



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

MODELO CONTINUO DE FLUJOS METABÓLICOS Y REGULACIÓN GÉNICA: APLICACIONES

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

JUAN ANDRÉS CANALES CÁDIZ

PROFESOR GUÍA:

JUAN ASENJO DE LEUZE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

ÁLVARO OLIVERA NAPPA

BÁRBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE

2014

Resumen

El metabolismo de los microorganismos, así como la dinámica de sus cambios, son cada vez más importantes en el desarrollo de la industria y la investigación. El desarrollo de modelos matemáticos es una herramienta que permite estudiar, comprender y simular estos procesos.

El objetivo de este trabajo es la construcción de un modelo de red metabólica que incorpore la regulación génica de sus vías mediante la simulación de síntesis enzimática, además de la validación de una metodología de obtención de parámetros.

La red metabólica propuesta para modelar el metabolismo de *Escherichia coli* está constituida por las reacciones de la vía de la glicólisis, el ciclo TCA, la producción y consumo de acetato y la degradación de lactosa y galactosa. Las fuentes de carbono utilizadas durante el crecimiento del microorganismo fueron glucosa y lactosa, que una vez consumidas dan paso al consumo de galactosa y acetatos secretados previamente, en un proceso conocido como diaúxia. La red da cuenta de las relaciones de entre los metabolitos a través 45 flujos.

Los cambios en el metabolismo, a medida que se pasa de consumir una fuente de carbón a otra, son representados por la síntesis de las enzimas que controlan las vías responsables de estos cambios. La síntesis de enzimas es a partir de genes cuya expresión es reprimida o inducida por los metabolitos presentes en el medio o al interior de la célula.

La metodología utilizada consiste en el desarrollo de ecuaciones cinéticas simplificadas para las reacciones de la red. Estas cinéticas se basan en ley de acción de masa, cinética de Michaelis-Menten y ecuaciones de transporte. La regulación génica representada por la concentración de enzimas, relativa a su máximo, está acoplada al sistema de ecuaciones diferenciales que dan cuenta de las variaciones de concentración de metabolitos.

La obtención de los parámetros cinéticos y las condiciones iniciales de simulación se obtiene a través de un ajuste de parámetros de las expresiones cinéticas sobre los valores de flujos obtenidos a través de un MFA. Para el desarrollo del MFA se utilizan flujos de consumo o producción de metabolitos obtenidos de datos experimentales en tres momentos del cultivo, uno por cada fase.

A partir de la simulación de este modelo se obtuvo perfiles de concentración para los metabolitos extracelulares (glucosa, lactosa, galactosa y acetato), así como también para el crecimiento de biomasa. Los coeficientes de determinación de las curvas superan el valor de 0.83 para el acetato, y el de 0.94 para el resto de los metabolitos y la biomasa. Con estos resultados se concluye que el modelo es capaz de representar de forma cuantitativa el crecimiento diaúxico de *Escherichia coli*.

Agradecimientos

Agradezco a mi profesor guía Juan Asenjo y al profesor Álvaro Olivera por guiarme y aconsejarme durante este trabajo.

*A mi familia por su apoyo incondicional en todo aspecto y momento de mi vida.
Y a mis compañeros por su ánimo y compañía, en especial a Ximena por su ayuda y paciencia a lo largo de todo este proceso.*

Tabla de contenido

| | |
|--|-----|
| Resumen..... | ii |
| Agradecimientos..... | iii |
| Índice de tablas | v |
| Índice de ilustraciones..... | vi |
| Lista de Abreviaciones | vii |
| I. Introducción | 1 |
| 1. Metabolismo de los Microorganismos | 1 |
| 2. Regulación Génica | 3 |
| 3. Redes Metabólicas | 5 |
| 4. Crecimiento Diaúxico..... | 7 |
| 5. MFA: Análisis de Flujos Metabólicos | 9 |
| 6. Modelamiento Matemático | 11 |
| 7. ¿Por qué <i>Escherichia coli</i> ? | 11 |
| 8. Motivación | 11 |
| 9. Objetivos | 12 |
| 9.1. Objetivo General..... | 12 |
| 9.2. Objetivos Específicos..... | 12 |
| II. Materiales y Métodos..... | 13 |
| 1. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> | 13 |
| 2. Construcción de la Red Metabólica | 13 |
| 3. MFA..... | 14 |
| 4. Construcción Modelo Cinético | 15 |
| 5. Síntesis de Enzimas | 16 |
| 6. Programación de Modelo Integrado y Simulación | 17 |
| III. Resultados y Discusión | 19 |
| 1. Red Metabólica..... | 19 |
| 2. MFA..... | 19 |
| 3. Parámetros Cinéticos y Condiciones Iniciales | 22 |
| 4. Simulación..... | 24 |
| IV. Conclusiones | 26 |
| V. Bibliografía..... | 27 |
| VI. Anexos | 30 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Constantes cinéticas del modelo..... | 23 |
| Tabla 2. Concentraciones intracelulares de E. coli durante crecimiento en glucosa. | 24 |
| Tabla 3. Coeficientes de Determinación..... | 24 |
| Tabla 4. Expresiones Cinéticas del Modelo..... | 30 |
| Tabla 5. Parámetros del Modelo. | 31 |
| Tabla 6. Factores de Importancia Relativa en Ajuste de Parámetros..... | 31 |
| Tabla 7. Comparación de flujos MFA/Simulación (fase glucosa). | 32 |
| Tabla 8. Comparación de flujos MFA/Simulación (fase lactosa). | 33 |
| Tabla 9. Comparación de flujos MFA/Simulación (fase galactosa). | 34 |

Índice de ilustraciones

| | |
|---|----|
| Figura 1 “Metabolismo central del carbono de Escherichia coli.[5]” | 2 |
| Figura 2 “Esquema del mecanismo del PTS.[10]” | 3 |
| Figura 3 “Esquema de regulación génica utilizada por Vibrio fischeri para determinar densidad celular y regular la producción de luciferasa.[11]” | 4 |
| Figura 4 “Esquema del mecanismo de represión catabólica.[10]” | 5 |
| Figura 5 “Red metabólica del metabolismo central del carbono de E. coli.[2]” | 6 |
| Figura 6 “Esquema simplificado de vías metabólicas de S. cerevisiae.[1]” | 7 |
| Figura 7 “Crecimiento de E. coli en distintos pares de fuentes de carbono.[20]” | 8 |
| Figura 8 “Mecanismo responsable por el crecimiento diaúxico en medios con glucosa y lactosa, en E. coli.[22]” | 9 |
| Figura 9 “Datos de crecimiento de E. coli utilizados para la entrada del modelo” | 13 |
| Figura 10 “Diagrama de la red metabólica utilizada.” | 20 |
| Figura 11 “Flujos metabólicos obtenidos para la red.” | 21 |
| Figura 12 “Simulación de crecimiento de E. coli.” | 25 |
| Figura 13. “Datos Experimentales Utilizados en MFA.” | 31 |
| Figura 14. “Linealización de una cinética de Michaelis-Menten. $V_{max}=1$; $K_m=1$.” | 35 |

Lista de Abreviaciones

| | |
|--------|---|
| Ac | Acetato intracelular |
| ACoA | Acetil Coenzima A |
| ACTP | Acetil fosfato |
| AcX | Acetato en membrana |
| AcX0 | Acetato extracelular |
| ADP | Adenosin difofato |
| AKG | α -ketoglutarato |
| Allo | Allolactosa |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BPG | 1,3 bifosfoglicerato |
| CARB | Carbohidratos |
| Cit | Citrato |
| CO2 | Dióxido de carbono intracelular |
| CO2X0 | Dióxido de carbono extracelular |
| CoA | Coenzima A |
| DHAP | Dihidroxyacetona fosfato |
| F6P | Fructosa 6 fosfato |
| FBP | Fructosa bifosfato |
| Fum | Fumarato |
| G1P | Galactosa 1 fosfato |
| G6P | Glucosa 6 fosfato |
| Gal | Galactosa intracelular |
| GalX | Galactosa en membrana |
| GalX0 | Galactosa extracelular |
| GAP | Gliceraldehído 3 fosfato |
| Glc | Glucosa intracelular |
| GlcX | Glucosa en membrana |
| GlcX0 | Glucosa extracelular |
| Isocit | Isocitrato |
| Lac | Lactosa intracelular |
| LacX | Lactosa en membrana |
| LacX0 | Lactosa extracelular |
| LIP | Lípidos |
| Mal | Malato |
| NAD | Nicotinamida adenín dinucleótido |
| NADH | Nicotinamida adenín dinucleótido (reducido) |
| OAC | Oxaloacetato |
| PEP | Fosfo Enol Piruvato |
| PPP | Vía de las pentosas fosfato |
| PROT | Proteínas |

| | |
|------|---------------------|
| Pyr | Piruvato |
| SCoA | Succinil Coenzima A |
| Suc | Succinato |

I. Introducción

En el campo de la ingeniería, el modelamiento es una herramienta fundamental para el estudio y diseño de innumerables fenómenos. Dentro de la biotecnología esta herramienta ha avanzado hasta el punto de permitir el estudio del comportamiento de los metabolitos intracelulares permitiendo determinar sus funciones y relevancia en variadas actividades de la célula.

Por otro lado, la regulación génica de las redes metabólicas ha sido ampliamente estudiada en sus mecanismos sin que estos conocimientos den lugar a un entendimiento de las dinámicas de los procesos involucrados en el cambio del metabolismo, a pesar de que ésta puede ser una característica de vital importancia en la ingeniería de procesos.

En el presente trabajo se desarrolló la adaptación y aplicación del modelo publicado por P. Moisset y colaboradores[1] al fenómeno del crecimiento diaúxico en *Escherichia coli*, un fenómeno estudiado por décadas, tanto en sus mecanismos de regulación como en el modelamiento de los metabolitos involucrados. A pesar de lo anterior, los pocos modelos encontrados que integran ambos conceptos no lo hacen de manera continua.[2]

A continuación se introducen los conceptos generales utilizados a lo largo del trabajo, así como los objetivos del mismo.

1. Metabolismo de los Microorganismos

Se conoce como metabolismo al proceso de asimilación de nutrientes y su descomposición en una serie de metabolitos, que se encuentra mediado por diversas enzimas, las que a su vez son reguladas a lo largo de este proceso por variados mecanismos. Algunos de estos mecanismos se explican más adelante.

