

# La pseudo-reacción de biomasa, el mayor desafío del modelizado metabólico de microorganismos.

Castañeda, M. Teresita<sup>1</sup>; Nuñez, Sebastián<sup>1</sup>; Jamilis, Martín<sup>1</sup>; Voget, Claudio<sup>2</sup>; De Battista, Hernán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Control Aplicado (GCA), Instituto LEICI, UNLP-CONICET, Facultad de Ingeniería, UNLP. castaneda@biotec.quimica.unlp.edu.ar.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), UNLP-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

## 1. Introducción

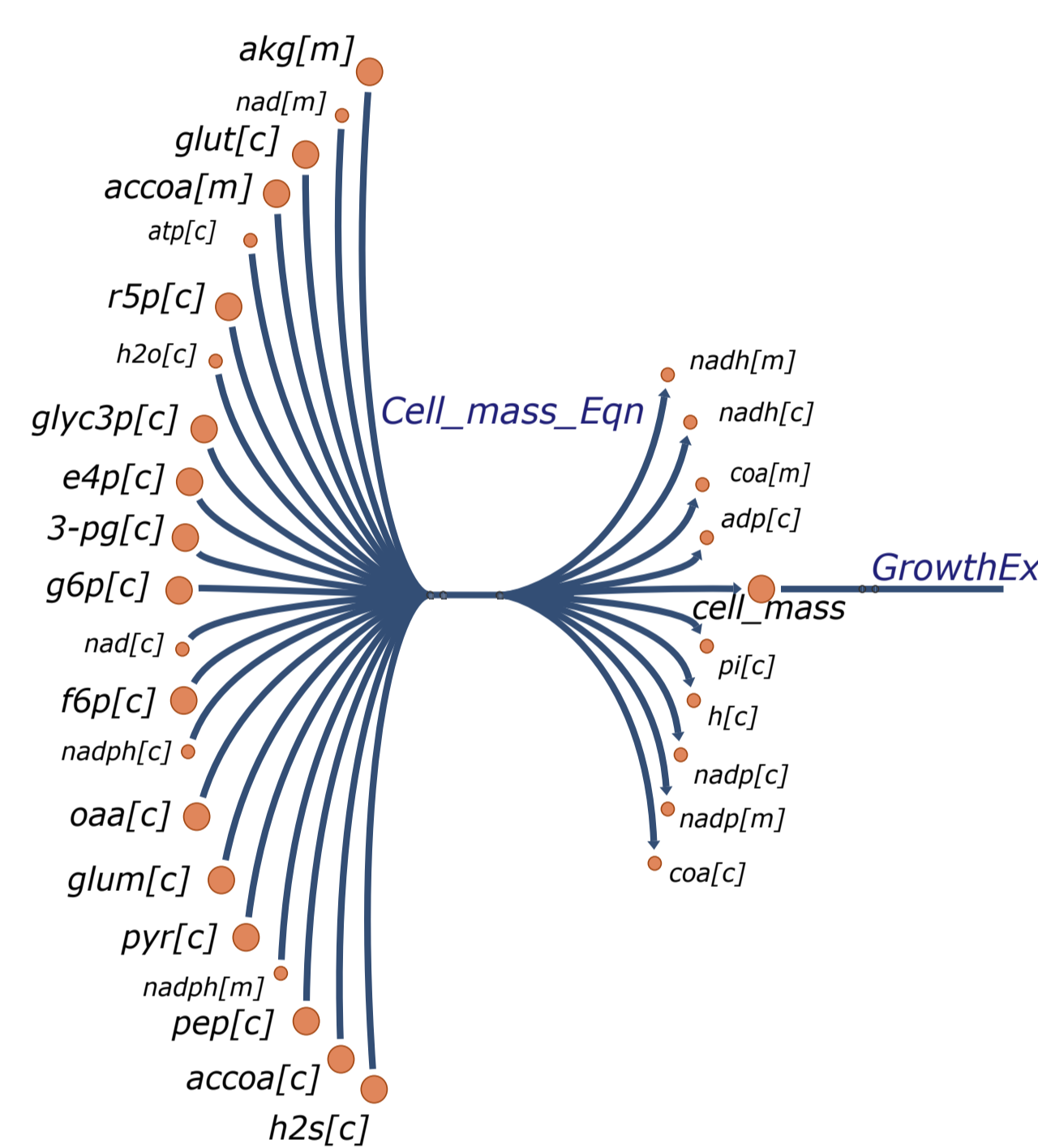
El modelizado metabólico de cepas de interés biotecnológico se ha establecido como una de las herramientas más útiles para el análisis sistemático del metabolismo y su relación con el fenotipo expresado. Estos modelos permiten la predicción de los flujos de todas las reacciones que intervienen en el metabolismo mediante técnicas de optimización como el Análisis de Balance de Flujos (FBA). Las inferencias sobre el metabolismo dependen en gran medida de la función objetivo empleada en FBA, siendo la más utilizada la denominada pseudo-reacción de biomasa. Esta se trata de una reacción empírica, específica para cada microorganismo, compuesta por los precursores metabólicos de las principales biomoléculas que componen a los seres vivos (glúcidos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), junto con los requerimientos de poder reductor (NADPH) y la energía (ATP) necesaria para los procesos anabólicos.

