



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

ILIANA DEL CARMEN BARRERA MARTÍNEZ

Maestra en Ciencias en Bioprocesos

MODELACIÓN METABÓLICA DE COMPUESTOS DE RESERVA DE *Saccharomyces cerevisiae*

Dirigida por

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

México, D. F., diciembre de 2010



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 1 del mes de diciembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis de grado titulada:

"Modelación metabólica de compuestos de reserva de *Saccharomyces cerevisiae*"

presentada por la alumna:

Barrera
Apellido paterno

Martínez
materno

Iliana del Carmen
nombre

Con registro:

A	0	7	0	5	3	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de: Doctor en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

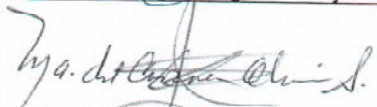
Director de tesis


Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas


Dr. Enrique Durán Páramo



Dr. Edgar Salgado Manjarrez


Dr. Luis Carlos Fernández Linares


Dra. María del Carmen Oliver Salvador

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Edgar Salgado Manjarrez


 INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
 UNIDAD PROFESIONAL
 INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGIA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
 POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

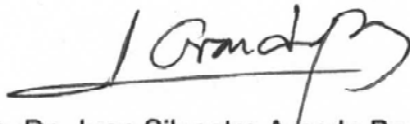
En la ciudad de México D. F., el día 3 del mes Diciembre del año 2010, la que suscribe Iliana del Carmen Barrera Martínez alumna de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos con número de registro A070537, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la Dirección del Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas y cede los derechos del trabajo intitulado Modelación metabólica de compuestos de reserva de *Saccharomyces cerevisiae*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ilianabm@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. en C. Iliana del Carmen Barrera Martínez

Declaración de originalidad

“Yo Iliana del Carmen Barrera Martínez declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



Vo. Bo. Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas.

Capítulo 1 Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE CUADROS	5
RESUMEN GENERAL	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES GENERALES	5
JUSTIFICACIÓN	10
OBJETIVOS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
Capítulo 1 : Modelo metabólico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la producción de biomasa y etanol en un cultivo por lote alimentado.	12
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Material biológico y medios de cultivo	14
Estrategia de cultivo	14
Técnicas analíticas	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Producción de biomasa y bioetanol en cultivos por lote alimentado	21
Análisis de velocidades de reacción para la producción de bioetanol con una descripción de caja negra.	23
Distribución de flujos metabólicos de la red simplificada en <i>S. cerevisiae</i>	25
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS	30
Capítulo 2 Modelo metabólico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la acumulación de trehalosa y glucógeno en un cultivo continuo.	33
RESUMEN	33
INTRODUCCIÓN	34
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Material biológico y medios de cultivo	37

Estrategia de cultivo	37
Técnicas analíticas	39
Tratamiento matemático	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	60
RECOMENDACIONES GENERALES	63
ANEXO	64
NOMENCLATURA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1 Ruta metabólica simplificada de *S. cerevisiae* en cultivos para producir biomasa y etanol. Los flujos molares de las diferentes concentraciones de glucosa (27.25, 38.5, y 50.01 g/L) son referidos a una velocidad de consumo (100%).19
- Figura 1.2 Concentraciones experimentales medidas de biomasa producida (●), glucosa residual (□), amonio consumido (+) y etanol producido (○) en cultivos lote alimentado con diferentes concentraciones de glucosa suministrada (g/L): (a) 27.25, (b) 38.5, y (c) 50.01. Concentraciones estimadas a partir de la ecuación 6 (—), los puntos en la gráfica de etanol representa la concentración del metabolito estimados con la descripción de caja negra (—) con su correspondiente error (·····), y valores encontrados con el análisis de flujos metabólicos (— —).22
- Figura 1.3 Coeficiente respiratorio (RQ) en cultivos de levadura. Datos experimentales (—) y estimados a partir del análisis de caja negra de velocidades de reacción (●). Media de los valores estimados (—). Los círculos corresponden a los errores de RQ calculados a partir del análisis de redundancia.....23
- Figura 1.4 Coeficientes de transferencia de oxígeno estimado (—) y medido (●) para cultivos en lote alimentado.....24
- Figura 1.5 Comparación de flujos metabólicos en las rutas oxidativas y respiratorias en cultivos lote alimentado de levadura con diferentes concentraciones en la corriente de alimentación: (●) 27.25, (□) 38.5, y (◆) 50.01 g/L.27
- Figura 2.1 Ruta metabólica simplificada de *S. cerevisiae* de la síntesis de los compuestos de reserva y protección. Los flujos molares en condiciones no limitantes (A) y en ausencia de nitrógeno (B) son referidos a una velocidad de consumo (100%).....41
- Figura 2.2 Concentraciones experimentales medidas de biomasa producida (●,), y glucosa residual (■,◇) en los cultivos continuos en condiciones no limitantes.45
- Figura 2.3 (a) Concentraciones experimentales medidas de biomasa producida (●, ■), glucosa residual (◇,), en los cultivos continuo en ausencia de nitrógeno.46
- Figura 2.4 Comparación de flujos metabólicos (a) glicolisis, (b) ruta de las pentosas fosfato, (c) Ciclo de Krebs, (d) metabolismo energético y (e) síntesis de

aminoácidos y proteínas en cultivos continuo de levadura en condiciones no limitantes y en ausencia de fuente de nitrógeno (AFN)58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Rendimientos de producción de biomasa y etanol obtenidos en el cultivo lote alimentado con diferentes concentraciones de glucosa	21
Cuadro 1.2. Estequiometría simplificada de la conversión de glucosa a biomasa y etanol por <i>S. cerevisiae</i>	26
Cuadro 2.1. Composición de medio de cultivo PDA.....	37
Cuadro 2.2. Composición de medio de cultivo complejo para la fase de preinóculo	37
Cuadro 2.3 Composición de medio sintético para la fase de inóculo, cultivo en lote y cultivo continuo	38
Cuadro 2.4. Estequiometría simplificada de la conversión de glucosa a biomasa y a compuestos del metabolismo energético.....	48
Cuadro 2.5 Velocidades medidas (q_m) en condiciones no limitantes y en ausencia de nitrógeno	55
Cuadro 2.6 Velocidades calculadas (q_c) de la ruta metabólica propuesta para la síntesis de compuestos de reserva y protección	55

RESUMEN GENERAL

El cultivar *Saccharomyces cerevisiae* para aplicaciones en la industria alimentaria o para la producción de bioetanol como biocombustible, presenta aún importantes retos tecnológicos como un proceso de la industria biotecnológica. La concentración final de trehalosa y glucógeno en las células es utilizada como parámetro de calidad en la industria alimentaria. Además se asocia a estos dos compuestos la capacidad de la levadura a sobrevivir en condiciones adversas de crecimiento, tales como ambientes oxidativos, altas osmolaridades, limitación de nutrientes, temperaturas elevadas y presencia de sustancias tóxicas.

La modelación metabólica del metabolismo celular aplicado en la producción de biológicos regularmente mejora rendimientos, sin embargo para aplicaciones industriales el modelo debe ser lo más simple posible con el fin de lograr que sea técnicamente útil y viable. En el primer capítulo se describe un análisis entre una descripción de caja negra y una red metabólica simplificada. En el segundo capítulo se describe la obtención de un modelo metabólico a partir de un análisis de flujo metabólico en una red metabólica simplificada que permita predecir la concentración de trehalosa y glucógeno en *Saccharomyces cerevisiae*. En ambos casos se tomaron en cuenta las principales reacciones involucradas en el crecimiento de la levadura y la síntesis de estos compuestos (bioetanol, trehalosa y glucógeno) y, se llevó a cabo un análisis riguroso de las velocidades de reacción permitiendo la estimación de la concentración de etanol producido en cultivos por lote alimentado, y la acumulación de trehalosa y glucógeno en cultivos continuos.

Se interpretó el estado fisiológico de la levadura en cultivos por lote alimentado a diferentes concentraciones de glucosa alimentada mediante un análisis estequiométrico asociado a la ruta metabólica simplificada. Los resultados confirman que el aumento en las velocidades de consumo de glucosa, controlados principalmente por su concentración en la corriente de alimentación, produce una regulación en el catabolismo reductivo por lo que la excreción de etanol se incrementó. La producción de la biomasa recae normalmente del catabolismo oxidativo, que es controlado por las velocidades de consumo de la glucosa y oxígeno. Por lo tanto la producción de biomasa o etanol depende del estado fisiológico de la levadura en el cultivo, que puede ser inferido a partir de un apropiado balance de flujos metabólicos.

Por otro lado, se logró interpretar el estado fisiológico de la levadura en cultivos continuos en presencia y ausencia de una fuente nitrogenada un análisis estequiométrico asociado a la ruta metabólica simplificada. Los resultados confirman que la ausencia de nitrógeno en el cultivo incrementa la velocidad de síntesis de trehalosa y la de consumo de glucógeno, activándose al metabolismo de reserva y protección de *S. cerevisiae*, ante la ausencia de un nutriente esencial en el medio de cultivo. Por lo tanto la concentración de trehalosa y glucógeno en la célula depende del estado fisiológico de la levadura en el cultivo, que puede ser inferido a partir de un apropiado balance de flujos metabólicos.

ABSTRACT

Growing *Saccharomyces cerevisiae* for applications in the food industry or to produce ethanol as a biofuel, still has important techno-economic challenges as a process of the biotechnology industry. The final concentration of trehalose and glycogen in cells is used as a benchmark for quality in the food industry. Also associated with these two compounds the ability of yeast to survive in adverse growing conditions such as oxidative environment, high osmolarity, nutrient limitation, high temperature and presence of toxic substances. Metabolic modeling of cellular metabolism applied in the production of biological usually improves performance, but for industrial applications, the model should be as simple as possible in order to make it useful and technically feasible. In the first chapter describes an analysis from a description of black box and a simplified metabolic network. The second chapter describes the production of a metabolic model based on an analysis of metabolic flux in a simplified metabolic network to predict the concentration of trehalose and glycogen in *Saccharomyces cerevisiae*. In both cases it took into account the main reactions involved in the growth of yeast and the synthesis of these compounds (ethanol, trehalose and glycogen), and took out a rigorous analysis of the reaction rates allowing the estimation of the concentration of ethanol produced in fed-batch cultures and the accumulation of trehalose and glycogen in continuous culture.

We interpreted the physiological state of yeast in fed-batch cultures at different concentrations of glucose fed by a stoichiometric analysis associated with the simplified pathway. The results confirm that the increase in the rates of glucose uptake, mainly controlled by the concentration in the feed stream, produces a reductive catabolism regulation so that the excretion of ethanol increased. Biomass production is associated to oxidative catabolism, which is controlled by the speed of consumption of glucose and oxygen. Therefore the biomass or ethanol production depends on the physiological state of yeast culture, which can be inferred from a proper balance of metabolic fluxes.

On the other hand, it was possible to interpret the physiological state of yeast in continuous culture in the presence and absence of a nitrogen source stoichiometric analysis associated with the simplified pathway. The results confirm that the absence of nitrogen in the crop increases the rate of synthesis of trehalose and glycogen consumption, activating the metabolism of reserve and protection of *S. cerevisiae*, in the absence of an essential nutrient in the culture medium. Therefore the concentration of trehalose and glycogen in the cell depends on the physiological state of yeast culture, which can be inferred from a proper balance of metabolic fluxes.

INTRODUCCIÓN

Entre los microorganismos más estudiados se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Debido a su gran versatilidad metabólica y relativa facilidad de manejo en laboratorio, *S. cerevisiae* es utilizada como modelo para la descripción matemática de crecimiento celular y producción de metabolitos. También ha sido empleada en biología molecular para el estudio de modificaciones genéticas y como vector para transformaciones en otros organismos. Por otra parte, es usada en numerosos bioprocesos para la obtención de metabolitos y de biomasa utilizada como insumo para otros procesos de la industria alimentaria.

El inminente agotamiento de combustibles fósiles y los problemas ambientales que conllevan su uso, ha obligado a la humanidad a buscar fuentes alternativas de energía, siendo las renovables las de mayor interés. Dentro de estas destaca el etanol, producido por vía fermentativa. Tradicionalmente se utiliza a *S. cerevisiae* para dicho fin, sin embargo existen ciertos factores técnicos y metabólicos que deben ser mejorados para que la producción de etanol sea económicamente viable. Como ejemplo de estos se encuentra la utilización de subproductos agroindustriales como sustrato, mejorar el rendimiento de transformación de sustrato-etanol e incrementar la tolerancia a altas concentraciones de etanol por parte de la levadura.

Uno de los usos más conocidos de *S. cerevisiae* es en la industria de la panificación como agente leudante para esponjar la masa antes del horneado. Para este propósito la levadura es comercializada en dos formas: como pasta comprimida o como polvo seco, en cualquiera de las dos presentaciones la levadura debe mantenerse viable.

Se han reportado que la viabilidad, tolerancia a altas concentraciones de metabolitos tóxicos y crecimiento en condiciones adversas de crecimiento está relacionada a dos sustancias de reserva energética y protección: la trehalosa y el glucógeno.

Una de las estrategias propuestas para estudiar y mejorar los bioprocesos es la ingeniería metabólica, cuyo objetivo es mejorar la formación de un producto o propiedades celulares a través de la modificación de una reacción o reacciones bioquímicas específicas, o la introducción de nuevas con el uso de técnicas de biología molecular. Para lograrlo se deben estudiar las rutas metabólicas involucradas utilizando análisis de reacciones bioquímicas desde el punto de vista estequiométrico y energético. Una vez que se

concluye el punto anterior, es posible simplificarlas con el uso de algoritmos y englobarlas en un modelo matemático. Éste podrá ser utilizado para encontrar los puntos clave para optimizar el proceso y obtener mejores productos. En ocasiones, sólo es necesario modificar las condiciones ambientales de cultivo y en otras se deben realizar modificaciones genéticas al organismo en cuestión.

Aún cuando se ha identificado que la trehalosa y el glucógeno son importantes para la levadura, solo se reportan estudios acerca de la biosíntesis y acumulación de estos compuestos. Hasta ahora la generación de modelos matemáticos de la acumulación de las sustancias de reserva de *S. cerevisiae* ha sido poco estudiada.

Esto abre la posibilidad del estudio de la acumulación y biosíntesis de las sustancias de reserva utilizando la ingeniería metabólica para proponer un modelo matemático y un protocolo de producción de *S. cerevisiae* con una aplicación potencial en la industria de la panificación.

ANTECEDENTES GENERALES

Saccharomyces cerevisiae es una levadura, clasificada como hongo ascomiceto o basidiomiceto que se reproduce vegetativamente por gemación o fusión y en una forma asexual (Walker, 2000).

Es un microorganismo diplótico con una alta reproducción clonal. También es homotálico, lo que le confiere la posibilidad de regenerar una célula diploide de una haploide (renovación genómica). Este mecanismo puede ser el responsable de que se encuentren cepas homocigóticas en un alto porcentaje (28%), sobre todo en aquellas que provienen de viñedos. Muchos estudios indican que las cepas que provienen de viñedos, cervecerías o para panificación presentan aneuploidia, lo que se piensa puede ser una respuesta de la levadura para adaptarse a varios ambientes por medio de la modificación en el número de genes involucrados en este proceso. Además, se ha observado una alta incidencia de polimorfismo cariotípico especialmente en levadura de viñedos, resultado de varios mecanismos como son la recombinación mitótica o ectópica (Legras, et al., 2007).

Por otro lado *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo eucariótico más ampliamente estudiado, lo que ha ayudado en gran medida a entender la biología de las células eucarióticas y por lo tanto de la biología humana. Ha sido utilizada desde hace siglos en la producción de alimentos y bebidas alcohólicas (Ostergaard, et al., 2000). Se conoce el uso de *S. cerevisiae* para producir bebidas fermentadas desde el año de 7000 AC en China, en Irán y Egipto en 6000 AC y 3000 AC respectivamente, extendiéndose su uso para dicho fin a otras partes del mundo (Legras, et al., 2007).

En años recientes su uso se ha extendido a diferentes procesos en la industria farmacéutica. Además es un organismo muy atractivo para trabajar ya que no es patógeno y cuenta con una larga historia de aplicaciones en la producción de productos de consumo, como el etanol y la levadura de panificación, además ha sido clasificada como organismo GRAS (generalmente reconocido como seguro). Otra razón por la cual es una levadura utilizada en biotecnología en su susceptibilidad a modificaciones genéticas por tecnología DNA recombinante, lo que facilitó la secuenciación completa de su genoma, publicado en 1996 (Ostergaard, et al., 2000).

Una de las áreas de aplicación de *S. cerevisiae* ha tenido mayor relevancia en los últimos años es en la producción de bioetanol. Esto, debido a que gran número de países están intentando depender menos de los combustibles fósiles, despertando un gran interés en la producción de biocombustibles a partir de recursos renovables. El etanol sirve como un combustible líquido, y su producción vía fermentación usando subproductos de la agroindustria es viable técnica y económicamente hablando. En países como Brasil y Estados Unidos ya se utiliza el bioetanol como combustible para medios de transporte terrestre. Los principales sustratos para la producción de etanol son caña de azúcar, maíz y otros granos.

Sin embargo, mientras la producción de bioetanol en Brasil compite exitosamente con combustibles fósiles en Brasil, en otros países no es económicamente viable. Además el uso exclusivo de almidón o azúcar como sustrato contenido en la biomasa, genera (i) una competencia entre la producción de bioetanol y la producción de alimentos y (ii) un costo de producción ineficiente. Para evitar esto se debe de utilizar la biomasa completa, o mejor aún utilizar subproductos de la agroindustria. Tradicionalmente *S. cerevisiae* ha sido usada para la producción de etanol, por lo que se están haciendo importantes esfuerzos por mejorar la comprensión de este proceso. Las principales líneas de estudio son: a) procesos clásicos utilizando almidón o azúcar como sustrato inicial, b) utilización de sustratos biomasa lignocelulósica y c) incrementar la eficiencia de bioconversión de azúcar-etanol y la tolerancia al etanol de *S. cerevisiae* (Nevoigt, 2008).

La sobrevivencia y conservación de las funciones metabólicas de la levadura en condiciones adversas de crecimiento y almacenamiento, tal como tolerancia a altas concentraciones de etanol, están estrechamente relacionadas con el contenido intracelular de compuestos de reserva y protección: trehalosa y glucógeno. La trehalosa es un azúcar no reductor (disacárido) encontrado en bacterias, microorganismos eucarióticos, plantas, insectos e invertebrados. Ha sido estudiada en *S. cerevisiae*, donde se ha encontrado que estabiliza proteínas y membranas bajo una variedad de condiciones ambientales desfavorables (incluyendo incremento de temperatura, presión hidrostática, desecación, limitación de nutrientes, ambientes oxidativos y exposición a químicos tóxicos) También es importante para regular el flujo de glucosa durante la respuesta celular en condiciones adversas. Debido a las propiedades de estabilizar moléculas, suave sabor dulce, alta solubilidad y ser poco higroscópica, la trehalosa se ha vuelto un

importante objetivo en la biotecnología, donde es utilizada para la fabricación de alimentos, protección de vacunas en climas cálidos y productos cosméticos.

La glucosa 6 fosfato (G6P) es la clave del metabolismo de los azúcares en *S. cerevisiae*. En condiciones normales de crecimiento la levadura utiliza 2/3 partes para la glicolisis, 10% es para el ciclo de las pentosas, 20% es usado en la conversión reversible de glucosa 1 fosfato (G1P) y una pequeña cantidad es usada para la producción de trehalosa 6 fosfato (T6P) y otras rutas (Nevoigt, 2008).

La trehalosa (α -d-glucopiranosil α -d-glocopiranosido o α - α -1,1-diglucoosa) se produce en un proceso multietapa, donde el sustrato es la glucosa. La glucosa es convertida en glucosa-6-fosfato (G6P), que junto con la glucosa uridin fosfato (UDPG), llevan a cabo la formación de la trehalosa-6-fosfato (T6F) y subsecuentemente la trehalosa. Esta última se puede dividir en dos moléculas de glucosa, cerrando así el ciclo de la trehalosa: (2) glucosa \rightarrow G6P + UDPG \rightarrow T6P \rightarrow Trehalosa \rightarrow (2)glucosa.

En condiciones fisiológicas normales y una temperatura aproximada de 25°C, la trehalosa y la T6P se encuentran en concentraciones bajas. La glucosa es utilizada principalmente para glicólisis y cualquier exceso es almacenado en forma de glucógeno, que también se forma a partir de UDPG, pero es un carbohidrato energéticamente superior a la trehalosa.

Cuando la temperatura aumenta aproximadamente a 37°C la actividad de la T6P sintasa y la T6P fosfatasa se incrementa y la cantidad de trehalosa puede aumentar a 500 mM o 1g/g proteína.