Es posible clasificar las vías metabólicas en dos tipos; las vías anabólicas corresponden a cadenas de reacciones en las que los metabolitos son reducidos, produciendo los distintos componentes disimilados por la célula; en tanto, las vías catabólicas son aquellas en las que los metabolitos son oxidados, removiendo electrones de un sustrato con el objetivo de generar energía para las demás reacciones. De esta manera la célula debe alcanzar un equilibrio entre la cantidad de nutrientes destinados a formar productos secundarios y la cantidad utilizada en la generación de energía.[3]

La energía química utilizada en los procesos de la célula es almacenada en forma de adenosin trifosfato (ATP), Otros compuestos importantes en las vías dismilitorias son la nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADP) y la nicotinamida adenín dinucleótido (NAD), que junto a sus respectivas versiones reducidas, NADPH y NADH, actúan como co-factores en una gran cantidad de las reacciones metabólicas.

Dentro de la ingeniería metabólica, el metabolismo central del carbono es uno de los más estudiados. Además, es una vía común en la mayoría de los organismos conocidos debido a que es la manera más eficiente, bioquímicamente hablando, de formar los precursores de la biomasa y mantener un balance energético positivo.[3], [4] Como se aprecia en la *Figura 1*, el metabolismo central del carbono está formado principalmente

por la vía de la glicolisis, la de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs, entre algunos otros. Las flechas delgadas indican la reversibilidad o irreversibilidad de las reacciones entre los metabolitos, las flechas gruesas indican la formación de biomasa a partir de los precursores.

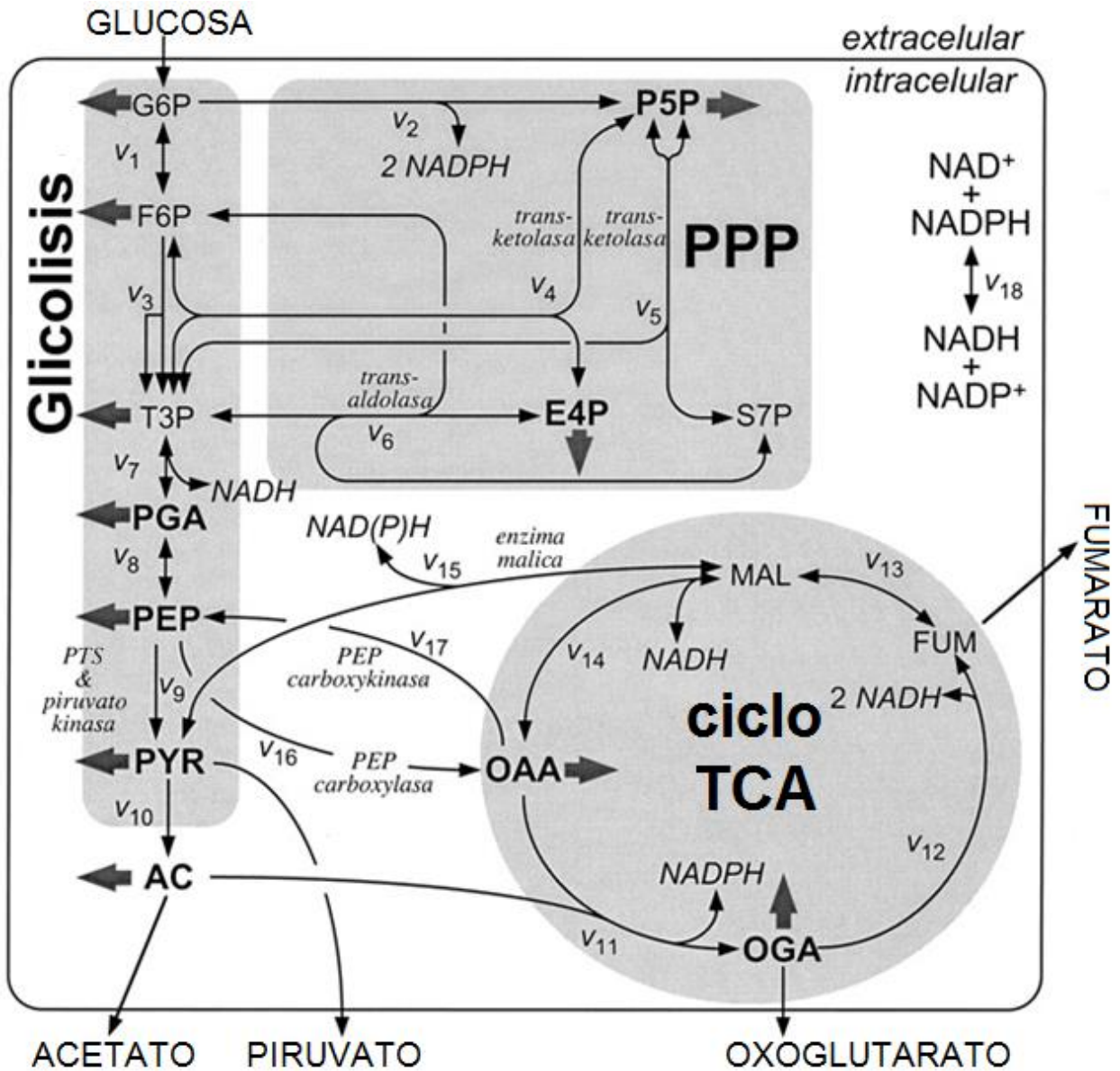


Figura 1 "Metabolismo central del carbono de *Escherichia coli*.[5] Abreviaciones: G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; P5P, pentosas fosfato; E4P, erythrosa-4-fosfato; S7P, seduheptulosa-7-fosfato; T3P, triosa-3-fosfato; PGA, 3-fosfoglicerato; ACA, acetil-coenzima A; AC, acetato; OGA, 2-oxoglutarato; PYR, piruvato; FUM, fumarato; MAL, malato; OAA, oxaloacetato."

Para muchos de los organismos modelo estudiados, la glucosa es la fuente de carbono que permite el crecimiento más rápido y es, por lo general, el primer nutriente consumido en presencia de una mezcla de ellos[6], aunque los microorganismos pueden metabolizar una gran variedad de compuestos orgánicos. En particular, *E. coli* puede utilizar fructosa,

galactosa, manitol, glicerol, glutamato, piruvato y succinato, entre muchos otros como fuente de carbono y energía.[7], [8]

Se les llama precursores de biomasa a los intermediarios de metabolismo central del carbono que son posteriormente transformados en los componentes estructurales y funcionales de la célula, como aminoácidos, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, entre otros. Dentro de los principales precursores se encuentran: Glucosa-6-fosfato, fosfo-glicerato, fosfo-enol-piruvato (PEP), piruvato, acetil CoA, oxalocetato y oxoglutarato, estos 7 metabolitos son los que aportan en mayor medida a la formación de biomasa.[9]

Los organismos cuentan con variados medios de asimilación de nutrientes, siendo el sistema de fosfo transferasa (PTS) uno de los más eficientes en el transporte de fuentes de carbono. El PTS, ilustrado en la *Figura 2*, es un sistema multiproteico que acopla el transporte de azúcares al interior de la célula con su fosforilación. Este sistema consta de al menos 3 proteínas distintas, enzima I (EI), histidina (HPr) y enzima II (EII), EII posee varios dominios que transportan azúcares selectivamente, determinando el tipo de éstos que pueden asimilarse por este sistema. El inicia la reacción al fosforilarse utilizando PEP, este grupo fosfato es transmitido al dominio A de EII por la HPr, y posteriormente transferido por el dominio B al azúcar ingresada por el dominio acoplado a la membrana (C).[10]

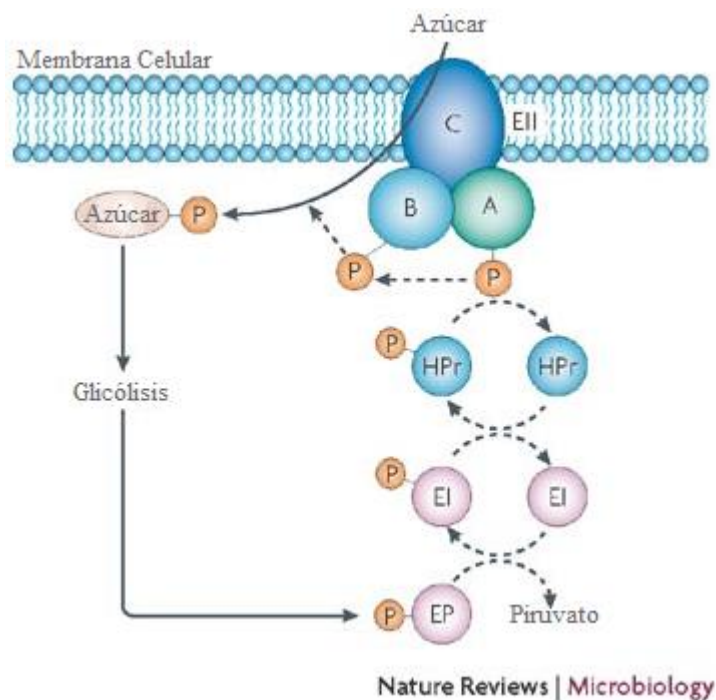
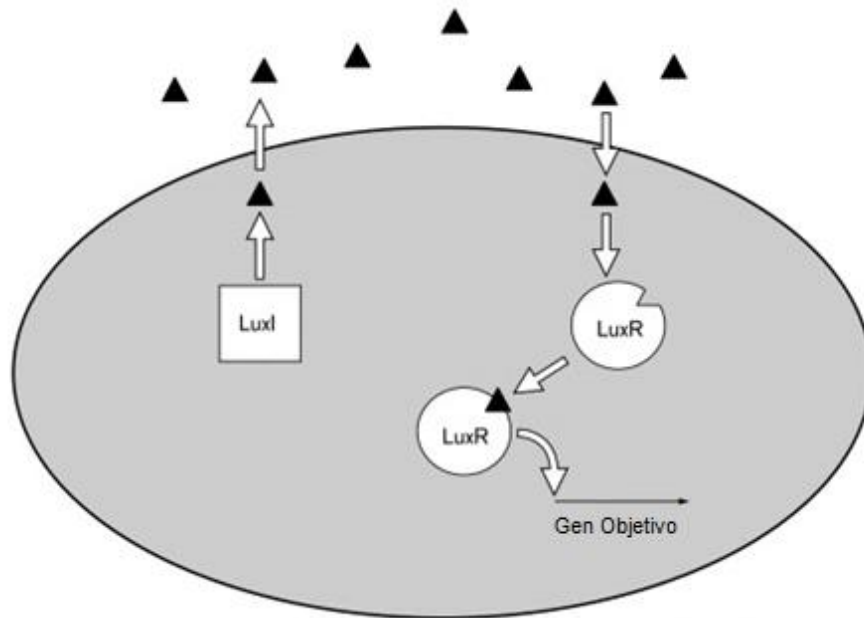