## 2. Objetivo

Analizar la incidencia de la pseudo-reacción de biomasa en las predicciones llevadas a cabo mediante FBA. Para ello, se consideró como microorganismo de estudio la levadura *Rhodosporidium toruloides*, de relevancia por su potencial para la producción de biodiesel de tercera generación, enzimas de interés farmacéutico y carotenoides, entre otros.

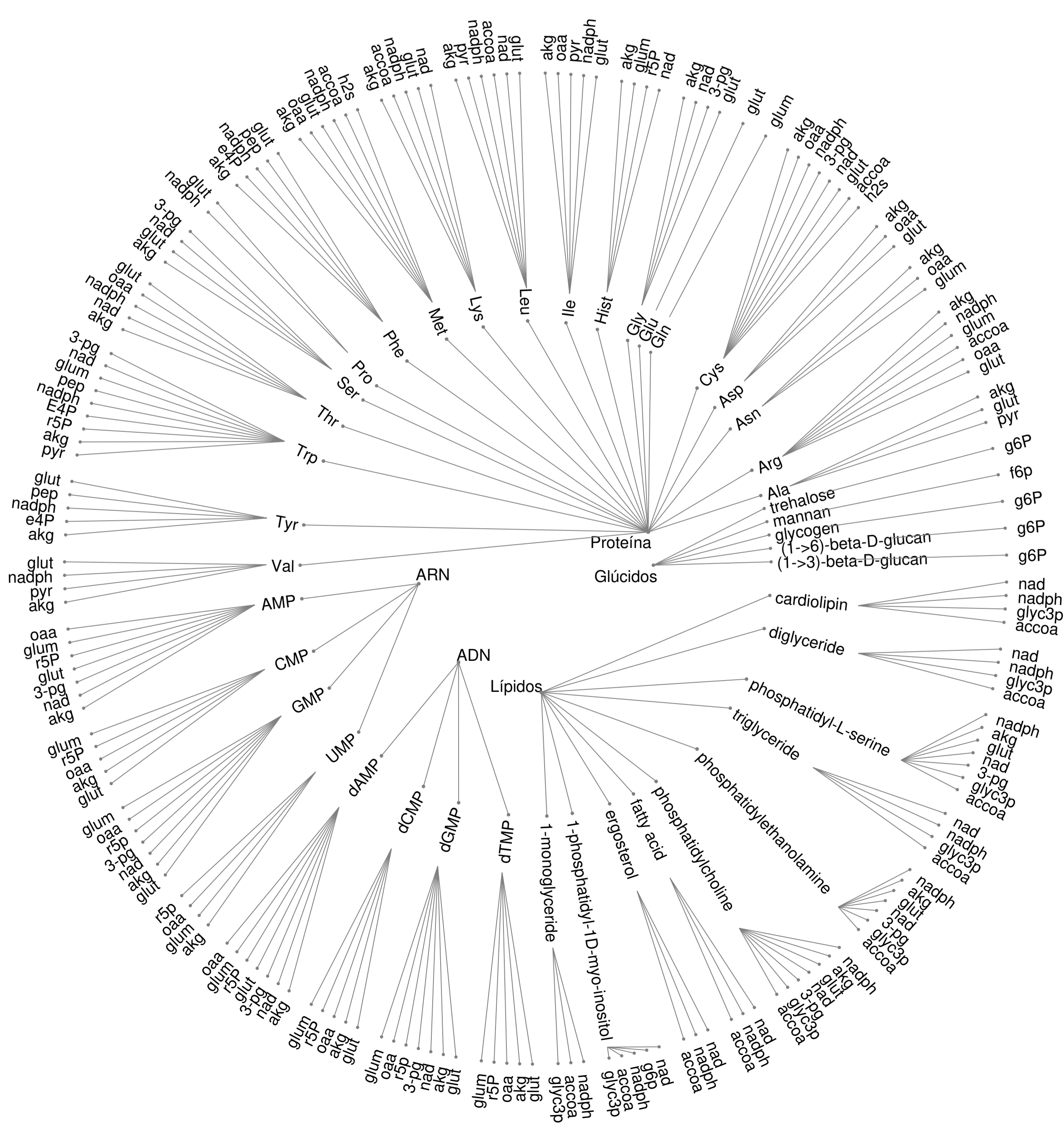
## 3. Modelo metabólico de *R. toruloides*