Sin embargo la excesiva acumulación de la trehalosa no aumenta la supervivencia de la célula, la rápida movilización y remoción del disacárido es crítica para una exitosa recuperación de la levadura después de haber sido sometida a un incremento de temperatura. La T6P en altas concentraciones resulta tóxica para *S. cerevisiae* y la trehalosa en altas concentraciones impiden el redoblamiento de las proteínas que son parcialmente desnaturalizadas durante las etapas adversas de crecimiento (Voit, 2003).

El glucógeno es un α -1,4-glucono con ramificaciones α -1,6 similares a los del almidón, pero con más bifurcaciones. La síntesis y degradación del glucógeno está controlada por factores ambientales. Su biosíntesis se ve afectada por la glucógeno sintetasa que cataliza uniones secuenciales de glucosa proveniente de glucosa-UDP a un polisacárido

aceptor de uniones lineales α -1,4. La formación de las ramificaciones α -1,6 es función de enzimas ramificadoras. Cuando del suministro de nutrientes esenciales se limita, la levadura acumula glucógeno. La utilización del glucógeno almacenado contribuye al mantenimiento del metabolismo de la levadura, ya que suministra el ATP necesario para conservar la viabilidad celular. No obstante que la degradación del glucógeno esta mediada por la enzima glucógeno fosforilasa, se sabe que el AMP cíclico está relacionado con el control de la degradación del polisacárido. El rompimiento de glucógeno está acompañado con la formación de esteroides, que son esenciales para la viabilidad celular y capacidad fermentativa (Francois, et al., 2001).

La ingeniería metabólica ha sido desarrollada para optimizar procesos biocatalíticos con células a través de la introducción de cambios genéticos o metabólicos dirigidos. Involucra técnicas de biología molecular y métodos de análisis de la ingeniería de reacciones químicas. La aplicación de la ingeniería metabólica comienza con un análisis de la función celular, basada en los resultados de este análisis se diseñan cepas mejoradas y subsecuentemente se construyen con ingeniería genética. Simultáneamente se determinan las condiciones ambientales que propician la producción del conjunto enzimático para conducir el metabolismo hacia la obtención del producto requerido. Algunos de los campos en los que más ha incidido la ingeniería metabólica son: (1) producción de proteínas heterólogas, (2) extensión de la gama de sustratos, (3) rutas metabólicas para nuevos productos, (4) rutas metabólicas para la degradación de xenobióticos, (5) mejoras en la fisiología celular total (6) eliminación o reducción de la formación de subproductos y (7) mejoras de los rendimientos o productividad (Nielsen, 2001).

En el caso particular de *Saccharomyces cerevisiae*, la ingeniería metabólica tiene por objetivo redireccionar intencionalmente los flujos metabólicos, que juegan un papel importante en el mejoramiento de cepas de levadura para su aplicación industrial. En contraste con los métodos clásicos de ingeniería genética donde el mejoramiento de cepas se realiza por medio de mutación, hibridación y entrecruzamiento; la ingeniería metabólica confiere dos ventajas: (i) la modificación directa de cepas evitando la acumulación desfavorable de mutaciones y (ii) la introducción de genes de otros organismos para generar cepas de *S. cerevisiae* con nuevos rasgos. De esta manera se pueden ofrecer a la industria biotecnológica cepas de levadura capaces de crecer en

diferentes de medios de cultivo (biomasa lignocelulósica) y/o producir compuestos no formados convencionalmente por *S. cerevisiae* (Nevoigt, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Saccharomyces cerevisiae es una levadura con múltiples aplicaciones en el área de alimentos, farmacia, ambiental y biología molecular donde es utilizada como organismo modelo en estudios de crecimiento celular y producción de metabolitos. A pesar del extendido uso, su producción para algunas de estas aplicaciones se lleva a cabo de manera empírica o artesanal. Por esta razón la calidad final del producto no es consistente. Además no permite determinar cuáles son las etapas críticas del proceso, lo que hace difícil proponer mejoras al mismo.

Por otro lado, se ha demostrado que la levadura acumula durante su crecimiento trehalosa y glucógeno. Estos compuestos de reserva son útiles para mantenerse viable aún después de su acondicionamiento para venta y uso posterior. Esta característica es importante en la levadura que se utiliza en la industria de la panificación. Sin embargo, los protocolos de producción existentes pueden ser mejorados introduciendo bases técnicas para producir *Saccharomyces cerevisiae* con determinada cantidad de compuestos de reserva.

Lo que se pretende realizar en esta tesis es un análisis metabólico de las rutas biosintéticas de *Saccharomyces cerevisiae* involucradas en la acumulación de compuestos de reserva. Una vez concluido el análisis se propone un modelo matemático que permita predecir la concentración de trehalosa y glucógeno que tendrá la levadura en curso de cultivo. A partir del modelo y el análisis metabólico se haría posible el planteamiento de un protocolo de producción que permita obtener levadura para panificación con la cantidad adecuada de trehalosa y glucógeno. Esto redundaría en la fabricación de un producto con calidad consistente y mejores cualidades para su uso final.

Además, el conocimiento logrado con el análisis metabólico y el modelo matemático acerca de las rutas biosintéticas de *Saccharomyces cerevisiae*, podrán ser utilizados como una base científica para la mejorar la producción de otros metabolitos de interés económico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Generar un modelo metabólico de compuesto de reserva de *Saccharomyces cerevisiae*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar las velocidades de reacción involucradas en la síntesis de trehalosa y glucógeno en *Saccharomyces cerevisiae*
- Estudiar el control de la biosíntesis de la trehalosa y el glucógeno en *Saccharomyces cerevisiae*
- Proponer un modelo de la síntesis de la trehalosa y glucógeno en *Saccharomyces cerevisiae*
- Verificar experimentalmente el modelo propuesto de la síntesis de trehalosa y glucógeno en *Saccharomyces cerevisiae*

Capítulo 1 : Modelo metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de biomasa y etanol en un cultivo por lote alimentado.

RESUMEN

El cultivar *Saccharomyces cerevisiae* para aplicaciones en la industria alimentaria o para la producción de bioetanol como biocombustible, presenta aún importantes retos tecnológicos como un proceso de la industria biotecnológica. La modelación metabólica del metabolismo celular aplicado en la producción de biológicos regularmente mejora rendimientos, sin embargo para aplicaciones industriales el modelo debe ser lo más simple posible con el fin de lograr que sea técnicamente útil y viable. En este capítulo se describe un análisis entre una descripción de caja negra y una red metabólica simplificada tomando en cuenta las principales reacciones involucradas en el crecimiento de la levadura y la producción de bioetanol.

En ambos casos, se llevó a cabo un análisis riguroso de las velocidades de reacción permitiendo la estimación de la concentración de etanol producido en cultivos por lote alimentado, aunque los resultados obtenidos con un análisis de flujo metabólico muestran mayor exactitud.

Además, se logró interpretar el estado fisiológico de la levadura en cultivos por lote alimentado a diferentes concentraciones de glucosa alimentada mediante un análisis estequiométrico asociado a la ruta metabólica simplificada. Los resultados confirman que el aumento en las velocidades de consumo de glucosa, controlados principalmente por la su concentración en la corriente de alimentación, produce una regulación en el catabolismo reductivo por lo que la excreción de etanol se incrementó. La producción de la biomasa recae normalmente del catabolismo oxidativo, que es controlado por las velocidades de consumo de la glucosa y oxígeno. Por lo tanto la producción de biomasa o etanol depende del estado fisiológico de la levadura en el cultivo, que puede ser inferido a partir de un apropiado balance de flujos metabólicos.

Palabras clave: bioetanol, biomasa, balance de flujos metabólicos, modelo estequiométrico, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente explotada para la conversión a nivel industrial de carbohidratos de caña de azúcar y otros subproductos de la agroindustria (biomasa vegetal) a biomasa microbiana, que es utilizada como materia prima para numerosos procesos de la industria alimentaria (*Jorgensen, et al., 2002*), y los bioalcoholes para ser usados como solventes, combustibles o químicos básicos (*Antoni, et al., 2007*). Una de las estrategias utilizadas para alcanzar el rendimiento óptimo en la producción de biomasa de levadura es someter al microorganismo a condiciones adversas de crecimiento en cultivos lote alimentado (*Cannizzaro, et al., 2007*), mientras que el proceso de producción de etanol como biocombustible se encuentra aún en investigación con el fin de hacerlo económicamente viable (*Kwiatkowski, et al., 2006; Hahn-Kowski, et al., 2006*) sin afectar el suministro global de alimentos (*Hill, et al., 2005*). Una manera racional de alcanzar este objetivo es la modelación matemática de procesos de producción. La producción de biomasa y de bioetanol ha sido mejorada técnicamente hablando en el pasado aplicando estrategias de modelación (*Cannizzaro, et al., 2007; Wong, et al., 2010*), porque los modelos matemáticos son útiles para entender, predecir y controlar o incluso diseñar la producción en sistemas biológicos (*Wu, et al., 2008*). Sin duda un modelo matemático formal de producción de biomasa o etanol debe incluir las rutas bioquímicas centrales del metabolismo del carbono, como son la glicolisis, el ciclo de los ácido tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa. Se reportan contribuciones importantes de la modelación restringida basada en el paradigma de modelos restringidos (PMR) considerando rutas metabólicas a gran escala basadas en genomas anotados (*Princen, et al., 2004; Mahadevan, et al., 2005; Hjersted, et al., 2007; Bro, et al., 2006; Shiyuta, et al., 2007*), pero para aplicaciones industriales se requieren modelos tan simples como sean posibles, donde se involucren un número reducido de reacciones bioquímicas. Algunos avances en cuanto a estas reacciones condensadas han arrojado resultados interesantes acerca de la condición fisiológica celular, comportamiento cinético o del funcionamiento global del proceso con diferentes sistemas microbiológicos (*Burgard, et al., 2001; Aranda, et al., 2010*). Se ha utilizado un modelo simple de balance de flujos metabólicos (BFM) para estudiar la regulación transciente del metabolismo central del carbono en *S. cerevisiae* (*Herwig, et al., 2002*), pero no se ha hecho énfasis en la producción de bioetanol o biomasa en cultivos. Por tanto, la integración de flujos

metabólicos para la producción explícita de biomasa asociada a la fosforilación oxidativa, y a la producción de etanol en el metabolismo reductivo, fue el objeto de estudio en este capítulo con la intención de generar un modelo de una ruta metabólica simplificada para estimar la producción de etanol y biomasa en un proceso de producción en lote alimentado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y medios de cultivo

Se cultivó una cepa comercial de *S. cerevisiae* en un medio de cultivo con la siguiente composición (g/L): 7.0, CaCl₂ 2H₂O 0.25, NaCl 0.5, MgCl₂ 6H₂O 6.0, adicionado con soluciones de vitaminas y minerales (10 mL/L de cada una) las cuales tenían la siguiente composición, solución de minerales: FeSO₄ 7H₂O (278 mg), ZnSO₄ 7H₂O (288 mg), CuSO₄ 5H₂O (7.5 mg), Na₂MoO₄ 2H₂O (25 mg), MnSO₄ H₂O (169 mg) disueltas en 500 mL de agua con ayuda de unas gotas de H₂SO₄ con el fin de disolver las sales de Fe, solución de vitaminas (500ml): biotina (1.5 mg), pantotenato de calcio (20 mg) inositol (125 mg) piridoxina-HCl (25 mg) y tiamina-HCl (50 mg). Se alimentaron soluciones de glucosa para los diferentes experimentos a las siguientes concentraciones (g/L) 27.25, 38.5, 50.0. El pH del cultivo fue controlado adicionando una solución de amonio (20% v/v), siendo la única fuente de nitrógeno. Las condiciones experimentales del cultivo fueron: 30 °C, pH 5.0, flujo de aire 450 L/h, y oxígeno disuelto 10% del valor de saturación (0.8 mg/L).

Estrategia de cultivo

Se utilizó un bioreactor de 15 L para los cultivos en lote alimentado, el cual fue inoculado con levadura a una concentración de 3.0×10^6 cel/mL: El volumen inicial del biorreactor era de 6 L y la alimentación inició a las 12 h. El flujo de entrada de la solución de glucosa se mantuvo en 0.4 L/h con el fin de mantener la concentración de glucosa cercana a cero dentro del biorreactor ($S \approx 0$), y favorecer la conversión de sustrato.

Planteando un balance de masa para un compuesto z en un biorreactor con un cultivo por lote alimentado:

$$\frac{dz}{dt} = D(z_F - z) \pm q_z \quad (1.1)$$

Se puede reorganizar para estimar la velocidad de volumétrica a partir de las concentraciones medidas, como:

$$q_z = D(z_F - z) \pm \frac{dz}{dt} \quad (1.2)$$

El segundo término del lado derecho de la ecuación (1.2) tiende a cero conforme se va alcanzando un estado estacionario, pero la importancia de éste es que depende de la sustancia z y del tiempo t . Por lo tanto, para las condiciones experimentales en las que la concentración del sustrato es $S \approx 0$, se establece un estado pseudo-estacionario donde ($dS/dt = 0$), y la velocidad de consumo de glucosa está dada por:

$$q_s = -DS_F \quad (1.3)$$

cuando la velocidad volumétrica de crecimiento es lenta, la manera más adecuada de calcularla es:

$$q_x = \frac{dx}{dt} + DX \quad (1.4)$$

o para un intervalo infinito de tiempo:

$$q_x = \frac{\Delta x}{\Delta t} + D\bar{X} \quad (1.5)$$

La ecuación (1.5) también es útil para estimar la velocidad volumétrica de producción de etanol y de consumo de amonio, aunque no se debe de tomar en cuenta el término de la dilución porque el amonio es consumido instantáneamente después de que se adiciona. Se puede hacer una estimación muy acertada de la concentración de la biomasa en el medio líquido en cualquier instante en el cultivo si la tasa específica de crecimiento μ se mantiene aproximadamente constante:

$$X_{i+1} = X_i + \mu\bar{X}\Delta t \quad (1.6)$$

La velocidad de consumo de oxígeno puede ser estimada cuando la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido es mínima ($C_{O_2} \approx 0$) utilizando la siguiente expresión:

$$q_{O_2} = -k_L a \cdot C_{O_2}^* \quad (1.7)$$

El coeficiente de transferencia de masa fue medido teórica y experimentalmente con una correlación empírica (Moresi y Patete, 1998) y con el método dinámico (Merchuk, et al., 1989; Scargiali, et al., 2010), respectivamente.

Técnicas analíticas

Se tomaron muestras cada 2 horas para realizar análisis cuantitativos. La concentración de la biomasa fue evaluada con una correlación empírica entre el peso seco y la densidad óptica a 620 nm (Boeco S-22, Hamburgo, Alemania). La muestra se centrifugó por 5 minutos a 5000 rpm (Sol-BAT, Puebla, México), las concentraciones de glucosa, amonio y etanol fueron determinadas en el sobrenadante. La glucosa y amonio por técnicas espectrofotométricas (método del DNS y método de Nessler), mientras que las concentraciones de bioetanol fueron medidas por medio de HPLC (TSP Spectra system, San Jose California, EUA) con una columna Aminex HPX-87 (Bio-Rad, Hercules California, EUA) a 40 °C, 1200 psi y un flujo de fase móvil 0.4 mL/min (H₂SO₄ 5.0 mM). A partir de estas mediciones experimentales, las velocidades volumétricas de producción de etanol y de consumo de amonio, necesarias para un análisis de redundancia, fueron fácilmente evaluadas. La composición del gas de salida fue medida continuamente usando un analizador paramagnético de oxígeno (Servomex 570/571, Houston Texas, EUA) y un analizador infrarrojo de dióxido de carbono (Servomex 1410, Houston Texas, EUA) conectado a una microcomputadora, por lo que el coeficiente respiratorio experimental fue calculado a partir de estos datos.

Tratamiento matemático

Se puede representar un cultivo aerobio de *S. cerevisiae* con glucosa (CH₂O), amonio (NH₃) y oxígeno disuelto como sustratos (O₂) con una descripción de caja negra, como sigue:



Los productos principales de la reacción son biomasa (CH_{1.8}O_{0.58}N_{0.16}) y etanol (CH₃O_{0.5}). El vector de las velocidades volumétricas de reacción asociadas a la ecuación (1.8):

$$\mathbf{q} = [q_s \ q_{NH_3} \ q_{O_2} \ q_X \ q_E \ q_{CO_2} \ q_{H_2O}] \quad (1.9)$$

La descripción cinética del crecimiento aerobio y la producción de etanol, como se representa en la ecuación (1.8) se consigue cuando se conocen los valores numéricos de las velocidades de reacción durante el proceso del cultivo microbiano. El análisis de

reacción consiste en medir alguna de las velocidades del vector \mathbf{q} de acuerdo a los grados de libertad (D_F) asociados a la descripción cinética, y calcular en resto de las velocidades no medidas. Los grados de libertad son (Nielsen y Villadsen, 1994):

$$D_F = ns + np + 1 - ne = 3 + 3 + 1 - 4 = 3 \quad (1.10)$$

Lo que significa que se deben de medir al menos tres velocidades de reacción para poder calcular las cuatro restantes. Las velocidades de reacción elegidas para ser medidas (\mathbf{q}_m): q_S , q_X y q_{O_2} , por lo tanto el vector \mathbf{q} se puede dividir en:

$$\mathbf{q} = [\mathbf{q}_m \ \mathbf{q}_c]^T \quad \text{con} \quad \mathbf{q}_m = [q_S \ q_{O_2} \ q_X]^T \quad \text{y} \quad \mathbf{q}_c = [q_{NH_3} \ q_E \ q_{CO_2} \ q_{H_2O}]^T \quad (1.11)$$

En donde \mathbf{q}_c es un subvector de las velocidades de reacción calculables. Considerando \mathbf{E} como una matriz elemental, esta puede ser planteada de acuerdo a la ley de la conservación de la materia (Nielsen y Villadsen, 1994; Soto-Cruz y Páez-Lerma, 2005) como:

$$\mathbf{E}\mathbf{q} = \mathbf{0} \quad (1.12)$$

La estructura de la matriz \mathbf{E} para la producción de biomasa en la ecuación (8) es:

$$\mathbf{E} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 2 & 3 & 0 & 1.82 & 3 & 0 & 2 \\ 1 & 0 & 2 & 0.58 & 0.5 & 2 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0.16 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (1.13)$$

La matriz \mathbf{E} puede dividirse en:

$$\mathbf{E}_m = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 \\ 2 & 1.82 & 0 \\ 1 & 0.58 & 2 \\ 0 & 0.16 & 0 \end{pmatrix}$$

y

$$\mathbf{E}_c = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 1 & 0 \\ 3 & 3 & 0 & 2 \\ 0 & 0.5 & 2 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (1.14)$$

De acuerdo a la partición mostrada en la ecuación en las ecuaciones (1.11) y (1.14), la ecuación (1.12) puede ser reescrita como:

$$E\mathbf{q} = E_m\mathbf{q}_m + E_c\mathbf{q}_c = 0 \quad (1.15)$$

donde las velocidades calculables \mathbf{q}_c son (Nielsen y Villadsen, 1994):

$$\mathbf{q}_c = -[E_c^{-1}E_m]\mathbf{q}_m \quad (1.16)$$

Se dice que el sistema esta sobredeterminado cuando el número de velocidades medidas es mayor a D_F , entonces se puede llevar a cabo un análisis de redundancia. Este análisis permite estimar el error bruto de las mediciones experimentales. La matriz redundancia está dada por (van der Heijden, et al., 1994):

$$R = E_m - E_c[E_c^T E_c]^{-1} E_c^T E_m \quad (1.17)$$

De donde la matriz redundancia reducida \mathbf{R}_r está definida por la eliminación de las filas dependientes en \mathbf{R} . Considerando \mathbf{q}_m como las velocidades medidas y sus correspondientes valores verdaderos \mathbf{q}_{mt} , puede ser recalculado como:

$$\mathbf{q}_m = \mathbf{q}_{mt} + \delta \quad (1.18)$$

donde δ es el vector de los errores de medición, que puede ser calculado de (van der Heijden, et al., 1994; Nielsen y Villadsen, 1994):

$$\delta = F\mathbf{R}_r^T P^{-1} \mathbf{R}_r \mathbf{q}_m \quad (1.19)$$

Donde F es la matriz varianza-covarianza, y P esta dado por (Stephanopoulos, et al., 1998):

$$P = \mathbf{R}_r F \mathbf{R}_r^T \quad (1.20)$$

Así, a través de la estimación exacta de \mathbf{q}_E y \mathbf{q}_{NH_3} a partir de los datos experimentales con la ecuación (1.5), se calculan los errores para \mathbf{q}_m .