Figura 2 "Esquema del mecanismo del PTS.[10]"

2. Regulación Génica

La regulación génica es uno de los mecanismos de control del metabolismo, siendo su función principal la de maximizar la eficiencia en el uso de los nutrientes. Para esto, los

organismos cuentan con receptores, proteínas que pueden activarse o desactivarse al unirse selectivamente a determinados metabolitos, generando la inducción o represión de la síntesis de proteínas al marcar o bloquear determinados genes, respectivamente.[11]

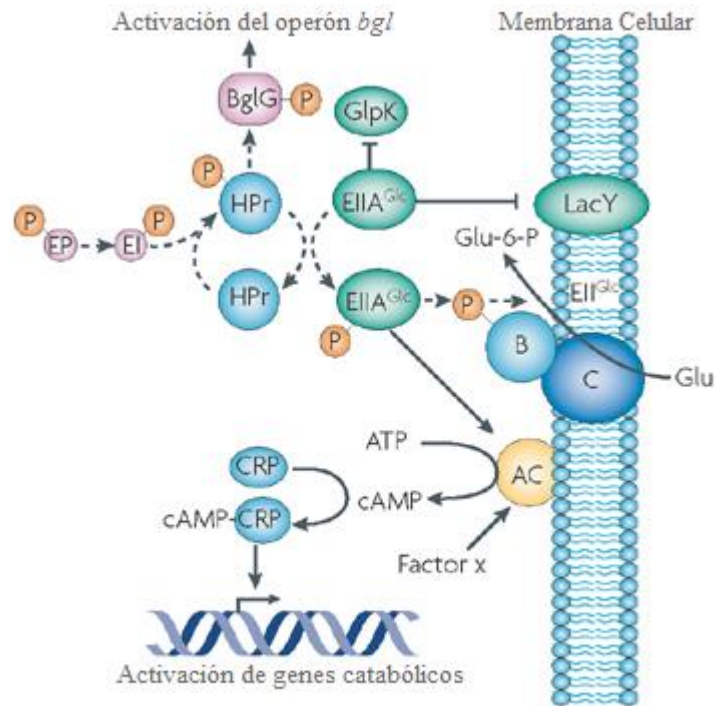


Current Opinion in Microbiology

Figura 3 "Esquema de regulación génica utilizada por *Vibrio fischeri* para determinar densidad celular y regular la producción de luciferasa.[11]"

Dentro de los mecanismos de regulación génica se encuentra la represión catabólica (Figura 4), la que corresponde al mecanismo por el cual la glucosa u otro azúcar rápidamente metabolizable, inhibe continuamente la síntesis de enzimas de otras vías catabólicas.[12]

La unidad central del proceso es el dominio EIIGlc del PTS. Cuando éste se acumula en su estado fosforilado, por falta de glucosa que transporta hacia el interior de la célula mediante el PTS, se activa la cAMP sintetasa que sintetiza adenosin monofosfato cíclico (cAMP) a partir de adenosin monofosfato (AMP). Éste se une a la llamada proteína receptora de cAMP (CRP), cuyo complejo regula la transcripción de enzimas de otras vías catabólicas.[13]–[15]



Nature Reviews | Microbiology

Figura 4 “Esquema del mecanismo de represión catabólica.[10]”

3. Redes Metabólicas

Los set de reacciones, o vías metabólicas, forman y funcionan como una red a través de las cuales los distintos metabolitos reaccionan de manera sucesiva hasta transformarse componentes de biomasa, aceptores finales de electrones u otros productos. Las reacciones que componen esta red son mediadas por enzimas, que son a su vez reguladas por metabolitos de la misma u otras vías, logrando un grado de interconexión entre los metabolitos que alcanza varias dimensiones. A las interconexiones formadas por los metabolitos de un organismo se les denomina redes metabólicas.

Las redes metabólicas se construyen a partir del estudio del genoma de los organismos, identificando las enzimas que catalizan las reacciones de la red. Existen bases de datos en las que esta información se organiza de manera de construir redes que den cuenta de la mayor parte de las vías metabólicas de los diferentes organismos. En particular, las redes metabólicas de *E. coli* han sido ampliamente estudiadas y documentadas.[16]

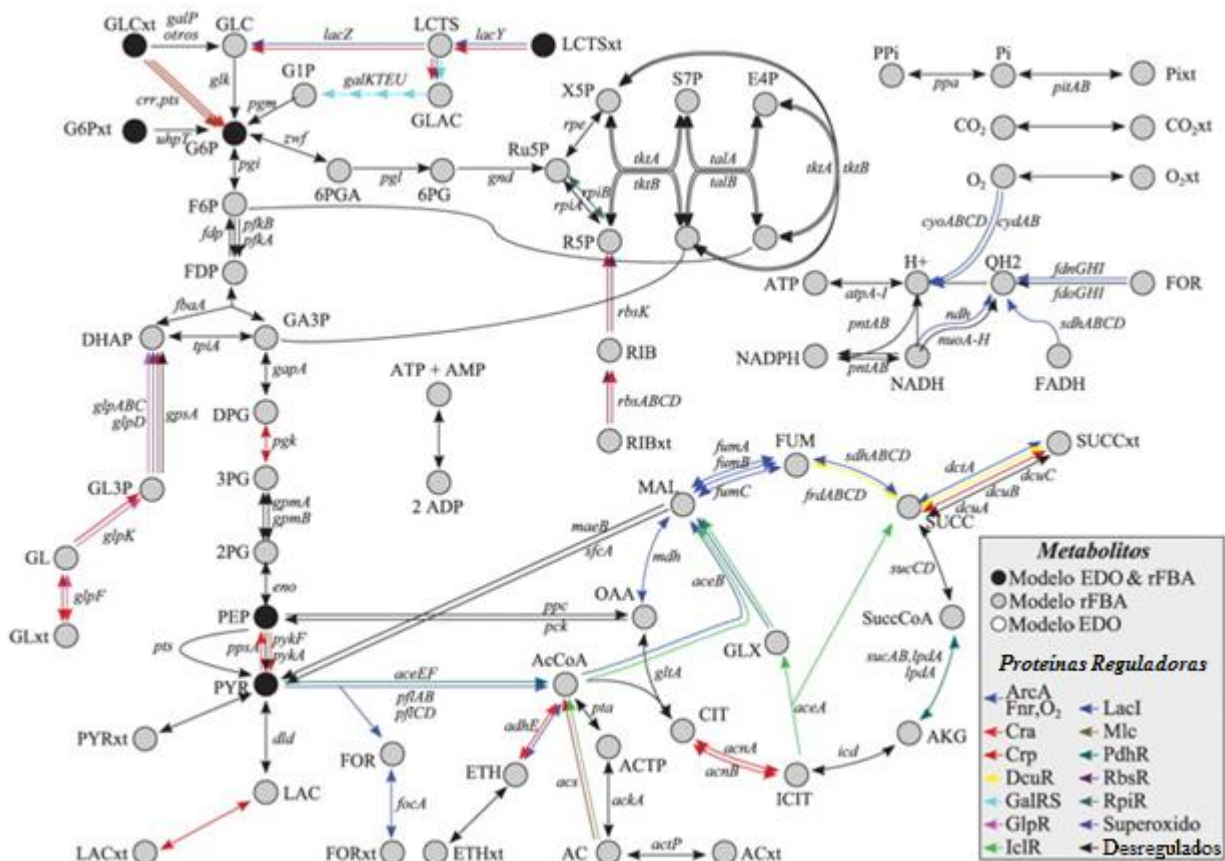


Figura 5 “Red metabólica del metabolismo central del carbono de *E. coli*.[2]

Para la construcción de la red metabólica utilizada en la presente memoria, la mayor parte de la información de vías metabólicas se obtuvo a partir de la base de datos EcoCyc[17] y del trabajo de M. Covert[2] (Figura 5). Del trabajo de P. Moisset[1] (Figura 6) se utilizó la idea de colapsar reacciones en serie en una sola reacción, eliminando metabolitos considerados irrelevantes para el modelamiento. Consideraciones sobre el ciclo del glioxilato, así como también la identificación de los precursores que aportan en mayor medida a la biomasa fueron extraídas de otros trabajos.[9], [18], [19]

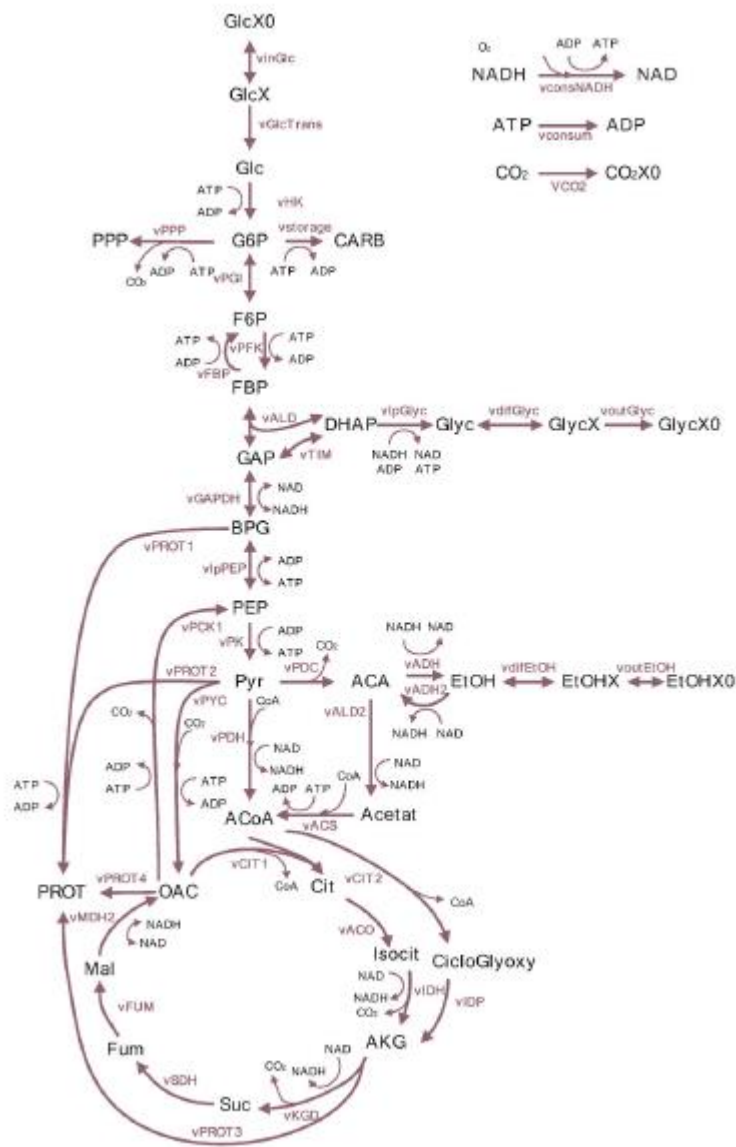


Figura 6 “Esquema simplificado de vías metabólicas de *S. cerevisiae*.[1]”

