11 \pm 0
<i>emp3</i>	11 \pm 0
<i>emp4</i>	89 \pm 0
<i>emp5</i>	77 \pm 0
<i>emp6</i>	74 \pm 0
<i>emp7</i>	62 \pm 0
<i>emp8</i>	-9 \pm 0
<i>ana1</i>	-2 \pm 2
<i>tcc1</i>	59 \pm 0
<i>tcc2</i>	52 \pm 0
<i>tcc4</i>	52 \pm 0
<i>tcc5</i>	48 \pm 0
<i>tcc6</i>	48 \pm 0
<i>tcc7a</i>	24 \pm 0
<i>tcc7b</i>	24 \pm 0
<i>tcc9</i>	48 \pm 0
<i>ppp1</i>	1 \pm 10
<i>ppp2</i>	-2 \pm 3
<i>ppp3</i>	2 \pm 1
<i>ppp4</i>	-2 \pm 1
<i>ppp5</i>	0 \pm 11
<i>ppp6</i>	0 \pm 11
<i>co2_out</i>	153 \pm 0
<i>g6p_bm</i>	5 \pm 0
<i>f6p_bm</i>	3 \pm 0
<i>r5p_bm</i>	2 \pm 0
<i>e4p_bm</i>	2 \pm 0
<i>pg3_bm</i>	3 \pm 0
<i>pep_bm</i>	4 \pm 0
<i>pyr_bm</i>	4 \pm 0
<i>accoa_bm</i>	7 \pm 0
<i>oaa_bm</i>	4 \pm 0
<i>akg_bm</i>	4 \pm 0

Modelo 3 (Glicerol $\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)	
Reacciones	% \pm SD*
<i>glyupt0</i>	100 \pm 0
<i>emp1</i>	6 \pm 1547
<i>emp2</i>	11 \pm 278
<i>emp3</i>	11 \pm 278
<i>emp4</i>	89 \pm 33
<i>emp5</i>	77 \pm 28
<i>emp6</i>	74 \pm 40
<i>emp7</i>	62 \pm 9144
<i>emp8</i>	-9 \pm 0
<i>ana1</i>	7 \pm 0
<i>ana2</i>	9 \pm 1
<i>tcc1</i>	58 \pm 51
<i>tcc2</i>	51 \pm 57
<i>tcc4</i>	51 \pm 62
<i>tcc5</i>	47 \pm 62
<i>tcc6</i>	47 \pm 62
<i>tcc7a</i>	24 \pm 62
<i>tcc7b</i>	24 \pm 62
<i>tcc9</i>	38 \pm 3544
<i>ppp1</i>	1 \pm 11668
<i>ppp2</i>	-2 \pm 3627
<i>ppp3</i>	2 \pm 1237
<i>ppp4</i>	-2 \pm 1583
<i>ppp5</i>	0 \pm 12500
<i>ppp6</i>	0 \pm 12500
<i>tr_pyr</i>	54 \pm 2498
<i>tr_oaa</i>	13 \pm 10535
<i>co2_out</i>	151 \pm 1
<i>g6p_bm</i>	5 \pm 0
<i>f6p_bm</i>	3 \pm 0
<i>r5p_bm</i>	2 \pm 0
<i>e4p_bm</i>	2 \pm 0
<i>pg3_bm</i>	3 \pm 0
<i>pep_bm</i>	4 \pm 0
<i>pyr_bm</i>	4 \pm 0
<i>accoa_bm</i>	7 \pm 0
<i>oaa_bm</i>	3 \pm 0
<i>akg_bm</i>	3 \pm 0
<i>bs_ser</i>	0 \pm 0
<i>ser_bm</i>	0 \pm 0
<i>bs_ala</i>	1 \pm 0
<i>ala_bm</i>	1 \pm 0
<i>bs_val</i>	1 \pm 0
<i>val_bm</i>	1 \pm 0
<i>bs_pro</i>	1 \pm 0
<i>pro_bm</i>	1 \pm 0
<i>bs_asp</i>	1 \pm 0
<i>bs_thr</i>	0 \pm 0
<i>thr_bm</i>	0 \pm 0
<i>bs_asn</i>	0 \pm 0
<i>asn_bm</i>	0 \pm 0

(*) % en relación al sustrato utilizado \pm error en relación al sustrato.

A.III.3.2 Usando datos experimentales obtenidos por ^{13}C -RMN (análisis de flujos metabólicos con restricciones derivadas de ^{13}C -RMN)

Glicerol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo \pm SD*	%**
<i>emp1</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>emp2</i>	-0,07 \pm 1,28	-6
<i>emp3</i>	-0,10 \pm 0,43	-9
<i>emp4</i>	-0,15 \pm 0,43	-13
<i>emp5</i>	0,94 \pm 0,43	86
<i>emp6</i>	0,78 \pm 0,43	72
<i>emp7</i>	0,76 \pm 0,43	70
<i>emp8</i>	0,73 \pm 0,43	67
<i>ana1</i>	0,07 \pm 0,03	7
<i>ana2</i>	0,03 \pm 0,03	3
<i>tcc1</i>	0,65 \pm 0,43	60
<i>tcc2</i>	0,64 \pm 0,43	59
<i>tcc3</i>	0,64 \pm 0,43	59
<i>tcc4</i>	0,64 \pm 0,43	59
<i>tcc5</i>	0,64 \pm 0,43	59
<i>tcc6</i>	0,61 \pm 0,40	56
<i>ppp1</i>	0,03 \pm 1,29	2
<i>ppp2</i>	0,00 \pm 0,86	0
<i>ppp3</i>	0,03 \pm 0,43	3
<i>ppp4</i>	0,01 \pm 0,43	1
<i>ppp5</i>	0,01 \pm 0,43	1
<i>ppp6</i>	-0,01 \pm 0,43	-1
<i>gly</i>	1,09 \pm 0,03	100
<i>c_o2</i>	2,69 \pm 0,27	247
<i>f_bm</i>	1,32 \pm 0,06	121
<i>gly_upt</i>	1,09 \pm 0,03	100
<i>o2_upt</i>	2,70 \pm 0,27	248
<i>co2_out</i>	1,95 \pm 0,10	179
<i>glu_out</i>	0,00 \pm 0,02	0
<i>tr_oaa1</i>	0,20 \pm 0,10	18
<i>tr_oaa2</i>	0,16 \pm 0,07	15
<i>tr_pyr</i>	0,66 \pm 0,40	60

(*) en $[\text{mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biom}}] \pm \text{error}$.

(**) % en relación al sustrato (s) utilizado (s).

A.III.4 Flujos metabólicos obtenidos mediante análisis de módulos elementales

Glucosa ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo*	%**
<i>emp1</i>	1,48	100
<i>emp2</i>	0,72	49
<i>emp3</i>	0,81	55
<i>emp4</i>	0,81	55
<i>emp5</i>	0,81	55
<i>emp6</i>	1,73	117
<i>emp7</i>	1,64	111
<i>emp8</i>	1,49	101
<i>ana1</i>	0,35	24
<i>ana2</i>	0,03	2
<i>ana3</i>	0,05	4
<i>vf1</i>	0,00	0
<i>vf2</i>	0,03	2
<i>vf3</i>	0,03	2
<i>tcc1</i>	1,00	67
<i>tcc2</i>	0,97	65
<i>tcc3a</i>	0,65	44
<i>tcc3b</i>	0,32	22
<i>tcc4</i>	0,81	55
<i>tcc5</i>	0,81	55
<i>tcc6</i>	0,76	51
<i>ppp1</i>	0,55	37
<i>ppp2</i>	0,25	17
<i>ppp3</i>	0,30	20
<i>ppp4</i>	0,19	13
<i>ppp5</i>	0,19	13
<i>ppp6</i>	0,11	7
<i>gly</i>	0,00	0
<i>fo1</i>	4,12	278
<i>fo2</i>	2,06	139
<i>f_bm</i>	5,72	386
<i>glu_upt</i>	1,48	100
<i>o2_upt</i>	3,09	208
<i>co2_out</i>	3,17	214
<i>gly_out</i>	0,00	0
<i>ace_out</i>	0,00	0
<i>eth_out</i>	0,00	0
<i>tr_oaa1</i>	0,44	30
<i>tr_oaa2</i>	0,23	15
<i>tr_accoa</i>	0,01	1
<i>tr_pyr</i>	1,11	75
<i>tr_akg</i>	0,15	10

Glicerol ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)			Glicerol ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)			80G20M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo*	%**	Reacciones	Flujo*	%**	Reacciones	Flujo*	%**
<i>emp1</i>	0,00	0	<i>emp1</i>	0,00	0	<i>emp1</i>	0,00	0
<i>emp2</i>	-0,07	-7	<i>emp2</i>	-0,80	-29	<i>emp2</i>	-0,11	-8
<i>emp3</i>	-0,16	-15	<i>emp3</i>	-0,76	-28	<i>emp3</i>	-0,49	-33
<i>emp4</i>	-0,16	-15	<i>emp4</i>	-0,76	-28	<i>emp4</i>	-0,49	-33
<i>emp5</i>	0,89	85	<i>emp5</i>	1,96	72	<i>emp5</i>	0,88	59
<i>emp6</i>	0,72	68	<i>emp6</i>	1,30	48	<i>emp6</i>	0,70	47
<i>emp7</i>	0,69	66	<i>emp7</i>	1,20	44	<i>emp7</i>	0,67	45
<i>emp8</i>	0,65	62	<i>emp8</i>	1,07	39	<i>emp8</i>	0,63	43
<i>ana1</i>	0,08	8	<i>ana1</i>	0,31	11	<i>ana1</i>	0,09	6
<i>ana2</i>	0,29	28	<i>ana2</i>	0,04	1	<i>ana2</i>	0,23	15
<i>ana3</i>	0,01	1	<i>ana3</i>	0,02	1	<i>ana3</i>	0,01	0
<i>vf1</i>	0,00	0	<i>vf1</i>	0,00	0	<i>vf1</i>	0,00	0
<i>vf2</i>	0,29	28	<i>vf2</i>	0,04	1	<i>vf2</i>	0,23	15
<i>vf3</i>	0,29	28	<i>vf3</i>	0,04	1	<i>vf3</i>	0,23	15
<i>tcc1</i>	0,24	23	<i>tcc1</i>	0,58	21	<i>tcc1</i>	0,28	19
<i>tcc2</i>	0,51	49	<i>tcc2</i>	0,54	20	<i>tcc2</i>	0,48	33
<i>tcc3a</i>	0,43	41	<i>tcc3a</i>	0,24	9	<i>tcc3a</i>	0,40	27
<i>tcc3b</i>	0,08	8	<i>tcc3b</i>	0,30	11	<i>tcc3b</i>	0,08	6
<i>tcc4</i>	0,47	45	<i>tcc4</i>	0,40	15	<i>tcc4</i>	0,44	30
<i>tcc5</i>	0,47	45	<i>tcc5</i>	0,40	15	<i>tcc5</i>	0,44	30
<i>tcc6</i>	0,47	44	<i>tcc6</i>	0,38	14	<i>tcc6</i>	0,44	30
<i>ppp1</i>	0,01	1	<i>ppp1</i>	0,55	20	<i>ppp1</i>	0,04	3
<i>ppp2</i>	0,02	2	<i>ppp2</i>	0,26	10	<i>ppp2</i>	-0,12	-8
<i>ppp3</i>	-0,02	-2	<i>ppp3</i>	0,29	11	<i>ppp3</i>	0,17	11
<i>ppp4</i>	0,00	0	<i>ppp4</i>	0,19	7	<i>ppp4</i>	-0,15	-10
<i>ppp5</i>	0,00	0	<i>ppp5</i>	0,19	7	<i>ppp5</i>	-0,15	-10
<i>ppp6</i>	-0,02	-2	<i>ppp6</i>	0,11	4	<i>ppp6</i>	-0,17	-11
<i>gly</i>	1,05	100	<i>gly</i>	2,71	100	<i>gly</i>	0,89	60
<i>fo1</i>	2,09	199	<i>fo1</i>	2,04	75	<i>fo1</i>	2,02	136
<i>fo2</i>	1,84	175	<i>fo2</i>	4,3	158	<i>fo2</i>	1,89	127
<i>f_bm</i>	1,69	161	<i>f_bm</i>	6,3	230	<i>f_bm</i>	1,73	117
<i>gly_upt</i>	1,05	100	<i>gly_upt</i>	2,72	100	<i>vm1</i>	0,59	40
<i>o2_upt</i>	1,97	187	<i>o2_upt</i>	3,17	117	<i>vm2</i>	0,11	8
<i>co2_out</i>	1,47	139	<i>co2_out</i>	1,90	70	<i>vm3</i>	0,11	8
<i>glu_out</i>	0,00	0	<i>glu_out</i>	0,00	0	<i>vm4</i>	0,48	32
<i>ace_out</i>	0,00	0	<i>ace_out</i>	0,00	0	<i>vm5</i>	0,48	32
<i>eth_out</i>	0,00	0	<i>eth_out</i>	0,00	0	<i>gly_upt</i>	0,89	60
<i>tr_oaa1</i>	0,23	22	<i>tr_oaa1</i>	0,34	12	<i>meth_upt</i>	0,59	40
<i>tr_oaa2</i>	0,18	17	<i>tr_oaa2</i>	0,16	6	<i>o2_upt</i>	2,25	152
<i>tr_accoa</i>	0,29	27	<i>tr_accoa</i>	0,00	0	<i>co2_out</i>	1,53	103
<i>tr_pyr</i>	0,27	26	<i>tr_pyr</i>	0,72	27	<i>glu_out</i>	0,00	0
<i>tr_akg</i>	0,04	4	<i>tr_akg</i>	0,14	5	<i>ace_out</i>	0,00	0
						<i>eth_out</i>	0,00	0
						<i>form_out</i>	0,00	0
						<i>formoh_out</i>	0,00	0
						<i>tr_oaa1</i>	0,20	13
						<i>tr_oaa2</i>	0,15	10
						<i>tr_accoa</i>	0,22	15
						<i>tr_pyr</i>	0,32	21
						<i>tr_akg</i>	0,04	3
						<i>tr_xyl</i>	0,48	32
						<i>tr_form</i>	0,11	8
						<i>tr_gap</i>	0,48	32
						<i>tr_dha</i>	0,48	32