Una descripción más detallada de los procesos involucrados en el crecimiento aeróbico y la excreción del etanol es obtenida por balance de flujo metabólico (BFM). En este acercamiento (Llaneras y Pico, 2008), se considera una descripción de las rutas bioquímicas involucradas para la producción global de biomasa o etanol para evaluar el rendimiento del proceso. Dicha ruta metabólica condensada se presenta en la figura 1.1. Las velocidades volumétricas \mathbf{q} dependen de la velocidad específica de reacción \mathbf{r}_j para cada reacción bioquímica en la ruta metabólica de acuerdo a (Nielsen y Villadsen, 1994):

$$q = T^T r_X \quad (1.21)$$

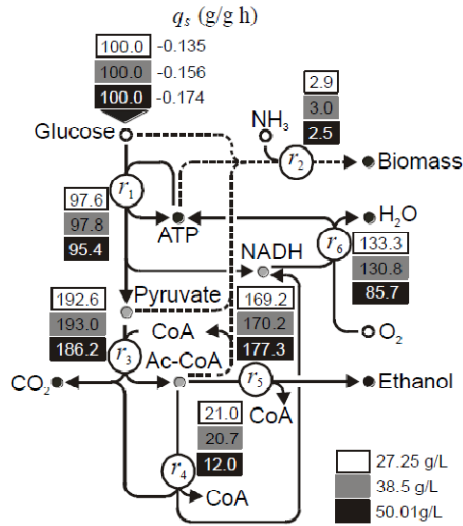


Figura 1.1 Ruta metabólica simplificada de *S. cerevisiae* en cultivos para producir biomasa y etanol. Los flujos molares de las diferentes concentraciones de glucosa (27.25, 38.5, y 50.01 g/L) son referidos a una velocidad de consumo (100%).

Donde T^T es la transpuesta de la matriz estequiométrica total. La ecuación (1.21) es conveniente particionada de manera similar a la ecuación (1.14) como sigue:

$$\begin{pmatrix} q_m \\ q_c \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} T_1 & T_2 \\ T_3 & T_4 \\ T_5 & T_6 \end{bmatrix} \begin{pmatrix} r_m X \\ r_c X \end{pmatrix} \quad (1.22)$$

Los vectores r_m y r_c son los flujos metabólicos desconocidos en la red. De la ecuación (1.22) es fácil ver que:

$$q_m = T_1 r_m X + T_2 r_c X \quad (1.23)$$

$$q_c = T_3 r_m X + T_4 r_c X \quad (1.24)$$

y

$$0 = T_5 r_m + T_4 r_c \quad (1.25)$$

La ecuación (1.25) representa el llamado estado pseudo-estacionario en CMP (Llaneras y Pico, 2008). Combinando las ecuaciones 1.23-1.25, los flujos desconocidos r_m y r_c pueden ser calculados como lo indica la ecuación (1.26):

$$r_m X = A_m q_m, \text{ entonces } \begin{bmatrix} r_6 \\ r_5 \\ r_4 \end{bmatrix} X = A_m \begin{bmatrix} q_s \\ q_x \\ q_{O_2} \end{bmatrix}, \text{ con}$$

$$A_m = [T_1 - T_2 T_6^{-1} T_5]^{-1} = \begin{bmatrix} 0 & 0.091 & 0 \\ -1 & -0.091 & 0 \\ 0 & 0.000 & -2 \end{bmatrix} \quad (1.26)$$

$$\text{y } r_c X = A_c q_m, \text{ entonces } \begin{bmatrix} r_3 \\ r_2 \\ r_1 \end{bmatrix} X = A_c \begin{bmatrix} q_s \\ q_x \\ q_{O_2} \end{bmatrix}, \text{ con}$$

$$A_c = -T_6^{-1} T_5 [T_1 - T_2 T_6^{-1} T_5]^{-1} = \begin{bmatrix} -2 & -0.318 & 0.333 \\ 0 & -0.045 & -0.333 \\ -2 & -0.273 & 0.000 \end{bmatrix} \quad (1.27)$$

En esta aproximación BFM, los grados de libertad son:

$$D_F = J - C = 6 - 3 = 3 \quad (1.28)$$

Donde J es el número de reacciones en la ruta metabólica y C es el número de intermediarios en la ruta en estado pseudo-estacionario. De acuerdo con esto, las mediciones de velocidades volumétricas $q_m = [q_s q_x q_{O_2}]^T$ proporciona suficiente información experimental para estimar la distribución de todos flujos metabólicos $r = [r_m r_c]^T$, en el conjunto de reacciones mínimas presentadas en la figura 1.1, las cuales representan los eventos fisiológicos principales durante el crecimiento y producción de etanol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de biomasa y bioetanol en cultivos por lote alimentado

En la figura 1.2 se muestra el comportamiento cinético de la levadura durante el proceso de lote alimentado con diferentes concentraciones de la solución de glucosa alimentada.

De manera general, se observó que el suministro de la solución de glucosa con concentración más alta, generó la concentración más baja de biomasa y la concentración más alta de etanol. Esta tendencia se verificó calculando los rendimientos de biomasa ($Y_{X/S}$) y etanol ($Y_{E/S}$), presentados en el cuadro 1.1.

Cuadro 1.1. Rendimientos de producción de biomasa y etanol obtenidos en el cultivo lote alimentado con diferentes concentraciones de glucosa

Concentración de glucosa alimentada (g/L)	Concentración final de biomasa (g/L)	Concentración final de etanol (g/L)	Rendimiento de biomasa (g/g)	Rendimiento de etanol (g/g)
27.25	12.2	4.7	0.44	0.059
38.5	9.8	5.1	0.42	0.093
50.01	7.2	6.3	0.37	0.11

La concentración de etanol excretado fue la más alta con la concentración más alta de sustrato disponible, aún en condiciones aerobias; lo que significa que el catabolismo reductivo en las células de levadura fue activado en algún grado. Resulta interesante observar que este comportamiento corresponde tanto al valor de RQ medido y estimado en los diferentes procesos lote alimentado (figura 1.3). En el proceso lote donde $S \gg 0$, hay una producción importante de CO_2 de la descarboxilación del piruvato con una producción simultánea de etanol y el máximo consumo de O_2 , por lo que el coeficiente respiratorio es mayor que 1. Si la concentración de glucosa en el medio de cultivo es controlada a través del proceso de alimentación ($S \approx 0$), la producción del CO_2 es estequiométricamente equivalente al consumo de O_2 y $RQ \approx 1$ (Fiechter, et al., 1981). Sin embargo, si la glucosa en la alimentación excede la capacidad respiratoria de la levadura (Cooney, et al., 1977) se observa una ligera tendencia de incremento en el coeficiente respiratorio, comportamiento representado en la figura 1.3. Como consecuencia la concentración de etanol fue alta (figura 1.2). Además hubo una acumulación simultánea

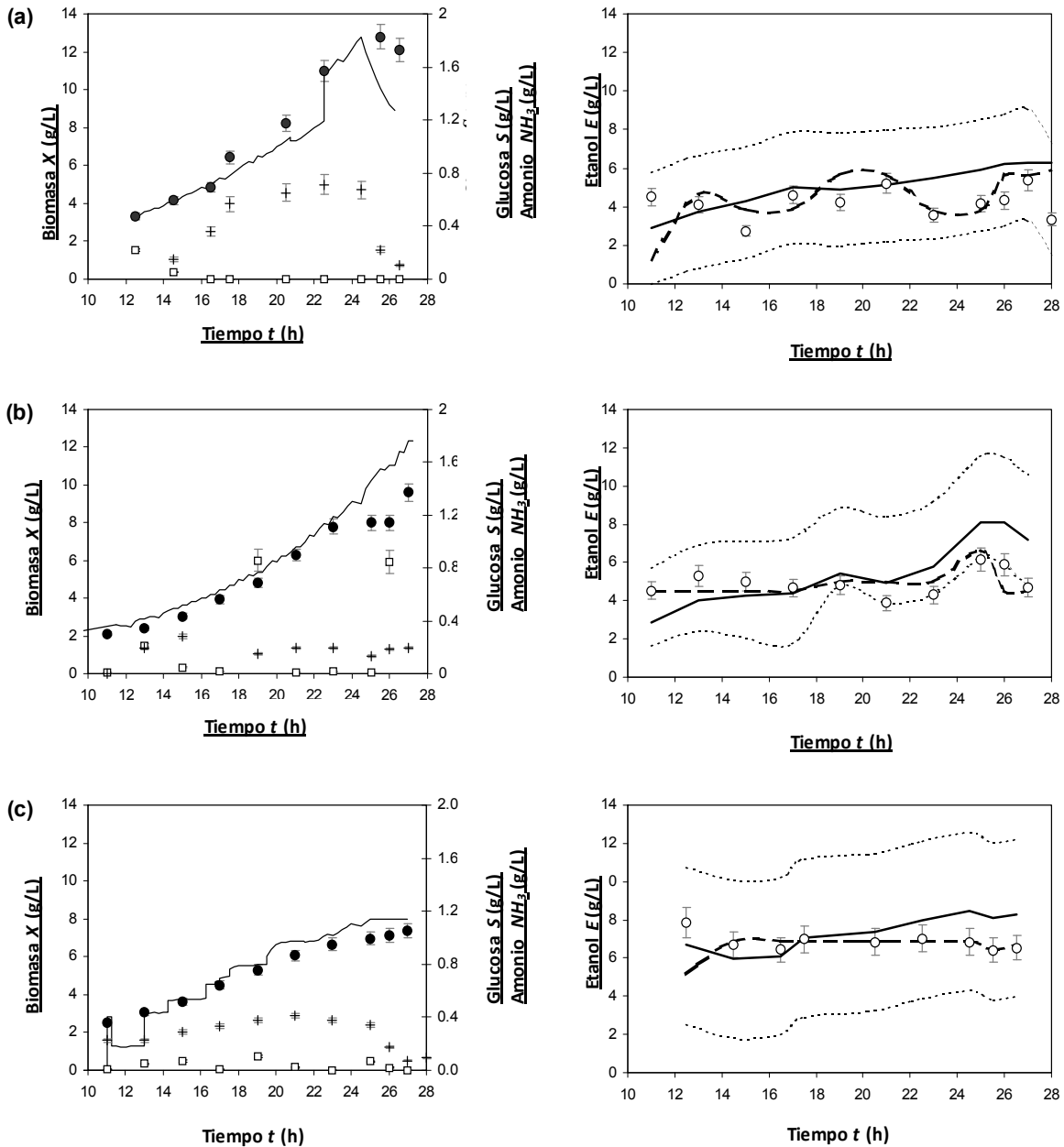


Figura 1.2 Concentraciones experimentales medidas de biomasa producida (●), glucosa residual (□), amonio consumido (+) y etanol producido (○) en cultivos lote alimentado con diferentes concentraciones de glucosa suministrada (g/L): (a) 27.25, (b) 38.5, y (c) 50.01. Concentraciones estimadas a partir de la ecuación 6 (—), los puntos en la gráfica de etanol representa la concentración del metabolito estimados con la descripción de caja negra (—) con su correspondiente error (·····), y valores encontrados con el análisis de flujos metabólicos (— —).

de biomasa y bioetanol, por lo que el metabolismo puede ser controlado para inducir la generación de cualquiera de los dos productos.

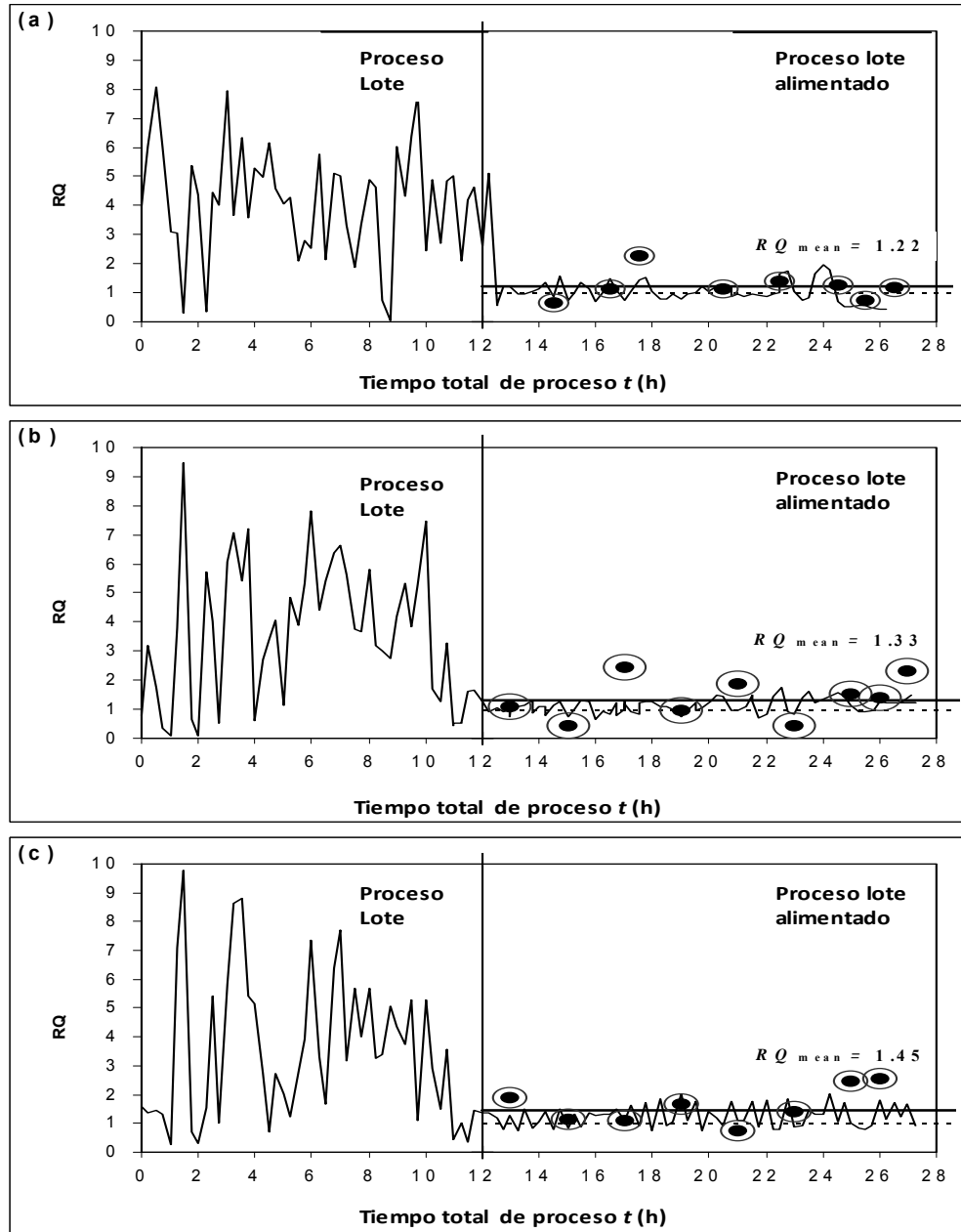


Figura 1.3 Coeficiente respiratorio (RQ) en cultivos de levadura. Datos experimentales (—) y estimados a partir del análisis de caja negra de velocidades de reacción (●). Media de los valores estimados (—). Los círculos corresponden a los errores de RQ calculados a partir del análisis de redundancia.

Análisis de velocidades de reacción para la producción de bioetanol con una descripción de caja negra.

De las concentraciones experimentales de biomasa y glucosa alimentada, se calcularon las velocidades volumétricas instantáneas q_s y q_x usando las ecuaciones 1.3 y 1.5.

Adicionalmente, el coeficiente de transferencia de masa puede ser medido o estimado como una función del flujo de aireación Q_G , y la correlación se muestra en la figura 1.4.

Para el flujo de aire establecido en los experimentos, el $k_L a$ calculado fue 51 h^{-1} de acuerdo a la relación empírica de Moresi y Patete (Moresi y Patete, 1988). A partir de la ecuación 1.7, la velocidad de consumo de oxígeno fue $q_{O_2} = 0.416 \text{ g/Lh}$.

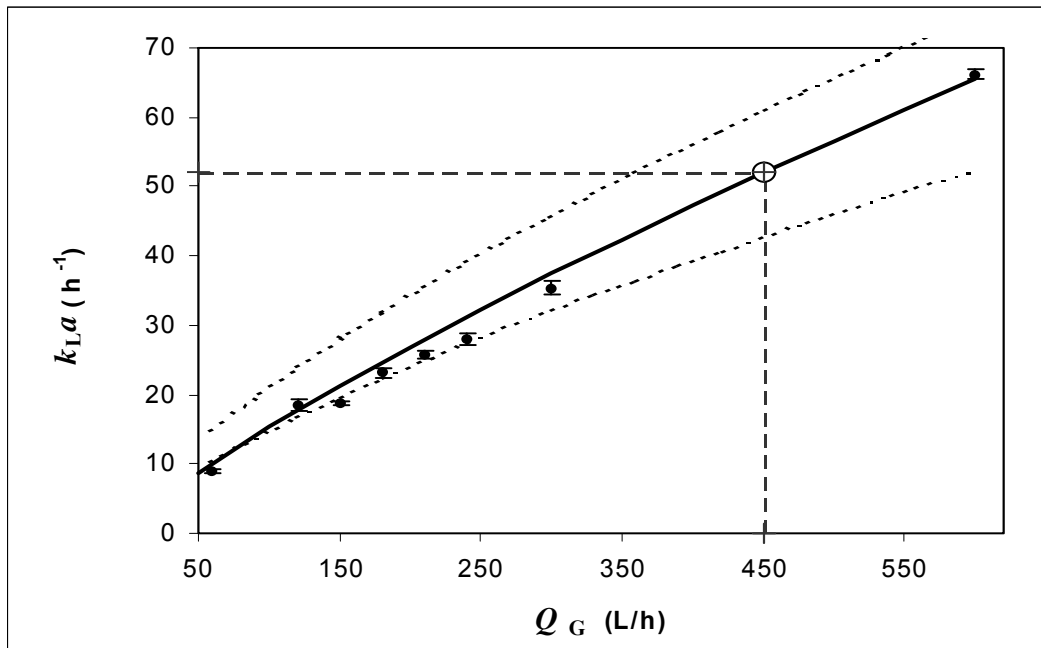


Figura 1.4 Coeficientes de transferencia de oxígeno estimado (—) y medido (●) para cultivos en lote alimentado.

De acuerdo a la descripción de caja negra, las velocidades volumétricas medidas permiten la estimación de la velocidad de producción de etanol q_E durante el cultivo, por lo que las concentraciones de etanol pueden ser estimadas de:

$$E_{i+1} = E_i + q_E \Delta t \quad (1.29)$$

donde es necesario conocer el valor experimental de E_0 para comenzar la estimación de las subsecuentes concentraciones de etanol. Las fronteras de confianza superior e inferior de las concentraciones predichas de etanol fueron obtenidas con el error δ_E obtenido del análisis de redundancia ecuación 1.19:

$$\begin{aligned}
 E_{i+1, sup} &= E_i + (q_E + \delta_E)\Delta t \\
 E_{i+1, inf} &= E_i - (q_E - \delta_E)\Delta t
 \end{aligned}
 \tag{1.30}$$

Como se observa en la gráfica de etanol (figura 1.2), los valores estimados de concentración de este metabolito con caja negra fueron aceptables. No obstante, dichos valores mejoraron sustancialmente cuando se consideraron los eventos metabólicos principales en la conversión de glucosa a biomasa o bioetanol, como se presenta a continuación.

Distribución de flujos metabólicos de la red simplificada en *S. cerevisiae*

En la figura 1.1 se representa una ruta metabólica simplificada que describe el crecimiento celular y la producción de etanol en un proceso lote alimentado. La variable r_1 representa el flujo de glucosa a través de glicolisis hasta piruvato, que es descarboxilado a acetyl-CoA reacción representada por el flujo r_3 . Estos dos intermediarios son convertidos ya sea en etanol (r_5) o incorporado al ciclo de Krebs simplificado mediante el flujo r_4 . Los flujos r_4 y r_5 corresponden respectivamente al catabolismo oxidativo y reductivo en las células de levadura. El flujo metabólico r_6 representa el nivel de la actividad en la cadena respiratoria y la velocidad de oxidación del NAHD, mientras que r_2 indica, de manera condensada la síntesis de biomasa, donde los intermediarios clave son la glucosa, piruvato y acetyl-CoA.

El cuadro 1.2 muestra la estequiometría asociada a esta ruta mínima metabólica. Donde la glucosa suministrada en los cultivos lote alimentada fue controladas para ajustar las condiciones experimentales $S \approx 0$ y lograr que la velocidad específica de crecimiento cambiara gradualmente hasta igualar la tasa de dilución D , por lo que los cultivos lote alimentado se comportarán como cultivos continuos.

Por esta razón, las velocidades volumétricas de producción y consumo en los procesos lote alimentado fueron prácticamente constantes, y las distribuciones de los flujos metabólicos calculados mostrados en la figura 1.1 son consistentes.