4. Crecimiento Diaúxico

El crecimiento diaúxico o diaúxia, es un término acuñado por Jacques Monod, para describir el crecimiento de un microorganismo en dos fases. Este fenómeno es observado cuando un microorganismo tiene a su alcance más de un azúcar o nutriente y, en lugar de metabolizarlos simultáneamente, los consume en forma secuencial, obteniéndose dos fases de crecimiento. En la primera fase, el microorganismo consume aquel nutriente para el cual su metabolismo le permite crecer a una mayor velocidad, dejando una segunda fase de crecimiento más lento. En la *Figura 7*, se observa el cultivo de *E. coli* en distintas parejas de fuente de carbono, se observa que en algunas de ellas los microorganismos crecen de forma diaúxica.

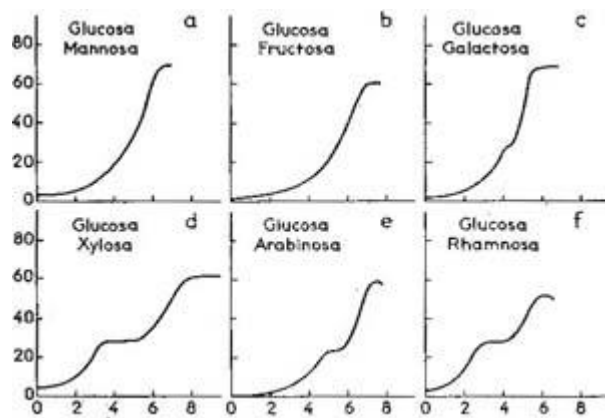


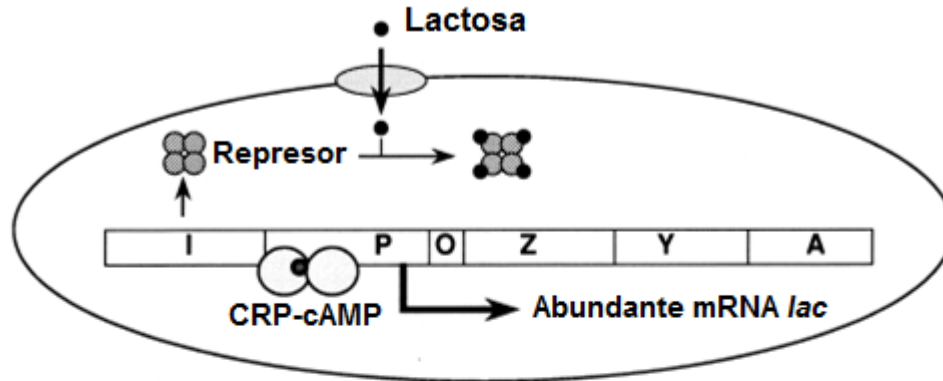
Figura 7 "Crecimiento de *E. coli* en distintos pares de fuentes de carbono.[20]"

Cuando un organismo gasta recursos y energía en sintetizar enzimas que le permiten crecer en un sustrato a una menor tasa de crecimiento, se encuentra en desventaja, reproductivamente hablando, contra aquel microorganismo que pueda metabolizar exclusivamente aquel sustrato que le permita proliferar a una mayor velocidad. De esta manera, los microorganismos capaces de generar este fenómeno, poseen una ventaja evolutiva.[10] Dentro de las distintas fuentes de carbono, la glucosa es generalmente el primer azúcar en ser metabolizado, aunque existen casos en los cuales la secuencia de consumo de los distintos nutrientes está hecha de manera de lograr una mejor armonía en un sistema mayor.[21]

Dentro del crecimiento diauxico, la inducción y síntesis de las enzimas a lo largo de las vías necesarias para metabolizar la segunda fuente de carbono es denominada cambio diauxico. Este proceso es el responsable del tiempo que transcurre entre las fases de crecimiento, que es el tiempo que toma a los microorganismos el transcribir los genes reprimidos previamente por la primera fuente de carbono, y traducirlos en enzimas capaces de degradar los nutrientes consumidos en la segunda fase. Los conjuntos de genes que codifican estas enzimas se conocen como operones, siendo el operón *lac* el más conocido dentro de ellos.

El operón *lac* es quien regula las enzimas capaces de hidrolizar la lactosa. En *E. coli*, este operón, junto a otro mecanismo de represión catabólica, controlan el crecimiento diauxico en glucosa y lactosa (Figura 8). Cuando glucosa y lactosa están presentes en el medio, la EII se acumula en su forma desfosforilada, inactivando la proteína que permite el paso de lactosa a través de la membrana, al no permitir el paso de lactosa el represor *lac*, puede actuar sobre el operón, reprimiendo la síntesis de enzimas. Una vez agotada la glucosa, la lactosa ingresa a la célula a través de la permeasa, inactivando el represor, y permitiendo la síntesis de enzimas capaces de metabolizarla.

En ausencia de glucosa; presencia de lactosa



En presencia de glucosa; presencia de lactosa

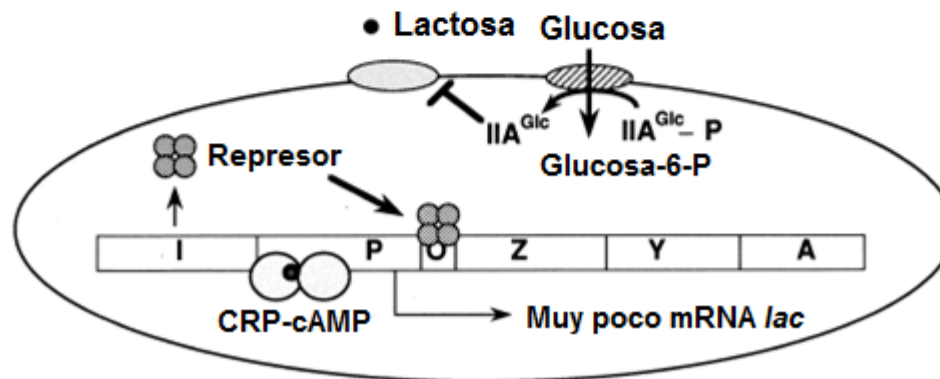


Figura 8 "Mecanismo responsable por el crecimiento diauxico en medios con glucosa y lactosa, en *E. coli*.[22]"

5. MFA: Análisis de Flujos Metabólicos

El análisis de flujos metabólicos es una herramienta que permite el cálculo de flujos a lo largo de las redes metabólicas de un organismo, utilizando un modelo estequiométrico de las reacciones y balances de masa de los metabolitos. Como datos de entrada se utilizan las velocidades de consumo y producción de metabolitos extracelulares, así como la velocidad de producción de biomasa. Por otro lado, este método tiene como supuesto que el sistema se encuentra en estado pseudoestacionario.[23]

Con la cuantificación de los flujos intracelulares es posible determinar vías o reacciones que limitan el crecimiento o la producción de determinados metabolitos, esto permite el rediseño de medios de cultivo o la proposición de manipulaciones genéticas con el objeto de optimizar las características deseadas.[24] Esta metodología ha sido aplicada en numerosos trabajos, con exitosos resultados.[1], [9], [19], [24]

El fundamento sobre el cual se basan los cálculos de flujos intracelulares se explica a continuación.

La información relativa a la estequiometría de las reacciones de las vías catabólicas y anabólicas se utiliza para elaborar un esquema de las redes metabólicas del microorganismo en estudio. La labor de representar todas las reacciones de la red en detalle, es ciertamente difícil. Sin embargo, es posible restringir esta red de acuerdo a capacidades y características del comportamiento celular. Así como también, ciertas vías o intermediarios pueden ser omitidos, de acuerdo al enfoque y la complejidad requerida o buscada en la modelación.

El punto de partida del cálculo de flujos en el MFA es un balance dinámico de flujos para cada metabolito de la célula.

$$\frac{dx_1}{dt} = v_{sin} - v_{cons} - v_{bio} \mp r_1 \quad (1.1)$$

El balance de la Ecuación 1.1 da cuenta de la velocidad de síntesis (v_{sin}), de consumo (v_{cons}), el flujo dirigido a formación de biomasa (v_{bio}) y la tasa de transporte entre la célula y el medio (r_1), del metabolito x_1 . Cabe destacar que la dilución causada por el crecimiento celular es mínima en comparación con la magnitud de los otros flujos, por lo que es despreciada.[23]

El balance de flujos de los metabolitos de la red puede ser reescrito de manera vectorial, como se muestra en la *Ecuación 1.2*, donde x representa un vector de dimensión m , definido por la cantidad de metabolitos en la red, v representa los n flujos entre los metabolitos, S es la matriz estequiométrica, de $n \times m$, cuyas columnas representan metabolitos y filas reacciones de la red metabólica, por último r representa el vector de flujos entre la célula y el medio, teniendo un valor de 0 para los intermediarios de las vías metabólicas.

$$\frac{dx}{dt} = S' \cdot v - r \quad (1.2)$$

Debido a la alta tasa de intercambio de metabolitos intracelulares, estos se ajustan rápidamente a nuevos niveles en caso de perturbaciones, por lo que se asume estado pseudoestacionario. Este supuesto permite eliminar la dependencia del tiempo en la Ecuación 1.2, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} 0 &= S' \cdot v - r \\ S' \cdot v &= r \end{aligned} \quad (1.3)$$

El sistema representado en la Ecuación 1.3 posee m relaciones algebraicas para los m metabolitos. Como se tienen n flujos en el vector v , es necesario conocer a lo menos $n-m$ flujos para que este sistema tenga una solución. Estos flujos generalmente corresponden a los flujos medidos, pudiéndose conocer los flujos restantes. Cuando se tienen mediciones de una cantidad mayor de flujos que los necesarios, se tiene un sistema sobredeterminado, que permite determinar la consistencia de los datos experimentales, comparando resultados obtenidos con los distintos sets de mediciones. Por otro lado, si se tienen medidos una menor cantidad de los flujos requeridos, se da lugar a un sistema subdeterminado, el cual no es posible resolver sin otro tipo de

restricciones, obtenidas a partir de un criterio de optimización, como puede ser maximizar la producción de biomasa o minimizar la magnitud de los flujos, entre otros.