60G40M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo*	%**
<i>emp1</i>	0,00	0
<i>emp2</i>	-0,05	-2
<i>emp3</i>	-1,06	-48
<i>emp4</i>	-1,06	-48
<i>emp5</i>	1,06	49
<i>emp6</i>	0,91	42
<i>emp7</i>	0,88	40
<i>emp8</i>	0,84	38
<i>ana1</i>	0,13	6
<i>ana2</i>	0,37	17
<i>ana3</i>	0,03	2
<i>vf1</i>	0,00	0
<i>vf2</i>	0,37	17
<i>vf3</i>	0,37	17
<i>tcc1</i>	0,32	15
<i>tcc2</i>	0,67	31
<i>tcc3a</i>	0,57	26
<i>tcc3b</i>	0,10	5
<i>tcc4</i>	0,62	28
<i>tcc5</i>	0,62	28
<i>tcc6</i>	0,59	27
<i>ppp1</i>	0,00	0
<i>ppp2</i>	-0,44	-20
<i>ppp3</i>	0,44	20
<i>ppp4</i>	-0,47	-21
<i>ppp5</i>	-0,47	-21
<i>ppp6</i>	-0,49	-23
<i>gly</i>	0,72	33
<i>fo1</i>	2,76	126
<i>fo2</i>	1,85	85
<i>f_bm</i>	1,65	76
<i>vm1</i>	1,46	67
<i>vm2</i>	0,06	3
<i>vm3</i>	0,06	3
<i>vm4</i>	1,40	64
<i>vm5</i>	1,40	64
<i>gly_upt</i>	0,72	33
<i>meth_upt</i>	1,46	67
<i>o2_upt</i>	3,03	139
<i>co2_out</i>	1,97	90
<i>glu_out</i>	0,00	0
<i>ace_out</i>	0,00	0
<i>eth_out</i>	0,00	0
<i>form_out</i>	0,00	0
<i>formoh_out</i>	0,00	0
<i>tr_oaa1</i>	0,31	14
<i>tr_oaa2</i>	0,22	10
<i>tr_accoa</i>	0,36	16
<i>tr_pyr</i>	0,34	16
<i>tr_akg</i>	0,05	2
<i>tr_xyl</i>	1,40	64
<i>tr_form</i>	0,06	3
<i>tr_gap</i>	1,40	64
<i>tr_dha</i>	1,40	64

60G40M ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo*	%**
<i>emp1</i>	0,00	0
<i>emp2</i>	-0,84	-19
<i>emp3</i>	-1,20	-27
<i>emp4</i>	-1,20	-27
<i>emp5</i>	2,28	50
<i>emp6</i>	1,73	38
<i>emp7</i>	1,61	36
<i>emp8</i>	1,45	32
<i>ana1</i>	0,41	9
<i>ana2</i>	0,04	1
<i>ana3</i>	0,06	1
<i>vf1</i>	0,00	0
<i>vf2</i>	0,04	1
<i>vf3</i>	0,04	1
<i>tcc1</i>	0,87	19
<i>tcc2</i>	0,82	18
<i>tcc3a</i>	0,46	10
<i>tcc3b</i>	0,36	8
<i>tcc4</i>	0,65	14
<i>tcc5</i>	0,65	14
<i>tcc6</i>	0,58	13
<i>ppp1</i>	0,66	15
<i>ppp2</i>	0,05	1
<i>ppp3</i>	0,61	13
<i>ppp4</i>	-0,04	-1
<i>ppp5</i>	-0,04	-1
<i>ppp6</i>	-0,14	-3
<i>gly</i>	2,70	60
<i>fo1</i>	3,31	73
<i>fo2</i>	6,83	151
<i>f_bm</i>	6,10	135
<i>vm1</i>	1,82	40
<i>vm2</i>	1,03	23
<i>vm3</i>	1,03	23
<i>vm4</i>	0,78	17
<i>vm5</i>	0,78	17
<i>gly_upt</i>	2,70	60
<i>meth_upt</i>	1,82	40
<i>o2_upt</i>	5,98	132
<i>co2_out</i>	3,83	85
<i>glu_out</i>	0,00	0
<i>ace_out</i>	0,00	0
<i>eth_out</i>	0,00	0
<i>form_out</i>	0,00	0
<i>formoh_out</i>	0,00	0
<i>tr_oaa1</i>	0,38	8
<i>tr_oaa2</i>	0,13	3
<i>tr_accoa</i>	0,00	0
<i>tr_pyr</i>	1,00	22
<i>tr_akg</i>	0,17	4
<i>tr_xyl</i>	0,78	17
<i>tr_form</i>	1,03	23
<i>tr_gap</i>	0,78	17
<i>tr_dha</i>	0,78	17

40G60M ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo	%
<i>emp1</i>	0,00	0
<i>emp2</i>	-0,06	-2
<i>emp3</i>	-1,70	-58
<i>emp4</i>	-1,70	-58
<i>emp5</i>	1,19	40
<i>emp6</i>	1,01	34
<i>emp7</i>	0,98	33
<i>emp8</i>	0,93	31
<i>ana1</i>	0,11	4
<i>ana2</i>	0,41	14
<i>ana3</i>	0,00	0
<i>vf1</i>	0,00	0
<i>vf2</i>	0,41	14
<i>vf3</i>	0,41	14
<i>tcc1</i>	0,35	12
<i>tcc2</i>	0,74	25
<i>tcc3a</i>	0,63	21
<i>tcc3b</i>	0,11	4
<i>tcc4</i>	0,69	23
<i>tcc5</i>	0,69	23
<i>tcc6</i>	0,69	23
<i>ppp1</i>	0,00	0
<i>ppp2</i>	-0,75	-25
<i>ppp3</i>	0,75	25
<i>ppp4</i>	-0,78	-26
<i>ppp5</i>	-0,78	-26
<i>ppp6</i>	-0,81	-27
<i>gly</i>	0,55	19
<i>fo1</i>	3,05	103
<i>fo2</i>	1,79	61
<i>f_bm</i>	1,88	64
<i>vm1</i>	2,40	81
<i>vm2</i>	0,06	2
<i>vm3</i>	0,06	2
<i>vm4</i>	2,34	79
<i>vm5</i>	2,34	79
<i>gly_upt</i>	0,55	19
<i>meth_upt</i>	2,40	81
<i>o2_upt</i>	3,62	123
<i>co2_out</i>	2,18	74
<i>glu_out</i>	0,00	0
<i>ace_out</i>	0,00	0
<i>eth_out</i>	0,00	0
<i>form_out</i>	0,00	0
<i>formoh_out</i>	0,00	0
<i>tr_oaa1</i>	0,25	9
<i>tr_oaa2</i>	0,19	7
<i>tr_accoa</i>	0,40	14
<i>tr_pyr</i>	0,41	14
<i>tr_akg</i>	0,05	2
<i>tr_xyl</i>	2,34	79
<i>tr_form</i>	0,06	2
<i>tr_gap</i>	2,34	79
<i>tr_dha</i>	2,34	79

40G60M ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$)		
Reacciones	Flujo	%
<i>emp1</i>	0,00	0
<i>emp2</i>	-0,73	-13
<i>emp3</i>	-2,00	-37
<i>emp4</i>	-2,00	-37
<i>emp5</i>	2,32	42
<i>emp6</i>	1,75	32
<i>emp7</i>	1,62	30
<i>emp8</i>	1,44	26
<i>ana1</i>	0,38	7
<i>ana2</i>	0,39	7
<i>ana3</i>	0,00	0
<i>vf1</i>	0,00	0
<i>vf2</i>	0,39	7
<i>vf3</i>	0,39	7
<i>tcc1</i>	0,47	9
<i>tcc2</i>	0,75	14
<i>tcc3a</i>	0,35	6
<i>tcc3b</i>	0,40	7
<i>tcc4</i>	0,56	10
<i>tcc5</i>	0,56	10
<i>tcc6</i>	0,56	10
<i>ppp1</i>	0,55	10
<i>ppp2</i>	-0,39	-7
<i>ppp3</i>	0,94	17
<i>ppp4</i>	-0,49	-9
<i>ppp5</i>	-0,49	-9
<i>ppp6</i>	-0,59	-11
<i>gly</i>	2,29	42
<i>fo1</i>	2,56	47
<i>fo2</i>	6,71	123
<i>f_bm</i>	6,46	118
<i>vm1</i>	3,17	58
<i>vm2</i>	1,15	21
<i>vm3</i>	1,15	21
<i>vm4</i>	2,02	37
<i>vm5</i>	2,02	37
<i>gly_upt</i>	2,30	42
<i>meth_upt</i>	3,17	58
<i>o2_upt</i>	6,22	114
<i>co2_out</i>	3,60	66
<i>glu_out</i>	0,00	0
<i>ace_out</i>	0,00	0
<i>eth_out</i>	0,00	0
<i>form_out</i>	0,00	0
<i>formoh_out</i>	0,00	0
<i>tr_oaa1</i>	0,32	6
<i>tr_oaa2</i>	0,11	2
<i>tr_accoa</i>	0,35	6
<i>tr_pyr</i>	0,67	12
<i>tr_akg</i>	0,19	3
<i>tr_xyl</i>	2,02	37
<i>tr_form</i>	1,15	21
<i>tr_gap</i>	2,02	37
<i>tr_dha</i>	2,02	37

(*) en $[\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{biom}]$.

(**) % en relación al substrato (s) utilizado (s).

A.IV Abundancias relativas de metabolitos y aminoácidos por espectrometría de masas, para el cultivo operado con glicerol a $\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$

AIV.1 Abundancias relativas para los metabolitos del metabolismo central

Metabolito	Abundancias relativas de los isotopómeros				
	Fragmento	Tiempo de Residencia 1	Tiempo de Residencia 2	Tiempo de Residencia 3	Tiempo de Residencia 4
G6P		0,332	0,311	0,287	0,280
G6P+1		0,181	0,166	0,177	0,163
G6P+2		0,128	0,117	0,120	0,110
G6P+3		0,223	0,254	0,244	0,223
G6P+4		0,075	0,080	0,087	0,077
G6P+5		0,040	0,033	0,051	0,047
G6P+6		0,022	0,039	0,033	0,101
F6P		0,314	0,304	0,279	0,254
F6P+1		0,182	0,173	0,175	0,162
F6P+2		0,148	0,118	0,132	0,122
F6P+3		0,192	0,235	0,226	0,215
F6P+4		0,085	0,087	0,084	0,080
F6P+5		0,046	0,038	0,064	0,055
F6P+6		0,032	0,044	0,039	0,113
PYR		0,633	0,658	0,715	0,609
PYR+1(1)		0,058	0,039	0,051	0,050
PYR+1(2)		0,040	0,028	0,041	0,037
PYR+2(1)		0,040	0,023	0,034	0,035
PYR+2(2)		0,025	0,012	0,025	0,020
PYR+3		0,268	0,279	0,200	0,306
GAP		0,296	0,601	0,602	0,624
GAP+1		0,028	0,021	0,024	0,025
GAP+2		0,172	0,050	0,059	0,061
GAP+3		0,504	0,327	0,315	0,289
DHAP		0,593	0,615	0,589	0,589
DHAP+1		0,131	0,085	0,106	0,115
DHAP+2		0,090	0,061	0,071	0,081
DHAP+3		0,186	0,239	0,234	0,216
R5P		0,278	0,312	0,308	0,301
R5P+1		0,173	0,169	0,168	0,186
R5P+2		0,226	0,185	0,181	0,169
R5P+3		0,167	0,170	0,170	0,171
R5P+4		0,086	0,089	0,103	0,099
R5P+5		0,070	0,075	0,071	0,074
RU5P/XU5P		0,374	0,374	0,364	0,357
RU5P/XU5P+1		0,227	0,195	0,207	0,206
RU5P/XU5P+2		0,152	0,140	0,133	0,144
RU5P/XU5P+3		0,156	0,170	0,172	0,169
RU5P/XU5P+4		0,075	0,084	0,091	0,089
RU5P/XU5P+5		0,016	0,037	0,033	0,034
E4P		0,460	0,441	0,442	0,440
E4P+1		0,214	0,220	0,219	0,215
E4P+2		0,041	0,022	0,023	0,025
E4P+3		0,198	0,218	0,214	0,221
E4P+4		0,087	0,099	0,102	0,099

Metabolito	Abundancias relativas de los isotopómeros			
Fragmento	Tiempo de Residencia 1	Tiempo de Residencia 2	Tiempo de Residencia 3	Tiempo de Residencia 4
S7P	0,214	0,220	0,197	0,180
S7P+1	0,209	0,204	0,209	0,179
S7P+2	0,177	0,167	0,166	0,146
S7P+3	0,170	0,190	0,180	0,159
S7P+4	0,113	0,126	0,122	0,109
S7P+5	0,068	0,037	0,073	0,065
S7P+6	0,039	0,041	0,041	0,150
S7P+7	0,009	0,015	0,012	0,012
MAL	0,533	0,515	0,547	0,503
MAL+1	0,174	0,178	0,167	0,181
MAL+2	0,144	0,152	0,140	0,154
MAL+3	0,108	0,111	0,105	0,116
MAL+4	0,042	0,044	0,041	0,047
SUCC	0,622	0,697	0,578	0,596
SUCC+1(1)	0,140	0,117	0,152	0,106
SUCC+1(2)	0,180	0,150	0,203	0,138
SUCC+2(1)	0,151	0,123	0,173	0,115
SUCC+2(2)	0,121	0,095	0,138	0,089
SUCC+3(1)	0,059	0,042	0,066	0,163
SUCC+3(2)	0,046	0,033	0,048	0,155
SUCC+4	0,028	0,021	0,031	0,020
AKG	0,470	0,506	0,478	0,477
AKG+1	0,021	0,022	0,021	0,021
AKG+2	0,144	0,146	0,137	0,135
AKG+3	0,168	0,168	0,158	0,159
AKG+4	0,090	0,100	0,095	0,092
AKG+5	0,107	0,058	0,111	0,115
FUM	0,375	0,363	0,303	0,310
FUM+1(1)	0,216	0,231	0,254	0,221
FUM+1(2)	0,253	0,272	0,289	0,255
FUM+2(1)	0,211	0,226	0,231	0,204
FUM+2(2)	0,195	0,185	0,211	0,187
FUM+3(1)	0,135	0,115	0,144	0,200
FUM+3(2)	0,113	0,116	0,122	0,182
FUM+4	0,062	0,066	0,068	0,064
FBP	0,319	0,355	0,336	0,299
FBP+1	0,180	0,130	0,144	0,150
FBP+2	0,130	0,093	0,102	0,107
FBP+3	0,235	0,279	0,271	0,244
FBP+4	0,072	0,062	0,067	0,070
FBP+5	0,041	0,040	0,042	0,043
FBP+6	0,023	0,040	0,038	0,087
PEP	0,810	0,909	0,925	0,882
PEP+1	0,178	0,086	0,073	0,113
PEP+2	0,011	0,005	0,002	0,005
PEP+3	0,002	0,000	0,000	0,000
ACO	0,565	0,505	0,492	0,450
ACO+1(1)	0,135	0,164	0,149	0,145
ACO+1(2)	0,131	0,146	0,136	0,136
ACO+2(1)	0,155	0,168	0,177	0,160
ACO+2(2)	0,156	0,165	0,191	0,173
ACO+3(1)	0,063	0,055	0,077	0,146
ACO+3(2)	0,073	0,093	0,097	0,159
ACO+4(1)	0,082	0,108	0,106	0,099
ACO+4(1)	0,026	0,035	0,031	0,031