Cuadro 1.2. Estequiometría simplificada de la conversión de glucosa a biomasa y etanol por *S. cerevisiae*.

Flujo	Proceso celular	Reacción condensada
r1	Glicolisis	Glucosa + 2H₃PO₄ + 2ADP + 2NAD⁺ → 2Piruvato + 2H₂O + 2ATP + 2NADH $C_6H_{12}O_6 + 2H_3PO_4 + 2C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 2C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2$ → $2C_3H_4O_3 + 2H_2O + 2C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 2[C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+]$
r2	Producción de biomasa	Glucosa + Piruvato + Acetil-CoA + NH₃ + 27.5ATP + 24.1H₂O → Biomasa + CoA + 27.5ADP + 27.5H₃PO₄ $C_6H_{12}O_6 + C_3H_4O_3 + C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + 1.98NH_3 + 27.5C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 24.1H_2O$ $→$ $11CH_{1.78}O_{0.6}N_{0.18} + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + 27.5C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 27.5H_3PO_4$
r3	Descarboxilación de piruvato	Piruvato + CoA + NAD⁺ → Acetil-CoA + CO₂ + NADH $C_3H_4O_3 + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2$ → $C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + CO_2 + [C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+]$
r4	Ciclo de Krebs	Acetil-CoA + 2H₂O + H₃PO₄ + ADP + 4NAD⁺ → 2CO₂ + CoA + ATP + 4NADH $C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + 2H_2O + H_3PO_4 + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 4C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2$ → $2CO_2 + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 4[C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+]$
r5	Producción de etanol	Acetil-CoA + H₃PO₄ + ADP + 2NADH → Etanol + CoA + H₂O + ATP + 2NAD⁺ $C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + H_3PO_4 + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 2[C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+]$ $→$ $C_2H_6O + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + H_2O + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 2C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2$
r6	Cadena respiratoria	3ADP + 3H₃PO₄ + NADH + 0.5O₂ → 3ATP + NAD⁺ + 4H₂O $3C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 3H_3PO_4 + [C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+] + 0.5O_2$ $→$ $3C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 + 4H_2O$

Los flujos metabólicos involucrados en la producción de etanol permiten la estimación de las concentraciones de dicho metabolito, y son mostradas en la figura 1.2. Aquí se observa que los valores predichos mejoran cuando se realiza la estimación considerando la distribución de flujos metabólicos comparados con los obtenidos con el modelo de caja negra, reproduciendo más cercanamente los valores experimentales encontrados.

Se observa en la figura 1.1, que el incremento en la concentración de glucosa en la alimentación provoca que el flujo relativo de producción de biomasa (r_2) decayera, mientras que la excreción de etanol (r_5) se incrementara. Esto puede deberse a que la células presentaron un ajuste metabólico ante el exceso de glucosa en el flujo de alimentación, resultando en una substancial activación del catabolismo reductivo (r_5) que es proporcional al flujo glicolítico (r_1) como se muestra en la figura 1.5b. El catabolismo oxidativo se reduce por las altas concentraciones de glucosa en la alimentación (figura 1.5a). Por lo tanto, la represión catabólica de la oxidación del NADH por glucosa (Gancedo, 1998) fue confirmada. El flujo r_4 correspondiente al ciclo de Krebs, se consideró como la ruta metabólica representativa del catabolismo oxidativo. El flujo metabólico r_4 asociado al ciclo de los ácidos tricarbónicos disminuye de manera importante por el incremento del flujo glicolítico r_1 , efecto observado en la figura 1.5c.

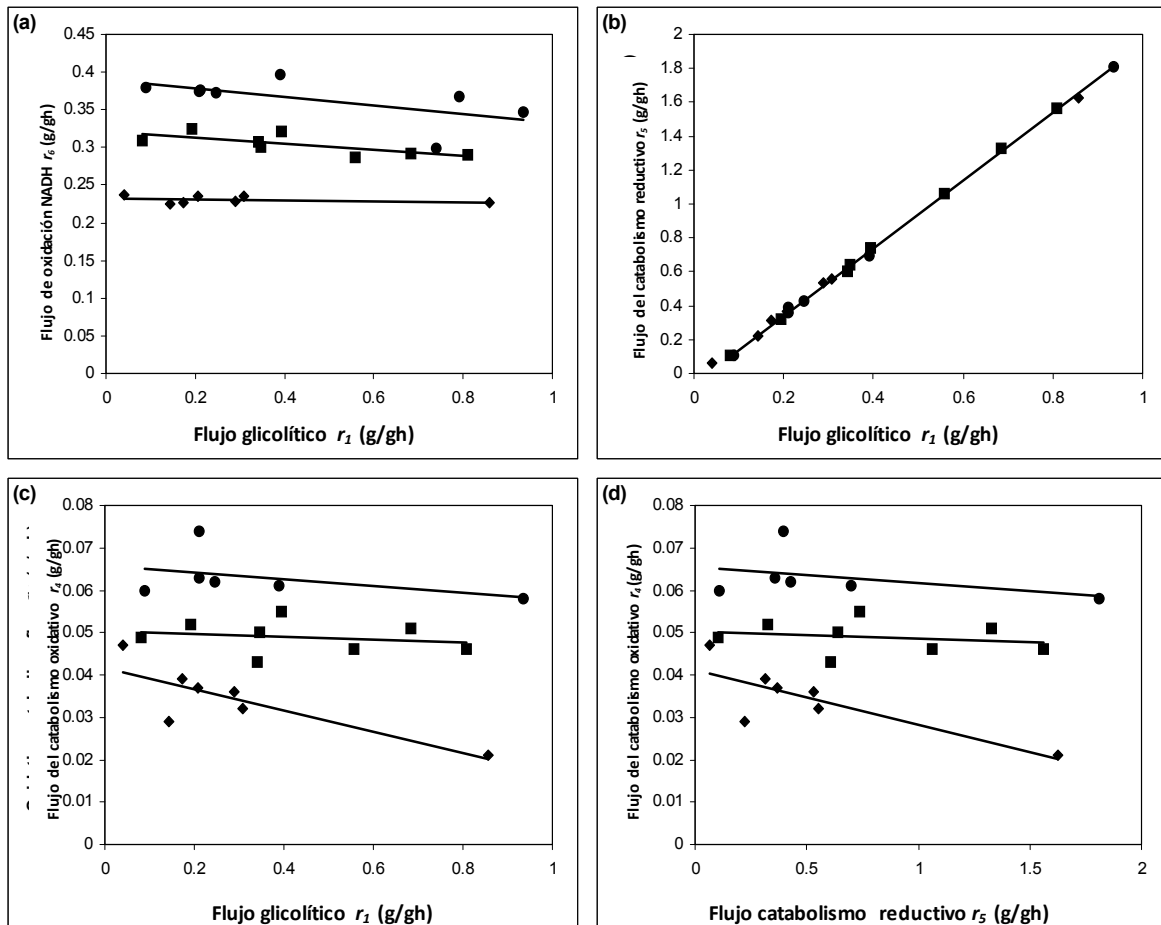


Figura 1.5 Comparación de flujos metabólicos en las rutas oxidativas y respiratorias en cultivos lote alimentado de levadura con diferentes concentraciones en la corriente de alimentación: (●) 27.25, (□) 38.5, y (◆) 50.01 g/L.

Además, cuando el metabolismo reductivo r_5 presenta un incremento en la figura 1.5d, se registró una disminución en el flujo r_4 correspondiente al catabolismo oxidativo. Estos resultados son consistentes con los representados en la figura 1.2, donde la concentración de la biomasa disminuye y la del etanol aumenta como funciones de la glucosa disponible en la alimentación.

En las figuras 1.5a y 1.5c se observa que el catabolismo oxidativo y la oxidación de NADH se incrementaron cuando la concentración de glucosa en la alimentación disminuyó. Este comportamiento es observado claramente en los flujo metabólicos r_4 y r_6 , tal como se representa en la figura 1.5b donde el flujo del catabolismo reductivo (r_5) es proporcional al flujo glicolítico r_1 no importando la concentración de glucosa en el flujo de entrada. Este hecho implica diferentes respuestas fisiológicas entre el catabolismo reductivo y oxidativo en las células de levadura ante un sobreflujo de alimentación.

El incremento del catabolismo reductivo se debió a la activación/inhibición de algunas enzimas existentes en el citoplasma involucradas en la descarboxilación del piruvato y reducción del etanol, por lo que estas enzimas pueden ajustarse ante cualquier variación de la velocidad de consumo de glucosa. En contraste el fenómeno de expresión/represión genética puede estar involucrado en el catabolismo oxidativo porque fueron estimados diferentes flujos en la ruta correspondiente a esta parte del metabolismo para los diferentes niveles de glucosa disponible en el cultivo. Los niveles de glucosa alimentada parecen estar fuertemente involucrados en la fisiología oxidativa de los cultivos aerobios de levadura, y los rendimientos de producción de biomasa y etanol dependen del balance de alimentación de glucosa/etanol.

CONCLUSIONES

Las mediciones experimentales necesarias para calcular la distribución de flujos metabólicos fueron básicamente biomasa acumulada, glucosa y oxígeno consumidos. A partir de estos datos se calcularon las velocidades de consumo de glucosa, el flujo glicolítico, el catabolismo reductivo y oxidativo, y oxidación de NADH a partir del BFM en el proceso de producción de biomasa o bioetanol. La velocidad volumétrica para la biomasa puede ser calculada de las estimaciones de las concentraciones de la biomasa basadas en la velocidad específica de crecimiento (ecuación 1.5), mientras que la velocidad de consumo de glucosa depende de la velocidad de dilución y la concentración de ésta en la alimentación (ecuación 1.2) y la velocidad de consumo de oxígeno depende de la concentración de saturación del O_2 y el coeficiente de transferencia de masa $k_L a$ (ecuación 1.6). Los parámetros necesarios para evaluar estas velocidades volumétricas son regularmente conocidos en los procesos aerobios lote alimentado, por lo que los flujos metabólicos pueden ser fácilmente estimados durante el desarrollo del proceso, lo que representa información valiosa para optimizar procesos de producción de biomasa o etanol con *S. cerevisiae*.

La incorporación de eventos bioquímicos y metabólicos en la evaluación del desarrollo de la producción de biomasa y etanol mejora la estimación de las concentraciones y rendimientos finales del proceso, por lo que el producto principal está incluido en el proceso. Además la estimación de flujos metabólicos para el catabolismo reductivo y oxidativo en las células de levadura es útil para conseguir los rendimientos óptimos en el proceso. Para la producción de etanol, el análisis de BFM también permite hacer predicciones muy precisas de las concentraciones experimentales.

Por lo tanto, el análisis de las velocidades de reacción en una ruta metabólica mínima aporta información importante acerca de la fisiología del cultivo de levadura, por lo que la producción de la biomasa o bioetanol puede ser mejorada ajustando las condiciones experimentales del cultivo lote alimentado. Si el bioetanol es el producto requerido, se debe de establecer una velocidad de alimentación de sustrato alta, mientras que el oxígeno alimentado debe mantenerse en niveles bajos, pero se debe de evitar la anaerobiosis. En el proceso de producción de biomasa, se debe de mantener una estrategia controlada de glucosa alimentada y condiciones totalmente aeróbicas lo que reducirá el sobreflujo a nivel del piruvato, por lo que se maximizara el catabolismo oxidativo asociado a la alta producción de biomasa.

REFERENCIAS

1. Walker, G. M. (2000) *Yeast Physiology and Biotechnology*. Primera edición. Wiley, Inglaterra.
2. Legras, J., Merdinoglu, D, Cortnuet, J., Karst, F. (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*. 16: 2091-2102
3. Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen J. (2000) Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1: 34-50
4. Nevoigt, E. (2008) Progress in metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 3: 379-412
5. Voit, E. (2003) Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *Journal of Theoretical Biology*. 223: 55-78.
6. Francois, J., Parrou, J. (2001) *Reserve carbohydrates in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 25: 125-145
7. Nielsen, J. (2001) Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 263-283.
8. Jørgensen, H., Olsson, L., Rønnow, B., Palmqvist, E. A. (2002) Fed-batch cultivations of baker's yeast followed by a nitrogen or carbon starvation: Effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *App. Microbiol. Biotechnol.* 59: 310-317.
9. Antoni, D., Zverlov, V., Schwarz, W. H. (2007) Biofuels from microbes. *App. Microbiol. Biotechnol.* 22: 23-35.
10. Cannizzaro, C., Valentinotti, S., von Stockar, U. (2004) Control of yeast fed-batch process through regulation of extracellular ethanol concentration. *Bioproc. Biosys. Eng.* 26: 377-383.
11. Kwiatkowski, J. R., McAloon A. J., Taylor F., Johnston, D. B. (2006) Modeling the process and costs of fuel ethanol production by corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products* 23: 288-296.
12. Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., Zacchi, G. (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24: 549-556.

13. Hill, J., Nelson E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffanty, D. (2005) Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11206-11210.
14. Wong, W. Ch., Song, H.-S., Lee, J. H., Ramkrishna, D. (2010) Hybrid cybernetic model-based simulation of continuous production of lignocellulosic ethanol: Rejecting abruptly changing feed conditions. *Contrl. Eng. Pract.* 18: 177-189.
15. Wu, W. H., F. Sh. Wang, and M. Sh. Chang (2008) Dynamic sensitivity analysis of biological systems. *BMC Bioinformatics* 9: 1-17.
16. Pricen, N. D., Reed, J. L., Palsson, B. O. (2004) Genome-scale models of microbial cells: Evaluating the consequences of constraints. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 886-897.
17. Mahadevan, R., Burgard, A. P., Famili, I., van Dien, S., Schilling Ch. H. (2005) Applications of metabolic modelling to drive process development for the production of value-added chemicals. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: 408-417.
18. Hjersted, J. L., Henson, M. A., Mahadevan, R. (2007) Genome-scale analysis of *Saccharomyces cerevisiae* metabolism and ethanol production in fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1190-1204.
19. Bro, Ch., Regenberg, B., Förster, J., Nielsen, J. (2006) *In silico* aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metabolic Eng.* 8: 102-111.
20. Shiyota, S., Shimizu, H., Hirasawa, T., Nagahisa, K., Furusawa, C., Pandey, G., Katakura, Y. (2007) Metabolic pathway recruiting through genome data analysis for industrial application of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Eng. J.* 36: 28-37.
21. Burgard, A. P., Vaidyaraman, S., Maranas, C. D. (2001) Minimal reaction sets for *Escherichia coli* metabolism under different growth requirements and uptake environments. *Biotechnol. Prog.* 17: 791-797.
22. Aranda-Barradas, J. S., Garibay-Orijel, C., Badillo-Corona, J. A., Salgado-Manjarrez E. (2010) A stoichiometric analysis of biological xylitol production. *Biochem. Eng. J.* 50: 1-9.
23. Herwig, Ch., von Stockar, U. (2002) A small metabolic flux model to identify transient metabolic regulations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioproc. Biosys. Eng.* 24:395-403.
24. Merchuk, J. C., Yona, S., Siegel, M. H., Ben Zvi, A. (1989) On the first order approximation to the response of dissolved oxygen electrodes for dynamic k_La estimation. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 1161-1163.

25. Scargiali, F., Busciglio, A., Grisafi, F., Brucato, A. (2010) Simplified dynamic pressure method for k_La measurements in aerated bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 49: 165-172.
26. Moresi, M., Patete, M. (1988) Prediction of k_La in conventional stirred fermenters. *J.Chem. Tech. Biotechnol.* 42: 197-210.
27. Nielsen, J., Villadsen, J. (1994) *Bioreaction Engineering Principles*, pp.100-102. Plenum Press, NY, USA.
28. Soto-Cruz, O., Páez-Lerma, J. (2005) Fermentation process balances: Consistency and metabolic flux analysis. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 4: 59-74.
29. van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C., Luyben, K. (1994) Linear constraint relations in biochemical reaction system: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 11-20.
30. Nielsen, J., Villadsen, J. (1994) *Bioreaction Engineering Principles*, pp.138-141. Plenum Press, NY, USA.
31. Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., Nielsen, J. (1998) *Metabolic Engineering Principles and Methodologies*. pp. 138-139. Academic Press, NY, USA.
32. Llaneras, F., Picó, J. (2008) Stoichiometric modelling of cell metabolism. *J. Biosci. Bioeng.* 105: 1-11.
33. Nielsen, J., Villadsen, J. (1994) *Bioreaction Engineering Principles*, pp.111-116. Plenum Press, NY, USA.
34. Fiechter, A., Furhmann, G. F., Käppeli, O. (1981) Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microbiol. Physiol.* 22: 123-183.
35. Cooney, Ch. L., Wang, H. Y., Wang D. I. C. (1977) Computer-aided baker's yeast fermentations. *Biotech. Bioeng.* 19: 69-86.
36. Gancedo, J. M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.

Capítulo 2 Modelo metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* para la acumulación de trehalosa y glucógeno en un cultivo continuo.

RESUMEN

Saccharomyces cerevisiae es uno de los microorganismos más usados en la industria biotecnológica. Se utiliza principalmente en la industria alimentaria, y para la producción de etanol como biocombustible (uso ampliamente estudiado actualmente). La concentración final de trehalosa y glucógeno en las células es utilizada como parámetro de calidad en la industria alimentaria. Además se asocia a estos dos compuestos la capacidad de la levadura a sobrevivir en condiciones adversas de crecimiento, tales como ambientes oxidativos, altas osmolaridades, limitación de nutrientes, temperaturas elevadas y presencia de sustancias tóxicas. La estimación de la concentración intracelular de estos compuestos es muy importante, sin embargo aún no se ha reportado algún método que prediga la concentración en las células de estas dos sustancias. La modelación metabólica aplicada en el crecimiento de microorganismos regularmente aporta información acerca de la composición celular, no obstante para aplicaciones industriales el modelo debe ser lo más simple posible con el fin de lograr que sea técnicamente útil. En este capítulo se describe la obtención de un modelo metabólico a partir de un análisis de flujo metabólico en una red metabólica simplificada que permita predecir la concentración de trehalosa y glucógeno en *Saccharomyces cerevisiae* considerando las principales reacciones involucradas en el crecimiento de la levadura y la síntesis de estos compuestos.

Se llevó a cabo un análisis riguroso de las velocidades de reacción permitiendo la estimación de la concentración de los llamados compuestos de reserva y protección en cultivos continuos, los resultados obtenidos con el análisis de flujo metabólico son similares los obtenidos experimentalmente.

Además, con base en el análisis de velocidades de reacción, se propone una interpretación del estado fisiológico de la levadura en cultivos continuos en presencia y ausencia de una fuente nitrogenada. Los resultados confirman que la ausencia de nitrógeno en el cultivo incrementa la velocidad de síntesis de trehalosa y la de consumo de glucógeno, activándose al metabolismo de reserva y protección de *S. cerevisiae*, ante la ausencia de un nutriente esencial en el medio de cultivo. Por lo tanto la concentración de trehalosa y glucógeno en la célula depende del estado fisiológico de la levadura en el

cultivo, a su vez condicionado por la disponibilidad de nutrientes, y que puede ser inferido a partir de un apropiado balance de flujos metabólicos.

Palabras clave: trehalosa, glucógeno, balance de flujos metabólicos, modelo estequiométrico, *Saccharomyces cerevisiae*

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de microorganismos en su medio ambiente natural y en muchas aplicaciones industriales es normalmente limitado por la disposición de nutrientes. En estas condiciones la velocidad específica de crecimiento del organismo se determina por la concentración de un solo nutriente. Por ejemplo, en la producción de levadura para panificación el crecimiento está limitado por la fuente de carbono, al tiempo que un cultivo aerobio a velocidades específicas de crecimiento relativamente bajas es esencial para lograr altos rendimientos de biomasa. Por otro lado, en procesos como la producción de cerveza, se necesitan altas concentraciones de azúcares fermentables y limitación por otros nutrientes (oxígeno y nitrógeno). Como resultado el metabolismo activo de la levadura se altera (Boer, et al., 2003).

La levadura para panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) es usada de manera extensiva debido a su capacidad de fermentar principalmente la sacarosa y la maltosa presentes en la masa para generar etanol y dióxido de carbono. La capacidad fermentativa de la levadura, por lo tanto es un parámetro sumamente importante en la producción de levadura para panificación. Otros parámetros importantes son la estabilidad al almacenarse (vida de anaquel), resistencia al congelado-descongelado y a condiciones osmóticas extremas (Hirasawa, et al., 2006). En ocasiones, al final del proceso de producción de la levadura, se someta al microorganismo a limitación de fuente de nitrógeno con el fin de incrementar el contenido de carbohidratos en la célula, lo que conferirá mayor vida de anaquel conservando su capacidad fermentativa. *Saccharomyces cerevisiae* experimenta múltiples cambios intracelulares durante el periodo de limitación de nutrientes, además estos cambios están relacionados a otras condiciones adversas de temperatura y regulación osmótica. Los cambios en el contenido intracelular de dos carbohidratos de reserva (trehalosa y glucógeno) están relacionados con la osmotolerancia, resistencia al congelado-descongelado, a altas temperaturas y a la estabilidad de almacenaje de la levadura (Jorgensen, et al., 2002).