6. Modelamiento Matemático

El modelamiento matemático consiste en la representación de los fenómenos utilizando conceptos y lenguaje matemático. Dentro de la investigación y la industria, el modelamiento matemático permite comprender de mejor manera los fenómenos, así como también proporciona un mejor aprovechamiento de recursos, entregando aproximaciones de resultados que de otra forma serían muy costosos o difíciles de obtener.

El modelo desarrollado en esta memoria, permite representar el crecimiento y metabolismo de *E. coli*, a través de un sistema de ecuaciones cinéticas de las reacciones del mismo. Esta representación puede ayudar a entender de mejor manera las cinéticas asociadas a la regulación génica, así como también, puede entregar estimaciones del comportamiento del organismo frente a una gran cantidad de posibles cambios en las vías metabólicas de éste, sin la necesidad de llevar a cabo cada uno de los experimentos.

Otra de las ventajas que presenta la metodología aquí presentada, es la obtención de parámetros y condiciones iniciales de modelamiento sin la necesidad de llevar a cabo difíciles prueba, como lo son la obtención de concentraciones intracelulares de microorganismos. Además de no requerir un estudio cinético de cada una de las enzimas involucradas en el metabolismo.

Las herramientas utilizadas en el desarrollo del modelo, son descritas en la sección Materiales y Métodos.

7. ¿Por qué *Escherichia coli*?

El crecimiento diaúxico de *E. coli* en glucosa y lactosa ha sido analizado por décadas y ofrece un excelente punto de comparación de desempeño de un nuevo modelo.[14] El largo tiempo que este fenómeno se ha estudiado, así como también el conocimiento que se posee del genoma de este microorganismo, provee de información vital para el desarrollo de una metodología como la utilizada en este trabajo. Como se discutirá más adelante, la existencia de información relativa a la regulación génica y los cambios en las vías metabólicas de acuerdo a factores como la disponibilidad de fuentes de carbono más complejas que acetato, entre otros, permite la elección adecuada de vías metabólicas, para describir de manera más certera lo que ocurre al interior de la célula.

8. Motivación

A pesar de que el análisis de dinámicas de la regulación génica puede dar lugar a mejoras en la eficiencia de los procesos y proporcionar nuevas soluciones a problemas antiguos, éstas no han sido estudiadas en profundidad en el área de bioprocesos.

El desarrollo de herramientas como el modelo matemático presentado en este trabajo, puede ayudar a entender estas dinámicas y a evaluar modificaciones genéticas desde el

punto de vista de las mismas, además de contribuir a la ampliación del conocimiento dentro el área de la investigación.

9. Objetivos

A continuación se enuncian los objetivos del trabajo de memoria.

9.1. Objetivo General

- Validar una metodología de obtención de parámetros y presentar un modelo continuo de simulación y estimación de parámetros *in vivo*, con el fin de representar el crecimiento de *E. coli* en tres fuentes de carbono sucesivas (glucosa, lactosa y galactosa-acetato), utilizando un mismo modelo y set de parámetros.

9.2. Objetivos Específicos

- Encontrar datos experimentales adecuados para la definición del sistema de flujos metabólicos.
- Definir la red metabólica que se utilizará para modelar el metabolismo de *E. coli*, en función del nivel de complejidad que se desea alcanzar.
- Definir la variación en el sistema de flujos para cada fase de crecimiento, en función de la regulación génica del microorganismo.
- Desarrollar expresiones cinéticas para las reacciones en cada fase, acordes al nivel de complejidad del sistema a modelar.
- Evaluar la diferencia de los flujos obtenidos mediante MFA y la simulación del sistema.
- Evaluar el desempeño del modelo, al contrastarlo con datos experimentales.
- Validar la metodología de obtención de parámetros y el modelo en base a datos experimentales.

II. Materiales y Métodos

1. Cultivo de *Escherichia coli*

La primera tarea fue la de encontrar datos de cultivo de *Escherichia coli*, ya que, permiten obtener la información de entrada necesaria para el modelo. Estos datos deben consistir en perfiles de concentración de los metabolitos extracelulares, así como también alguna información de cultivo que permita estimar el consumo de oxígeno.

Los datos utilizados provienen del trabajo de K. Bettenbrock[25], en él se presenta un cultivo de *E. coli* en medio limitado por glucosa y lactosa, los perfiles de metabolitos extracelulares corresponden a glucosa, lactosa, galactosa y acetato[2], además del perfil de biomasa. En la *Figura 9*, se muestran los datos de cultivo encontrados.

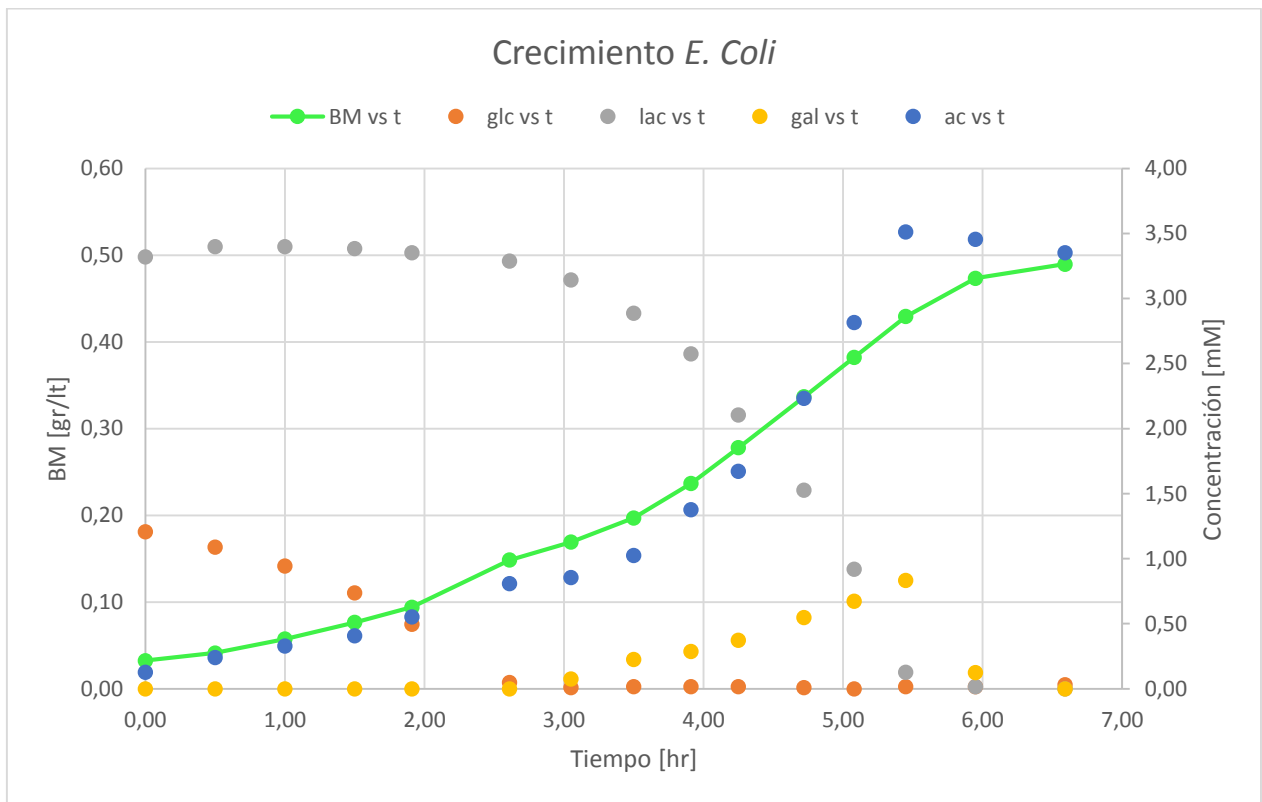


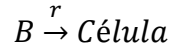
Figura 9 "Datos de crecimiento de *E. coli* utilizados para la entrada del modelo"

2. Construcción de la Red Metabólica

La construcción de esta red de *Escherichia coli* se basó en el trabajo de M. Covert[2]. La red utilizada contiene las vías de glicolisis, el ciclo TCA, la degradación de lactosa y galactosa, además de la producción de proteínas, la fosforilación oxidativa y el consumo de ATP. La síntesis de aminoácidos y nucleótidos fue excluida, así como también la PPP, con el objetivo de trabajar con la red más simple posible. El ciclo del glioxilato fue omitido debido a que siempre se encuentran disponible fuentes de carbono distintas de acetato durante el crecimiento.[26] La elección de los metabolitos tomados como precursores de biomasa fue hecha en relación al trabajo de H. Holms.[9]

3. MFA

La primera parte de este trabajo consistió en la determinación de los flujos medibles necesarios. Es fueron calculados a partir de los datos de cultivo descritos en la sección Cultivo de *Escherichia coli*, los datos utilizados para el cálculo de los flujos se muestran en la *Figura 13* de *Anexos*.



Para el cálculo de flujo se procede con un balance de masa sobre la especie en cuestión, obteniéndose:

$$\frac{d(C_B \cdot vol_m)}{dt} = X \cdot r \cdot vol_m \quad (2.1)$$

$$\frac{d(C_B)}{dt} vol_m + \frac{d(vol_m)}{dt} C_B = X \cdot r \cdot vol_m$$

$$\frac{1}{X} \frac{d(C_B)}{dt} = r - \frac{d(vol_m)}{dt} \frac{C_B}{vol_m} \quad (2.2)$$

Donde:

- C_B Concentración de B [M]
- r Velocidad de consumo de B [mol hr⁻¹ gr⁻¹]
- vol_m Volumen de medio [lt]
- X Concentración de biomasa [gr lt⁻¹]

Si se considera despreciable la variación del volumen celular, puede asumirse que el término $\frac{d(vol_m)}{dt} \frac{C_B}{vol_m} = 0$, quedando de la *Ecuación 2.2*:

$$\frac{1}{X} \frac{d(C_B)}{dt} = r \quad (2.3)$$

Como se disponen de datos de concentraciones discretos, la expresión anterior puede aproximarse por:

$$\frac{1}{X} \frac{\Delta(C_B)}{\Delta t} = r \quad (2.4)$$

Tomando la diferencia de concentraciones para distintos intervalos de tiempo.

