



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## CAMBIOS METABÓLICOS Y TERMODINÁMICOS EN UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Escherichia coli* SOMETIDA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE $dCO_2$ .

Ricardo Axayácatl González García, Edgar Salgado Manjarréz, Juan Silvestre Aranda Barradas. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Bioingeniería. México, D. F. C. P. 07340. lord.axayacatl@gmail.com

Palabras clave: GFP, *Escherichia coli*, Carga Metabólica.

**Introducción.** El uso de organismos recombinantes para la obtención de productos de alto valor agregado es una actividad común. Si bien las ventajas de este tipo de cultivos son ampliamente conocidas a nivel laboratorio, pocos estudios se han enfocado a la evaluación del efecto que tiene el aumento de la carga metabólica en los procesos energéticos y de mantenimiento celular debida a la síntesis de proteínas heterólogas, así como en la termodinámica de las reacciones bioquímicas a mayor escala. En el presente trabajo se plantea la estructuración de un modelo metabólico simplificado que permita describir las variaciones en los flujos metabólicos dentro de una cepa de *E. coli* recombinante que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo diferentes concentraciones de  $CO_2$  disuelto, del cual se ha reportado que a elevadas concentraciones inhibe el crecimiento celular de la bacteria activando reacciones anapleróticas para la fijación del mismo (1).

**Metodología.** Fueron analizadas las rutas bioquímicas más importantes en el metabolismo de *E. coli* y se construyó un mapa metabólico simplificado al cual fue acoplada la reacción de síntesis de GFP. El conjunto de reacciones obtenidas ( $J$ ), que contienen  $N+M+L$  compuestos, fueron tratadas de acuerdo al algoritmo propuesto por el Análisis de Flujos Metabólicos (AFM) (2), a fin de cumplir con las condiciones de observabilidad del sistema de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$q = T^T r x \quad 1$$
$$T^T = \begin{pmatrix} T_1 & T_2 \\ T_3 & T_4 \\ T_5 & T_6 \end{pmatrix} \quad 2$$
$$T_7 = T_1 - (T_2 T_5^{-1} T_2) \quad 3$$

donde  $q$  es un vector que contiene las velocidades volumétricas de producción/consumo de compuestos (en  $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ),  $T^T$  es la matriz estequiométrica total traspuesta con dimensiones  $(N+M+L) \times J$ ,  $x$  es la concentración de biomasa celular (en  $g \cdot L^{-1}$ ) y  $r$  es el vector de velocidades de reacción desconocidas ( $h^{-1}$ ). La evaluación termodinámica permitirá establecer la factibilidad de cada reacción dentro del modelo planteado, mediante la estimación de la energía libre de Gibbs para cada reacción (3):

$$\Delta_r G' = \sum_{i=1}^n n_i \Delta_f G'_i + RT \ln \left( \prod_{i=1}^n x_i^{n_i} \right) \quad 4$$

Donde  $\Delta_f G'_i$  es la energía libre de Gibbs de formación estándar,  $R$  es la constante de los gases,  $T$  la temperatura absoluta,  $n$  el número de compuestos  $i$  involucrados en la reacción,  $x$  la actividad de cada compuesto y  $n$  el coeficiente estequiométrico.

**Resultados.** Una vez analizado el metabolismo global de *E. coli*, se logró construir un mapa metabólico simplificado. El sistema cuenta con 60 reacciones en la que intervienen 70 metabolitos. El conjunto de ecuaciones bioquímicas fue agrupado en un sistema de ecuaciones lineales y escrito de forma matricial. La identificación del número de compuestos en estado pseudoestable fue determinante para lograr la observabilidad del sistema mediante el cálculo del número de grados de libertad, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F = J - C \quad 5$$

El valor de  $F=4$  indica el número de compuestos cuyas velocidades deben ser medidas para obtener una distribución de flujos metabólicos válida. Se propuso a biomasa ( $X$ ), acetato, glucosa y GFP como compuestos medidos, siendo esta una restricción más del modelo. Para establecer la observabilidad del sistema se calcularon las  $T_7$  y  $T_7^{-1}$ :

$$T_7 = \begin{pmatrix} 47.974 & 6.397 & 0 & 14.925 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 126 & 0 & 0 & 0 \\ -199.375 & -26.527 & 4.5 & -72.896 \end{pmatrix} \quad T_7^{-1} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 7.937 \times 10^{-3} & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 1.085 & 1.048 & -0.062 & 0.222 \\ 0.067 & 0.429 & -0.026 & 0 \end{pmatrix} \quad 6,7$$

**Conclusiones.** A partir del análisis realizado sobre el conjunto de reacciones bioquímicas dentro del metabolismo global de *E. coli*, se obtuvo un modelo metabólico simplificado observable, considerando 4 grados de libertad. Con los resultados obtenidos, se plantea entonces la evaluación del vector  $q$  y la obtención de los valores de las velocidades de reacción  $r$ , a partir de resultados experimentales de cultivos bajo diferentes concentraciones de  $dCO_2$ . Se continúa en la estimación de  $\Delta_r G'$ , siendo el cálculo de las actividades la principal limitante, y así establecer la distribución de flujos.

**Agradecimiento.** Proyecto SIP-IPN 20100707.

### Bibliografía.

- Baez, A., Flores, N., Bolívar, F., Ramírez, O. (2009). *Biotech and Bioeng.* 40 (40):1-9.
- Stephanopoulos, G.; Aristidou, A.; Nielsen, J. (1998). *Metabolic Pathway Synthesis*. In: **Metabolic Engineering**. Academic Press. Academic Press. USA. 285-307.
- Henry, C., Jankowski, M., Broadbelt, L., Hatzimanikatis, V. (2006). *Biophysical J.* 90(4): 1453-1461.