La trehalosa es un azúcar no reductor (disacárido) encontrado en bacterias, microorganismos eucarióticos, plantas, insectos e invertebrados. Ha sido estudiada en *S. cerevisiae*, estabiliza proteínas y membranas bajo una variedad de condiciones ambientales desfavorables (incluyendo incremento de temperatura, presión hidrostática, desecación, limitación de nutrientes, ambientes oxidativos y exposición a químicos tóxicos) (Jules, et al., 2008). También es importante para regular el flujo de glucosa durante la respuesta celular en condiciones adversas (Pérez-Torrado, et al., 2005). Debido a las propiedades de estabilizar moléculas, suave sabor dulce, alta solubilidad y ser poco higroscópica, la trehalosa se ha vuelto un importante objetivo en la biotecnología, donde es utilizada para la fabricación de alimentos, protección de vacunas en climas cálidos y en productos cosméticos (Voit, E, 2003).

El glucógeno es un polisacárido ramificado de alto peso molecular de cadenas lineales de α -(1,4)-glucosil con uniones α -(1,6). Se han realizado números estudios de caracterización bioquímica y molecular del metabolismo de la trehalosa y el glucógeno (Francois y Parrou, 2001).

Además la capacidad fermentativa de la levadura está relacionada con la cantidad y actividad de las enzimas glicolíticas y fermentativas, por lo que es importante producir levadura con alto contenido de proteína. Sin embargo, la relación entre las actividades enzimáticas, capacidades fermentativas y las condiciones de operación durante el proceso de producción aún no ha sido totalmente elucidada (van Hoek et al., 2000).

Por otro lado, el establecimiento de un cultivo en quimiostato hace posible el estudio de las adaptaciones fisiológicas en el estado pseudo-estacionario provocadas por la limitación por un nutriente. El medio que es continuamente alimentado al cultivo puede ser diseñado de tal manera que el crecimiento este limitado por un solo y definido nutriente, mientras que los otros se encuentran en exceso. Durante el cultivo continuo la velocidad de alimentación y de cosecha debe ser la misma, de tal manera que la velocidad de dilución (D) en el estado pseudo-estacionario se iguala a la velocidad específica de crecimiento (μ) (Brauer, J, et al., 2008). Esto ofrece la posibilidad única de estudiar el metabolismo y su regulación a una velocidad específica de crecimiento elegida y constante, bajo condiciones nutricionales estrictamente definidas. Los microorganismos han desarrollado múltiples estrategias para hacer frente a la limitación de nutrientes. Las condiciones limitantes de crecimiento a menudo inducen sistemas de transporte de gran afinidad y/o sistemas metabólicos que permitan una incorporación más eficiente de los

nutrientes. En otros casos, la composición final de la biomasa presenta un contenido reducido del nutriente limitante. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* se ha observado que la composición de los aminoácidos en el conjunto de las enzimas estructurales usadas en la asimilación de azufre, carbono o nitrógeno presenta una reducción del respectivo elemento comparado con el contenido promedio en el proteoma predicho (Boer, et al., 2003).

Para llevar cabo un análisis de flujos metabólicos (AFM) y control metabólico es esencial el análisis de la ruta metabólica en cuestión. Este último es una herramienta útil para el estudio de la parte analítica de la ingeniería metabólica. El AFM es un acercamiento celular global, donde en la red metabólica completa se considera las reacciones intracelulares y los flujos de las ramificaciones de dicha red se cuantifican. La comparación de la distribución de los flujos obtenidos bajo diferentes condiciones fisiológicas puede proporcionar valiosos conocimientos acerca de las interacciones entre diferentes rutas o puede ayudar a identificar el potencial de ciertas reacciones bioquímicas no descubiertas con anterioridad. Por lo tanto el AFM puede ser usado como una estrategia apropiada para la caracterización fisiológica de una cepa, a la que se desea introducir una nueva o alterar sus propiedades (Sainz, et al., 2003). Una de las áreas donde el AFM tiene especial interés es en la mejora de rendimientos y productividad. La modulación de la distribución de flujos alrededor de un punto específico de una ruta requiere el análisis completo de la misma, y es para esto que el AFM es importante. El AFM es por lo general más utilizado donde una gran fracción del carbono es dirigida a producto (metabolitos primarios). Sin embargo, el AFM puede ayudar a entender cómo se producen los metabolitos secundarios o proteínas heterólogas si se relaciona al metabolismo central del carbono a través de sus precursores. El AFM es una herramienta conveniente para realizar mediciones *in vivo* en combinación con el modelamiento cinético proporciona un valioso acercamiento al análisis de rutas metabólicas para mejorar el entendimiento de la dinámica entre los metabolitos extracelulares, intermediarios glicolíticos y metabolitos intracelulares en el metabolismo de la glucosa de *S. cerevisiae* (Ostergaard, et al., 2000, Nolan, et al., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y medios de cultivo

La cepa utilizada para este cultivo se conservó en un tubo inclinado a 4° C con medio PDA. Se utilizó de nueva cuenta una cepa comercial de *S. cerevisiae*.

Cuadro 2.1. Composición de medio de cultivo PDA

	g/L
Almidón de papa	20.0
Dextrosa	2.0
Agar	15.0

pH = 5.6

Se inocularon 4 matraces con 30 mL de medio complejo (ver composición en cuadro 2) con una asada de *Saccharomyces cerevisiae* tomada de un tubo inclinado, se incubó durante 48 horas a 30° C y 250 rpm. Para recuperar la biomasa fue colocado el contenido de los matraces en tubos Falcón estériles de 50 mL, y centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm, luego de lo cual se lavaron las células con agua destilada estéril, repitiendo el proceso dos veces más para eliminar restos del medio complejo.

Cuadro 2.2. Composición de medio de cultivo complejo para la fase de preinóculo

	g/L
Glucosa	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4
KH ₂ PO ₄	5
Extracto de levadura	1

pH = 5

La biomasa recuperada en el paso anterior fue utilizada para inocular 4 matraces con 250 mL de medio sintético (ver composición en cuadro 2.3), incubándose 48 h a 30° C y 250 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular el biorreactor.

Estrategia de cultivo

Se utilizó un biorreactor de 7 litros, para los cultivos continuos el cual fue inoculado con *S. cerevisiae* con una concentración de 3.0×10^4 cel/mL. El volumen inicial del biorreactor era de 5 L y el cultivo continuo se estableció a las 30 h. Las condiciones del cultivo por lote fueron 250 rpm, 5 vvm, 30° C, y el pH se mantuvo en 5 adicionando NaOH 1 N. El cultivo

continuo de mantuvo a 250 rpm, 5 vvm, 30° C, con un flujo de alimentación de sales y glucosa de 2.5 ml/min, respectivamente, y cosecha de 5 mL/min, el pH se mantuvo en 5 mediante la adición de NaOH 1 N.

Cuadro 2.3 Composición de medio sintético para la fase de inóculo, cultivo en lote y cultivo continuo

Etapa	Lote	Cultivo continuo	Inóculo
		g/L	
<i>Glucosa</i>	10	20	20
<i>Sales</i>			
(NH ₄) ₂ SO ₄		15	
MgCl ₂ ·6H ₂ O		6	
KH ₂ PO ₄		7	
NaCl		0.5	
CaCl ₂ ·2H ₂ O		0.25	
Solución de vitaminas		10 mL/L	
Solución de minerales		10 mL/L	

pH = 5

Para activar el metabolismo de compuestos de reserva y protección se eliminó la fuente de nitrógeno, sustituyendo el (NH₄)₂SO₄ por MgSO₄·7H₂O

Para la etapa de cultivo continuo se calculó la concentración de la fuente carbonada estableciendo los siguientes valores:

$$\mu = 0.02 \text{ h}^{-1} \quad (2.1)$$

$$X = 15 \text{ g/L} \quad (2.2)$$

$$Y_{X/S} = 0.5 \text{ g}_x/\text{g}_s \quad (2.3)$$

Se calcula la velocidad de consumo de sustrato que se requiere para lograr la velocidad específica de crecimiento (μ) y el rendimiento ($Y_{X/S}$) planteados:

$$q/X = \mu/ Y_{X/S} = 0.04 \text{ g}_x/\text{g}_s\text{h} \quad (2.4)$$

Para encontrar la concentración de la fuente carbonada requerida, se multiplica la velocidad calculada en (2.4) por la biomasa esperada (2.2):

$$q = (0.04 \text{ g}_x/\text{g}_s\text{h})(15 \text{ g/L}) = 0.01 \text{ g}_s/\text{Lmin}$$

Se estableció un flujo de alimentación y cosecha de 5 mL/min considerando la menor capacidad de bombeo del equipo disponible. Utilizando este flujo y la velocidad de consumo de sustrato (q) se obtuvo una concentración de alimentación de la solución de

glucosa de 10 g/L. Sin embargo el flujo de entrada se dividió para alimentar de manera separada las sales y la fuente de carbono, por lo tanto el flujo de alimentación final fue de 2.5 mL/min y la concentración de glucosa fue de 20 g/L.

Técnicas analíticas

Se tomaron al menos tres muestras del medio de cultivo en el biorreactor por día. El volumen aproximado de cada una fue de 30 mL.

La biomasa se determinó a partir de una correlación empírica entre el peso seco y la densidad óptica medida a 620 nm. La viabilidad de la biomasa se verificó con el método del azul de metileno. La proteína total fue cuantificada utilizando el método de Bradford y el glucógeno por un método enzimático. La trehalosa se determinó por extracción con ácido tricloroacético. La glucosa residual fue medida por el método de azúcares reductores (DNS). El etanol se cuantificó por el método de microdifusión de Conway (Conway, 1957). El nitrógeno inorgánico se midió por el método de Nessler.

A la salida de los gases exhaustos se detectó el porcentaje de CO₂ utilizando un analizador EX 2000 por medición directa de la señal generada por el detector con un amperímetro digital. La intensidad de corriente es convertida a la concentración de CO₂ mediante la expresión:

$$\% \text{CO}_2 = (X_{\text{mADC}} - 4) \cdot 0.3125, \text{ donde } X \text{ es la señal eléctrica medida en miliamperes}$$

Para cuantificar la concentración de oxígeno disuelto se determinó la velocidad de transferencia de oxígeno (V_{TO}) y el coeficiente global de transferencia de masa ($K_L A$) para el biorreactor por el método dinámico.

Este método se basa en registrar la variación de la concentración de oxígeno disuelto (C_L) al pasar de una mínima concentración a una máxima (cercana a C_L^*).

Se construye una gráfica de tiempo contra el logaritmo de las concentraciones de oxígeno disuelto y de acuerdo a la ecuación:

$$\ln (C_L^* - C_{L0}) / (C_L^* - C_L) = K_L A (t - t_0) \quad (2.5)$$

la pendiente de la recta es el coeficiente global de transferencia de masa ($K_L A$)

Basándose en la ecuación:

$$VTO = K_L A (C_L^* - C_L) \quad (2.6)$$

Se determinó la velocidad de transferencia de oxígeno

Tratamientos de muestras

Inactivación

La muestra fue inactivada con ácido perclórico (0.66 M) frío para la posterior determinación de trehalosa. En un tubo Falcón de 15 mL con 5 mL de ácido perclórico frío de añadieron 5 mL de muestra. Se agitó con vortex e inmediatamente después se guardó en congelación.

Ruptura celular

Para cuantificación de proteína total y glucógeno, las muestras fueron sometidas a rupturas con perlas de vidrio de aproximadamente 0.5 mm de diámetro. En un tubo Falcón de 15 mL se colocaron 5.0 mL de perlas y se adicionó un volumen similar de muestra. Se agitó con vortex por un minuto y se enfrió en un baño de hielo, este procedimiento se repitió 3 veces y el volumen final se guardó en congelación.

Sin tratamiento

El resto de la muestra se conservó en un tubo Falcón de 15 mL a -2°C . Ésta fue utilizada para cuantificar glucosa residual, nitrógeno inorgánico por el método de Nessler, sulfatos y etanol. Para realizar estas determinaciones se utilizó sobrenadante proveniente del medio residual de cultivo, obtenido por centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm para eliminar la biomasa.

Tratamiento matemático

Se llevó a cabo un balance de flujos metabólicos descrito en el primer capítulo de esta tesis en la ruta metabólica simplificada que se muestra en la figura 2.1.

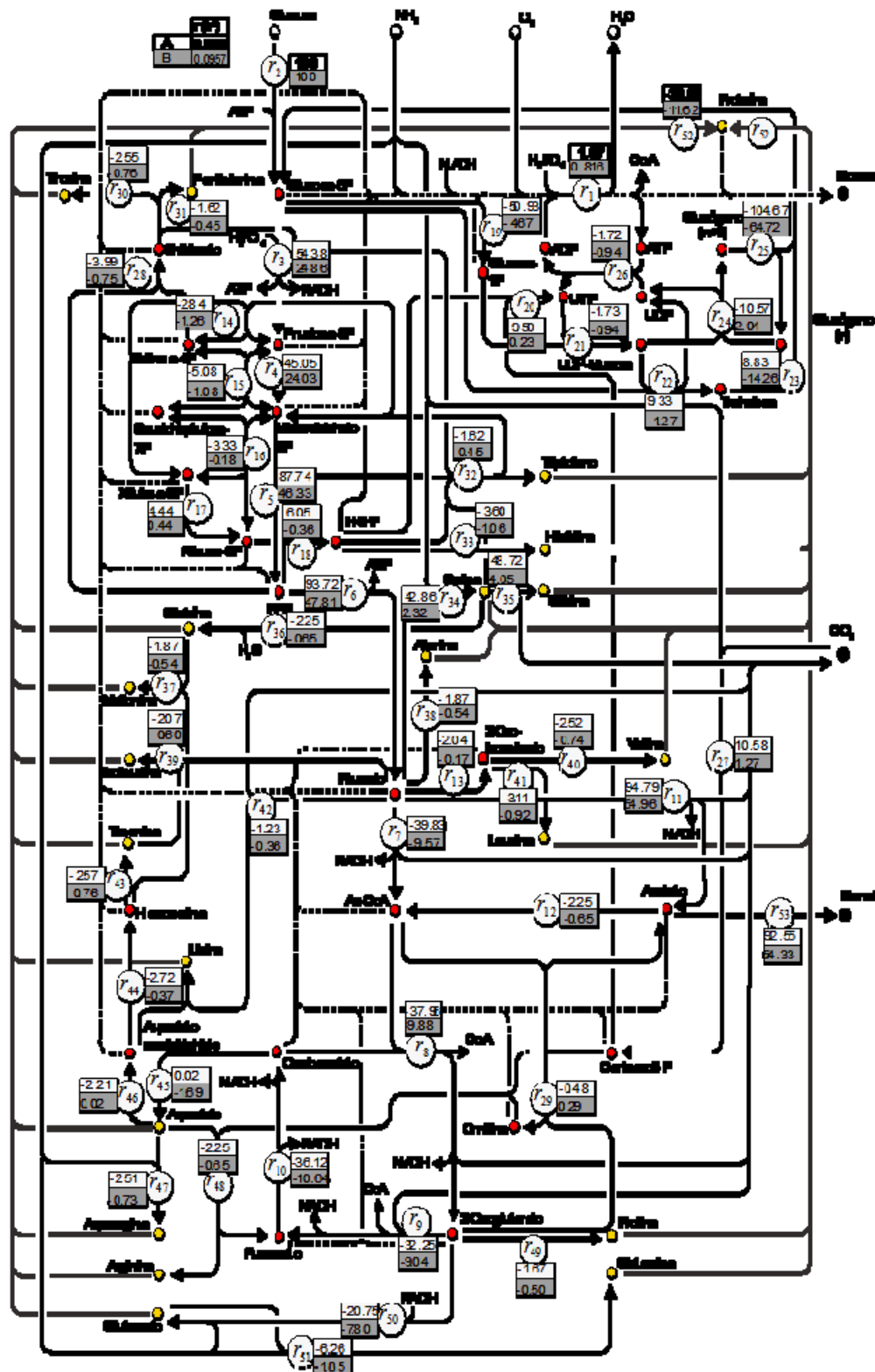


Figura 2.1 Ruta metabólica simplificada de *S. cerevisiae* de la síntesis de los compuestos de reserva y protección. Los flujos molares en condiciones no limitantes (A) y en ausencia de nitrógeno (B) son referidos a una velocidad de consumo (100%).

Para este caso,

$$r_m X = A_m q_m, \text{ entonces } [r_m]X = A_c \begin{bmatrix} q_s \\ q_X \\ q_{CO_2} \\ q_{tre} \\ q_{NH_3} \end{bmatrix}, \text{ con}$$

$$A_m = [T_1 - T_2 T_6^{-1} T_5]^{-1} = \begin{pmatrix} 73.57 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0.729 & 0 & 0 & -4.568 & 2 \\ 6.512 & 0 & 0 & -4.222 & 0 \\ -6.74 & 0.5 & 1 & 3.19 & -1.5 \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

y $r_c X = A_m q_m$, entonces

$$[r_c]X = A_c \begin{bmatrix} q_s \\ q_X \\ q_{CO_2} \\ q_{tre} \\ q_{NH_3} \end{bmatrix},$$

con

$$A_c = -T_6^{-1} T_5 [T_1 - T_2 T_6^{-1} T_5]^{-1} = \begin{pmatrix} -0.1275 & 0.1336 & -0.0668 & -0.0729 & 0.2672 \\ 0.0289 & -0.1484 & 0.0742 & -0.2206 & -0.2967 \\ -0.3448 & 1.1224 & 0.4388 & 0.8737 & 1.2449 \\ 0.2351 & -0.7721 & 0.3861 & -0.5473 & -1.5443 \\ -0.3049 & 0.6554 & 0.1723 & 0.5338 & 1.3109 \\ 0.3312 & -1.1224 & -0.4388 & -0.8737 & -2.2449 \\ 0.2022 & -0.7901 & 0.3951 & -0.6996 & -1.5803 \\ -1.1413 & 2.0950 & -0.0475 & 2.3831 & 4.1900 \\ 0.1969 & -0.8215 & 0.4107 & -0.7160 & -1.6430 \\ 0.0304 & -0.0632 & 0.0316 & -0.0331 & -0.1264 \\ 0.2824 & -0.8476 & 0.4238 & -0.5869 & -1.6953 \\ 0.0254 & -0.3403 & 0.1701 & -0.3211 & -0.6805 \\ 0.0344 & -0.0783 & 0.0392 & -0.0410 & -0.1566 \\ 0.0219 & -0.0313 & 0.0157 & -0.0164 & -0.0627 \\ -0.0136 & 0.0000 & 0.0000 & 0.0000 & 0.0000 \\ -0.0518 & -0.0493 & 0.0247 & -0.1687 & -0.0987 \\ 0.0373 & -0.0895 & 0.0448 & -0.0469 & -0.1790 \\ 0.0083 & -0.0313 & 0.0157 & -0.0164 & -0.0627 \\ -0.0472 & -0.5471 & 0.2735 & 0.4277 & -1.0942 \\ -0.0141 & 0.0321 & -0.0161 & 0.0644 & 0.0642 \\ -1.1330 & 2.0637 & -0.0318 & 2.3667 & 4.1274 \\ -0.6180 & 1.3206 & 0.3397 & 1.1203 & 2.6412 \\ -0.6868 & 1.4772 & 0.2614 & 1.2024 & 2.9545 \\ 0.0339 & -0.0462 & 0.0231 & 0.0234 & -0.0924 \\ 0.0475 & -0.0462 & 0.0231 & 0.0234 & -0.0924 \\ -0.0470 & 0.0141 & -0.0070 & -0.0879 & 0.0282 \\ -0.1081 & 0.0603 & -0.0301 & -0.1113 & 0.1206 \\ -0.0136 & 0.0000 & 0.0000 & 0.0000 & 0.0000 \end{pmatrix} \quad (2.8)$$