Metabolito	Abundancias relativas de los isotopómeros			
Fragmento	Tiempo de Residencia 1	Tiempo de Residencia 2	Tiempo de Residencia 3	Tiempo de Residencia 4
CIT/ICIT	0,382	0,327	0,271	0,275
CIT/ICIT+1(1)	0,162	0,177	0,174	0,182
CIT/ICIT+1(2)	0,225	0,240	0,241	0,245
CIT/ICIT+2(1)	0,241	0,254	0,285	0,265
CIT/ICIT+2(2)	0,217	0,238	0,268	0,246
CIT/ICIT+3(1)	0,155	0,177	0,192	0,208
CIT/ICIT+3(2)	0,148	0,163	0,185	0,201
CIT/ICIT+4(1)	0,060	0,065	0,078	0,070
AMP	0,150	0,110	0,086	0,079
AMP+1	0,175	0,171	0,151	0,147
AMP+2	0,170	0,195	0,183	0,178
AMP+3	0,156	0,180	0,173	0,165
AMP+4	0,137	0,158	0,153	0,151
AMP+5	0,101	0,048	0,117	0,115
AMP+6	0,063	0,076	0,075	0,103
AMP+7	0,031	0,040	0,041	0,040
AMP+8	0,012	0,016	0,016	0,016
AMP+9	0,003	0,005	0,005	0,005
AMP+10	0,000	0,000	0,001	0,001
ATP	0,144	0,094	0,074	0,063
ATP+1	0,174	0,166	0,153	0,132
ATP+2	0,172	0,189	0,183	0,159
ATP+3	0,172	0,197	0,190	0,167
ATP+4	0,138	0,159	0,156	0,137
ATP+5	0,102	0,071	0,121	0,106
ATP+6	0,064	0,081	0,081	0,199
ATP+7	0,032	0,041	0,042	0,037
ADP	0,120	0,080	0,062	0,058
ADP+1	0,171	0,166	0,149	0,137
ADP+2	0,172	0,188	0,179	0,167
ADP+3	0,169	0,193	0,181	0,175
ADP+4	0,146	0,170	0,161	0,153
ADP+5	0,107	0,061	0,126	0,117
ADP+6	0,067	0,082	0,082	0,136
ADP+7	0,033	0,044	0,043	0,041
ADP+8	0,013	0,017	0,016	0,017

A.IV.2 Abundancias relativas para los aminoácidos

Aminoácido	Abundancias relativas de los isotopómeros			
	Fragmento	Tiempo de residencia 1	Tiempo de residencia 2	Tiempo de residencia 3
Ala	0,9070	0,9145	0,9188	0,9171
Ala+1	0,0693	0,0569	0,0594	0,0591
Ala+2	0,0237	0,0286	0,0218	0,0238
Asn	0,4673	0,3991	0,3922	0,4004
Asn+1	0,1960	0,2169	0,2348	0,2218
Asn+2	0,1663	0,1905	0,1804	0,1846
Asn+3	0,1173	0,1338	0,1343	0,1397
Asn+4	0,0531	0,0597	0,0583	0,0535
Asp	0,4182	0,3555	0,3480	0,3646
Asp+1	0,2379	0,2475	0,2421	0,2377
Asp+2	0,1805	0,2021	0,2115	0,2028
Asp+3	0,1138	0,1355	0,1340	0,1365
Asp+4	0,0495	0,0594	0,0644	0,0584
Pro	0,4147	0,3181	0,3151	0,3109
Pro+1	0,1641	0,1817	0,1891	0,1913
Pro+2	0,2267	0,2589	0,2549	0,2579
Pro+3	0,1218	0,1491	0,1497	0,1494
Pro+4	0,0480	0,0610	0,0596	0,0600
Pro+5	0,0247	0,0313	0,0316	0,0305
Ser	0,5767	0,5626	0,5903	0,5700
Ser+1	0,1212	0,1239	0,1204	0,1260
Ser+2	0,0940	0,1034	0,0926	0,1153
Ser+3	0,2082	0,2101	0,1968	0,1886
Thr/HSer	0,5062	0,4348	0,4269	0,4458
Thr/Hser+1	0,2052	0,2479	0,2411	0,2474
Thr/Hser+2	0,1798	0,1977	0,2209	0,1938
Thr/Hser+3	0,1089	0,1195	0,1112	0,1130
Val	0,4951	0,4403	0,4115	0,4108
Val+1	0,0451	0,0501	0,0525	0,0535
Val+2	0,1777	0,2042	0,2268	0,2174
Val+3	0,1891	0,1995	0,2051	0,2114
Val+4	0,0170	0,0187	0,0195	0,0185
Val+5	0,0760	0,0872	0,0846	0,0883

A.V Abundancias relativas de los fragmentos C2 y C3 intactos de aminoácidos proteínogénicos para el cultivo operado con glicerol a $\mu=0,05\text{ h}^{-1}$

Abundancias relativas de los fragmentos de carbonos intactos																
Átomo de Carbono	Tiempo de Residencia 1				Tiempo de Residencia 2				Tiempo de Residencia 3				Tiempo de Residencia 4			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$												
Ala- α	0,03	0,05	0,01	0,91	0,05	0,05	0,02	0,88	0,04	0,06	0,01	0,89	0,05	0,05	-	0,90
Ala- β	0,06	0,94	-	-	0,06	0,94	-	-	0,08	0,92	-	-	0,07	0,93	-	-
Arg- β	0,74	0,26	0,00	0,00	0,65	0,35	-	0,01	0,63	0,36	0,02	-	0,68	0,32	-	-
Arg- δ	0,08	0,92	-	-	0,05	0,95	-	-	0,04	0,96	-	-	0,06	0,94	-	-
Asp- α	0,27	0,08	0,42	0,23	0,26	0,10	0,43	0,21	0,24	0,09	0,43	0,24	0,29	0,08	0,42	0,22
Asp- β	0,26	0,27	0,41	0,06	0,25	0,27	0,42	0,07	0,25	0,23	0,42	0,11	0,26	0,26	0,42	0,05
Glu- α	0,28	0,21	0,44	0,07	0,34	0,16	0,47	0,04	0,27	0,20	0,43	0,10	0,34	0,16	0,45	0,04
Glu- β	0,65	0,35	0,00		0,74	0,26	-	-	0,71	0,29	-	-	0,76	0,24	-	-
Glu- γ	0,01	0,00	0,99	0,00	0,02	-	0,98	-	0,03	-	0,95	0,02	0,04	-	0,96	-
Gly- α	0,05	0,95	-	-	0,08	0,92	-	-	0,05	0,95	-	-	0,10	0,90	-	-
His- α	0,03	0,00	0,00	0,97	0,01	-	-	0,99	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00
His- β	0,03	0,97	0,00	0,00	0,03	0,97	-	-	0,02	0,98	-	-	0,03	0,97	-	-
His- δ_2	0,70	0,30	-	-	0,73	0,27	-	-	0,67	0,33	-	-	0,75	0,25	-	-
Ile- α	0,37	0,00	0,63	0,00	0,35	-	0,65	-	0,34	-	0,66	-	0,36	-	0,64	-
Ile- γ_1	0,04	0,96	-	-	0,04	0,96	-	-	0,04	0,96	-	-	0,03	0,97	-	-
Ile- γ_2	0,57	0,44	0,00	-	0,54	0,46	-	-	0,49	0,50	0,00	-	0,50	0,50	-	-
Ile- δ	0,51	0,49	-	-	0,50	0,50	-	-	0,51	0,49	-	-	0,55	0,45	-	-
Leu- α	0,01	0,00	0,99	0,00	0,03	-	0,98	-	0,02	-	0,98	-	0,03	-	0,97	-
Leu- β	1,00	0,00	0,00	-	1,00	-	-	-	0,94	0,06	-	-	0,95	0,05	-	-
Leu- δ_1	0,05	0,95	-	-	0,04	0,96	-	-	0,04	0,96	-	-	0,05	0,95	-	-
Leu- δ_2	1,00	0,00	-	-	0,99	0,01	-	-	0,98	0,02	-	-	1,00	-	-	-
Lys- α	0,03	0,00	0,97	0,00	0,07	0,01	0,88	0,04	0,00	-	0,98	0,02	0,02	-	0,98	-
Lys- β	0,75	0,25	0,00	-	0,71	0,30	-	-	0,69	0,31	-	-	0,73	0,28	-	-
Lys- γ	0,79	0,21	0,00	-	0,77	0,24	-	-	0,65	0,33	0,01	-	0,77	0,18	0,05	-
Lys- δ	0,00	1,00	0,00	-	-	1,00	-	-	0,02	0,98	-	-	-	1,00	-	-
Lys- ϵ	1,00	0,00	-	-	1,00	-	-	-	0,05	0,96	-	-	0,09	0,91	-	-
Met- α	0,25	0,14	0,39	0,23	0,25	0,15	0,43	0,17	0,19	0,16	0,39	0,26	0,27	0,14	0,38	0,21
Phe- α	0,01	0,00	0,01	0,97	0,01	-	0,01	0,98	0,01	0,00	0,01	0,99	0,02	-	0,01	0,97
Phe- β	0,00	1,00	0,00	0,00	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-
Pro- α	0,56	0,44	-	-	0,05	0,95	-	-	0,05	0,95	-	-	0,04	0,96	-	-
Pro- β	0,31	0,21	0,42	0,06	0,28	0,23	0,44	0,05	0,24	0,22	0,43	0,11	0,28	0,20	0,44	0,08
Pro- γ	0,64	0,35	0,02	-	0,50	0,46	0,04	-	0,57	0,41	0,02	-	0,65	0,34	0,01	-
Pro- δ	0,06	0,90	0,04	-	0,02	0,91	0,07	-	0,00	0,89	0,11	-	0,01	0,93	0,06	-
Ser- α	0,01	0,00	0,40	0,59	0,02	0,01	0,41	0,56	0,02	-	0,39	0,59	0,03	-	0,44	0,52
Ser- β	0,43	0,57	-	-	0,42	0,58	-	-	0,45	0,55	-	-	0,47	0,53		
Thr- α	0,28	0,09	0,40	0,23	0,26	0,10	0,42	0,23	0,24	0,11	0,41	0,24	0,29	0,10	0,41	0,21
Thr- β	0,31	0,22	0,42	0,05	0,26	0,26	0,41	0,07	0,22	0,41	0,28	0,10	0,25	0,45	0,25	0,06
Thr- γ_2	0,47	0,53	-	-	0,47	0,54	-	-	0,47	0,53	-	-	0,51	0,49		
Tyr- α	0,02	0,00	0,02	0,96	0,01	0,01	0,00	0,97	0,01	-	0,01	0,98	0,01	-	0,01	0,98
Tyr- β	0,00	1,00	0,00	0,00	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-
Tyr- δ_x	0,00	1,00	0,00	-	-	1,00	-	-	0,00	1,00	-	-	-	1,00	-	-
Tyr- ϵ_x	0,58	0,00	0,00	0,42	0,60	-	-	0,41	0,56	0,00	-	0,44	0,60	-	-	0,41
Val- α	0,01	0,00	0,99	0,00	0,02	-	0,99	-	0,02	0,00	0,98	0,01	0,02	-	0,98	-
Val- γ_1	0,04	0,96	-	-	0,04	0,96	-	-	0,04	0,96	-	-	0,05	0,95	-	-
Val- γ_2	1,00	0,00	-	-	1,00	-	-	-	1,00	-	-	-	0,96	0,04	-	-

Observación: La primera columna indica la posición de carbono en que la estructura fina de ^{13}C fue observada, donde los valores de f fueron calculados de acuerdo con la metodología descrita por Szyperski (1995). Para los átomos de carbonos terminales, $f^{(2*)}$ y $f^{(3)}$ no están definidos; para cadenas medianas no son dados los valores de $f^{(2*)}$, las constantes de acoplamiento escalares carbono-carbono son similares y los dos dobletes no pueden ser distinguidos; para el aminoácido Tyr los dos carbonos δ^1 y δ^2 y ε^1 y ε^2 , respectivamente, son dados solamente el aumento de una de cada estructura fina de ^{13}C .

R. Rutinas

R.1 Reconciliación estadística de la composición elemental y de la biomasa

Referencia: Lange & Heijnen 2001

%datos experimentales, cultivo 80% glicerol 20% metanol:

```
[DatCm letras]=xlsread('80G20M005','Cm','B2:L8');  
[DatCc letras]=xlsread('80G20M005','Cc','B2:D8');  
[Datfm letras]=xlsread('80G20M005','fm','B2:C12');  
[Datb letras]=xlsread('80G20M005','b','A1:A7');
```

```
b=Datb;  
Cm=[DatCm (-b)];  
Cc=DatCc ;
```

```
fm=[Datfm(:,1);1];  
deltafm=[Datfm(:,2);1e-3];
```

```
[fc,sdfc,fm2,sdfm,h]=mfaoverd(Cm, Cc, fm, deltafm)
```

%datos calculados:

```
xlswrite('80G20M005',fc,'fc','B2:B4')  
xlswrite('80G20M005',sdfc,'fc','C2:C4')  
xlswrite('80G20M005',fm2,'fmc','B2:B12')  
xlswrite('80G20M005',sdfm,'fmc','C2:C12')  
xlswrite('80G20M005',h,'fmc','B14')
```

% función para calcular flujos metabólicos en un sistema sobredeterminado

```
function [rc,sdrc,rm2,sdrm,h,errorp]=mfaoverd(Em, Ec, rm, delta)
```

```
% Em parte correspondiente a la matriz estequimétrica medida  
% Ec parte correspondiente a la matriz estequimétrica calculada  
% rm vector de flujos medidos (Cmol/C-molBM·h)  
% delta vector error con la desviación estandar del vector de flujos medidos  
% rm2 vector flujos medidos corregidos  
% varrm varianza mesudida corregides  
% sdrm desviación típica medida corregida  
% rc vector flujos calculados  
% varrc varianza de flujos calculados  
% sdrc desviación típica de flujos calculados  
% referencia Noorman et al. 1996
```

```

% cálculo de la matriz redundancia

R=Em-Ec*pinv(Ec)*Em;

% rango de matriz redundancia
rk=rank(R,1e-9);

%Rr=[R(1,:);R(2,:)];
% reduced row echelon form
Rred=rref(R,1e-9);

% ecuaciones no combinacion-lin rref
Rr=[Rred(1:rk,:)];

%delta=diag(rm*err');

F=diag(diag(delta*delta'));
P=Rr*F*Rr';

%corrección rm
estdelt=F*Rr'*pinv(P)*Rr*rm;
rm2=rm-estdelt;
covrm=F-F*Rr'*pinv(P)*Rr*F;
varrm=diag(covrm);
sdrm=sqrt(varrm);
% estadístico
epsilon=Rr*rm;
h=epsilon*pinv(P)*epsilon;
errorp =100*chi2cdf(h,rk);
%calculo valores no medidos con rm corregido
rc=-pinv(Ec)*Em*rm2;
covrc=pinv(Ec)*Em*covrm*Em'*pinv(Ec)';
varrc=diag(covrc);
sdrc=sqrt(varrc);