En este trabajo se utilizó como base un modelo metabólico de *R. toruloides* publicado por nuestro grupo de trabajo. En este modelo, la pseudo-reacción de producción de biomasa fue obtenida a partir de una reconstrucción previa, basada en la composición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y posteriormente fue mejorada y depurada.



## 4. Actualización de la pseudo-reacción de biomasa

Para la actualización de la reacción de biomasa se emplearon dos modelos a escala genómica (GEMs) publicados recientemente (Tiukova, ref.[11] y Dinh, ref.[12]) y bases de datos como YeastPathways y MetaCyc. El ATP necesario para el crecimiento (GAM) y mantenimiento de la cepa (NGAM), se determinó empleando datos experimentales en cultivo continuo (ref.[17]).



Del centro hacia afuera: macromoléculas (nivel 1), constituyentes y monómeros (nivel 2) y precursores de nuestro modelo (nivel 3)

## 5. Parámetros estequiométricos y balances globales

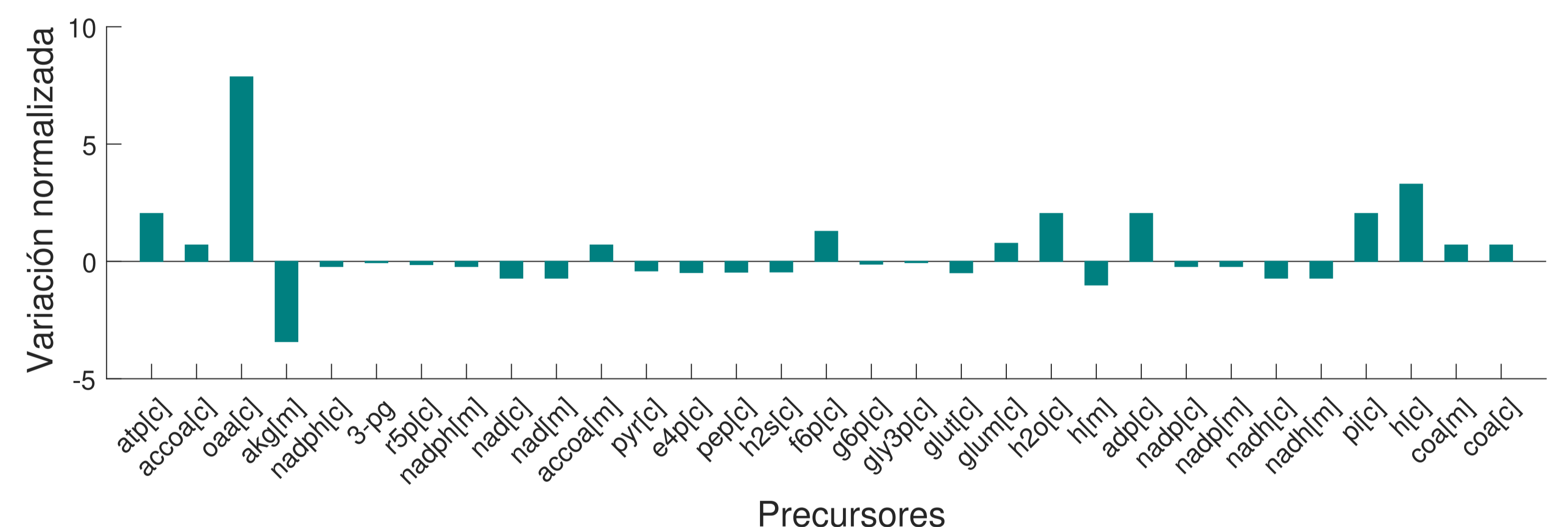
Para evaluar la influencia de las modificaciones en la pseudo-reacción de biomasa, se calcularon los flujos de las reacciones extracelulares ( $v$ ) mediante FBA y se determinaron los rendimientos en biomasa ( $y_{x/s}$ ),  $CO_2$  ( $y_{CO_2/s}$ ) y  $O_2$  ( $b$ ) respecto a glucosa y el rendimiento de biomasa respecto al amonio ( $y_{x/n}$ ). Con éstos, se calcularon los balances de carbono (BC), grado de reducción ( $B\gamma$ ), nitrógeno (BN) y el cociente respiratorio (CR), y se contrastaron con el modelo original y los GEMs de *R. toruloides*.