Además,

$$q_c = A_{qc}q_m, \text{ entonces } A_{qc}q_m =$$

con

$$\begin{pmatrix} 0.0555 & 0.5158 & -0.2579 & -0.4441 & 1.0315 \\ 0.0089 & -0.0336 & 0.0168 & -0.0176 & -0.0671 \\ 0.0059 & -0.0224 & 0.0112 & -0.0117 & -0.0448 \\ 0.0059 & -0.0224 & 0.0112 & -0.0117 & -0.0448 \\ 0.0775 & 0.4330 & -0.2165 & -0.4875 & 0.8659 \\ 0.1484 & -0.5594 & 0.2797 & -0.2930 & -1.1189 \\ 0.0135 & -0.0509 & 0.0255 & -0.0267 & -0.1018 \\ 0.0234 & -0.0884 & 0.0442 & -0.0463 & -0.1768 \\ 0.0095 & -0.0358 & 0.0179 & -0.0188 & -0.0716 \\ 0.0083 & -0.0313 & 0.0157 & -0.0164 & -0.0627 \\ 0.0070 & -0.0263 & 0.0131 & -0.0138 & -0.0526 \\ 0.0070 & -0.0263 & 0.0131 & -0.0138 & -0.0526 \\ 0.0064 & -0.0241 & 0.0120 & -0.0126 & -0.0481 \\ 0.0117 & -0.0442 & 0.0221 & -0.0231 & -0.0884 \\ 0.0046 & -0.0173 & 0.0087 & -0.0091 & -0.0347 \\ 0.0098 & -0.0369 & 0.0185 & -0.0193 & -0.0738 \\ 0.0486 & -0.0806 & 0.0403 & -0.0422 & -0.1611 \\ 0.0094 & -0.0355 & 0.0178 & -0.0186 & -0.0710 \\ 0.0083 & -0.0313 & 0.0157 & -0.0164 & -0.0627 \\ 0.0077 & -0.0291 & 0.0145 & -0.0152 & -0.0582 \end{pmatrix}$$

$$A_{qc} \begin{bmatrix} q_s \\ q_X \\ q_{CO_2} \\ q_{tre} \\ q_{NH_3} \end{bmatrix},$$

$$A_{qc} = (T_3 - T_4 T_6^{-1} T_5) T_7^{-1} = \begin{pmatrix} 2.7437 & 0 & -0.2111 & -0.1407 & 0.4221 \\ 37.6281 & 0 & 0.1055 & -0.4296 & -0.2111 \\ 72.1231 & 0 & -10.1633 & -14.4422 & 22.3266 \\ 16.9497 & 0 & -2.6884 & -2.1256 & 3.3769 \\ 178.8363 & 0.5000 & -11.8951 & -12.0967 & 22.2902 \\ -49.9950 & 0 & 3.7688 & 2.5126 & -7.5377 \\ -4.4585 & 0 & 0.3430 & 0.2286 & -0.6859 \\ 49.6099 & 0 & -0.4315 & -0.2877 & 0.8631 \\ -3.0000 & 0 & 0.0000 & 1.0000 & 0.0000 \\ 0.7437 & 0 & -0.2111 & 0.8593 & 0.4221 \\ -3.1112 & 0 & 0.2393 & 0.1595 & -0.4786 \\ 1.0000 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1.5188 & 0 & -0.1168 & -0.0779 & 0.2337 \\ -16.9497 & 0 & 2.6884 & 2.1256 & -3.3769 \\ -0.0000 & 0 & -0.0000 & -0.0000 & -0.0000 \\ 334.6244 & 0 & -34.9711 & -46.3141 & 69.9422 \\ -334.6244 & 0 & 34.9711 & 46.3141 & -69.9422 \end{pmatrix} \quad (2.9)$$

En esta aproximación BFM, los grados de libertad son:

$$D_F = J - C = 53 - 48 = 5 \quad (2.10)$$

Donde J es el número de reacciones en la ruta metabólica y C es el número de intermediarios en la ruta en estado pseudo-estacionario. De acuerdo con esto, las

mediciones de velocidades volumétricas $\mathbf{q}_m = [q_s \ q_X \ q_{CO_2} \ q_{tre} \ q_{NH_3}]^T$ proporciona suficiente información experimental para estimar la distribución de todos flujos metabólicos $\mathbf{r} = [\mathbf{r}_m \ \mathbf{r}_c]^T$, en el conjunto de reacciones mínimas presentadas en la figura 1, las cuales representan los eventos fisiológicos principales durante el crecimiento y el metabolismo de reserva y protección.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la construcción de la ruta metabólica simplificada se consultaron bases de datos especializadas en internet (*Brauer, et al., 2008, van Hoek, et al., 2000*) además de literatura de bioquímica y fisiología microbiana (*Moat, et al., 2002; Voet, et al., 2006; Walker, 1998*). Se analizaron todas las reacciones involucradas en la biosíntesis de compuestos de reserva, aminoácidos y crecimiento celular de la levadura. Se planteó una ruta metabólica completa que incluyó las reacciones involucradas en la producción de dichos compuestos.

En la figura 2.1 se presenta la ruta metabólica simplificada que describe el crecimiento celular, el metabolismo de los compuestos de reserva y protección y la biosíntesis de aminoácidos en un proceso de cultivo continuo. La variable r_1 representa el flujo condensado para la producción de la biomasa a partir de glucosa. Las reacciones de la glicolisis se representan de r_2 a r_6 , y r_{19} es una derivación hacia la síntesis de trehalosa y glucógeno. Las reacciones r_7 y r_{11} representan la descarboxilación del piruvato para generar Ac-CoA y acetato respectivamente. Las reacciones del ciclo de Krebs están condensadas en las reacciones r_8 , r_9 y r_{10} , involucrando al oxaloacetato, 2-oxoglutarato y fumarato. Las variables r_{13} , y de la r_{27} a la r_{51} corresponden a la biosíntesis de los aminoácidos. La ruta de las pentosas está representada por los flujos r_{14} y hasta r_{17} , considerando los principales carbohidratos involucrados en dicha ruta, hasta la formación de la fosforibosilpirofosfato (PRPP). Las reacciones correspondientes al metabolismo energético (compuestos de reserva y protección) se describen con las variables r_{20} a la r_{26} a partir de la glucosa-1-fosfato, para la formación de trehalosa y glucógeno. La reacción r_{53} representa el metabolismo reductivo de *S. cerevisiae*.

En la figura 2.2 se muestran los datos obtenidos de concentración de biomasa, sustrato residual, de *S. cerevisiae* en el cultivo continuo en condiciones no limitantes. En la gráfica, se observa que durante la fase de cultivo continuo (a partir de las 24 horas) la biomasa

presenta un comportamiento estable, excepto en los primeros puntos indicados con flechas en la figura. Los valores del promedio de concentración de biomasa producida en los cultivos continuos fueron de 11.73 ± 1.20 g/L y de 11.26 ± 1.38 g/L.

En cuanto a la fuente carbonada se observa que la glucosa alimentada fue consumida por la levadura para la producción de biomasa y CO₂, ya que el etanol detectado es mínimo (valores no presentados). Por lo que se puede inferir que el cultivo se condujo básicamente en condiciones fisiológicas de metabolismo oxidativo, porque la producción de etanol, que se presenta en metabolismo reductivo (*Walker, 1998*), fue escasa. La concentración cercana a cero del sustrato en el biorreactor (en promedio 0.282 g/L) también favorece al metabolismo oxidativo. La desviación estándar encontrada fue de ± 0.09 g/L.

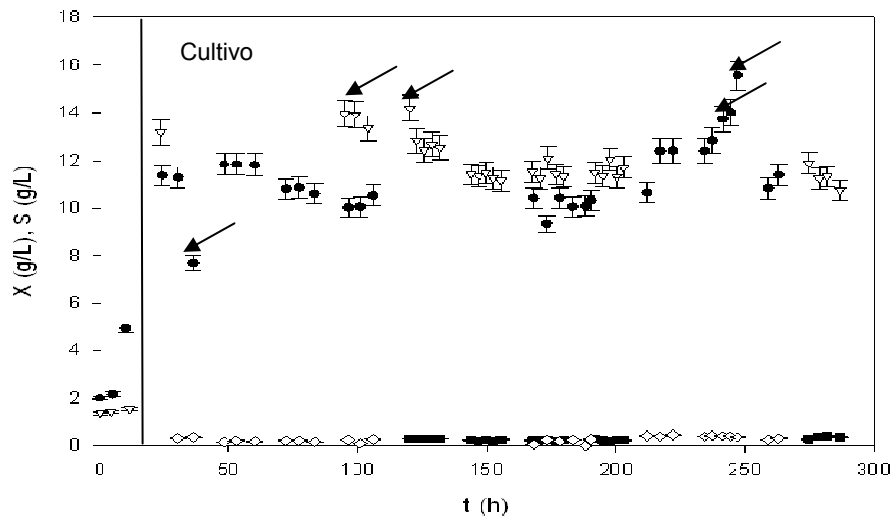


Figura 2.2 Concentraciones experimentales medidas de biomasa producida (●, ▽), y glucosa residual (■, ◇) en los cultivos continuos en condiciones no limitantes

En la figura 2.3 se muestran los datos obtenidos de concentración de biomasa, sustrato residual, para *S. cerevisiae* en cultivo continuo en limitación por nitrógeno. En la gráfica, se observa que durante el cultivo continuo la biomasa presenta un comportamiento estable hasta la hora 20 de haber iniciado la alimentación, después la concentración de la biomasa comienza a decaer. Sin embargo, la viabilidad del cultivo se mantuvo en 90%, por lo que este comportamiento se atribuye a que la velocidad específica de crecimiento disminuyó ante la ausencia de nitrógeno (*Jorgensen, et al., 2002; Thomsson, et al., 2005*).

En cuanto a la fuente carbonada, se observa que la glucosa alimentada fue consumida por la levadura para la producción de biomasa y CO_2 , manteniéndose el metabolismo oxidativo. Después de la hora 20, la concentración del sustrato residual se incrementa en aproximadamente 2 g/L, hecho que coincide con el ajuste de la velocidad de crecimiento de la biomasa. Si bien se detecta una ligera disminución en el consumo de la fuente carbonada, aparentemente la levadura mantuvo suficientemente activo el metabolismo glicolítico para continuar con una adecuada velocidad de consumo de glucosa y activar, ante la ausencia de nitrógeno, el metabolismo de compuestos de reserva y protección. Como resultado de este ajuste metabólico, la concentración de trehalosa y glucógeno aumentaron (datos no mostrados), efecto reportado ampliamente en la literatura (Blomberg, 2000; Francois y Parrou, 2001; Jorgensen, et al., 2002; Aranda et al., 2004, Albers, et al., 2007).

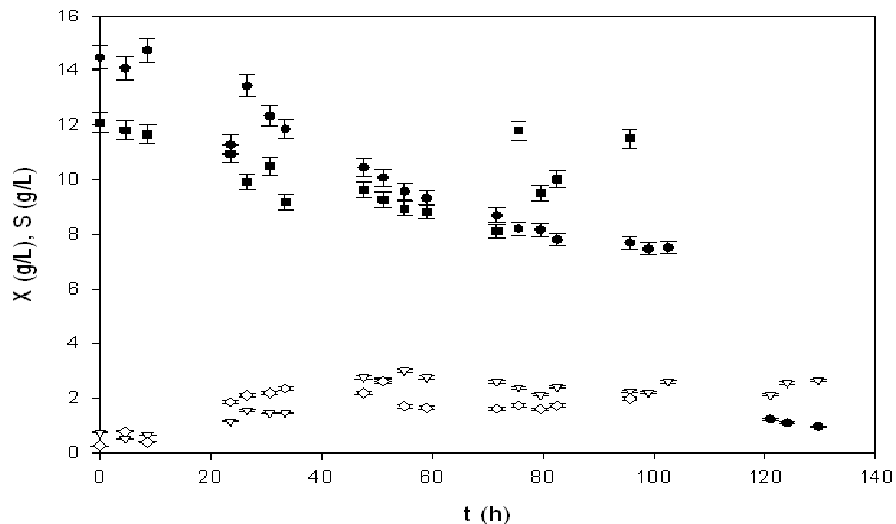


Figura 2.3 (a) Concentraciones experimentales medidas de biomasa producida (●, ■), glucosa residual (◇, ▽), en los cultivos continuos en ausencia de nitrógeno.

Para verificar la consistencia de los datos experimentales se realizaron balances de grado de reducción y elementales (Nielsen, et al., 2002; Stephanopoulos, et al., 1998).

El cuadro 2.4 muestra la estequiometría asociada a esta ruta metabólica condensada de los compuestos de reserva y protección. Donde la glucosa suministrada en los cultivos continuos fue controlada para ajustar las condiciones experimentales $S \approx 0$ y lograr que la velocidad específica de crecimiento cambiara gradualmente hasta igualar la tasa de dilución D , logrando establecer un cultivo en quimiostato. Por esta razón, las velocidades

volumétricas de producción y consumo en los procesos de cultivo continuo fueron prácticamente constantes, y las distribuciones de los flujos metabólicos calculados mostrados en la figura 2.4 son consistentes.

Cuadro 2.4. Estequiometría simplificada de la conversión de glucosa a biomasa y a compuestos del metabolismo energético.

Proceso metabólico		Reacción
Síntesis de biomasa con Glucosa-6P	de	$\text{Glucosa-6P} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} + 1.275\text{O}_2 + 0.575[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 0.95\text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 0.575\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P} + 3.55\text{H}_2\text{O} + 5\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Glucosa-1P	de	$\text{Glucosa-1P} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} + 1.275\text{O}_2 + 0.575[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 0.95\text{NH}_4 \rightarrow \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 0.575\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P} + 3.55\text{H}_2\text{O} + 5\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \text{CO}_2$
Biomass synthesis on Fructose-6P		$\text{Fructosa-6P} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} + 1.275\text{O}_2 + 0.575[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 0.95\text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 0.575\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P} + 3.55\text{H}_2\text{O} + 5\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Glicer aldehído-3P	de	$\text{Gliceraldehído-3P} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} + 0.38\text{NH}_3 + 1.34\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 0.69[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] \rightarrow 2\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 2.48\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 0.69\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con PEP	de	$\text{PEP} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_6\text{P} + 0.38\text{NH}_3 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 3.21[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + 2.1\text{O}_2 \rightarrow 2\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 4.0\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 3.21\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Piruvato	de	$\text{Piruvato} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + 0.38\text{NH}_3 + 0.84\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 0.69[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow 2\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 2.48\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 0.69\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Eritrosa-4P	de	$\text{Eritrosa-4P} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_7\text{P} + 0.57\text{NH}_3 + 0.1635\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 2[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] \rightarrow 3\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 3.47\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 2\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Sedo-heptulosa-7P	de	$\text{Sedoheptulosa-7P} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_{10}\text{P} + 0.57\text{NH}_3 + 2.02\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 1.285[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] \rightarrow 6\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 5.44\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 1.285\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Xylulosa-5P	de	$\text{Xylulosa-5P} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_8\text{P} + 0.76\text{NH}_3 + 2.92\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 2.86[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] \rightarrow 4\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 5.44\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 2.86\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Ribosa-5P	de	$\text{Ribosa-5P} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_8\text{P} + 0.76\text{NH}_3 + 2.92\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 2.86[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] \rightarrow 4\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 5.44\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 2.86\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$

Síntesis de biomasa con Ac-CoA	$\text{Ac-CoA} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CoA} + \text{CO}_2$ $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S} + \mathbf{0.19}\text{NH}_3 + \mathbf{1.295}\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{0.595}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{1.99}\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{0.595}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S} + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Oxaloacetato	$\text{Oxaloacetato} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5 + \mathbf{0.38}\text{NH}_3 + \mathbf{0.84}\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{1.19}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \mathbf{2}\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{2.48}\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{1.19}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \mathbf{2}\text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Fumarato	$\text{Fumarato} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \mathbf{0.57}\text{NH}_3 + \mathbf{0.385}\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{0.785}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \mathbf{3}\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{1.97}\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{0.785}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con 2-Oxo-glutarato	$\text{2-Oxoglutarato} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5 + \mathbf{0.76}\text{NH}_3 + \mathbf{2.27}\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{4.56}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \mathbf{4}\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{6.14}\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{4.56}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Aspartato-Semialdehido	$\text{Aspartato-semialdehido} + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3 + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_3 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{4.955}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \mathbf{1.875}\text{H}_3\text{PO}_4 + \mathbf{2.97}\text{O}_2 \rightarrow \mathbf{3}\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{6.14}\text{H}_2\text{O} + \mathbf{0.43}\text{NH}_3 + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{4.955}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Homoserina	$\text{Homoserina} + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3 + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3 + \mathbf{1.635}\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{1.285}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \mathbf{3}\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{3.47}\text{H}_2\text{O} + \mathbf{0.43}\text{NH}_3 + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{1.285}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Carbamoil-P	$\text{Carbamoil-P} + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3 + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{PO}_4 + \text{CO}_2$ $\mathbf{2}\text{CH}_4\text{NO}_5\text{P} + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{1.095}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \mathbf{0.295}\text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{0.99}\text{H}_2\text{O} + \mathbf{1.81}\text{NH}_3 + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{1.095}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{PO}_4 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con Ornitina	$\text{Ornitina} + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3 + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 + \mathbf{3.77}\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{4.56}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \mathbf{4}\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{6.14}\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{84.56}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \mathbf{1.24}\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \mathbf{2.24}\text{NH}_3$
Síntesis de biomasa con Shikimato	$\text{Shikimato} + \text{NH}_3 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5 + \mathbf{1.14}\text{NH}_3 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{1.07}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 + \mathbf{1.52}\text{O}_2 \rightarrow \mathbf{6}\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{3.44}\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{1.07}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con PRPP	$\text{PRPP} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+$ $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{O}_{14}\text{P}_3 + \mathbf{0.57}\text{NH}_3 + \mathbf{0.62}\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{32.255}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] \rightarrow \mathbf{3}\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{6.44}\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{2.255}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \mathbf{2}\text{CO}_2$
Síntesis de biomasa con 2-Oxo-	$\text{2-Oxo-isovalerato} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2$ $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3 + \mathbf{0.76}\text{NH}_3 + \mathbf{1.93}\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \mathbf{0.88}[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \mathbf{4}\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + \mathbf{3.46}\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + \mathbf{0.88}\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$

	isovalerato	
	Síntesis de biomasa con Acetato	$\text{Acetato} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CO}_2 + \text{PO}_4$ $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + 2.87\text{O}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 3.745[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + 0.19\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 6.14\text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 3.745\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{CO}_2$
	Proteína en biomasa	$\text{Proteína} \rightarrow \text{Biomasa}$ $\text{CH}_{1.58}\text{O}_{0.31}\text{N}_{0.27}\text{S}_{0.004} \rightarrow 0.57\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19}$
r ₁	Síntesis global de biomasa	Intermediarios metabólicos → Biomasa $\text{Glucosa-6P} + \text{Fructosa-6P} + \text{Glucosa-1P} + \text{Glicer aldehído-3P} + \text{PEP} + \text{Piruvato} + \text{Eritrosa-4P} + \text{Sedoheptulosa-7P} + \text{Xylulosa-5P} + \text{Ribosa-5P} + \text{Ac-CoA} + \text{Oxaloacetato} + \text{Fumarato} + 2\text{-Oxoglutarato} + \text{Aspartato-semialdehído} + \text{Homoserina} + (2)\text{Carbamoi-P} + \text{Ornitina} + \text{Shikimato} + \text{PRPP} + \text{acetato} + 2\text{-Oxo-isovalerato} + \text{Proteína} + \text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{ADP} + \text{NADH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{NAD}^+ + \text{CoA} + \text{CO}_2 + \text{PO}_4$ $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} + \text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} + \text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} + \text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} + \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_6\text{P} + \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + \text{C}_4\text{H}_9\text{O}_7\text{P} + \text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_{10}\text{P} + \text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_8\text{P} + \text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_8\text{P} + \text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S} + \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5 + \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + \text{C}_5\text{H}_5\text{O}_6 + \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4 + \text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_3 + \text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3 + 2\text{CH}_4\text{NO}_5\text{P} + \text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5 + \text{C}_5\text{H}_{13}\text{O}_{14}\text{P}_3 + \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{CH}_{1.58}\text{O}_{0.31}\text{N}_{0.7}\text{S}_{0.004} + 6.63\text{NH}_3 + 38\text{O}_2 + 22\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + 42.365[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + 11\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow 73.57\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.6}\text{N}_{0.19} + 88.2\text{H}_2\text{O} + 22\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + 42.365\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S} + 24\text{CO}_2 + \text{PO}_4$
r ₂	Glicólisis	Glucosa + ATP → Glucosa-6P + ADP (R00299, 2.7.1.2) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$
r ₃	Glicólisis	Glucosa-6P → Fructosa-6P (R00771, 5.3.1.9) $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P}$
r ₄	Glicólisis	Fructosa 6-P + ATP → 2Glicer aldehído-3P + ADP (R00756, 2.7.1.11) + (R01068, 4.1.2.13) + (R01015, 5.3.1.1) $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_9\text{P} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 \rightarrow 2\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$
r ₅	Glicólisis	Glicer aldehído-3P + H₃PO₄ + ADP + NAD⁺ → PEP + H₂O + ATP + NADH (R01061, 1.2.1.12) + (R01512, 2.7.2.3) + (R01518, 5.4.2.1) + (R00658, 4.2.1.11) $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_6\text{P} + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_6\text{P} + \text{H}_2\text{O} + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3 + [\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+]$
r ₆	Glicólisis	PEP + ADP → Piruvato + ATP (R00200, 2.7.1.40) $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_6\text{P} + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$
r ₇	Descarboxilación del piruvato a Ac-CoA	Piruvato + CoA + NAD⁺ → Ac-CoA + CO₂ + NADH (R00209, 1.2.4.1) $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3 + \text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S} + \text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 \rightarrow \text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S} + \text{CO}_2 + [\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+]$
r ₈	Ciclo Krebs	Oxaloacetato + Ac-CoA + H₂O + NADP → 2-Oxoglutarato + CoA + CO₂ + NADPH (R00351, 2.3.3.1) + (R01324, 4.2.1.3) + (R00267, 1.1.1.42) $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5 + \text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S} + \text{H}_2\text{O} + \text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3 \rightarrow \text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S} + \text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5 + \text{CO}_2 + [\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3 + \text{H}^+]$
r ₉	Ciclo Krebs	2-Oxoglutarato + 2NAD⁺ + ADP + H₃PO₄ → Fumarato + CO₂ + 2NADH + ATP (R08549, 1.2.4.2) + (R00405, 6.2.1.5) + (R00412, 1.3.99.1) NADH was taken as the electron acceptor $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5 + (2)\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 + (2)[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2 + \text{H}^+] + \text{CO}_2 + \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$