```

R.2 Reconciliación estadística de sustratos y productos por balance elemental y por grados de reductancia

```

%datos iniciales: cultivo glicerol 0,05 h-1
[DatosEm letras]=xlsread('glicerol005','Em','B2:E6')
[DatosEc letras]=xlsread('glicerol005','Ec','B2:D6')
[DatosRr letras]=xlsread('glicerol005','Rr','A1:D2')
[Datosrm letras]=xlsread('glicerol005','rm','B1:B4')
[Datosdrm letras]=xlsread('glicerol005','drm','B2:E5')
[Datosmrm letras]=xlsread('glicerol005','mrm','B2:E5')
[Datosvdrm letras]=xlsread('glicerol005','vdrm','B1:B4')
[Datosd letras]=xlsread('glicerol005','d','B1:B4')

```

```

Ec = DatosEc;
Em = DatosEm;
Rr = DatosRr;
rm = Datosrm;
drm=Datosdrm;
mrm=Datosmrm;
vdrm=Datosvdrm;
d=Datosd;

```

```

R=Em-Ec*((Ec*Ec)^-1)*Ec*Em
F=(drm-mrm)*(drm-mrm)'
P=Rr*F*Rr'
dch=F*Rr*(P^-1)*Rr*rm
rmch=vdrm-dch
e=Rr*d
h=e*(P^-1)*e
covrm=F-F*Rr*pinv(P)*Rr*F;
varrm=diag(covrm);
sdrm=sqrt(varrm);

```

%datos calculados:

```

xlswrite('glicerol005',R,'R','A1:D4');
xlswrite('glicerol005',rmch,'rmch','B1:B4');
xlswrite('glicerol005',h,'h','B8');
xlswrite('glicerol005',sdrm,'sdrm','E1:E4')

```

R.3 Cálculo de flujos metabólicos utilizando la metodología clásica de MFA y cálculo de las desviaciones estándar

%datos iniciales: cultivo glycerol 0,05 h-1

```

[DatosA letras]=xlsread('glicerol005','A','A1:AP42')
[DatosC letras]=xlsread('glicerol005','C','A1:AP43')
[Datosd letras]=xlsread('glicerol005','d','A1:B43')
[Datosb letras]=xlsread('glicerol005','b','A1:B42')
[Datoss letras]=xlsread('glicerol005','s','A1:B7')
[DatosR letras]=xlsread('glicerol005','R','A1:B42')
[DatosX2 letras]=xlsread('glicerol005','x2','A1:B42')

```

```

A=DatosA;
C=DatosC;
d=Datosd;
b=Datosb;
s=Datoss;
R=DatosR;
x2=DatosX2;

```

% cálculo del numero de condicionamiento

```

NC=norm(C)*norm(pinv(C))
%NC = Numero de condicionamiento = 28.0159

```

%Cálculo de flujos metabólicos de acuerdo con Pitkänen et al. 2003

```

x=lsqin(C,d,A,b)

```

%datos de los flujos calculados

```

xlswrite('glicerol005',x,'R','B2:B42');

```

% cálculo del error de acuerdo con Joshi et al., 2006.

```

%---calcul desv-----
fdelta=1e-3;
numpar=41;
nummeas=41;
S=zeros(nummeas,numpar);
xopt=R;
for i=1:numpar

```

```

%incremento un factor de flujo por el factor delta i cálculo de las rates medidas
xhigh=xopt;
xhigh(i)=xhigh(i)*(1+fdelta);
valsh=Values3(C,xhigh);
%decremento de un factor de flujo por el factor delta y calculo de las tasas medidas
xlow=xopt;
xlow(i)=xlow(i)*(1-fdelta);
valsl=Values3(C,xlow);
%calculo de las pendientes del efecto de cada factor de flujo en el resultado
S(:,i)=(valsh-valsl)./abs(xhigh(i)-xlow(i));
end

%agrupacion de las covarianzas de las medidas y cálculo de Q como inversa de la matriz
diagonal de covarianzas

Q=pinv(diag((x2).^2));

FIM=S*Q*S;
IFIM=pinv(FIM);
ELMFF_Dev=sqrt(diag(IFIM))

%dados de salida con los errores
xlswrite('glicerol005',ELMFF_Dev,'R','E2'); %desviación de los xr según el método FIM
-----

%función values
function vals=Values3(C,R)

rate_val_tmp = (C*R);

rate_tmp=rate_val_tmp;
vals=[rate_tmp]

end

```

R.4 Cálculo de flujos metabólicos con restricciones de ¹³C-RMN y cálculo de las desviaciones estándar

```

%dados iniciales: cultivo glicerol 0,05 h-1
[DatosN letras]=xlsread('glicerol005r','N','A1:A038')
[Datosmfl letras]=xlsread('glicerol005r','mfl','A1:B7')
[Datosmfile letras]=xlsread('glicerol005r','mfile','A1:B7')
[Datosflr letras]=xlsread('glicerol005r','flr','A1:A3')
[Datosflre letras]=xlsread('glicerol005r','flre','A1:A3')

N=DatosN;
mfl=Datosmfl;
mfile=Datosmfile;
flr=Datosflr;
flre=Datosflre;

%cálculo del flujo metabólico de acuerdo con Fischer et al., 2004
[v,mm]=fluxOpt (N, mfl, mfile, flr, flre)

vv=mean(v,2)

```

```

ss=std(v,0,2)
pss=100*ss./vv

%restricciones 13C-RMN
% cyt-OAA que proviene de cyt-PYR
R1=(vv(9))/(vv(9)+vv(37))

% mt-PYR que proviene de mt-MAL
R2=(vv(29))/(vv(29)+vv(39))

% mt-OAA que proviene de cyt-OAA
R3=(vv(36))/(vv(20)+ vv(36))

res=N*vv;

%dados de salida:
xlswrite('glicerol005r',v,'Resultats','B2:M41');
xlswrite('glicerol005r',vv,'Resultats','N2:N41');
xlswrite('glicerol005r',ss,'Resultats','O2:O41');
xlswrite('glicerol005r',pss,'Resultats','P2:P41');
xlswrite('glicerol005r',R1,'Resultats','Q3');
xlswrite('glicerol005r',R2,'Resultats','Q5');
xlswrite('glicerol005r',R3,'Resultats','Q7');
xlswrite('glicerol005r',mm,'Resultats','T3:T14');
xlswrite('glicerol005r',res,'Resultats','W2:W38');

```

Función fluxOpt

```

function [v,mm] = fluxOpt (N, mfl, mfle, flr, flre)
%function usando Matlab, función fmincon para la optimización de flujos

%N es la matriz estequiométrica
%x0 es el vector de flujos iniciales

% mfl1 contiene el valor de los flujos medidos y mfle contiene el error correspondiente, ver
fichero optF.m
% flr contiene los cuocientes de flujos y flre contiene el error correspondiente, ver fichero optF.m

[m, n] = size (N);
MAX_FLUXVECTORS = 12;
v=zeros(n,MAX_FLUXVECTORS);
mm=zeros(MAX_FLUXVECTORS,1);

lb =zeros(n,1);
ub =zeros(n,1);

fun = @optF;

for k=1:MAX_FLUXVECTORS
%for l=1:1
    %parametros adicionales para la función optFunction
    p1 = N;
    p2 = mfl;
    p3 = mfle;
    p4 = flr;
    p5 = flre;

    % restricciones para fmincon
    % m es el numero de metabolitos en el sistema

```

```

% n es el número de flujos en el sistema

% limites superiores e inferiores (para FMINCON)
for i=1:n
    lb(i) = -inf ;
    ub(i) = inf ;
end

%flujos positivos = flujos irreversibles (8, 9, 10, 13, 14, 15, 16,17, 18, 19, 20, 21, 27, 29, 36,
%37, 38, 39, 40)
%y los flujos sobre el sistema limite (flujos de entrada y salida) (28, 30, 31, 32, 33, 34, 35)
lb(8)=0;
lb(9)=0;
lb(10)=0;
lb(13)=0;
lb(14)=0;
lb(15)=0;
lb(16)=0;
lb(17)=0;
lb(18)=0;
lb(19)=0;
lb(20)=0;
lb(21)=0;
lb(27)=0;
lb(28)=0;
lb(29)=0;
lb(30)=0;
lb(31)=0;
lb(32)=0;
lb(33)=0;
lb(34)=0;
lb(35)=0;
lb(36)=0;
lb(37)=0;
lb(38)=0;
lb(39)=0;
lb(40)=0;
%generar un vector de flujos inicial randomico
%x0=10*n + 10*n*sqrt(0.5) *abs(randn(n,1));
%x0=abs(randn(n,1));
Mitja= 1;
Var=0.5;
x0=Mitja + sqrt(Var) *abs(randn(n,1));
%optimización usando la función FMINCON
[x,mm(k)] = fmincon (fun,x0,[],[],[],lb,ub,[],[],p1,p2,p3,p4,p5)
%[v(1:n,l)] = fmincon (@optF,x0,[],[],[],lb,ub,[],[],p1,p2,p3,p4,p5);

v(:,k)=x;
end

return;

```

Función optF

```

function value = optF(x, N, mfl, mfle, flr, flre);
% x es el vector de flujos
% N es la matriz estequiométrica
% mfl es un vector con los valores de los flujos medidos (mmol/gh)
% mfle es un vector que contiene el error de los flujos medidos
% flr es un vector con los cuocientes de flujos
% flre es un vector con los errores de los cuocientes de flujos

```

```

% suma de los cuadrados del balance de masa de los metabolitos
[m,n]= size(N);
b = zeros(m,1);
be= ones(m,1);
be=(N(:,28)*mfl(1)*0.05).^2;

b(22) = mfl(1);
b(33) = mfl(2);
b(28) = mfl(3);
b(29) = mfl(4);
b(30) = mfl(5);
b(31) = mfl(6);
b(32) = mfl(7);
metRes = N*x-b;
metRes = metRes.*metRes;

be(22) = mfle(1)* mfle(1);
be(33) = mfle(2)* mfle(2);
be(28) = mfle(3)* mfle(3);
be(29) = mfle(4)* mfle(4);
be(30) = mfle(5)* mfle(5);
be(31) = mfle(6)* mfle(6);
be(32) = mfle(7)* mfle(7);
for i=1:m
    if be(m)<10e-8
        metRes(m)=0;
    else
        metRes(m) = metRes(m)/be(m);
    end
end

resSum = sum(metRes);

% suma de los cuadrados de las restricciones de los cuocientes de flujo
%-----
%cyt-OAA que proviene de cyt-PYR
Dr1=(x(9)+x(37));
Rc=(x(9)-flr(1)*Dr1);
Rcdn=((flre(1)^2)*(Dr1^2));
if Rcdn<10e-10
    Rcdn=10e-10;
end
r(1)=(Rc^2)/Rcdn;
%r(1)=0;
%-----
% mt-PYR que proviene de mt-MAL
Dr2=(x(29)+x(39));
Re=(x(29)-flr(2)*Dr2);
Redn=((flre(2)^2)*(Dr2^2));
if Redn<10e-10
    Redn=10e-10;
end
r(2)=(Re^2)/Redn;
%r(2)=0;
%-----

% mt-OAA que proviene de cyt-PEP
Dr3=(x(20)+x(36));
Rh=(x(36)-flr(3)*Dr3);
Rhden=((flre(3)^2)*(Dr3^2));

```

```

if Rhden<10e-10
    Rhden=10e-10;
end
r(3)=(Rh^2)/Rhden;
%r(3)=0;
sumR = sum (r);

%valor de la función calculado
value = resSum + sumR;
return;

% cálculo del error de acuerdo con Joshi et al., 2006, ver apartado R.3
-----

function vals=Values(N,R)

rate_val_tmp = (N*R);

% glicerol 0,05 h-1
%cálculo de los cuocientes de flujos

% cyt-OAA que proviene de cyt-PYR
R1=(R(9))/(R(9)+ R(37))

% mt-PYR que proviene de mt-MAL
R2=(R(29))/(R(29)+R(39))

% mt-OAA que proviene de cyt-OAA
R3=(R(36))/(R(20)+ R(36))

rate_tmp=rate_val_tmp;
vals=[rate_tmp
      R1
      R2
      R3]

end

```

R.5 Cálculo de flujos metabólicos mediante el análisis de módulos elementales

Archivo con la function fluxes

```
function Fluxes(XLFile,NumFlux,NumRates, NumMeas,NumRats)
%Función para encontrar los flujos metabólicos dado la matriz estequiométrica,
%medidas experimentales y/o flujos medidos y cuocientes de flujos obtenidos por 13C,
%Desde un archivo de Excel y los resultados se almacenan en el mismo archivo.
.

% Lectura de datos del fichero -----
[FlxBal,XprDat,RatFlx,Aux]=ReadData(XLFile,NumFlux,NumRates, NumMeas,NumRats);

%llamar a la rutina para la optimización
%-----
%-----
[v,mm,xr,FlxBal,Aux]=FluxOpt (FlxBal,XprDat,RatFlx,Aux);

%-----
%-----
    rBM= FlxBal.MeasFlxPos(1);
%r9
    rOAAc_Pyr=RatFlx.Pos(1);
%r37
    rOAAc_mit=RatFlx.Pos(2);
%r29
    rPym_Mal=RatFlx.Pos(3);
%r39
    rPym_cyt=RatFlx.Pos(4);
%r36
    rOAAm_cit=RatFlx.Pos(5);
%r20
    rOAAm_Mal=RatFlx.Pos(6);
%r24
    rGap_xu=RatFlx.Pos(7);
%r25
    rGap_S7=RatFlx.Pos(8);
%r26
    rGap_E4=RatFlx.Pos(9);
%r4
    rGap_FB=RatFlx.Pos(10);

% cálculo del promedio de los resultados-----
%promedio de diferentes iteraciones
vv=mean(v,2); %promedio de diferentes flujos
ss=std(v,0,2); %desviación entre iteraciones
pss=100*ss./vv; %porcentaje de desviación entre iteraciones
%
xrm=mean(xr,2); %promedio de las fracciones
```

```

%cambio por xopt
vv3=FlxBal.BestFluxes;

% cálculo de los valores de comprobación de ratios por la pantalla y el fichero del óptimo final
vv3.
% cyt-OAA from cyt-PYR
R1=(vv3(rOAAc_Pyr))/(vv3(rOAAc_Pyr)+vv3(rOAAc_mit))

% mt-PYR from mt-MAL
R2=(vv3(rPym_Mal))/(vv3(rPym_Mal)+vv3(rPym_cyt))

% mt-OAA from cyt-OAA
R3=(vv3(rOAAm_cit))/(vv3(rOAAm_Mal)+ vv3(rOAAm_cit))

% PEP derived from PPP (upper bound)
R4=((vv3(rGap_xu)+ 2*vv3(rGap_S7)+ 3*vv3(rGap_E4))/(2*vv3(rGap_FB)+ vv3(rGap_xu)+
vv3(rGap_E4)))
%cálculo de las tasas
res=FlxBal.Stqmtry*vv3; %a partir de los flujos óptimos

%-----
%---calcul desv-----
fdelta=1e-3;
numpar=FlxBal.NumModes;
nummeas=XprDat.NumMeasVal+XprDat.NumRatios;
%nummeas=FlxBal.NumRates+XprDat.NumRatios;
S=zeros(nummeas,numpar);
xopt=FlxBal.BestFMod;
for i=1:numpar
%incremento de un factor de flujo por el factor delta y cálculo de las
%tasas medidas y los cuocientes de flujos
xhigh=xopt;
if xhigh(i)~=0
xhigh(i)=xhigh(i)*(1+fdelta);
else
xhigh(i)=xhigh(i)+fdelta;
end

valsh=Values(FlxBal,XprDat,RatFlx,xhigh);
%decremento de un factor de flujo por el factor delta y cálculo de las
%tasas medidas y los cuocientes de flujos
xlow=xopt;
if xlow(i)~=0
xlow(i)=xlow(i)*(1-fdelta);
else
xlow(i)=xlow(i)-fdelta;
end

valsl=Values(FlxBal,XprDat,RatFlx,xlow);
%calculo de las pendientes del efecto de cada factor de flujo en el
%resultado
S(:,i)=(valsh-valsl)./(xhigh(i)-xlow(i));
end

%agrupación de las covarianzas de las medidas
%i calculo de Q como inversa de la matriz diagonal de covarianzas

Q=pinv(diag([(XprDat.RateMeasDev).^2; (XprDat.RatioMeasDev).^2]));
%Q=pinv(diag([(Aux.be); (XprDat.RatioMeasDev).^2]));
FIM=S*Q*S;
IFIM=pinv(FIM);