Rendimientos	Balances globales
$y_{x/s} = \frac{v_{Cell\_mass\_Eqn}}{v_{EX\_GLC}}$	$BC = y_{x/s} + y_{CO_2/s}$
$y_{CO_2/s} = \frac{v_{EX\_CO_2}}{v_{EX\_GLC}}$	$B\gamma = y_{x/s} * \frac{\gamma_x}{\gamma_s} + b * \frac{4}{\gamma_s}$
$b = \frac{v_{EX\_O_2}}{v_{EX\_GLC}}$	$BN = 0.16 * y_{x/n}$
$y_{x/n} = \frac{v_{Cell\_mass\_Eqn}}{v_{EX\_NH_4}}$	$CR = \frac{v_{EX\_CO_2}}{v_{EX\_O_2}}$

Los rendimientos y balances se expresaron en unidades de Cmol, Nmol o mol.

## 6. Resultados obtenidos a partir de las modificaciones

A continuación, se muestran los cambios en la estequiometría de la reacción de biomasa. Se observaron diferencias considerables en los metabolitos derivados del GAM (atp[c], adp[c], h2o[c], pi[c] y h[c]) y en precursores como oaa[c] y alkgl[m] asociados principalmente a la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos. Con las modificaciones realizadas, el NGAM resultó ligeramente superior al del modelo original.



Como muestra la siguiente tabla, la modificación de la pseudo-reacción de biomasa resultó en una mejora sustancial de los balances de  $BC$ ,  $B\gamma$  y  $CR$ . En el caso del  $BN$ , se detectó una desviación respecto al valor esperado del GEM de Tiukova que se transfirió a nuestro modelo.

Parámetro	Valor esperado	Modelo original	Modelo modificado	GEM Tiukova	GEM Dinh
$y_{x/s}$	0,45-0,47	0,424	0,473	0,507	0,475
$y_{CO_2/s}$	0,53-0,55	0,188	0,445	0,451	0,479
$b$	0,46-0,48	0,211	0,409	0,408	0,429
$y_{x/n}$	6,25	6,247	8,811	9,288	5,910
$BC$	1	0,612	0,918	0,959	0,955
$B\gamma$	1	0,648	0,896	0,930	0,919
$BN$	1	0,999	1,410	1,486	0,946
$CR$	$\geq 1$	0,891	1,087	1,106	1,116

Podemos ver que aún con modelos altamente validados como los GEMs de Tiukova y Dinh, la estequiometría está ligeramente alejada de los valores teóricos ideales. Esto se debe fundamentalmente a que la reacción de biomasa es de carácter empírico, y por lo tanto, tiene asociado cierto error e incertidumbre.

## 7. Conclusiones

Los modelos metabólicos han revolucionado en las últimas décadas la forma de analizar, simular y optimizar los procesos biotecnológicos, a la vez que permitieron el diseño de cepas mejoradas para la sobreproducción de productos de interés. El proceso de reconstrucción de redes metabólicas es laborioso, y particularmente, la pseudo-reacción de biomasa constituye un gran desafío e influye significativamente, como se demostró en este trabajo, en las predicciones realizadas.