r ₁₀	Ciclo Krebs	Fumarato + H₂O + NAD⁺ → Oxaloacetato + NADH (R01082, 4.2.1.2) + (R00342, 1.1.1.37) $C_4H_4O_4 + H_2O + C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 \rightarrow C_4H_4O_5 + [C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+]$
r ₁₁	Descarboxilación del piruvato a Acetato	Piruvato + H₂O + NAD⁺ → Acetato + CO₂ + NADH (R03145, 1.2.2.2) NADH fue tomado como un aceptor de electrones en lugar de la ferredoxina $C_3H_4O_3 + H_2O + C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 \rightarrow C_2H_4O_2 + CO_2 + [C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+]$
r ₁₂ *	Acetato a Ac-CoA	Acetato + NADH + CoA → NAD + H₂O + Ac-CoA + 2H (R00710, 1.2.1.3) + (R00755, 4.1.1.1) + (R003270, 1.2.4.1) + (R02569, 2.3.1.12) $C_2H_4O_2 + [C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+] + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S \rightarrow C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 + H_2O + C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S$
r ₁₃	Síntesis de aminoácidos	2Piruvato + NADPH → 2-Oxoisovalerato + CO₂ + H₂O + NADP⁺ (R00006, 2.2.1.6) + (R04439, 1.1.1.86) + (R01209, 4.2.1.9) $2C_3H_4O_3 + [C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 + H^+] \rightarrow C_5H_8O_3 + CO_2 + H_2O + C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$
r ₁₄	Ruta de las pentosas fosfato	Eritrosa-4P + Xilulosa-5P → Fructosa-6P + Gliceraldehido-3P (R01067, 2.2.1.1) $C_6H_{13}O_9P + C_3H_7O_6P \rightarrow C_4H_9O_7P + C_5H_{11}O_8P$
r ₁₅	Ruta de las pentosas fosfato	Sedoheptulosa-7P + Gliceraldehido-3P → Eritrosa-4P + Fructosa-6P (R08575, 2.2.1.2) $C_7H_{15}O_{10}P + C_3H_7O_6P \rightarrow C_4H_9O_7P + C_6H_{13}O_9P$
r ₁₆	Ruta de las pentosas fosfato	Ribosa-5P + Xilulosa-5P → Sedoheptulosa-7P + Gliceraldehido-3P (R01641, 2.2.1.1) $C_5H_{11}O_8P + C_5H_{11}O_8P \rightarrow C_7H_{15}O_{10}P + C_3H_7O_6P$
r ₁₇	Ruta de las pentosas fosfato	Xilulosa-5P → Ribosa-5P (R01529, 5.1.3.1) + (R01056, 5.3.1.6) $C_5H_{11}O_8P \rightarrow C_5H_{11}O_8P$
r ₁₈	Ruta de las pentosas fosfato	Ribosa-5P + ATP → PRPP + ADP (R01049, 2.7.6.1) $C_5H_{11}O_8P + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 \rightarrow C_5H_{13}O_{14}P_3 + C_{10}H_{14}N_5O_7P$
r ₁₉	Glicólisis	G6P → G1P (R08639, 5.4.2.2) $C_6H_{13}O_9P \rightarrow C_6H_{13}O_9P$
r ₂₀	Metabolismo Energético	Carbamoil -P+ Aspartato + PRPP + (0.5)O₂ + 2ATP → 2ADP + Ortofosfato + 2H₂O + Difosfato + CO₂ + UTP (R01397, 2.1.3.2)+(R01993, 3.5.2.3)+(R018671, 1.3.3.1)+(R01870, 2.4.2.10)+(R00965, 4.1.1.23)+(R00158, 2.7.4.14)+(R00156, 2.7.4.6) $CH_4NO_5P + C_4H_7O_4N + C_5H_{13}O_{14}P_3 + O_2 + 2C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 \rightarrow 2C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + H_3PO_4 + H_2O + P_2H_4O_7 + CO_2 + C_9H_{15}O_{15}N_2P_3$
r ₂₁	Metabolismo Energético	G1P + UTP → UDP-Glucosa + Difosfato (R00289, 2.7.7.9) $C_6H_{13}O_9P + C_9H_{15}N_2O_{15}P_3 \rightarrow C_{15}H_{24}N_2O_{17}P_2 + P_2H_4O_7$
r ₂₂	Metabolismo Energético	UDP-Glucosa + Glucosa-6P + H₂O → Trehalosa + UDP + H₃PO₄ (R00836, 2.4.1.15)+(R02778, 3.1.3.12) $C_{15}H_{24}N_2O_{17}P_2 + C_6H_{13}O_9P + H_2O \rightarrow C_{12}H_{22}O_{11} + C_9H_{14}N_2O_{12}P_2 + H_3PO_4$

r ₂₃	Metabolismo Energético	Trehalosa + 2ATP + H₂O → 2Glucosa-6P + 2ADP (R00010, 3.2.1.28) + (R02848, 2.7.1.1) C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + (2) C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃ + H ₂ O → (2)C ₆ H ₁₃ O ₉ P + (2) C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂
r ₂₄	Metabolismo Energético	UDP-Glucosa + Glucógeno-n → Glucógeno-n+1 + UDP (R00292, 2.1.1.11) C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₁₇ P ₂ + (n)C ₆ H ₁₀ O ₅ → (n+1)C ₆ H ₁₀ O ₅ + C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₁₂ P ₂
r ₂₅	Metabolismo Energético	Glucógeno n+1 + H₃PO₄ → Glucógeno-n + Glucosa-6P (R06050, 2.4.1.1) + (R08639, 5.4.2.2) (n+1) C ₆ H ₁₀ O ₅ + H ₃ PO ₄ → (n)C ₆ H ₁₀ O ₅ + C ₆ H ₁₃ O ₉ P
r ₂₆	Metabolismo Energético	ATP + UDP → ADP + UTP (R00156, 2.7.4.6) C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃ + C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₁₂ P ₂ → C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂ + C ₉ H ₁₅ N ₂ O ₁₅ P ₃
r ₂₇	Síntesis de aminoácidos	CO₂ + NH₃ + 2ATP + H₂O → Carbamoil-P + H₃PO₄ + 2ADP (R00150, 2.7.2.2) CO ₂ + NH ₃ + 2C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃ + H ₂ O → CH ₄ NO ₅ P + H ₃ PO ₄ + 2C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂
r ₂₈	Síntesis de aminoácidos	Eritrosa-4P + PEP + NADPH → Shikimato + NADP+ + 2H₃PO₄ (R01826, 2.5.1.54) + (R03083, 4.2.3.4) + (R03084, 4.2.1.10) + (R02413, 1.1.1.25) C ₄ H ₉ O ₇ P + C ₃ H ₅ O ₆ P + [C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃ + H ⁺] → C ₇ H ₁₀ O ₅ + C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃ + 2H ₃ PO ₄
r ₂₉	Síntesis de aminoácidos	Ac-CoA + 2-Oxoglutarato + 2NH₃ + ATP + 3NADPH → Ornitina + Acetato + H₃PO₄ + CoA + ADP + 3NADP+ + H₂O (R00669, 3.5.1.14 or 3.5.1.16) + (R02283, 2.6.1.11) + (R03443, 1.2.1.38) + (R02649, 2.7.2.8) + (R00259, 2.3.1.1) C ₂₃ H ₃₈ N ₇ O ₁₇ P ₃ S + C ₅ H ₆ O ₅ + 2NH ₃ + C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃ + 3[C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃ + H ⁺] → C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ + C ₂ H ₄ O ₂ + H ₃ PO ₄ + C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁₆ P ₃ S + C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂ + 3C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₇ P ₃ + H ₂ O
r ₃₀	Síntesis de aminoácidos	Shikimato + PEP + Glutamato + NAD+ + ATP → Tirosina + 2-Oxoglutarato + CO₂ + 2H₃PO₄ + NADH + ADP (R02412, 2.7.1.71) + (R03460, 2.5.1.19) + (R01714, 4.2.3.5) + (R01715, 5.4.99.5) + (R01728, 1.3.1.12) + (R00734, 2.6.1.1) C ₇ H ₁₀ O ₅ + C ₃ H ₅ O ₆ P + C ₃ H ₉ NO ₄ + C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₄ P ₂ + C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃ → C ₉ H ₁₁ NO ₃ + C ₅ H ₆ O ₅ + CO ₂ + 2H ₃ PO ₄ + [C ₂₁ H ₂₉ N ₇ O ₁₄ P ₂ + H ⁺] + C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂
r ₃₁	Síntesis de aminoácidos	Shikimato + PEP + Glutamato + ATP → Fenilalanina + 2-Oxoglutarato + CO₂ + 2H₃PO₄ + H₂O + ADP (R02412, 2.7.1.71) + (R03460, 2.5.1.19) + (R01714, 4.2.3.5) + (R01715, 5.4.99.5) + (R01373, 4.2.1.51) + (R00694, 2.6.1.1) C ₇ H ₁₀ O ₅ + C ₃ H ₅ O ₆ P + C ₃ H ₉ NO ₄ + C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃ → C ₉ H ₁₁ NO ₂ + C ₅ H ₆ O ₅ + CO ₂ + 2H ₃ PO ₄ + H ₂ O + C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂
r ₃₂	Síntesis de aminoácidos	PRPP + PEP + Serina + Shikimato + ATP + NH₃ → Triptófano + Gliceraldehido-3P + Piruvate + CO₂ + 4H₃PO₄ + 2H₂O + ADP (R02412, 2.7.1.71) + (R03460, 2.5.1.19) + (R01714, 4.2.3.5) + (R00968, 4.1.3.27) + (R01073, 2.4.2.18) + (R03509, 5.3.1.24) + (R03508 , 4.1.1.18) + (R02722, 4.1.1.20) C ₇ H ₁₀ O ₅ + C ₅ H ₁₃ O ₁₄ P ₃ + C ₃ H ₅ O ₆ P + C ₃ H ₇ NO ₃ + C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃ + NH ₃ → C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ + C ₃ H ₇ O ₆ P + C ₃ H ₄ O ₃ + CO ₂ + 4H ₃ PO ₄ + 2H ₂ O + C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂
r ₃₃	Síntesis de aminoácidos	PRPP + ATP + 5H₂O + Glutamina + 2NAD+ → Histidina + AICAR + 5H₃PO₄ + 2-Oxoglutarato + 2NADH (R01071, 2.4.2.17) + (R04035, 3.6.1.31) + (R04037, 3.5.4.19) + (R04640, 5.3.1.16) + (R04558, 2.4.2.-) + (R03457, 4.2.1.19) + (R03243, 2.6.1.9) + (R03013, 3.1.3.15) + (R01158, 1.1.1.23)

			$C_5H_{13}O_{14}P_3 + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 5H_2O + C_5H_{10}N_2O_3 + 2C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 \rightarrow C_6H_9N_3O_2 + C_9H_{15}N_4O_8P + 5H_3PO_4 + C_5H_6O_5 + 2[C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+]$
r ₃₄	Síntesis aminoácidos	de	Piruvato + NH₃ → Serina (R00220, 4.3.1.17) $C_3H_4O_3 + NH_3 \rightarrow C_3H_7NO_3$
r ₃₅	Síntesis aminoácidos	de	Serina + H₂O + 2NAD⁺ → Glicina + CO₂ + 2NADH (R00945, 2.1.2.1) Se consider una equivalencia del NADH-Tetrahidrofolato en esta reacción $C_3H_7NO_3 + H_2O + 2C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 \rightarrow C_2H_5NO_2 + CO_2 + 2[C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+]$
r ₃₆	Síntesis aminoácidos	de	Serina + Ac-CoA + SO₄ + 2ATP + 2H + 3(NADH+H) → Cisteína + Acetato + CoA + P₂H₂O₇ + 2ADP + 3NAD + 3H₂O (R00529, 2.7.7.4)+(R00509, 2.7.1.25)+(R02021, 1.8.4.8)+(R00858, 1.8.2.1)+(R00897, 2.5.1.47)+(R00586, 2.3.1.30) + (R00897, 2.5.1.47) $C_3H_7NO_3 + C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + SO_4 + 2C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 2H + 3[C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+] \rightarrow C_3H_7NO_2S + C_2H_4O_2 + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + P_2H_2O_7 + 2C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 3C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 + 3H_2O$
r ₃₇	Síntesis aminoácidos	de	Cisteína + Homoserina + CO₂ + 2NADH → Metionina + Piruvato + NH₃ + H₂O + 2NAD⁺ (R01777, 2.3.1.46) + (R03260, 2.5.1.48) + (R01286, 4.4.1.8) + (R00946, 2.1.1.13) Se considero una equivalencia de [NADH+CO ₂]-[Metiltetrahidrofolato] en esta reacción $C_3H_7NO_2S + C_4H_9NO_3 + CO_2 + 2[C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+] \rightarrow C_5H_{11}NO_2S + C_3H_4O_3 + NH_3 + H_2O + 2C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2$
r ₃₈	Síntesis aminoácidos	de	Valina + Piruvato → Alanina + 2-Oxoisovalerato (R01215, 2.6.1.66) $C_5H_{11}NO_2 + C_3H_4O_3 \rightarrow C_3H_7NO_2 + C_5H_8O_3$
r ₃₉	Síntesis aminoácidos	de	Piruvato + Treonina + Glutamato + NADH → Isoleucina + 2-Oxoglutarato + NH₃ + CO₂ + NAD⁺ + H₂O (R00996, 4.3.1.19) + (R08648, 2.2.1.6) + (R05069, 1.1.1.86) + (R05068, 1.1.1.86) + (R05070, 4.2.1.9) + (R02199, 2.6.1.42) $C_3H_4O_3 + C_4H_9NO_3 + C_5H_9NO_4 + [C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+] \rightarrow C_6H_{13}NO_2 + C_5H_6O_5 + NH_3 + CO_2 + C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 + H_2O$
r ₄₀	Síntesis aminoácidos	de	2-Oxoisovalerato + Glutamato → Valina + 2-Oxoglutarato (R01090, 2.6.1.42) $C_5H_8O_3 + C_5H_9NO_4 \rightarrow C_5H_{11}NO_2 + C_5H_6O_5$
r ₄₁	Síntesis aminoácidos	de	2-Oxoisovalerato + Ac-CoA + Glutamato + NAD + H₂O → Leucina + 2-Oxoglutarato + NADH+H + CoA + CO₂ (R01213, 2.3.3.13) + (R03968, 4.2.1.33) + (R04426, 1.1.1.85) + (R01090, 2.6.1.42) $C_5H_8O_3 + C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + C_5H_9NO_4 + C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2 + H_2O \rightarrow C_6H_{13}NO_2 + C_5H_6O_5 + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + [C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+] + CO_2$
r ₄₂	Síntesis aminoácidos	de	Piruvato + Aspartato-semialdehido + NH₃ + 2NADPH → Lisina + CO₂ + 2NADP⁺ + 2H₂O (R02292, 4.2.1.52) + (R04198, 1.3.1.26) + (R04365, 2.3.1.17) + (R02734, 3.5.1.18) + (R02735, 5.1.1.7) + (R00451, 4.1.1.20) $C_3H_4O_3 + C_4H_7NO_3 + NH_3 + 2[C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 + H^+] \rightarrow C_6H_{14}N_2O_2 + CO_2 + 2C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3 + 2H_2O$
r ₄₃	Síntesis aminoácidos	de	Homoserina + ATP + H₂O → Treonina + ADP + H₃PO₄ (R01771, 2.7.1.30) + (R01466, 4.2.3.1) $C_4H_9NO_3 + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + H_2O \rightarrow C_4H_9NO_3 + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + H_3PO_4$
r ₄₄	Síntesis aminoácidos	de	Aspartato-semialdehido + NADH → Homoserina + NAD⁺ (R01773, 1.12.1.3) $C_4H_7NO_3 + [C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 + H^+] \rightarrow C_4H_9NO_3 + C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$
r ₄₅	Síntesis aminoácidos	de	Oxaloacetato + Glutamato → Aspartato + 2-Oxoglutarato (R00355, 2.6.1.1)

		$C_4H_4O_5 + C_5H_9NO_4 \rightarrow C_4H_7NO_4 + C_5H_6O_5$
r ₄₆	Síntesis aminoácidos de	Aspartato + ATP + NADPH → Aspartato-semialdehído + ADP + NADP+ + H₃PO₄ (R00480, 2.7.2.4) + (R02291, 1.2.1.11) $C_4H_7NO_4 + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + [C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 + H^+] \rightarrow C_4H_7NO_3 + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3 + H_3PO_4$
r ₄₇	Síntesis aminoácidos de	Aspartato + NH₃ + ATP + H₂O → Asparagina + AMP + 2H₃PO₄ (R00483, 6.3.1.1) $C_4H_7NO_4 + NH_3 + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + H_2O \rightarrow C_4H_8NO_3 + C_{10}H_{14}N_5O_7P + 2H_3PO_4$
r ₄₈	Síntesis aminoácidos de	Aspartato + Ornitina + Carbamoil-P → Arginina + Fumarato + H₃PO₄ + H₂O (R01398, 2.1.3.3) + (R01954, 6.3.4.5) + (R01086, 4.3.2.1) $C_4H_7NO_4 + C_5H_{12}N_2O_2 + CH_4NO_5P \rightarrow C_6H_{14}N_4O_2 + C_4H_4O_4 + H_3PO_4 + H_2O$
r ₄₉	Síntesis aminoácidos de	2-Oxoglutarato + NH₃ + 3NADPH + ATP → Prolina + 3NADP+ + ADP + 2H₂O + H₃PO₄ (R00248, 1.4.1.4) + (R00239, 2.7.2.11) + (R03313, 1.2.1.41) + (R03314, no enzimática) + (R01248, 1.5.1.2) $C_5H_6O_5 + NH_3 + 3[C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 + H^+] + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 \rightarrow C_5H_9NO_2 + 3C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3 + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 2H_2O + H_3PO_4$
r ₅₀	Síntesis aminoácidos de	2-Oxoglutarato + NH₃ + NADPH → Glutamato + H₂O + NADP+ (R00248, 1.4.1.4) $C_5H_6O_5 + NH_3 + [C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 + H^+] \rightarrow C_5H_9NO_4 + H_2O + C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$
r ₅₁	Síntesis aminoácidos de	Glutamato + NH₃ + ATP → Glutamina + ADP + H₃PO₄ (R00253, 6.3.1.2) $C_5H_9NO_4 + NH_3 + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 \rightarrow C_5H_{10}N_2O_3 + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + H_3PO_4$
r ₅₂	Síntesis Proteína de	AA → Proteína 0.056Gly + 0.047Ala + 0.017Val + 0.079Leu + 0.052Ile + 0.047Met+ 0.04Phe + 0.04Trp + 0.043Pro + 0.052Ser + 0.014Thr + 0.009Cys + 0.065Tyr + 0.0635Asn + 0.067Gln + 0.0635Asp + 0.067Glu + 0.031Lys + 0.056Arg + 0.091His → Protein
r ₅₃	Glicólisis	Acetato + 2NADH + H → Etanol + H₂O + 2NAD (R00710, 1.2.1.3) + (R00754, 1.1.1.1) $C_2H_4O_2 + 2[C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + H^+] \rightarrow C_2H_6O + H_2O + 2(C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2)$

Las velocidades calculadas a partir de datos experimentales (q_m) se presentan en el cuadro 2.5. Los valores corresponden a los promedios obtenidos en los distintos experimentos en condiciones no limitantes y en ausencia de nitrógeno.