```

```
ELMFF_Dev=sqrt(diag(IFIM));
```

```
%-----  
%-----  
WriteData( XLFile );
```

```
%-----SubFunciones-----  
%-----  
%-----  
%-----
```

```
function [FlxBal,XprDat,RatFlx,Aux]=ReadData(XLFile,NumFlux,NumRates,  
NumMeas,NumRats)
```

```
% Los datos se leen desde el archivo 'XLFile'.  
% La hoja CNA contiene la matriz estequiométrica importada del  
%Fluxanalyzer.
```

```
[DatosN letras]=xlsread(XLFile,'CNA','A1:BC54');  
% estructura FlxBal contiene los datos de la estequiometria  
FlxBal.RateNames= letras(3:end,1);  
FlxBal.FlxName= letras(1,2:end);  
FlxBal.FlxRev= logical(DatosN(1,:));  
FlxBal.Stqmtry= DatosN(2:end,:);  
[FlxBal.NumRates,FlxBal.NumFlux]=size(FlxBal.Stqmtry);
```

```
%lectura de datos  
%experimentales-----  
%-----  
% 7: r28-BM; r30-GLC ;r31-GOL;r32-ACE;r33-ETH;;r34-CO2;r35-O2;r41-FORM;  
% r42-FORMOH; r43-METH  
% estructura XprDat contiene los datos experimentales
```

```
[Datosmfl letras]=xlsread( XLFile,'mfl','A1:B10');  
XprDat.RateMeasName= letras(:,1);  
XprDat.RateMeasVal= Datosmfl(:,1);  
[XprDat.NumMeasVal]=length(XprDat.RateMeasVal);
```

```
[Datosmfl letras]=xlsread( XLFile ,'mfl','A1:B10');  
XprDat.RateMeasDev= Datosmfl(:,1);  
[XprDat.NumMeasDev]=length(XprDat.RateMeasDev) ;  
%lectura ratios a partir C13  
% R1; R2 ;R3; R4 --- cyt-PYR To cyt-OAA; mt-MAL to mt-PYR (Upper/Lower Bounds);  
% cy t-PEP To mt-OAA ; PPP To PEP (upper bound).
```

```
[Datosflr letras]=xlsread( XLFile ,'flr','A1:B3');  
XprDat.RatioMeasName= letras(:,1);  
XprDat.RatioMeasVal= Datosflr(:,1);  
[XprDat.NumRatios]=length(XprDat.RatioMeasVal);  
[Datosflre letras]=xlsread( XLFile ,'flre','A1:B3');  
XprDat.RatioMeasDev= Datosflre(:,1);  
[XprDat.NumRatiosDev]=length(XprDat.RatioMeasDev) ;
```

```
%lectura Glucose modes -----  
%nuevo experimental-----  
%[Datos letras]=xlsread( XLFile ,'Glucose-modes','A4:BC17');  
[Datos letras]=xlsread( XLFile ,'Glycerol-modes','A3:BC16');  
FlxBal.Modes=Datos';  
FlxBal.NumModes=size(FlxBal.Modes,2); %número de modos leídos  
FlxBal.FluxContrib=zeros(size(FlxBal.Modes)); %fracción contribución w de cada modo al  
flujo
```

```

FlxBal.TMPFluxContrib=zeros(size(FlxBal.Modes)); %valores temporales de la fracción w de
la contribución
FlxBal.NormFluxMod=zeros(1,FlxBal.NumModes); % norma de los fluxmodes corregidos
por w
FlxBal.TMPNormFluxMod=zeros(1,FlxBal.NumModes); %temporal de la norma de los
fluxmodes corregidos per w
FlxBal.BestIter=0; %mejor iteración
FlxBal.BestFMod=zeros(FlxBal.NumModes,1); %valores del mejor Fmode
FlxBal.BestFluxes=zeros(FlxBal.NumFlux,1); %mejores flujos calculados
%-----

```

%Verificación de la entrada (Input verification) -----

```

if (FlxBal.NumRates ~= NumRates)
    error('Wrong number of rates')
elseif (FlxBal.NumFlux ~= NumFlux)
    error('Wrong number of fluxes')
elseif ( XprDat.NumMeasVal~=NumMeas)
    error('Wrong number of meassures')
elseif ( XprDat.NumRatios~=NumRats)
    error('Wrong number of ratios')
elseif ( XprDat.NumMeasDev~=NumMeas)
    error('Wrong number of measure deviations')
elseif ( XprDat.NumRatiosDev~=NumRats)
    error('Wrong number of ratios deviations')
end

```

%-----

%añadimos a FlxBal la información correspondiente a la posiciones relevantes de
%medidas. Las implicadas a los cuocientes se hacen afora.

```

for i=1:FlxBal.NumRates
    for j=1:XprDat.NumMeasVal
        if strcmp (FlxBal.RateNames(i,1), XprDat.RateMeasName(j,1) )
            % guardamos la fila que contiene las reacciones de entrada-salida
            FlxBal.MeasRatePos(j)=i;
            % FlxBal.RatePos(j)=i;
            % guardamos la columna que correspondan a los flujos de entrada-salida
            FlxBal.MeasFlxPos(j)=find(FlxBal.Stqmtry(i,:));
            % guardamos el nombre del flux I/O
            FlxBal.MeasFlxName(j)=FlxBal.FlxName(1,FlxBal.MeasFlxPos(j));
        % FlxBal.InpFlxName(j)=FlxBal.FlxNames(1,FlxBal.MeasFlxPos(j));
        end
    end
end
if (size(FlxBal.MeasRatePos)~=size(FlxBal.MeasFlxPos))
    error('Wrong input rate-flux vector specification')
end

```

% guardamos la columna que contiene las reacciones implicadas en los cuocientes de flujos
y

% que no son medidos a la estructura RatFlx

```

[Datos letras]=xlsread( XLFile,'MFL_names','A1:B11');
%RatFlx.Reac = {'r9'; 'r37'; 'r29'; 'r39'; 'r36'; 'r20'; 'r24'; 'r25'; 'r26';
'r4'};
tmpReac = letras(2:end,1);
% RatFlx.Names = {'rOAAc_Pyr';'rOAAc_mit';'rPyrm_Mal'; 'rPyrm_cyt'; 'rOAAm_cit';
'rOAAm_Mal'; 'rGap_xu'; 'rGap_S7'; 'rGap_E4'; 'rGap_FB'};
tmpNames = letras(2:end,2);
[RatFlx.Num]=length( tmpReac);

```

```

for j=1:RatFlx.Num
    RatFlx.Names(j) = cell (1,1);

```

```

RatFlx.Reac(j) = cell (1,1);
RatFlx.Names(j) = tmpNames (j,1);
RatFlx.Reac(j) = tmpReac(j,1);

end
RatFlx.Pos=zeros(1,RatFlx.Num);

    for j=1:RatFlx.Num
% guardamos la columna que correspondan a los flujos implicados a los cuocientes de flujo
        RatFlx.Pos(1,j)=strmatch(RatFlx.Reac(1,j), FlxBal.FlxName, 'exact');
% guardamos la reversibilidad de la reacción que corresponda a los flujos implicados a los
cuocientes de flujo
        RatFlx.Rev(j)=FlxBal.FlxRev(1,RatFlx.Pos(j));
    end

Aux.marca=0;
end

function WriteData( XLFile )
%escritura de los resultados al fichero
%-----
%-----
xlswrite( XLFile ,v , 'Resultats','B2:M55'); %flujos diff iter
xlswrite( XLFile ,vv , 'Resultats','N2:N55'); %flujos promig
xlswrite( XLFile ,ss , 'Resultats','O2:O55'); %sd diff iter
xlswrite( XLFile ,pss , 'Resultats','P2:P55'); %percentage sd
xlswrite( XLFile ,R1 , 'Resultats','Q3'); %cuociente R1 calculado
xlswrite( XLFile ,R2 , 'Resultats','Q5'); % cuociente R2 calculado
xlswrite( XLFile ,R3 , 'Resultats','Q7'); % cuociente R3 calculado
xlswrite( XLFile ,R4 , 'Resultats','Q9'); % cuociente R4 calculado
xlswrite( XLFile ,mm , 'Resultats','Q57:V68'); %vector residuales final
xlswrite( XLFile ,res , 'Resultats','W2:W53'); %vector de tasas final
xlswrite( XLFile ,xr , 'Resultats','AD2'); %vectores de contribuciones de los modos x
%promedios
xlswrite( XLFile ,xopt , 'Resultats','EE2'); %valor del promedio de los xr
xlswrite( XLFile ,ELMFF_Dev , 'Resultats','CC2'); %desviación de los xr según FIM
xlswrite( XLFile ,S , 'Ss','B2'); %valores de sensibilidades del FIM
%el mejor
xlswrite( XLFile , FlxBal.FluxContrib , 'Resultats','DI2'); %mejor cálculo de contribuciones de
modos*xr
xlswrite( XLFile , FlxBal.NormFluxMod , 'Resultats','DI59'); %norma de cada vector de
contribuciones

xlswrite( XLFile , FlxBal.BestFMod , 'Resultats','CB2'); %valores mejores modos -mejor xr-
xlswrite( XLFile , FlxBal.BestFluxes , 'Resultats','EG2'); %flujos al punto escogido óptimo-
mejor v-
xlswrite( XLFile , FlxBal.BestIter , 'Resultats','EI2'); %mejor iteración -kk-

end
end

```

Función optF

```

function [v,mm,xr,FlxBal,Aux]=FluxOpt (FlxBal,XprDat,RatFlx,Aux)
%subrutina de optimización de flujos con info de cuociente de flujos
%ponemos a cero la x
x=zeros(FlxBal.NumFlux,1);

```

```

% inicializar vectores por diferentes valores iniciales
% número de iteraciones
MAX_FLUXVECTORS = 12;
v=zeros(FlxBal.NumFlux,MAX_FLUXVECTORS);
mm=zeros(6,MAX_FLUXVECTORS); %dimensionado el vector de residuales
xr=zeros(FlxBal.NumModes,MAX_FLUXVECTORS);
% función a optimizar
%fun = @optF;

%-----
% matrices auxiliares de cálculos y medidas
% inicialización de valores de balance global
Aux.b = zeros(FlxBal.NumRates,1);
%error por defecto---eps 2.22 e-16-----
defaulterr = (eps*1.e13).^2; % 4.9304e-06
%(eps*1.e13).^2=4.9304e-006 ; (eps*1.e14).^2=4.9304e-004
Aux.be= ones(FlxBal.NumRates,1)*defaulterr;
    for i=1:XprDat.NumMeasVal
        Aux.b(FlxBal.MeasRatePos(i)) = XprDat.RateMeasVal(i);
    end
%Asumimos la varianza de las tasas que intervienen en la formación de BM
%coger posición de la biomasa al vector de medidas
MBMPos = strmatch('BIOM', XprDat.RateMeasName, 'exact');
%identificar posición al vector de tasas
BMPos =FlxBal.MeasFlxPos(MBMPos);
%proporción error a la medida de la biomasa (ratio error relativo)de BM
relBMerr = abs(XprDat.RateMeasDev(MBMPos)/XprDat.RateMeasVal(MBMPos));
%proporcional al error de medida
%relBMerr =abs(XprDat.RateMeasDev(MBMPos));
%variancias aceptadas por defecto relativas a la de BM
Aux.be=(FlxBal.Stqmtry(:,BMPos)*relBMerr).^2;

%inserten las otras variancias a partir de los errores experimentales
%de las medidas
    for i=1:XprDat.NumMeasVal
        if (XprDat.RateMeasVal(i)~=0)
            % Aux.be(FlxBal.MeasRatePos(i)) =
            (abs(XprDat.RateMeasDev(i)/XprDat.RateMeasVal(i))).^2;
            %a los errores medidas
            Aux.be(FlxBal.MeasRatePos(i)) = (abs(XprDat.RateMeasDev(i))).^2;
        end
    end

    end
% Quedan a casi cero se debería poner un mínimo???????
% es una precaución para evitar una 'divide por cero'
% aquí quedan con un error por defecto las variancias de los no medidos y
% también todas las otras
    for i=1:FlxBal.NumRates
        if (Aux.be(i)<=defaulterr)
            Aux.be(i)=defaulterr;
        end
    end
end

% ya puestos por defecto inicial

%aumentar el error tolerado a las tasas correspondientes a equivalente de reducción y
%ATP's
% NADHcyt , NADPHcyt , NADHmit , NADPHmit ,ATPcyt , ATPper

posNADHc = strmatch('NADHcyt', FlxBal.RateNames, 'exact');

