

# MODELACIÓN DE LOS FLUJOS METABÓLICOS COMO HERRAMIENTA PARA EL ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE UNA CEPA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MODIFICADA GENÉTICAMENTE DURANTE SU CULTIVO ANAERÓBICO.

Juan Manuel Urrieta-Saltijeral<sup>\*</sup>; Claude Gilles Dussap<sup>a</sup> y Agnes Pons<sup>a</sup>, <sup>\*</sup>Responsable del trabajo: Instituto tecnológico de Villahermosa, Carretera a Frontera Km 3.5 Ciudad Industrial Villahermosa Tabasco, México, teléfono:01(93)530259 ext. 121, Fax: 01(93)512872, correo electrónico: [jurrieta@latinmail.com](mailto:jurrieta@latinmail.com); <sup>a</sup> Laboratoire de Génie Chimique Biologique UBP Francia.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, cepa modificadas genéticamente, calculo de flujos metabólicos.

**Introducción.** La función celular de un microorganismo depende de los cambios dinámicos del metabolismo. Dichos cambios conducen a diferentes expresiones de las funciones celulares (síntesis de biomasa y metabolitos, asimilación de sustratos). Una herramienta interesante para poder tener una visión detallada del metabolismo en su conjunto y así poder estudiar la influencia del metabolismo energético sobre la función celular es la cuantificación de los flujos metabólicos a través de las vías catabólicas y anabólicas asociando la fisiología microbiana a la ingeniería genética a través de modelos matemáticos<sup>1</sup>. El principio esta basado en la construcción de una red metabólica del microorganismo en el cual las reacciones más importantes son puestas en juego a través de una técnica de cálculo de flujos metabólicos para la obtención de los flujos intracelulares<sup>2</sup>. La validación del modelo constituye un punto esencial, sin embargo hoy en día pocos trabajos han sido llevados a cabo bajo la óptica de validar los modelos a partir de datos experimentales<sup>3</sup>. El presente trabajo pone en marcha una estrategia experimental basada en el estudio de la influencia de las condiciones de cultivo sobre la respuesta del microorganismo utilizando como modelo de estudio dos cepas haploides de *S. Cerevisiae*. El objetivo del presente trabajo es obtener la distribución de los flujos metabólicos de una cepa modificada genéticamente de *S. Cerevisiae* para el análisis de su metabolismo a partir de datos experimentales obtenidos en un fermentador tipo "batch" en condiciones anaeróbicas.

**Metodología.** Una cepa ordinaria de panadería (ATCC 7754) y una cepa mutante glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (CD101-1A: MAT $\alpha$ , his3, leu2, ura3, ade2, trp1, met19::URA3) fueron caracterizadas y comparadas en el presente estudio. Las cepas fueron cultivadas en un fermentador (B. Braun®) de 4 litros bajo condiciones anaeróbicas utilizando glucosa o fructosa (100g/l) como fuente de carbono. Una técnica de balance de masa asociada a un método de reconciliación de datos fue desarrollada para el cálculo de los flujos metabólicos

**Resultados y discusión.** Los resultados de la parte experimental mostraron que los rendimientos de producción de los metabolitos principales (CO<sub>2</sub> y etanol), no presentaron variación entre las dos cepas para las dos fuentes de carbono, sin embargo los rendimientos en biomasa, glicerol y acetato, así como las tasa de crecimiento máximo ( $\mu_{max}$ ) son diferentes para la cepa CD101-1A (Cuadro 1), para la cual el crecimiento es más lento. De manera general, el crecimiento se lleva a cabo de manera más rápida y con una concentración mas elevada en biomasa cuando la glucosa es utilizada como fuente de carbono.

dos cepas utilizando glucosa o fructosa como fuente de carbono. Desviación estandar en cursiva.

	Cepa ATCC 7754		Cepa CD101-1A	
	glucosa	fructosa	glucosa	fructosa
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.28 $\pm$ 0,02	0.23 $\pm$ 0,03	0.075 $\pm$ 0,007	0.092 $\pm$ 0,006
Y <sub>X/S</sub> (gX/gS)	0.090 $\pm$ 0,002	0.075 $\pm$ 0,002	0.056 $\pm$ 0,002	0.051 $\pm$ 0,004
Y <sub>ES</sub> (gE/gS)	0.40 $\pm$ 0,01	0.42 $\pm$ 0,01	0.39 $\pm$ 0,01	0.40 $\pm$ 0,01
Y <sub>CO2/S</sub> (gCO2/gS)	0.411 $\pm$ 0,009	0.391 $\pm$ 0,008	0.384 $\pm$ 0,018	0.407 $\pm$ 0,011
Y <sub>Gly/S</sub> (gGly/gS)	0.064 $\pm$ 0,001	0.065 $\pm$ 0,002	0.094 $\pm$ 0,003	0.108 $\pm$ 0,001
Y <sub>AS</sub> (gA/gS)	0.001 $\pm$ 0,001	0.002 $\pm$ 0,011	0.015 $\pm$ 0,001	0.013 $\pm$ 0,001

Los datos obtenidos experimentalmente permitieron realizar el cálculo de los rendimientos de producción en función del sustrato consumido, los cuales pudieron ser considerados como constantes para un periodo de tiempo significativo, lo que permitió utilizar dichos resultados para realizar el cálculo de los flujos metabólicos por un método de balance de masa, utilizando para ello una red metabólica que consta de 117 reacciones del metabolismo de *S. Cerevisiae*<sup>4</sup>.

**Conclusión.** El cálculo de flujos metabólicos a partir de datos obtenidos experimentalmente nos permitió situar los fenómenos que parecen preponderantes a cada cepa, para así poner en evidencia la incapacidad de la cepa CD101 de realizar las dos primeras reacciones de la vía de pentosas fosfato lo que es compensado por un aumento en la producción de glicerol y acetato.

La comparación entre las dos cepas y la modelación metabólica realizada en el presente estudio demuestran que esta técnica es una herramienta de cálculo que puede ser utilizada para predecir los flujos metabólicos de un microorganismo modificado genéticamente.

## Bibliografía.

- Vallino, J.J., Stephanopoulos G. (1990). Flux distribution in cellular bioreaction networks: application to lysine fermentations. *Frontiers in Bioprocessing*, (1) 205-219.
- Stephanopoulos G., Vallino J. (1991). Network rigidity and metabolic engineering in metabolic overproduction. *Science*; (252):1675-1681.
- Vanrolleghem P. A., Jong-Gubbels P., Van Gulik M. W., Pronk J. T., Van Dijken P. J., Heijnen S. (1996). Validation of a metabolic network for *Saccharomyces cerevisiae* using mixed substrate studies. *Biotechnol. Prog.* (12) 434-448.
- Urrieta-Saltijeral, J. M., Dussap C. G., Pons A., Gros J. B. (1999). Metabolic modelling of a genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strain behavior during anaerobic batch cultures. *Proc. 9<sup>th</sup> Eur. Congr. Biotech., Bruxelles*, (1)245-251.

Cuadro 1. Comparación de los rendimientos de producción de los metabolitos principales (gP/gS) y tasa de crecimiento  $\mu_{max}$  (h<sup>-1</sup>) de las