Cuadro 2.5 Velocidades medidas (q_m) en condiciones no limitantes y en ausencia de nitrógeno

Velocidad (g/Lh)	q_x	q_s	q_{O_2}	q_{CO_2}	q_{glucg}	q_{treh}	q_{etanol}	q_{NH_3}	q_{SO_4}	$q_{proteína}$
Cond. no limitantes	0,732	-0,093	-0,359	0,007	0,007	0,000	0,000	-0,194	-0,590	0,002
Ausencia de fuente N	0,433	-0,998	-0,173	0,349	0,274	0,104	0,001	0,000	-0,683	0,159

Las velocidades calculadas (q_c) a partir de la ecuación (9) se muestran en el cuadro 2.6. Estas velocidades pueden ser comparadas con las correspondientes velocidades medibles (q_m). Al realizar dicha comparación se observa que algunas de las velocidades son similares tal como sucede con la biomasa, NH_3 , trehalosa y O_2 . Por otro lado para algunos metabolitos solo en una de las condiciones el valor de la velocidad medida y calculada es cercano, ejemplo de esto es el sustrato, CO_2 , y proteína. Sin embargo las velocidades de los metabolitos de mayor interés para este estudio (trehalosa, glucógeno, biomasa, NH_3 y sustrato) presentan valores aceptables, lo que valida los flujos metabólicos calculados.

Cuadro 2.6 Velocidades calculadas (q_c) de la ruta metabólica propuesta para la síntesis de compuestos de reserva y protección

Velocidad (g/Lh)	Condiciones no limitantes	Ausencia de nitrógeno
q_x	0,732	0,580
q_s	-0,582	-1,089
q_{CO_2}	0,359	0,530
q_{NH_3}	-0,195	0,000
$q_{Trehalosa}$	0,000	0,107
q_{SO_4}	0,013	0,005
q_{O_2}	-0,405	-0,300
$q_{Ethanol}$	0,536	0,578
$q_{Glycogen\ qn+1}$	0,537	0,608
q_{H_2O}	1,316	1,350
$q_{Protein}$	-0,236	-0,105
q_{AICAR}	-0,021	-0,009
q_{ATP}	0,035	0,015
q_{P2H4O7}	0,032	-0,011

Q_{UTP}	0,054	0,002
Q_{AMP}	-0,014	-0,006
Q_{PO4}	0,010	0,008
$Q_{NADPH+H}$	0,000	0,000
$Q_{Glycogen\ n}$	-0,537	-0,608
Q_{AcCoA}	0,000	0,000
Q_{NAD}	0,668	0,641
Q_{NADH+H}	-0,668	-0,641

Los flujos metabólicos involucrados en el metabolismo energético que permiten estimar la concentración de trehalosa y glucógeno son mostrados en la figura 2.1. Se observa en la figura 2.4a que la ausencia de nitrógeno en la alimentación provoca que el flujo relativo de producción de biomasa (r_1) y las reacciones asociadas al metabolismo glicolítico (r_3 , r_4 , r_5 , r_6 y r_{53}) decayeran y el flujo r_{19} (G6P \rightarrow G1P) incrementara, siendo la glucosa-1-P el sustrato principal en la ruta del metabolismo energético. Esto puede deberse a que la células presentaron un ajuste metabólico ante la ausencia de fuente nitrogenada en el flujo de alimentación, resultando en una substancial activación del metabolismo energético, ya que los sustratos fosforilados de la glicolisis inducen la producción de trehalosa (r_{19}) (Kolkman, et al., 2006). El metabolismo de los compuestos de reserva y protección se activa ante la disminución o ausencia de alguno de los nutrientes alimentados (Nilsson, et al., 2001; Voit, 2003). Por lo tanto, la inhibición del paso inicial de la glicolisis por la presencia de la enzima trehalosa-6-fosfo sintetasa 1 (TPS1) de la síntesis de la trehalosa (Francois y Parrou, 2001) fue confirmada. Los flujos correspondientes a la ruta de las pentosas fosfato r_{14} , r_{15} y r_{16} aumentaron mientras que r_{17} y r_{18} disminuyeron, tal como se representa en la figura 2.4b. Redirigiendo el flujo general de la ruta hacia la acumulación de gliceraldehido-3-fosfato. En cuanto a las reacciones del ciclo de Krebs (figura 2.4c), el aumento en los flujos r_7 , r_8 , r_9 y r_{10} , y la disminución del flujo r_{11} , provocan una acumulación del piruvato, en la ausencia de fuente nitrogenada. Esto probablemente se deba al ajuste energético que la levadura debe de hacer en su capacidad metabólica para activar y redirigir el metabolismo energético (Blomberg, 2000).

Por otro lado los flujos del metabolismo de los compuestos de reserva y protección, mostrados en la figura 2.4d las variables r_{20} , r_{22} y r_{23} disminuyen, mientras que la r_{24} y r_{25} se incrementan. Además los flujos r_{21} y r_{26} muestran un ligero aumento. Se observa que de *S. cerevisiae* ajustó su metabolismo ante la ausencia de nitrógeno. Dicho ajuste estimula la acumulación de trehalosa y la utilización del glucógeno como reserva energética. Este particular efecto en los flujos, la acumulación de uno de los

compuestos y el decaimiento del otro, se debe a que la trehalosa se acumula en condiciones adversas de crecimiento (T, pH, ausencia o disminución de nutrientes, ambientes oxidativos o tóxicos y altas osmolaridades), sin embargo la síntesis de glucógeno se activa cuando las condiciones de crecimiento son favorables, para su posterior utilización (*Francois y Parrou, 2001; Albers, et al., 2007*). Además se ha demostrado que en condiciones adecuadas de crecimiento 2/3 de la glucosa es utilizada para glicolisis, 10% es para el ciclo de las pentosas y 20% es usado para la conversión reversible de la glucosa-1-P y una pequeña cantidad es utilizada para la producción de trehalosa-6- fosfato y otras rutas, y cualquier exceso de glucosa es almacenado en forma de glucógeno, cuya concentración puede incrementarse 5 veces, carbohidrato energéticamente superior a la trehalosa (*Voit, 2003*). En contraste, cuando las condiciones son adversas la concentración de trehalosa se puede incrementar 4 veces (*Jorgensen, et al., 2002*). El ajuste de distribución de flujos ante la ausencia de nitrógeno, confirma lo anterior.

Se observa en la figura 2.4e que las variables correspondientes a las reacciones para biosíntesis de aminoácidos que aumentaron fueron los flujos metabólicos (r_{50} , r_{51} , a r_{52}) mientras que los que disminuyeron, fueron los flujos correspondientes a la síntesis de carbamoil (r_{27}), serina (r_{34}) y glicina (r_{35}), sintetizados a partir del piruvato. Por lo que la ausencia de fuente nitrogenada provocó una disminución en la actividad metabólica de la levadura en la síntesis de aminoácidos, principalmente en aquellos que se forman a partir del piruvato, contribuyendo a la acumulación de dicho metabolito y a la activación del metabolismo energético. Si bien el flujo correspondiente a la síntesis de proteína, del glutamato y glutamina se incrementó, la disminución en los flujos del resto de los aminoácidos incide directamente en la concentración de proteína total detectada que resulta ser menor en los cultivos continuos con ausencia de nitrógeno que en aquellos en donde no existe esta condición limitante, resultado similar al encontrado por otros autores (*Gargiano, et al., 2002; Albers, et al., 2007*). Además se ha demostrado que el amoníaco, el glutamato y la glutamina son buenas fuentes de nitrógeno ya que cuando las condiciones lo exigen la levadura selecciona producir estos compuestos que le permitan una rápida y óptima utilización del N_2 , para mantener su metabolismo (*Gargiano, et al., 2002*), por lo que es explicable que los dos aminoácidos cuya distribución de flujos metabólicos se haya visto aumentado fueron glutamato y glutamina.

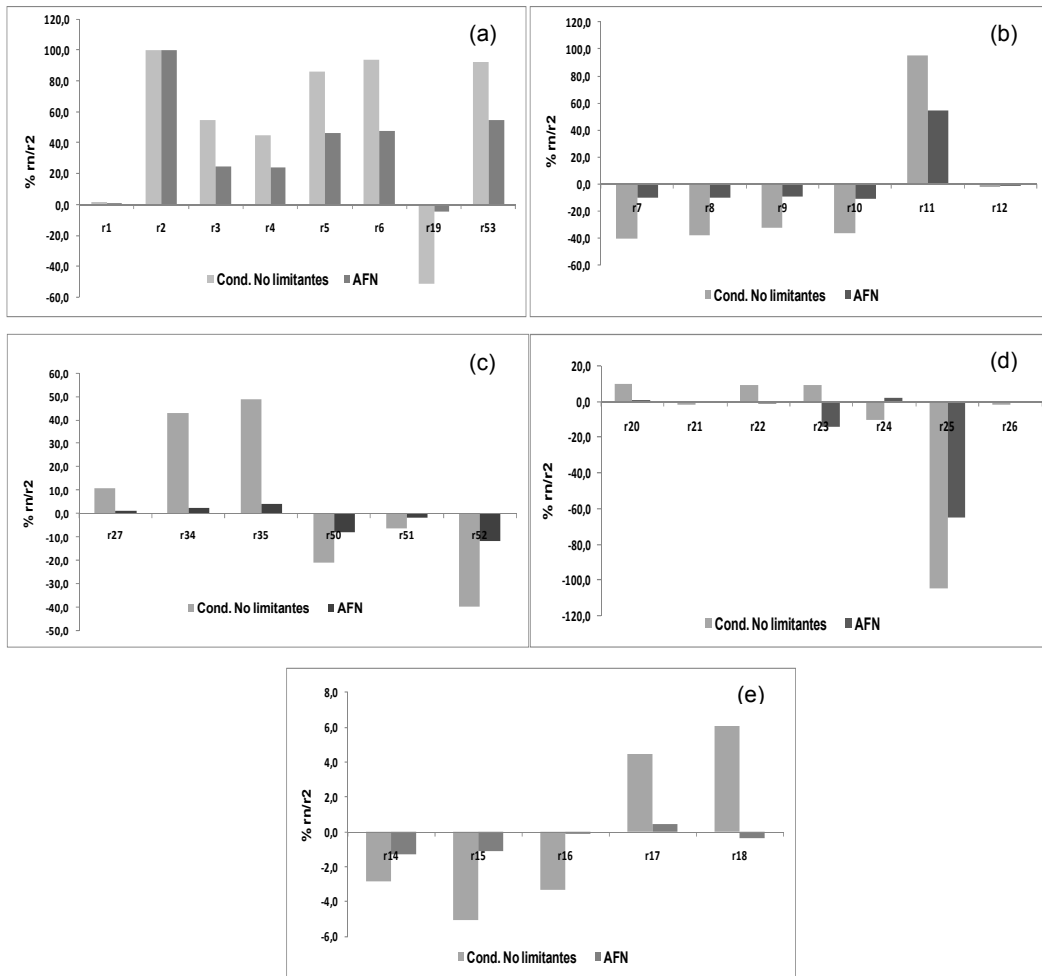


Figura 2.4 Comparación de flujos metabólicos (a) glicolisis, (b) ruta de las pentosas fosfato, (c) Ciclo de Krebs, (d) metabolismo energético y (e) síntesis de aminoácidos y proteínas en cultivos continuo de levadura en condiciones no limitantes y en ausencia de fuente de nitrógeno (AFN)

CONCLUSIONES

Se redistribuyeron los flujos metabólicos calculados en condiciones no limitantes cuando el cultivo se sometió a ausencia de fuente nitrogenada. Los flujos de las reacciones de la glicolisis fueron claramente afectados ante la ausencia de fuente nitrogenada, notándose una importante disminución de dichos flujos. La afectación de la ruta de las pentosas fosfato es clara ante la disminución de los flujos metabólicos encontrada, redirigiéndose a la síntesis de ribulosa y xilulosa. Los flujos metabólicos del ciclo de Krebs se encuentran claramente deprimidos en ausencia de fuente nitrogenada, enfocándose a la producción de piruvato. El metabolismo de los compuestos de protección y reserva es activado por la ausencia de fuente nitrogenada. Aparentemente esta parte del metabolismo de la levadura se intensifica para acumular trehalosa y utilizar el glucógeno como reserva energética.

Los flujos metabólicos de la biosíntesis de los aminoácidos disminuyen, afectando la síntesis de proteínas.

El balance de flujos metabólicos resultó ser un análisis útil para la generación de modelos para predecir concentraciones de metabolitos de acuerdo a las condiciones de operación, por lo que la aplicación de este tipo de metodología en procesos industriales es muy conveniente ya que representa una manera rápida y económica, pero sobre todo con bases metabólicas, para mejorar y mantener la calidad del producto de interés.

REFERENCIAS

1. Boer, V., Johanner, H., Pronk, J., Matthew, P. (2003) The Genome-wide Transcriptional Responses of *Saccharomyces cerevisiae* Grown on Glucose in Aerobic Chemostat Cultures Limited for Carbon, Nitrogen, Phosphorus, or Sulfur. *The Journal of Biological Chemistry*. 5:3265-3274
2. Jørgensen, H., Olsson, L., Ronnow, B., Palmqvist, E.A. (2002) Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59:310–317
3. Hirasawa, T., Nakakura, Y., Yoshikawa, K., Ashitan K., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura. Y., Shimizu, H., Shioya, S. (2006) Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Appl Microbiol Biotechnol*. 70: 346-357
4. Jules, M., Beltran, G., Francois, J., Luc, J. (2008) New insights into trehalosa metabolism by *S. cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalalase, and deletion of TPS1 reveals Ath1p dependent trehalose mobilization. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:605-614.
5. Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, J., Matallana E. (2005) Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Appl Environ Microbiol*. 11: 6831–6837
6. Francois, J. y Parrou, J. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 25:125-145
7. van Hoek, P., de Hulster, E., van Dijken, J. P. y Pronk, J. T. (2000) Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnology and Bioengineering*. 68: 517–523.
8. Brauer. M., Huttenhower, C., Airoidi. E., Rosenstein, R., Matese, J., Gresham, D., Boer, V., Troyanskaya, O., Botstein, D. (2008) Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. *Molecular Biology of the cell*. 19: 352–367
9. Sainz, J., Pizarro, F., Pérez-Correa, J., Agosin, E. (2003) Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnol Bioeng*. 81: 18–828
10. Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. (2000) Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 34-50.

11. Nolan, R., Fenley, A., Lee, K. (2006) Identification of distributed metabolic objectives in the hypermetabolic liver by flux and energy balances analysis. *Metabolic Engineering*. 8: 30-45.
12. Larsson, G.; Tornskuist, M. (1996) Rapid sampling, cell inactivation and evaluation of low extracellular glucose concentrations during fed-batch cultivation. *Journal of Biotechnology*. 49: 69-82.
13. Conway, E. J. (1957) Microdiffusion Analyses and Volumetric Error. Crosby Lockwood & Sons Ltd, London 4ta Edición, 98.
14. www.brenda-enzymes.org
15. www.genome.jp/kegg
16. Moat, A.G, Foster, J.W, Spector, M.P. (2002) Microbial Physiology. Cuarta edición. Editorial Wiley-Liss,EUA.
17. Voet, D, Voet, J. (2006) Bioquímica. Tercera edición. Editorial Médica panamericana. Argentina.
18. Walker, G. M. (1998) Yeast Physiology and Biotechnology. Primera edición. Editorial Wiley, Inglaterra.
19. Thomsson, E., Gustafsson, L., Larsson C. (2005) Starvation response of *Saccharomyces cerevisiae* grown in anaerobic nitrogen- or carbon-limited chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*. 6: 3007–3013
20. Aranda, J., Salgado, E., Taillander, P. (2004) Trehalose accumulation in *S. cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling. *Biochemical Engineering Journal*. 17: 129-140
21. Albers, E., Larsson, C., Andlid, T., Walsh, M., Gustafsson L. (2007) Effect of nutrient starvation on the cellular composition and metabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 15: 4839-4848.
22. Nielsen, J., Villadsen, J. (2002) *Bioreaction Engineering Principles*, pp.111-116. Plenum Press, NY, USA.
23. Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., Nielsen, J. (1998) *Metabolic Engineering Principles and Methodologies*. pp. 138-139. Academic Press, NY, USA.
25. Kolkman, A., Daran-Lapujade, P., Fullaondo, A., Olsthoorn, M., Pronk, J., Slijper, M., Heck, A. (2006) Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. *Mol Syst Biol*. 2: 1-16.
26. Nilsson, A., Pahlman, I.-L., Jovall, P.-A., Blomberg, A., Larsson, C. and Gustafsson, L. (2001) The catabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae* is preserved to a higher extent during carbon compared to nitrogen starvation. *Yeast*. 18: 1371–1381

27. Blomberg, A. (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiology Letters*. 182: 1-8
28. Voit, E. (2003) Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *Journal of Theoretical Biology*. 223: 55-78.
29. Gagiano, M., Bauer, F., Pretorius, I. (2002) The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2: 433-470

RECOMENDACIONES GENERALES

- Verificar la validez del modelo presentado sometiendo a la levadura a distintas condiciones adversas de crecimiento, como pueden ser choques térmicos, ambientes con altas osmolaridades o ausencia de fuente de azufre.
- Proponer el estudio en estado transiente del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* y generar otro modelo.
- Realizar un análisis de sensibilidad para el modelo de los compuestos de reserva y protección obtenido en esta tesis, con el fin de saber que tanto impactan los errores experimentales cometidos en el modelo propuesto.
- Efectuar un nuevo análisis matricial con el fin de encontrar nuevas configuraciones de submatrices y verificar si los resultados obtenidos experimentalmente y aquellos que se calculan pueden tener mayor similitud a la ya lograda en este trabajo

ANEXO

NOMENCLATURA

Letras romanas

C	Compuestos en estado pseudoestacionario	-
$C_{O_2}^*$	Concentración de oxígeno saturado	mg/L
C_{O_2}	Concentración de oxígeno disuelto en el bioreactor	mg/L
D	Velocidad de dilución en el sistema lote alimentado	h^{-1}
D_F	Grados de libertad	-
E	Matriz elemental	-
E_c, E_m	Submatrices de la partición de E	-
E	Concentración de etanol en el biorreactor	g/L
E_T	Etanol total producido en el biorreactor	g
F	Matriz varianza-covarianza	-
J	Reacciones consideradas en la ruta metabólica	-
$k_L a$	Coefficiente de transferencia de oxígeno	h^{-1}
NH_3	Amonio consumido en el cultivo	g/L
ne	Número de elementos principales en la reacción global (Ec. 5)	-
np	Número de productos en la reacción global (Ec. 5)	-
ns	Número de sustratos en la reacción global (Ec. 5)	-
P	Matriz modificada de varianza-covarianza	-
Q_G	Flujo de aireación en el biorreactor	L/h
Q	Vector de velocidades volumétricas	g/Lh
q_c	Vector de velocidades volumétricas calculadas	g/Lh
q_m	Vector de velocidades volumétricas medidas	g/Lh
q_{mt}	Vector de velocidades volumétricas verdaderas	g/Lh
q_E	Velocidad volumétrica de producción de etanol	g/Lh
q_{CO_2}	Velocidad volumétrica de producción de CO_2	g/Lh
q_{H_2O}	Velocidad volumétrica de producción de agua	g/Lh
q_{NH_3}	Velocidad volumétrica de consumo de NH_3	g/Lh
q_{O_2}	Velocidad volumétrica de consumo de oxígeno	g/Lh
q_s	Velocidad volumétrica de consumo de glucosa	g/Lh
q_x	Velocidad volumétrica de crecimiento de levadura	g/Lh
R	Matriz redundancia	-
R_r	Matriz redundancia reducida	-
RQ	Coefficiente respiratorio	-

R	Vector de flujos metabólicos	g/gh
r_c, r_m	Partición de r	g/gh
T	Matriz estequiométrica total	-
T_j	Partición de T ^T (j = 1, ..., 6)	-
S	Concentración de glucosa en el biorreactor	g/L
S_F	Concentración de glucosa en la corriente de salida	g/L
S_T	Glucosa total consumida	g
T	Tiempo de proceso	h
X	Concentración de biomasa en el biorreactor	g/L
Y_{E/S}	Coefficiente de rendimiento de etanol	g/g
Y_{X/S}	Coefficiente de rendimiento de biomasa	g/g
\bar{z}	Valor promedio de z en el intervalo z _{i-1} - z _i	/unidades

Letras griegas

δ	Vector de errores en las velocidades medidas	g/L h
μ	Velocidad específica de crecimiento □	1/h

Superíndice

T	Matriz transpuesta	-
-1	Matriz inversa	-

Subíndice

0	Valor o condición inicial	-
I	Punto inicial de un intervalo	-
i + 1	Punto final de un intervalo	-
J	Contador de las J reacciones en la ruta metabólica	-