```

```

posNADHm = strmatch('NADHmit', FlxBal.RateNames, 'exact');

posNADPHc = strmatch('NADPHcyt', FlxBal.RateNames, 'exact');
posNADPHm = strmatch('NADPHmit', FlxBal.RateNames, 'exact');

%posATPc = strmatch('ATPcyt', FlxBal.RateNames, 'exact');
%posATPp = strmatch('ATPper', XprDat.RateMeasName, 'exact');

%posATPp = strmatch('ATPper', FlxBal.RateNames, 'exact');

% en el caso de los módulos elementales, aumentar la desviación evitara que
% restringe el ajuste. Individualmente ya están ajustados cuando se calculan los
% módulos y globalmente quizás no cuadran.
%fijamos el error como porcentaje del error por defecto
for i=1:FlxBal.NumRates
    if (i==posNADHc)
        Aux.be(i)= (defaulterr*1.e2);
    end
    if (i==posNADHm)
        Aux.be(i)= (defaulterr*1.e2);
    end
    if (i==posNADPHc)
        Aux.be(i)= (defaulterr*1.e2);
    end
    if (i==posNADPHm)
        Aux.be(i)= (defaulterr*1.e2);
    end
end
% en este caso no consideramos el ATP
% if (i==posATPc)
%     Aux.be(i)= (defaulterr*1.e5);
% end
% if (i==posATPp)
%     Aux.be(i)= (defaulterr*1.e5);
% end
end
%guardaremos el total de los errors considerados
Aux.beSuma=sum(Aux.be);

%posiciones en el vector x de las medidas disponibles: columnas con datos exp+cols. A los
cuocientes de flujos (flujos)
MeasColPos = [FlxBal.MeasFlxPos RatFlx.Pos];

%calculo varinzas a x a partir pinv
xet=abs(pinv(FlxBal.Stqmtry)*Aux.be);
% seleccionar los errores a x correspondientes a las medidas/medidas (se obtiene el vector
% columna)
Aux.xme=xet(MeasColPos);

% matriz metabólica correspondiente a los medidos + cuocientes de flujo
Aux.Mm = FlxBal.Stqmtry(:,MeasColPos);
%Matriz alternativa para los calculados
Aux.Mc=FlxBal.Stqmtry;
Aux.Mc(:,MeasColPos)= [];
%anular las filas con tasas medidas
Aux.Mm(FlxBal.MeasRatePos,:)= [];
Aux.Mc(FlxBal.MeasRatePos,:)= [];
Mtmp=pinv(Aux.Mc)*Aux.Mm;
rank(Mtmp)
%xm medidas : flujos correspondientes a entradas/salidas + los que intervienen en cuocientes
de flujos

```

```

%cálculo de los valores de xm a partir de las medidas
%solo las partes de b con valores y/o tienen medida y hacemos utilizar
%la transpuesta?????? corregida más abajo
for i=1:XprDat.NumMeasVal

Aux.xm(i)=XprDat.RateMeasVal(i)/FlxBal.Stqmtry(FlxBal.MeasRatePos(i),FlxBal.MeasFlxPos(i))
;
    x(FlxBal.MeasFlxPos(i))=Aux.xm(i);
end
%y sus correspondientes errores
%for i=1:XprDat.NumMeasVal
%
Aux.xme(i)=XprDat.RateMeasDev(i)/FlxBal.Stqmtry(FlxBal.MeasRatePos(i),FlxBal.MeasFlxPos(i));
%end
%inicialización de los otros flujos a optimizar
for i=1:RatFlx.Num
    Aux.xm(XprDat.NumMeasVal+i)=0;
end
%los errores son la sumatoria de la contribución de cada variación a bien.
%for i=1:RatFlx.Num
% Aux.xme(XprDat.NumMeasVal+i)=sum(Aux.be(:).*FlxBal.Stqmtry(:,RatFlx.Pos(i)));
%end
%columnas no incluidas en los Mm
xrow= 1:1:FlxBal.NumFlux ;
xrow([FlxBal.MeasFlxPos RatFlx.Pos])=[];
Aux.xcPos=xrow;
%-----
%[m,n]= size(N);

% "BIOM" metpos(1)
% "GLC(E)' metpos(2)
% "GOL(E)' metpos(3)
% "ACE(E)' metpos(4)
% "ETH(E)' metpos(5)
% "CO2(E)' metpos(6)
% "O2(E)" metpos(7)
% "METH(E)"metpos(8)
% "FORM(E)"metpos(9)
% "FORMOH(E)"metpos(10)

%-----
% constraints for fmincon
%upper and lower bounds (for FMINCON)
%optflux: nombre de los flujos a optimizar: nombre reacc. implicadas en los cuocientes de flujos
menos la biomasa;
%optflux = NumRat -1 ;

%inicializar limites a los flujos a optimizar
lb =zeros(FlxBal.NumModes,1);
ub =ones(FlxBal.NumModes,1)*600;
%reversibilidades de los flujos implicados en optim (cuocientes de flujos)
% for i=1:XprDat.NumMeasVal
%     if (~FlxBal.FlxRev(FlxBal.MeasFlxPos(i)))
%         lb(i) = 0 ;
%     else
%         lb(i) = -600;
%     end
%     ub(i) = 600 ;
% end

% for i=1:RatFlx.Num

```

```

%     if (~RatFlx.Rev(i))
%         lb(XprDat.NumMeasVal+i) = 0 ;
%     else
%         lb(XprDat.NumMeasVal+i) = -600;
%     end
%     ub(XprDat.NumMeasVal+i) = 600 ;
% end

Aux.xm = Aux.xm' ;
% no hace falta ya es vector columna Aux.xme = Aux.xme' ;

%options= optimset('LargeScale','off','TolCon',1e-7,'TolFun',1e-6,'ToIX ',1e-6) ;
%MxFEval=100*numberofvariables;
opcions=optimset('fgoalattain');
MxFEval=100*62*6;
opcions= optimset(opcions,'LargeScale','off','TolCon',1e-9,'TolFun',1e-9,'ToIX ',1e-
9,'MaxFunEvals',MxFEval) ;
x00=ones(FlxBal.NumModes,1)*0.1;
x00=lsqnonneg((FlxBal.Stqmtry*FlxBal.Modes),Aux.b);
%->>>>>-Iteración con diferentes valores iniciales -----
for kk=1:MAX_FLUXVECTORS

    %if (kk==1)
    %generation of a random initial flux vector
    Mitja= 0.5;
    Var=0.005;
    %x0=Mitja + sqrt(Var) *abs(randn(RatFlx.Num,1));
    x0=zeros(FlxBal.NumModes,1);

% x0=pinv(FlxBal.Stqmtry*FlxBal.Modes)*Aux.b;

    for i=1:FlxBal.NumModes
        % x0(i,1)=Mitja + sqrt(Var) *abs(randn(1,1));
        x0(i,1)=x00(i,1) + sqrt(x00(i,1) *Var/100) *abs(randn(1,1));
    %         if (lb(XprDat.NumMeasVal+i)==0);
    %             x0r(i,1)=Mitja + sqrt(Var) *abs(randn(1,1));
    %         else
    %             x0r(i,1)=Mitja + sqrt(Var) *(randn(1,1));
    %         end
    end
    % disp('Iteració = ')
    % disp(kk)
    fprintf('Iteració = %5.0f \n',kk)
    %x0
    % x0=Aux.xm;
    % x0(XprDat.NumMeasVal+1:end,1)=x0r(:,1);
    %5else
    %[xc,sdxc,xm,xe,h]=mfaoverd(Aux.Mm, Aux.Mc, Aux.xm', Aux.xme')
    %x0=Aux.xm'
    %end

%optimisation using FMINCON function
%[xr,mm(kk)] = fmincon (fun,x0,[],[],[],lb,ub,[],options,p1,p2,p3,p4,p5,p6,p7,p8)
%[v(1:n,l)] = fmincon (@optF,x0,[],[],[],lb,ub,[],p1,p2,p3,p4,p5);
%[xr,mm(kk)] = fmincon (@(xr) optF(xr,FlxBal,XprDat,RatFlx,Aux),x0,[],[],[],lb,ub,[],options);

% [xr(:,kk),mm(kk)] = fmincon (@(xr) optF(xr),x0,[],[],[],lb,ub,[],options);
%x = fgoalattain(fun,x0,goal,weight,A,b,Aeq,beq,lb,ub)
goal=[0;0;0;0;0;0];
%weight=[-0.01;-0.01;-0.01;-0.01;-0.01;-0.01];

```



```

% añadir los flujos implicados en los cuocientes en optimizacion
%Asignacion a entradas a xm
%for i=1:RatFlx.Num
    %Aux.xm(XprDat.NumMeasVal+i)=xr(i);
%end
%for i=1:(RatFlx.Num+XprDat.NumMeasVal)
%    Aux.xm(i)=xr(i);
%end

% flujos calculados
% Llama para solucionar el sistema-----
%-----
%[xc,sdxc,xm,xe,h]=mfaoverd(Aux.Mm, Aux.Mc, Aux.xm, Aux.xme);
%Mtmp=pinv(Aux.Mc)*Aux.Mm;
%rank(Mtmp)
%xc=-Mtmp*Aux.xm;
%disp(xc')
%disp(sdxc')
%disp(xm')
%disp(xe')
%disp(h)
%x = lscov(A,b,w)
%reconstrucción vector de flujos globales

%--- Versión norma de la contribución de flujos ---
%--- experimental
    for ii=1:FlxBal.NumModes
        FlxBal.TMPFluxContrib(:,ii)=FlxBal.Modes(:,ii)*xr(ii);
    end
    for ii=1:FlxBal.NumModes
        FlxBal.TMPNormFluxMod(1,ii)=norm(FlxBal.TMPFluxContrib(:,ii));
    end
x=sum(FlxBal.TMPFluxContrib,2); % suma de todas las contribuciones por filas para
calcular los flujos
%-----

%versio si min norma dels xr-----
%x=FlxBal.Modes *xr;
%-----
%-----

%asignar los valores de los metabolitos a su fila
%for i=1:XprDat.NumMeasVal
%    x(FlxBal.MeasFlxPos(i))=Aux.xm(i);
%end
% Asignar los valores de los flujos óptimos que hay a los cuocientes de flujo
%for i=1:RatFlx.Num
%    x(RatFlx.Pos(i))=Aux.xm(XprDat.NumMeasVal+i);
%end
%Asignar los valores calculados a las otras posiciones
%for i=1:(FlxBal.NumFlux-(XprDat.NumMeasVal+RatFlx.Num))
%    x(Aux.xcPos(i))=xc(i);
%end

% cálculo residuales de la red -----
%-----
metRes = (FlxBal.Stqmtry*x)-Aux.b;
%rr=rref([FlxBal.Stqmtry Aux.b]);
%Cuadrados de los residuales de la red metabolica
%metRes = (metRes.*metRes);
%metRes = (metRes.*metRes)./(Aux.be.*1e10);

```

```

metRes = (metRes.*metRes)./(Aux.be);
% protección por valores residuales muy pequeños y ponderación según el error
%for i=1:FlxBal.NumRates
%   if (Aux.be(i)/Aux.beSuma)<eps*1.e6
%       metRes(i)=metRes(i)./(eps*1.e6/Aux.beSuma);
%       metRes(i)=metRes(i);
%   else
%       metRes(i) = metRes(i)./(Aux.be(i)/Aux.beSuma);
%       metRes(i) = metRes(i)./(Aux.be(i));
%   end
%end

```

```

% suma cuadrada de los residuales del balance-----
%resSum = ((sum(metRes)/FlxBal.NumFlux)/Aux.beSuma)/1e+003;
%resSum =sum(metRes)/(Aux.beSuma);
%resSum =sum(metRes);
%resSum = sum(metRes)/FlxBal.NumFlux ;
resSum =sum(metRes);
%-----

```

```

% suma de los cuadrados de las restricciones de los cuocientes de flujo-----
%-----

```

```

%cyt-OAA from cyt-PYR
Dr1=(x(rOAAc_Pyr)+abs(x(rOAAc_mit)));
Rc=(x(rOAAc_Pyr)-XprDat.RatioMeasVal(1)*Dr1);
Rcden=((XprDat.RatioMeasDev(1)^2)*(Dr1^2));
if Rcden<eps*1.e4
    Rcden=eps*1.e4;%valor mínimo para el denominador 2.22e-12
end

```

```

r(1)=(Rc^2)/Rcden;
%r(1)=0;
%-----

```

```

% mt-PYR from mt-MAL
Dr2=(x(rPyrm_Mal)+x(rPyrm_cyt));
Re=(x(rPyrm_Mal)-XprDat.RatioMeasVal(2)*Dr2);
Reden=((XprDat.RatioMeasDev(2)^2)*(Dr2^2));
if Reden<eps*1.e4
    Reden=eps*1.e4;
end

```

```

r(2)=(Re^2)/Reden;
%r(2)=0;
%-----

```

```

% mt-OAA from cyt-PEP
Dr3=(x(rOAAm_Mal)+x(rOAAm_cit));
Rh=(x(rOAAm_cit)-XprDat.RatioMeasVal(3)*Dr3);
Rhden=((XprDat.RatioMeasDev(3)^2)*(Dr3^2));
if Rhden<eps*1.e4
    Rhden=eps*1.e4;
end

```

```

r(3)=(Rh^2)/Rhden;
%r(3)=0;
%{
%-----

```

```

% PEP derived from PPP (upper bound)
Dr4=(2*x(rGap_FB)+x(rGap_xu)+x(rGap_E4));
Rg=(( x(rGap_xu)+ 2*x(rGap_S7)+3*x(rGap_E4))-XprDat.RatioMeasVal(4)*Dr4);
Rgden=((XprDat.RatioMeasDev(4)^2)*(Dr4^2));
if Rgden<eps*1.e4
    Rgden=eps*1.e4;

```

```

    end
    r(4)=(((Rg+abs(Rg))/2)^2)/Rgden;
    %}
    %r(4)=0;
    sumR = sum (r);

    %cálculo de la función residual -----
    %-----
    %value = resSum + sumR + norm(xr)/FixBal.NumModes ;

    value(1,1)=resSum*10 ;
    value(2,1)=r(1)*10;
    value(3,1)= r(2)*10;
    %value(4,1)= r(3)*10;
    %value(5,1)= r(4)*10000;
    %value(6,1)=norm(xr) ;
    %value(6,1)=norm(FixBal.TMPNormFluxMod) ;
    value(4,1)= r(3)*10;
    value(5,1)=norm(xr) ;
    disp(value)
    end
    %-----
    %-----
end