Los flujos medidos corresponden a glucosa, lactosa, galactosa y acetato. Estos flujos son insuficientes para el desarrollo del MFA, por lo que aproximaciones sobre el flujo de precursores a biomasa fueron calculadas en base al trabajo de H. Holms.[9] De la misma, forma relaciones entre el flujo de metabolitos hacia la PPP fueron obtenidas del trabajo de J. Zhao.[19] Finalmente, la fracción de lactosa hidrolizada y la fracción transformada

en alolactosa fue estimada a partir del estudio sobre la actividad de beta-galactosidasa llevado a cabo por B. Hall.[27]

Para el desarrollo del MFA, se definió una red metabólica que no presentara singularidades y se identificaron las reacciones correspondientes al crecimiento en cada fase. Se resolvió el sistema obteniendo flujos correspondientes a los momentos escogidos en cada fase.

4. Construcción Modelo Cinético

Parte vital del trabajo fue la construcción de un modelo que represente las dinámicas de las reacciones metabólicas, durante las 3 fases de crecimiento. De acuerdo a esto, el desarrollo del modelo se basó en el trabajo de P. Moisset[1] para definir las expresiones cinéticas de las reacciones de la red.

Para las expresiones cinéticas se decidió utilizar la cinética de Michaelis-Menten en el caso de las enzimáticas y la ley de acción de masa para el resto de las reacciones.

La ley de acción de masa estipula que la velocidad de una reacción es proporcional a la concentración de las especies que reaccionan, con el valor de cada concentración elevado al coeficiente estequiométrico de la reacción.

Se tiene que para la reacción $A + B \rightarrow C$, la velocidad de reacción v está dada por:

$$v = K \cdot [A][B] \quad (2.5)$$

Donde k es la constante cinética, $[A]$ es la concentración del compuesto A , y $[B]$ la concentración del compuesto B .

Para una reacción de tipo reversible $A \leftrightarrow C$, se tiene que la velocidad de reacción v está dada por:

$$v = r_d \cdot [A] - r_i \cdot [C] \quad (2.6)$$

Donde r_d es la constante cinética de la reacción directa, r_i de la reacción inversa, $[A]$ es la concentración del compuesto A , y $[C]$ la concentración del compuesto C .

La cinética de Michaelis-Menten plantea que la velocidad de reacción v , para reacciones enzimáticas del tipo está dada por:

$$v = \frac{K[E][S]}{K_M + [S]} \quad (2.7)$$

Durante este trabajo se trabajó con una forma simplificada de la cinética planteada en la Ecuación 2.7. Asumiendo que $k_M \gg [S]$ la expresión puede ser simplificada de la siguiente manera:

$$v = \frac{K[E][S]}{k_M}$$

$$v = K'[E][S] \quad (2.8)$$

Definiendo $e = \frac{[E]}{[E]_{max}}$ puede reescribirse la *Ecuación 2.8* como:

$$v = e \cdot K''[S] \quad (2.9)$$

El valor de e puede variar entre 0 y 1, siendo 0 cuando la enzima no está expresada, y 1 en su máxima expresión. Para enzimas constitutivas el valor es siempre 1.

La tasa de producción de biomasa fue considerada proporcional a la tasa de producción de proteínas:

$$\frac{dBiomasa}{dt} = K_{yield} v_{PROT} [Biomasa] \quad (2.10)$$

Donde v_{PROT} corresponde a la velocidad de producción de proteínas a partir de los precursores de biomasa de la red metabólica.

Las expresiones para cada uno de los flujos de la red metabólica utilizada se encuentran en la *Tabla 4* de *Anexos*.

5. Síntesis de Enzimas

El modelamiento de síntesis de enzimas es otra parte fundamental en este trabajo, ya que es lo que conecta la expresión génica con los flujos metabólicos. Siendo que los tiempos de síntesis y degradación de enzimas son pequeños en relación con los tiempos de simulación o cultivo, un modelo simplificado de síntesis enzimática fue utilizado.[1]

La velocidad de expresión de las enzimas está determinada por la concentración de su mRNA y su velocidad de degradación:

$$\frac{d[E]}{dt} = K_{enz1}[mRNA] - K_{enz2}[E] \quad (2.11)$$

Ya que, el valor de e cambia de 0 a 1 en tiempos cortos en comparación con el tiempo de simulación, este proceso es modelado por una función de Hill:

Para represión por glucosa extracelular, basada en mecanismo explicado en la sección *Crecimiento Diaúxico de Antecedentes*, se tiene:

$$\frac{d[mRNA_1]}{dt} = K_{mRNA} \left(\frac{0.1^\alpha}{0.1^\alpha + [GlcX]^\alpha} - [mRNA_1] \right) \quad (2.12)$$

$$\frac{d[e_1]}{dt} = K_{enz}([mRNA_1] - [e_1]) \quad (2.13)$$

Para la inducción de la degradación de galactosa, se tiene:

$$\frac{d[mRNA_2]}{dt} = K_{mRNA} \left(\frac{[Gal]^\alpha}{0.1^\alpha + [Gal]^\alpha} - [mRNA_2] \right) \quad (2.14)$$

$$\frac{d[e_2]}{dt} = K_{enz}([mRNA_2] - [e_2]) \quad (2.15)$$

Para la represión de entrada de acetato o galactosa durante crecimiento en glucosa, se tiene:

$$\frac{d[mRNA_3]}{dt} = K_{mRNA} \left(\frac{0.1^\alpha}{0.1^\alpha + \max([GlcX], [Glc])^\alpha} - [mRNA_3] \right) \quad (2.16)$$

$$\frac{d[e_3]}{dt} = K_{enz}([mRNA_3] - [e_3]) \quad (2.17)$$

Los valores de K_{mRNA} y K_{enz} fueron elegidos de modo que los tiempos de degradación del mRNA y las enzimas sean del orden de minutos. En la Tabla 5 de *Anexos* se muestran los valores utilizados de K_{mRNA} , K_{enz} y α .

6. Programación de Modelo Integrado y Simulación

El primer paso para simular el sistema es contar con los parámetros cinéticos de las reacciones del modelo, así como también condiciones iniciales para la resolución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales propuesto.

Para obtener los valores de los parámetros cinéticos y de las condiciones iniciales de concentración, se procede a igualar las expresiones cinéticas con los flujos calculados con el MFA. Sin embargo, este sistema consta de 191 incógnitas (62 constantes cinéticas y 43 concentraciones), pero solo 135 ecuaciones (45 flujos de la red metabólica). Por lo que es necesario utilizar un acercamiento distinto, se plantea una función de error que relaciona los flujos calculados con las expresiones cinéticas, además de consideraciones sobre el comportamiento del sistema de acuerdo al funcionamiento celular. Posteriormente se procede a encontrar un mínimo de esta función dentro de los rangos definidos de cada parámetro.

La función de error utilizada está dada por la siguiente expresión[1]:

$$R = \alpha_W \sum_i \left(\frac{v_i}{f_{MFA,i}} - 1 \right)^2 + a \text{ priori} \quad (2.18)$$

$$+ \gamma_W \sum_i C_i^2 + \delta_W \sum_i (K_i - 5)^2 + \text{conservación}$$

Donde

$$a \text{ priori} = \varphi_W \left[\begin{array}{l} (C_{GlcX0,glc} - \overline{C_{GlcX0,glc}})^2 \\ + \left(C_{GlcX,glc} - \frac{\overline{C_{GlcX0,glc}}}{K_{conv}} \cdot 0.995 \right)^2 \end{array} \right] + \beta_W (C_{GlcX0,lac}^2 + C_{GlcX,lac}^2) \quad (2.19)$$

$$\begin{aligned}
& \text{conservación} = \\
& \varepsilon_W \left[\begin{array}{l} (C_{ATP,glc} + C_{ADP,glc} - C_{ATP,lac} - C_{ADP,lac})^2 \\ + (C_{NADH,glc} + C_{NAD,glc} - C_{NADH,lac} - C_{NAD,lac})^2 \\ + (C_{ACoA,glc} + C_{SCoA,glc} + C_{CoA,glc} - C_{ACoA,lac} - C_{SCoA,lac} - C_{CoA,lac})^2 \end{array} \right] \quad (2.20)
\end{aligned}$$

El término que acompaña a γ_W previene que las concentraciones intracelulares sean demasiado grandes, así como el que acompaña a δ_W evita que las constantes sean demasiado pequeñas, siendo la elección del valor utilizado en este término ($K_i - 5$) de naturaleza arbitraria.

El término *a priori* da cuenta de las concentraciones medidas, donde $\overline{C_{GlcX0,glc}}$ es la concentración de glucosa extracelular en la fase de crecimiento en glucosa. Estos términos son también incluidos para los metabolitos que correspondan en cada fase.

El término *conservación* corresponder a la conservación de metabolitos relacionados a lo largo del crecimiento. También se incluyen en la expresión los términos para la fase de crecimiento en galactosa.

Los factores de importancia relativa, con el subíndice W , indican el aporte relativo entre las expresiones de la función de error. En la Tabla 6 de *Anexos*, se muestran los valores utilizados de estos factores.

El valor de e durante el ajuste de parámetros, tiene carácter binario, siendo 1 o 0, para el caso en que la enzima está presente o no, respectivamente.

El proceso de optimización se llevó a cabo 100 veces, desde condiciones iniciales aleatorias, para luego optimizar el mejor de los sets de parámetros encontrado en este ciclo relajando las restricciones sobre las concentraciones y constantes. Para ambos procesos fue utilizado el método del gradiente reducido generalizado implementados en MATLAB® y Microsoft Excel®.

Para la simulación del sistema se utilizó las constantes obtenidas del ajuste de parámetros para la cinética, y las concentraciones obtenidas para la fase de crecimiento en glucosa como condiciones iniciales. El método de resolución utilizado corresponde a una función basada en fórmulas de diferenciación numérica implementado en MATLAB.

Las constantes de rendimiento de biomasa (K_{yield}) fueron obtenidas mediante un ajuste de parámetros del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias sobre los datos de cultivo de *E. coli*. Estas constantes se muestran en la Tabla 5 de *Anexos*.

III. Resultados y Discusión

1. Red Metabólica

El primer resultado obtenido corresponde a la red metabólica formada con los datos encontrados en bibliografía, que se muestra en la *Figura 10*. Esta red está constituida por las vías de degradación de lactosa y galactosa, glicólisis, ciclo TCA, producción de acetato y reacciones que indican la formación de biomasa a partir de determinados precursores. La capacidad de secretar galactosa durante el crecimiento en lactosa fue añadido al modelo en función del trabajo de K. Bettenbrock.[25] Se considera una reacción que engloba el consumo energético como paso de ATP a ADP, así como también la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa.

Tratándose de un modelo simplificado, la PPP fue reemplazada por el flujo neto hacia esta ruta. El ciclo de glioxilato fue omitido debido a que su función es la de evitar las reacciones de descarboxilación del ciclo TCA durante el crecimiento en acetato, de manera de contrarrestar el consumo de precursores de biomasa involucrados en ambos ciclos,[26] sin embargo, durante el tiempo de cultivo modelado, el consumo de acetato es acompañado por galactosa, por lo que la producción de metabolitos necesarios para el ciclo (como el oxaloacetato) ocurre desde la glicólisis. Otra de las simplificaciones hechas para la construcción de este modelo fue la de considerar el consumo de acetato solo a través de las reacciones ilustradas en la *Figura 10*, omitiendo de esta forma la reacción catalizada por la Acetyl-CoA sintetasa, la cual genera ACoA y AMP a partir de acetato y ATP, y eliminando así el AMP de los metabolitos necesarios a modelar el comportamiento de la red. Finalmente, se optó por reemplazar reacciones en serie de varios metabolitos por sólo una reacción, como el paso de BPG a PEP, saltando los intermediarios 3-fosfoglicetato y 2-fosfoglicerato, de manera de reducir el número de metabolitos.

2. MFA

Los resultados obtenidos del MFA se muestran en la *Figura 11*. Se observa que durante el crecimiento en lactosa, los flujos de algunas vías metabólicas alcanzan valores cercanos al doble de aquellos mismos en otras fases de crecimiento. En este caso, la producción de ATP no es necesariamente estequiométrica respecto a las reacciones, ya que, los organismos pueden utilizar ciclos fútiles de manera gastar el exceso de energía producida.[28]

En cuanto al desarrollo del MFA, debido a que no se cuenta con datos experimentales suficientes para lograr un sistema determinado de ecuaciones e incógnitas, fue necesario estimar algunos de los flujos de salida de la red metabólica. Los flujos estimados fueron los relacionados con la producción de biomasa. Los precursores de biomasa escogidos para representar la formación de proteínas fueron elegidos según el trabajo de H Holms,[9] en este caso corresponden a: BPG, PEP, Pyr, ACoA, AKG y OAC. Estas estimaciones fueron realizadas en base a la composición aminoacídica de *E. coli* y a la velocidad de crecimiento en cada fase. Los flujos de G6P a carbohidratos y ácidos nucleicos, así como también el flujo de DHAP a lípidos, fueron estimados de manera similar.

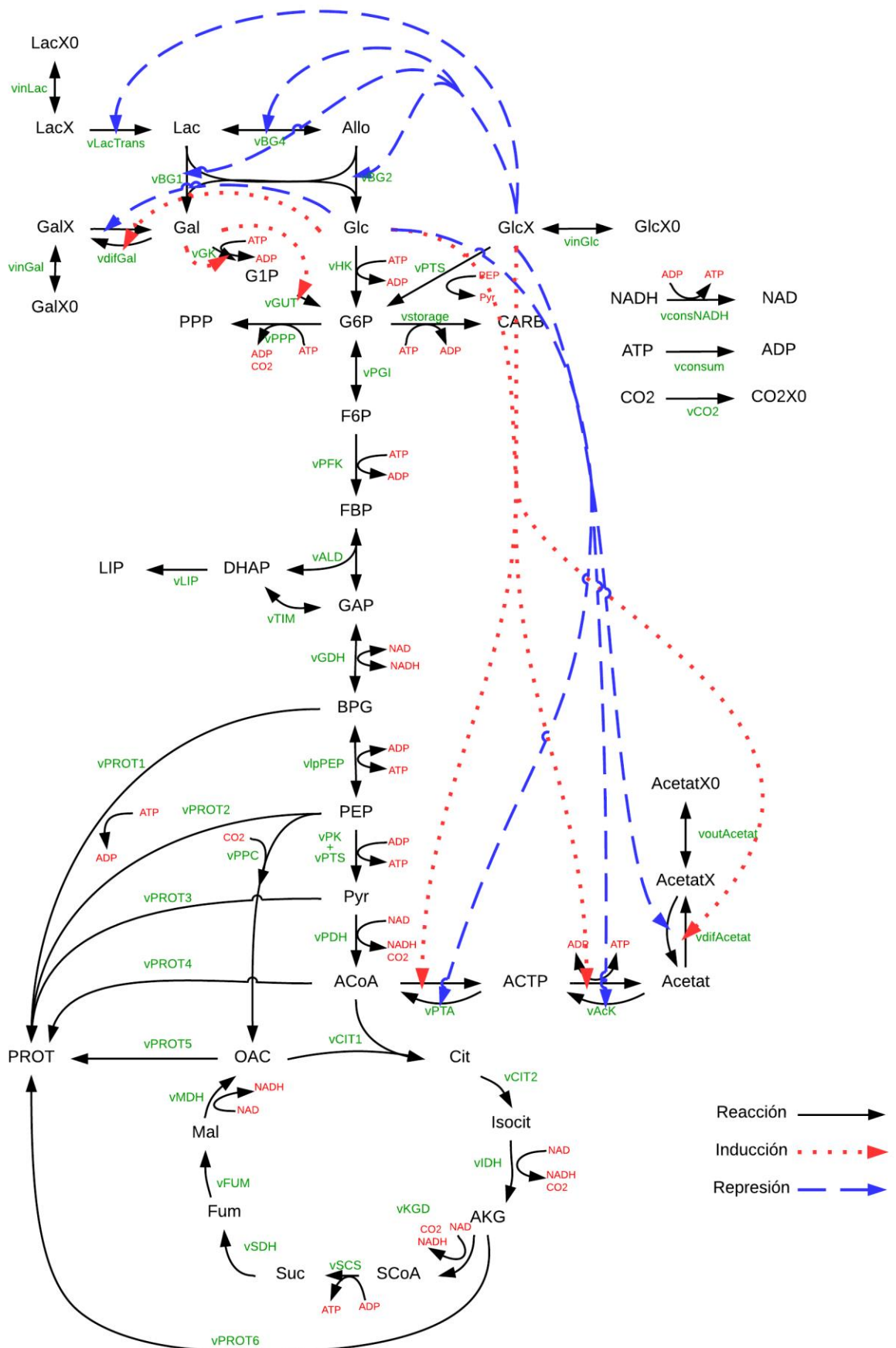


Figura 10 "Diagrama de la red metabólica utilizada."

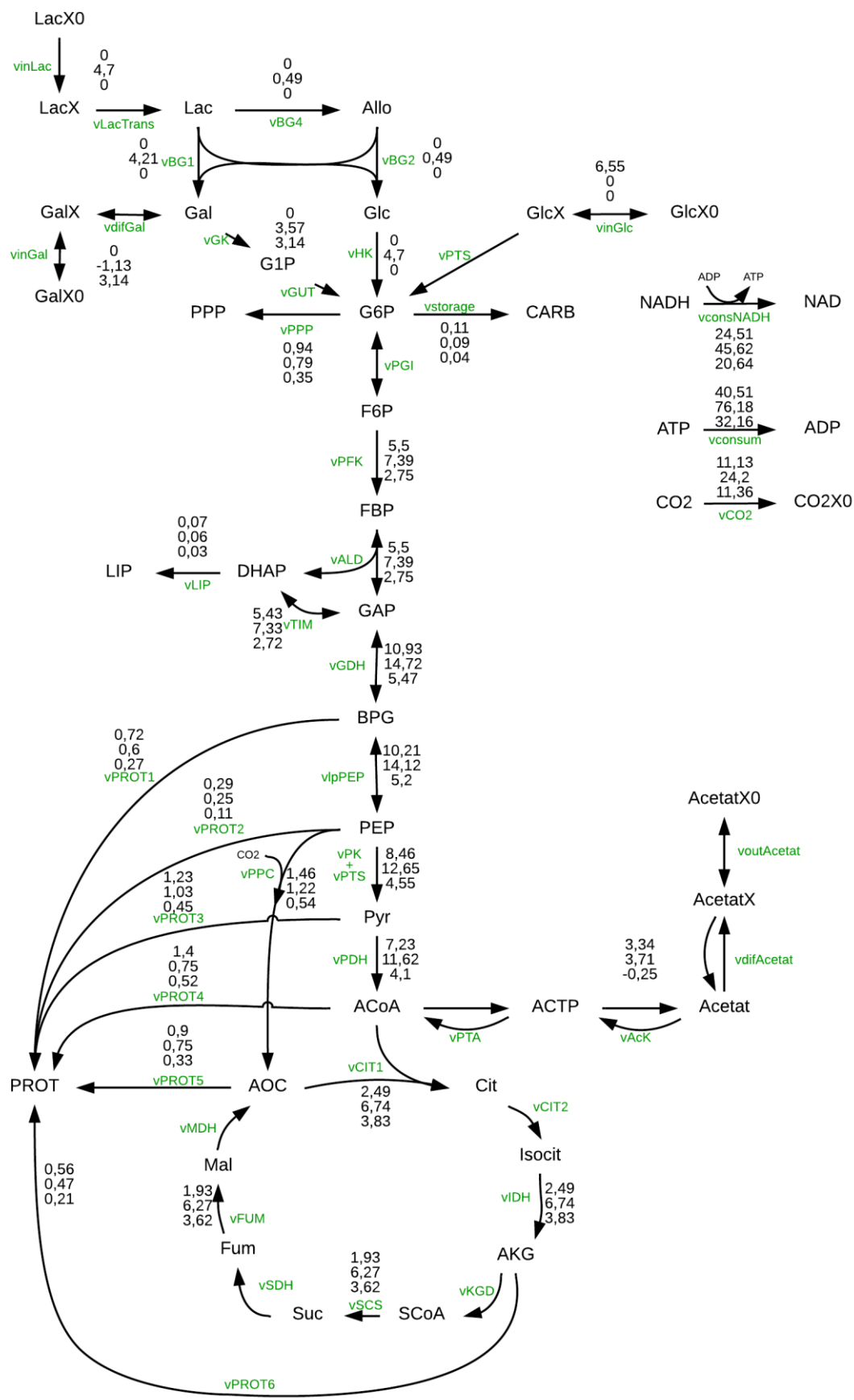


Figura 11 "Flujos metabólicos obtenidos para la red."