```

R.6 Hoja de cálculo para simulación y optimización utilizando el software

13C-Flux

```
PROJECT
  NAME VERSION   FORMAT   DATE COMMENT
  Glycerol 1 (Modelo 1) 25May2007 incl transport
reaction, excl biosynthesis pathways

NETWORK
  FLUX_NAME  EDUCT_1  EDUCT_2  PRODUCT_1  PRODUCT_2

//Mixture input
glyuptU  GLYU  DHAP
  #ABC  #ABC
glyupt0  GLY0  DHAP
  #ABC  #ABC
//glyuptX  GLYX  DHAP
//  #ABC  #ABC
// Embden Meyerhof Parnas Pathway

emp1  Fru6P  Glc6P
  #ABCDEF  #ABCDEF

emp2  FruBP  Fru6P
  #ABCDEF  #ABCDEF

emp3  DHAP  GA3P  FruBP
  #ABC  #DEF  #CBADEF

emp4  DHAP  GA3P
  #ABC  #ABC

emp5  GA3P  PGA
  #ABC  #ABC

emp6  PGA  PEP
  #ABC  #ABC
emp7  PEP  Pyr
  #ABC  #ABC
emp8  OAA  PEP  CO2
  #ABCa  #ABC  #a

// Pentose Phosphate Pathway

ppp1  Glc6P  CO2  Ru15P
  #ABCDEF  #A  #BCDEF

ppp2  Ru15P  Xu15P
  #ABCDE  #ABCDE

ppp3  Ru15P  Rib5P
  #ABCDE  #ABCDE

ppp4  Xu15P  Ery4P  GA3P  Fru6P
  #ABCDE  #abcd  #CDE  #ABabcd
```

```

ppp5  Xul5P Rib5P Sed7P GA3P
      #ABCDE      #abcde      #ABabcde      #CDE

ppp6  GA3P Sed7P Ery4P Fru6P
      #ABC #abcdefg #defg #abcABC

// Tricarboxylic Acid Cycle

tcc_tr1  Pyr      Pyrmit
         #ABC      #ABC
tcc_tr2  OAA      OAAmit
         #ABCD     #ABCD
tcc1     Pyrmit   AcCoAmit CO2
         #ABC      #BC #A
tcc2     AcCoAmit OAA Citmit
         #AB #abcd #dcbaBA
tcc4     Citmit   AKGmit CO2
         #ABCDEF   #ABCEF #D
tcc5     AKGmit   SuccCoAmit CO2
         #ABCDE     #BCDE #A
tcc6     SuccCoAmit Sucmit
         #ABCD      #ABCD
tcc7a    Sucmit   Malmit
         #ABCD      #ABCD
tcc7b    Sucmit   Malmit
         #ABCD      #DCBA
//tcc8a  Fummit   Malmit
// #ABCD #ABCD
//tcc8b  Fummit   Malmit
// #ABCD #DCBA
tcc9     Malmit   OAA
         #ABCD      #ABCD

// Anaplerotic Reactions

ana1     Pyr CO2 OAA
         #ABC #a #ABCa
ana2     Malmit   Pyrmit CO2
         #ABCD #ABC #D

// CO2 output
coOut    CO2      CO2_out
         #A        #A
// Flux to biomass
Glc6P_bm Glc6P      Glc6P_BM
         #ABCDEF    #ABCDEF
Fru6P_bm Fru6P      Fru6P_BM
         #ABCDEF    #ABCDEF
Rib5P_bm Rib5P      Rib5P_BM
         #ABCDE     #ABCDE
Ery4P_bm Ery4P      E4P_BM
         #ABCD     #ABCD
PGA_bm   PGA      PGA_BM
         #ABC     #ABC

```

```

PEP_bm      PEP      PEP_BM
      #ABC      #ABC
Pyr_bm      Pyrmit    Pyr_BM
      #ABC      #ABC
AcCoA_bm    AcCoAmit  AcCoA_BM
      #AB       #AB
OAA_bm      OAA      OAA_BM
      #ABCD     #ABCD
AKG_bm      AKGmit    AKG_BM
      #ABCDE    #ABCDE

//CO2_bm    CO2      CO2_BM
// #A       #A

FLUXES
NET
NAME  FCD  VALUE(F/C)  ED_WEIGHT  LOW(F)  INC(F)
UP(F)

      glyuPTU  F      0.357
      glyuPT0  D
//    glyuPTX  F      0.275

      emp1  D
      emp2  D
      emp3  D
      emp4  D
      emp5  D
      emp6  D
      emp7  C      0.735
      emp8  D

      ppp1  F      0.009
      ppp2  D
      ppp3  D
      ppp4  D
      ppp5  D
      ppp6  D

      tcc_tr1  D
      tcc_tr2  D
      tcc1  D
      tcc2  D
      tcc4  F      0.275
      tcc5  D
      tcc6  D
      tcc7a  D
      tcc7b  D
      //tcc8a  D
      //tcc8b  D
      tcc9  D

      ana1  F      0.088
      ana2  D
      coOut  D

      Glc6P_bm  C      0.05894
      Fru6P_bm  C      0.038409
      Rib5P_bm  C      0.025488
      Ery4P_bm  C      0.024957
      PGA_bm    C      0.031683

```

```

PEP_bm      C      0.043011
Pyr_bm      C      0.050091
AcCoA_bm    C      0.083721
OAA_bm      C      0.041418
AKG_bm      C      0.045489
// CO2_bm    F      1e-14//0.186

```

XCH

```

NAME FCD VALUE(F/C) ED_WEIGHT LOW(F) INC(F)
UP(F)

```

// no xch-fluxes realized (i.e. only unidirectional fluxes)

```

glyuptU     D
glyupt0     D
// glyuptX   D
emp1 C      0.99
emp2 C      0
emp3 C      0
emp4 C      0.99
emp5 C      0.99
emp6 C      0.99
emp7 C      0
emp8 C      0

ppp1 C      0
ppp2 F      0.99
ppp3 F      0.0167536
ppp4 F      0.303064
ppp5 F      0.305523
ppp6 F      0.61022

tcc_tr1     C      0
//tcc_tr2   C      0.99
tcc1 C      0
tcc2 C      0
tcc4 F      0.203257
tcc5 C      0
tcc6 C      0.99
tcc7a C     0.99
tcc7b C     0.99
//tcc8a     C      0
//tcc8b     C      0
tcc9 C      0

ana1 C      0
ana2 C      0

```

EQUALITIES

NET

VALUE FORMULA

```

0 tcc7a-tcc7b // scrambling reaction
//0 tcc8a-tcc8b
1.19 glyuptU+glyupt0 //+glyuptX

```

XCH

VALUE FORMULA

INEQUALITIES

NET

VALUE COMP FORMULA

// Inequalities for Input and Output Fluxes are generated automatically

XCH

VALUE COMP FORMULA

// Inequalities for Input and Output Fluxes are generated automatically

FLUX_MEASUREMENTS

FLUX_NAME	VALUE	DEVIATION	//	Val	Dev
glyuptU	0.357	0.0357			
glyupt0	0.714	0.0714			
//glyuptX	01.Mär	0.01			
coOut	1.56	0.156			

LABEL_INPUT

META_NAME	ISOTOPOMER	VALUE
GLYU	#000	0.01
	#111	0.99
GLY0	#000	0.967
	#001	0.011
	#010	0.011
	#100	0.011
//GLYX	#100	0.978
//	#010	0.011
//	#001	0.011

LABEL_MEASUREMENTS

META_NAME	CUM_GROUP	VALUE	DEVIATION	CUM_CONSTRAINTS	
Glc6P	1	0.279739828913282	0.0179103139819943	#000000	
	1	0.163259220604954	0.0130584334281219		
	#000001+#000010+#000100+#001000+#010000+#100000	1	0.11001360493505	0.011960180978625	
	#000011+#000101+#000110+#001001+#001010+#001100+#010001+#010010+#010100+#011000+#100001+#100010+#100100+#100100+#101000+#110000	1	0.222710923085525	0.0151079311875498	
	#000111+#001011+#001101+#001110+#010011+#010101+#010110+#011001+#011010+#011100+#100011+#100101+#100110+#101001+#101010+#101100+#110001+#110010+#110100+#111000	1	0.0770076597648024	0.0107848774026813	
	#001111+#010111+#011011+#011101+#011110+#100111+#101011+#101101+#101110+#110011+#110101+#110110+#111001+#111010+#111100	1	0.0466854278099782	0.0105359997385708	
	#011111+#101111+#110111+#111011+#111101+#111110	1	0.100583334886408	0.0100951819474519	#111111
	Fru6P	1	0.253741782067422	0.0144841499221959	#000000
	1	0.16179419032965	0.0137235368741116		
	#000001+#000010+#000100+#001000+#010000+#100000	1	0.122068354548422	0.0129246777805031	
#000011+#000101+#000110+#001001+#001010+#001100+#010001+#010010+#010100+#011000+#100001+#100010+#100100+#101000+#110000					

	1	0.214761971371287	0.017904540170867	
		#000111+#001011+#001101+#001110+#010011+#010101+#010110+#011001+#011010+#011100+#100011+#100101+#100110+#101001+#101010+#101100+#110001+#110010+#110100+#111000		
	1	0.079544924698093	0.0110891056566705	
		#001111+#010111+#011011+#011101+#011110+#100111+#101011+#101101+#101110+#110011+#110101+#110110+#111001+#111010+#111100		
	1	0.0552524828647363	0.0115050627523361	
		#011111+#101111+#110111+#111011+#111101+#111110		
	1	0.11283629412039	0.0102227816768109	#111111
DHAP	1	0.5885209036083	0.0313591854468641	#000
	1	0.115123172850864	0.0162987715839555	
		#001+#010+#100		
	1	0.0806756618624144	0.0127542197952763	
		#011+#101+#110		
	1	0.215680261678422	0.0158159924677516	#111
GA3P	1	0.624106717484516	0.0631322310092537	#000
	1	0.025488327775131	0.0129080514330959	
		#001+#010+#100		
	1	0.0614395133213618	0.0164116082949361	
		#011+#101+#110		
	1	0.288965441418991	0.0340448660042251	#111
Pyr	1	0.609109734511038	0.12787442924537	#000
	1	0.0502006991937919	0.0116002988274475	
		#001+#010+#100		
	1	0.0345553852704354	0.0115503841825182	
		#011+#101+#110		
	1	0.306134181024735	0.0327621529567816	#111
Rib5P	1	0.30108650229837	0.0235963623639016	#00000
	1	0.18559339740911	0.0173377850856735	
		#00001+#00010+#00100+#01000+#10000		
	1	0.168825741746761	0.0139864965669687	
		#00011+#00101+#00110+#01001+#01010+#01100+#10001+#10010+#10100+#11000		
	1	0.171228583368157	0.0158077026101289	
		#00111+#01011+#01101+#01110+#10011+#10101+#10110+#11001+#11010+#11100		
	1	0.0989343919765984	0.0109627854436963	
		#01111+#10111+#11011+#11101+#11110		
	1	0.0743313832010029	0.0122360103224207	
		#11111		
Rul5P	1	0.357088395262543	0.0258915767734881	#00000
	1	0.206077703790305	0.0152879819425895	
		#00001+#00010+#00100+#01000+#10000		
	1	0.144021416831868	0.0114623100512411	
		#00011+#00101+#00110+#01001+#01010+#01100+#10001+#10010+#10100+#11000		
	1	0.169436960978668	0.0138302937416757	
		#00111+#01011+#01101+#01110+#10011+#10101+#10110+#11001+#11010+#11100		
	1	0.089420356156492	0.0120263454065366	
		#01111+#10111+#11011+#11101+#11110		
	1	0.033955166980125	0.0137201283445689	#11111
Ery4P	1	0.439746474802321	0.0247611492065802	#0000

```

1      0.215124801288271 0.0177027831226567
#0001+#0010+#0100+#1000
1      0.0253938105167537      0.0102437657935132
#0011+#0101+#0110+#1001+#1010+#1100
1      0.221111959865392 0.0161638158981899
#0111+#1011+#1101+#1110
1      0.0986229535272622      0.0121586970341869      #1111

Sed7P 1      0.180430118918346 0.0151412322572081      #0000000
1      0.179039648277141 0.0137704750686185
#0000001+#0000010+#0000100+#0001000+#0010000+#0100000+#1000000
1      0.145668352888206 0.0120176403507101
#0000011+#0000101+#0000110+#0001001+#0001010+#0001100+#0010001+#
0010010+#0010100+#0011000+#0100001+#0100010+#0100100+#0101000+#0110000
+#1000001+#1000010+#1000100+#1001000+#1010000+#1100000
1      0.158778504648145 0.012213048669887
#0000111+#0001011+#0001101+#0001110+#0010011+#0010101+#0010110+#
0011001+#0011010+#0011100+#0100011+#0100101+#0100110+#0101001+#0101010
+#0101100+#0110001+#0110010+#0110100+#0111000+#1000011+#1000101+#10001
10+#1001001+#1001010+#1001100+#1010001+#1010010+#1010100+#1011000+#110
0001+#1100010+#1100100+#1101000+#1110000
1      0.109449903329184 0.012044096382461
#0001111+#0010111+#0011011+#0011101+#0011110+#0100111+#0101011+#
0101101+#0101110+#0110011+#0110101+#0110110+#0111001+#0111010+#0111100
+#1000111+#1001011+#1001101+#1001110+#1010011+#1010101+#1010110+#10110
01+#1011010+#1011100+#1100011+#1100101+#1100110+#1101001+#1101010+#110
1100+#1110001+#1110010+#1110100+#1111000
1      0.0646899912598988      0.0106464592981761
#0011111+#0101111+#0110111+#0111011+#0111101+#0111110+#1001111+#
1010111+#1011011+#1011101+#1011110+#1100111+#1101011+#1101101+#1101110
+#1110011+#1110101+#1110110+#1111001+#1111010+#1111100
1      0.149773551924147 0.0111750566098856
#0111111+#1011111+#1101111+#1110111+#1111011+#1111101+#1111110
1      0.0121699287549329      0.0100358157166327
#1111111

Malmit 1      0.502882712331125 0.025839756124573 #0000
1      0.180879442388779 0.0143955989416098
#0001+#0010+#0100+#1000
1      0.153515188021685 0.0127998144734322
#0011+#0101+#0110+#1001+#1010+#1100
1      0.115824799931159 0.0119689534330769
#0111+#1011+#1101+#1110
1      0.0468978573272524      0.0103910232415846      #1111

//Sucmit 1      0.595541766010391 0.019474095590463 #0000
// 1      0.106059186301151 0.0101161811337736
#0001+#0010+#0100+#1000
// 1      0.115151956854457 0.0107331579457066
#0011+#0101+#0110+#1001+#1010+#1100
// 1      0.162836944412631 0.0101821880911281
#0111+#1011+#1101+#1110
// 1      0.0204101464213701      0.0100606024635681      #1111

//AKGmit 1      0.477415985975905 0.0268088415137224
#00000
// 1      0.0207843795457089      0.0101009057399925
#00001+#00010+#00100+#01000+#10000
// 1      0.135065831188691 0.0143711489881269
#00011+#00101+#00110+#01001+#01010+#01100+#10001+#10010+#10100+#
11000

```

```

//      1      0.159496102346052 0.0168085826378917
#001111+#01011+#01101+#01110+#10011+#10101+#10110+#11001+#11010+#
11100
//      1      0.0923128566633098      0.0122277547372906
#011111+#10111+#11011+#11101+#11110
//      1      0.114924844280333 0.0130432742971112      #11111

//Fummit      1      0.310126086616023 0.0598965019516516      #0000
//      1      0.221493460725194 0.0115381285777028
#0001+#0010+#0100+#1000
//      1      0.204499177695982 0.0127250157282959
#0011+#0101+#0110+#1001+#1010+#1100
//      1      0.19980029759574 0.0112039900053353
#0111+#1011+#1101+#1110
//      1      0.0640809773670609      0.0123051849045433      #1111

PEP      1      0.882103613262151 0.0675618065396114      #000
      1      0.112596811109704 0.0135654543202932
#001+#010+#100
      1      0.00482108681071247      0.0100304905479175
#011+#101+#110
      1      0.000478488817431511      0.010005771160241 #111

FruBP      1      0.299054245026633 0.0357907118710831      #000000
      1      0.149961952386129 0.0163751339119369
#000001+#000010+#000100+#001000+#010000+#100000
      1      0.107185563648223 0.0121679353681651
#000011+#000101+#000110+#001001+#001010+#001100+#010001+#010010+
#010100+#011000+#100001+#100010+#100100+#101000+#110000
      1      0.243776497445374 0.020374012765635
#000111+#001011+#001101+#001110+#010011+#010101+#010110+#011001+
#011010+#011100+#100011+#100101+#100110+#101001+#101010+#101100+#11000
1+#110010+#110100+#111000
      1      0.0696271333840635      0.0114734849666287
#001111+#010111+#011011+#011101+#011110+#100111+#101011+#101101+
#101110+#110011+#110101+#110110+#111001+#111010+#111100
      1      0.043156864876617 0.0104078871885803
#011111+#101111+#110111+#111011+#111101+#111110
      1      0.0872377432329601      0.0107754054196722
#111111

Citmit      1      0.274963449354913 0.0144441187835139
#000000
      1      0.181855490291636 0.0103173872530576
#000001+#000010+#000100+#001000+#010000+#100000
      1      0.264549721702106 0.0115704384135922
#000011+#000101+#000110+#001001+#001010+#001100+#010001+#010010+
#010100+#011000+#100001+#100010+#100100+#101000+#110000
      1      0.208479749660143 0.0120520970520433
#000111+#001011+#001101+#001110+#010011+#010101+#010110+#011001+
#011010+#011100+#100011+#100101+#100110+#101001+#101010+#101100+#11000
1+#110010+#110100+#111000
      1      0.0701515889912022      0.0110029150245845
#001111+#010111+#011011+#011101+#011110+#100111+#101011+#101101+
#101110+#110011+#110101+#110110+#111001+#111010+#111100
      1      0      0.01
#011111+#101111+#110111+#111011+#111101+#111110

```

1 0 0.01 #111111

PEAK_MEASUREMENTS

META_NAME	PEAK_NO	VALUE_S	VALUE_D-	VALUE_D+
VALUE_DD	VALUE_T	DEVIATION_S	DEVIATION_D-	
DEVIATION_D+		DEVIATION_DD/T		

MASS_SPECTROMETRY

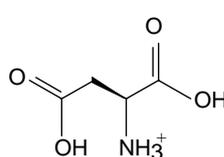
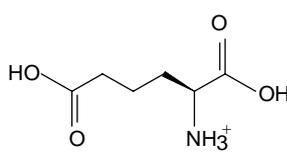
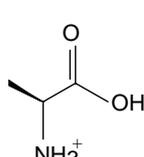
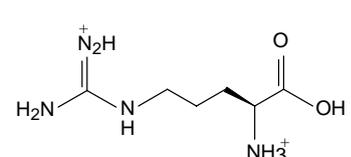
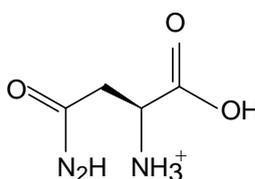
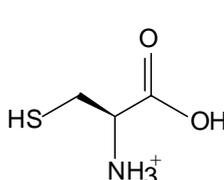
META_NAME	FRAGMENT	WEIGHT	VALUE	DEVIATION
-----------	----------	--------	-------	-----------

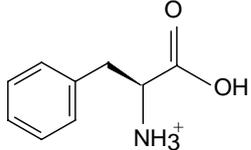
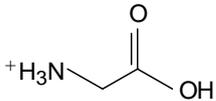
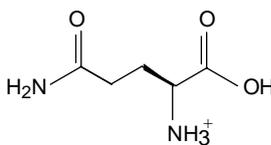
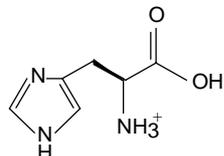
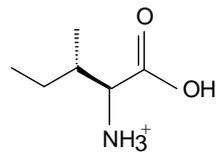
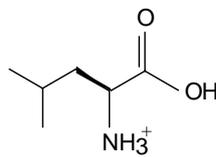
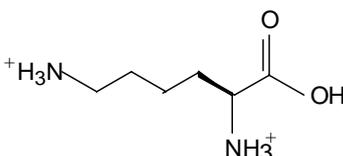
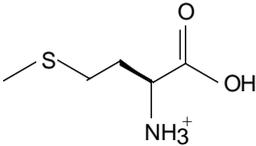
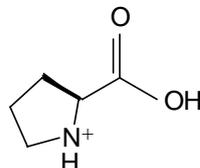
OPTIONS

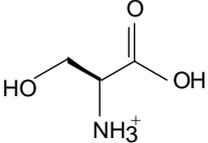
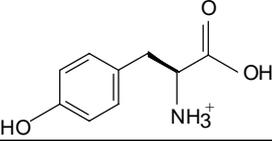
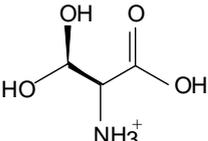
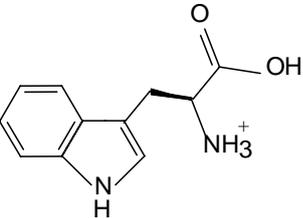
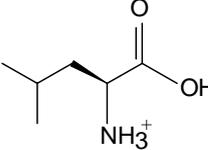
OPT_NAME	OPT_VALUE
MATLAB_FOR_FLUX_EQ_CONSTR_MATR	1

T. Tablas

Tabla T.1 Propiedades de los aminoácidos.

	Nombre y clasificación	Estructura en pH = 1	PM	pK
Asp	(L) Ácido Aspártico a) Dicarboxílico b) Polar cargado		133,11	2,97
Glu	(L) Ácido Glutámico a) Dicarboxílico b) Polar cargado		147,13	3,22
Ala	(L) Alanina (*) a) Alifático b) No polar		85,10	6,02
Arg	(L) Arginina a) Básico b) Polar cargado		174,20	10,76
Asn	(L) Asparagina a) Amida de AA, dicarboxílico b) Polar no cargado		148,11	5,41
Cys	(L) Cisteína a) Sulfurado b) Polar no cargado		121,16,	5,02

Phe	(L) Fenilalanina a) Aromático b) No polar		165,19	5,91
Gly	(L) Glicina (**) a) Alifático b) Polar no carregado		75,07	5,97
Gln	(L) Glutamina a) Amida de AA, dicarboxílico b) Polar no carregado		162,13	5,65
His	(L) Histidina a) Básico b) Polar carregado		155,16	7,58
Ile	(L) Isoleucina a) Alifático b) No polar		131,18	6,02
Leu	(L) Leucina a) Alifático b) No polar		131,18	5,98
Lys	(L) Lisina a) Básico b) Polar carregado		146,14	9,74
Met	(L) Metionina a) Sulfurado b) No polar		149,21	5,75
Pro	(L) Prolina a) Iminoácido b) No polar		115,13	6,1 0,0

Ser	(L) Serina a) Hidroxilado b) Polar no carregado		105,10	5,6 8,0
Tyr	(L) Tirosina a) Aromático b) Polar no carregado		181,19	5,6 5,0
Thr	(L) Treonina a) Hidroxilado b) Polar no carregado		119,12	6,5 3,0
Trp	(L) Triptófano a) Aromático b) No polar		204,33	5,8 8,0
Val	(L) Valina a) Alifático b) No polar		117,15	5,9 7,0

(*) En la frontera entre no polares y polares no carregados.

(**) Classificado como polar, aunque su grupo R=H sea muy pequeño para influenciar la polaridad.

Referencia: Vasconcellos *et al.*, 1996.

Tabla T.2 Puntos Críticos de la Distribución del test Chi-cuadrado.

N	Nivel de confianza												
	99,5%	99%	97,5%	95%	90%	75%	50%	25%	10%	5%	2,5%	1%	0,5%
α	0,005	0,010	0,025	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	0,90	0,95	0,975	0,99	0,995
1	0,39e-4	0,00016	0,00098	0,0039	0,0158	0,102	0,455	1,32	2,71	3,84	5,02	6,63	7,88
2	0,0100	0,0201	0,0506	0,103	0,211	0,575	1,39	2,77	4,61	5,99	7,38	9,21	10,6
3	0,0717	0,115	0,216	0,352	0,584	1,21	2,37	4,11	6,25	7,81	9,35	11,3	12,8
4	0,207	0,297	0,484	0,711	1,06	1,92	3,36	5,39	7,78	9,49	11,1	13,3	14,9
5	0,412	0,554	0,831	1,15	1,61	2,67	4,35	6,63	9,24	11,1	12,8	15,1	16,7
6	0,676	0,872	1,24	1,64	2,20	3,45	5,35	7,84	10,6	12,6	14,4	16,8	18,5
7	0,989	1,24	1,69	2,17	2,83	4,25	6,35	9,04	12,0	14,1	16,0	18,5	20,3
8	1,34	1,65	2,18	2,73	3,49	5,07	7,34	10,2	13,4	15,5	17,5	20,1	22,0
9	1,73	2,09	2,70	3,33	4,17	5,9	8,34	11,4	14,7	16,9	19,0	21,7	23,6
10	2,16	2,56	3,25	3,94	4,87	6,74	9,34	12,5	16,0	18,3	20,5	23,2	25,2
11	2,60	3,05	3,82	4,57	5,58	7,58	10,3	13,7	17,3	19,7	21,9	24,7	26,8
12	3,07	3,57	4,40	5,23	6,30	8,44	11,3	14,8	18,5	21,0	23,3	26,2	28,3
13	3,57	4,11	5,01	5,89	7,04	9,3	12,3	16,0	19,8	22,4	24,7	27,7	29,8
14	4,07	4,66	5,63	6,57	7,79	10,2	13,3	17,1	21,1	23,7	26,1	29,1	31,3
15	4,60	5,23	6,26	7,26	8,55	11,0	14,3	18,2	22,3	25,0	27,5	30,6	32,8
16	5,14	5,81	6,91	7,96	9,31	11,9	15,3	19,4	23,5	26,3	28,8	32,0	34,3
17	5,70	6,41	7,56	8,67	10,1	12,8	16,3	20,5	24,8	27,6	30,2	33,4	35,7
18	6,26	7,01	8,23	9,39	10,9	13,7	17,3	21,6	26,0	28,9	31,5	34,8	37,2
19	6,84	7,63	8,91	10,1	11,7	14,6	18,3	22,7	27,2	30,1	32,9	36,2	38,6
20	7,43	8,26	9,59	10,9	12,4	15,5	19,3	23,8	28,4	31,4	34,2	37,6	40,0
21	8,03	8,90	10,3	11,6	13,2	16,3	20,3	24,9	29,6	32,7	35,5	38,9	41,4
22	8,64	9,54	11,0	12,3	14,0	17,2	21,3	26,0	30,8	33,9	36,8	40,3	42,8
23	9,26	10,2	11,7	13,1	14,8	18,1	22,3	27,1	32,0	35,2	38,1	41,6	44,2
24	9,89	10,9	12,4	13,8	15,7	19,0	23,3	28,2	33,2	36,4	39,4	43,0	45,6
25	10,5	11,5	13,1	14,6	16,5	19,9	24,3	29,3	34,4	37,7	40,6	44,3	46,9
26	11,2	12,2	13,8	15,4	17,3	20,8	25,3	30,4	35,6	38,9	41,9	45,6	48,3
27	11,8	12,9	14,6	16,2	18,1	21,7	26,3	31,5	36,7	40,1	43,2	47,0	49,6
28	12,5	13,6	15,3	16,9	18,9	22,7	27,3	32,6	37,9	41,3	44,5	48,3	51,0
29	13,1	14,3	16,0	17,7	19,8	23,6	28,3	33,7	39,1	42,6	45,7	49,6	52,3
30	13,8	15,0	16,8	18,5	20,6	24,5	29,3	34,8	40,3	43,8	47,0	50,9	53,7
α	0,005	0,010	0,025	0,05	0,10	0,25	0,50	0,75	0,90	0,95	0,975	0,99	0,995
N	Nivel de confianza												

Tabla T.3 Puntos Críticos de la Distribución Q de Dixon.

N	Nivel de confianza					
	80%	90%	95%	96%	98%	99%
α	0,20	0,10	0,05	0,04	0,02	0,01
3	0,886	0,941	0,970	0,976	0,988	0,994
4	0,679	0,765	0,829	0,846	0,889	0,926
5	0,557	0,642	0,710	0,729	0,780	0,821
6	0,482	0,560	0,625	0,644	0,698	0,740
7	0,434	0,507	0,568	0,586	0,637	0,680
8	0,399	0,468	0,526	0,543	0,590	0,634
9	0,370	0,437	0,493	0,510	0,555	0,598
10	0,349	0,412	0,466	0,483	0,527	0,568
11	0,332	0,392	0,444	0,460	0,502	0,542
12	0,318	0,376	0,426	0,441	0,482	0,522
13	0,305	0,361	0,410	0,425	0,465	0,503
14	0,294	0,349	0,396	0,411	0,450	0,488
15	0,285	0,338	0,384	0,399	0,438	0,475
16	0,277	0,329	0,374	0,388	0,426	0,463
17	0,269	0,320	0,365	0,379	0,416	0,452
18	0,263	0,313	0,356	0,370	0,407	0,442
19	0,258	0,306	0,349	0,363	0,398	0,433
20	0,252	0,300	0,342	0,356	0,391	0,425
21	0,247	0,295	0,337	0,350	0,384	0,418
22	0,242	0,290	0,331	0,344	0,378	0,411
23	0,238	0,285	0,326	0,338	0,372	0,404
24	0,234	0,281	0,321	0,333	0,367	0,399
25	0,230	0,277	0,317	0,329	0,362	0,393
26	0,227	0,273	0,312	0,324	0,357	0,388
27	0,224	0,269	0,308	0,320	0,353	0,384
28	0,220	0,266	0,305	0,316	0,349	0,380
29	0,218	0,263	0,301	0,312	0,345	0,376
30	0,215	0,260	0,298	0,309	0,341	0,372
α	0,20	0,10	0,05	0,04	0,02	0,01
N	Nivel de confianza					