En cuanto a la degradación de lactosa fue necesario recurrir a estudios cinéticos de la enzima beta-galactosidasa para determinar la proporción entre la velocidad de hidrólisis de lactosa y la producción de allolactosa.[27]

3. Parámetros Cinéticos y Condiciones Iniciales

Para obtener los parámetros cinéticos necesarios para la simulación del sistema, se realizó un ajuste de parámetros de las expresiones asociadas a la cinética de reacción con respecto a los valores de flujos obtenidos del MFA. Este ajuste de parámetro arrojó no sólo constantes cinéticas de las reacciones modeladas (*Tabla 1*), sino también concentraciones intracelulares de los metabolitos de la red (*Tabla 2*).

Las expresiones cinéticas utilizadas corresponden a simplificaciones de la cinética de Michaelis-Menten, en las que se considera que las concentraciones intracelulares son menores que las K_m , y por lo tanto sólo se utiliza la parte lineal de la expresión (desarrollo explicado en la sección 4 de *Materiales y Métodos*). El estudio de tal relación no fue llevado a cabo durante este trabajo, por lo que, se propone realizar tal estudio para futuros desarrollos del modelo. Si bien las concentraciones intracelulares pueden variar en gran medida, como se muestra en los rangos obtenidos según bibliografía (*Tabla 2*), pudiendo superar los valores de K_m de las enzimas, el supuesto de que la cinética sea lineal no es exagerada ya que, como se aprecia en la *Figura 14* de *Anexos*, la cinética de Michaelis-Menten tendrá un comportamiento pseudo lineal, con un coeficiente de determinación (R^2) superior a 0.9, mientras la concentración no supere en 2.5 el valor de K_m .

Las constantes cinéticas relacionadas con el transporte de glucosa y lactosa fueron ajustadas directamente de los flujos calculados a partir de datos experimentales. A pesar de que el modelo fue desarrollado en base a fundamentos fenomenológicos, los demás valores de las constantes obtenidos no necesariamente se condicen con las características de los fenómenos individuales que conforman el modelo, sino más bien, cumplen la función de representar la red metabólica como un conjunto. Una de las causales esto, es que cada constante representa más de un concepto y puede agrupar velocidades de reacción máximas, constantes de saturación, normalización por concentraciones intracelulares de metabolitos (en caso de que estos sean similares a la constante de saturación), concentraciones intracelulares de enzimas, e incluso agrupar cinéticas de varias reacciones en serie, como se explica en la sección 1 de *Resultados y Discusiones*. Por otro lado, los valores entregados por el ajuste corresponden simplemente a una solución al sistema, en la que grupos de parámetros pueden tomar infinitos valores y el resultado final está fuertemente influenciado por las condiciones iniciales. El análisis de la relación de los valores obtenidos con las características cinéticas de cada reacción o grupo de reacciones puede hacerse a través de ensayos de medición de actividad enzimática *in vivo* la que junto con información acerca de la cinética de las reacciones *in vitro*, podría ayudar a determinar la capacidad de manejar vías metabólicas o reacciones de manera individual y manipularlas con el objetivo de obtener predicciones del comportamiento celular frente a modificaciones genéticas. Se propone llevar a cabo este tipo de análisis en futuras implementaciones de modelo.

Tabla 1. Constantes cinéticas del modelo.

| | | | | | |
|----------------|-------|----------------|------|----------------|------|
| K_{inLac} | 136 | K_{PGIf} | 83,3 | K_{PPC} | 6,70 |
| $K_{convLac}$ | 2,59 | K_{PGIr} | 156 | K_{Cit1} | 1101 |
| K_{Lac1} | 5,90 | K_{PFK} | 3,36 | K_{Cit2} | 103 |
| K_{Lac2} | 0,05 | K_{ALDf} | 106 | K_{IDH} | 306 |
| K_{BG4f} | 83,5 | K_{ALDr} | 1058 | K_{KGD} | 340 |
| K_{BG4r} | 339 | K_{TIMf} | 410 | K_{SCS} | 30,9 |
| K_{BG1} | 51,4 | K_{TIMr} | 32,8 | K_{SDH} | 131 |
| K_{BG2} | 26,2 | K_{GDHf} | 1999 | K_{FUM} | 209 |
| K_{inGal} | 363 | K_{GDHr} | 96,1 | K_{MDH} | 354 |
| $K_{convGal}$ | 11,4 | $K_{lpPEPff}$ | 1375 | $K_{storage}$ | 0,03 |
| $K_{difGalff}$ | 176 | K_{lpPEPr} | 0,10 | K_{PPP} | 0,23 |
| $K_{difGalr}$ | 2,97 | K_{PK} | 134 | K_{LIP} | 3,74 |
| K_{GK} | 3,39 | K_{PDH} | 2759 | K_{PROT1} | 7,86 |
| K_{GUT} | 91,9 | K_{PTAfff} | 72,1 | K_{PROT2} | 0,47 |
| K_{HK} | 14,1 | K_{PTAr} | 79,6 | K_{PROT3} | 1,17 |
| K_{inGlc} | 144 | K_{AcKfff} | 36,1 | K_{PROT4} | 17,0 |
| $K_{convGlc}$ | 0,99 | K_{AcKr} | 1,83 | K_{PROT5} | 1,04 |
| K_{PTS1} | 6,86 | $K_{difAcfff}$ | 10,8 | K_{PROT6} | 3,86 |
| K_{PTS2} | 0,05 | K_{difAcr} | 1,90 | $K_{consNADH}$ | 1353 |
| K_{PTS3} | 0,001 | K_{outAc} | 4,78 | K_{consum} | 13,5 |
| | | K_{convAc} | 4,46 | K_{CO2} | 410 |

La *Tabla 2* muestra las concentraciones intracelulares obtenidas del ajuste de parámetros entre las expresiones cinéticas y los valores de flujo del MFA. Estas concentraciones fueron utilizadas como condición inicial para la simulación del crecimiento de *E. coli* de acuerdo a la red metabólica planteada. Los rangos de concentraciones de la *Tabla 2* corresponden a los encontrados en literatura.[29]–[34] El 70% de las concentraciones de la simulación cae dentro de los rangos, o se encuentra dentro del orden de magnitud de los valores encontrados. No se encontraron reportes de concentraciones intracelulares para BPG en la literatura consultada, y para varios de los metabolitos sólo se tiene un valor de referencia, por lo que no es posible concluir respecto a la cercanía de este al valor utilizado como condición inicial. Dentro de los metabolitos cuya concentración difiere en mayor medida con la encontrada en literatura, los más importantes son el ACoA y el NAD, ya que ACoA es un intermediario en la mayoría de las vías modeladas, y NAD está relacionado con el balance energético del sistema. Debido a la cantidad de intermediarios no es fácil determinar, *a priori*, la importancia de estas diferencias en el comportamiento de la red, sin embargo, este es otro factor que lleva a considerar los parámetros del modelo más como un todo que por partes, y que impulsa a proponer un análisis como el mencionado anteriormente.

Tabla 2. Concentraciones intracelulares de *E. coli* durante crecimiento en glucosa.

| | Conc. modelo [g/L] | Rango Bibliografía [g/L] | | Conc. modelo [g/L] | Rango Bibliografía [g/L] |
|-------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| <i>Glicólisis</i> | | | <i>Ciclo TCA</i> | | |
| G6P | 0,32 | 0,06-0,78 | ACoA | 0,02 | 0,11-0,49 |
| F6P | 0,16 | 0,03-0,36 | OAC | 0,02 | 0,004-0,08 |
| FBP | 0,08 | 0,02-5,10 | Cit | 0,005 | 0,002-0,38 |
| GAP | 0,01 | 0,03-0,26 | Isocit | 0,01 | 0,01-0,04 |
| DHAP | 0,003 | 0,03-0,29 | AKG | 0,01 | 0,001-0,27 |
| BPG | 0,01 | - | SCoA | 0,30 | 0,20 |
| PEP | 0,03 | 0,01-0,18 | Suc | 0,002 | 0,07-0,26 |
| Pyr | 0,03 | 0,02-0,17 | Fum | 0,001 | 0,01 |
| <i>Energía</i> | | | <i>Producción Acetato</i> | | |
| ATP | 1,54 | 0,05-4,87 | Acetat | 0,01 | 0,02 |
| ADP | 0,08 | 0,06-0,53 | ACTP | 0,04 | 0,15 |
| NADH | 0,50 | 0,08-0,44 | <i>Otro</i> | | |
| NAD | 0,08 | 1,72-2,41 | CoA | 0,05 | 1,07 |

4. Simulación

Al analizar las diferencias entre los flujos entregados por el MFA y los obtenidos al resolver el sistema de ecuaciones diferenciales se observan grandes diferencias en los flujos de algunas de las vías metabólicas (*Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9 en Anexos*), sin embargo, esto no afecta en gran medida el comportamiento del modelo respecto a los datos experimentales de concentración, como se puede apreciar según los coeficientes de determinación de las curvas de lactosa, glucosa, galactosa, acetato y biomasa (*Tabla 3*).

Tabla 3. Coeficientes de Determinación.

| Curva | R² |
|------------------|----------------------|
| Lactosa | 0.986 |
| Glucosa | 0.998 |
| Galactosa | 0.836 |
| Acetato | 0.946 |
| Biomasa | 0.997 |

El resultado de la simulación del modelo se ve ilustrado en la *Figura 12*, en donde se observa que el comportamiento general de las curvas de la simulación es similar al de los datos experimentales, excepto en el caso de la curva de acetato durante el crecimiento en galactosa. El comportamiento de esta curva puede deberse a la forma en la que está planteada la regulación de la vía mediante la cual se produce o consume acetato, ya que, en el momento que se agota la lactosa del medio, y la bacteria comienza el consumo de galactosa y acetato de acuerdo a los datos experimentales, la

concentración intracelular de glucosa es todavía lo suficientemente alta como para generar inhibición del consumo de acetato. Por otro lado, este comportamiento puede también ser explicado por el uso de una cinética de primer orden en el metabolismo de la glucosa intracelular, en donde una cinética de Michaelis-Menten sin simplificar pudiese acelerar el proceso de consumo de ésta y levantar esta inhibición más rápidamente.

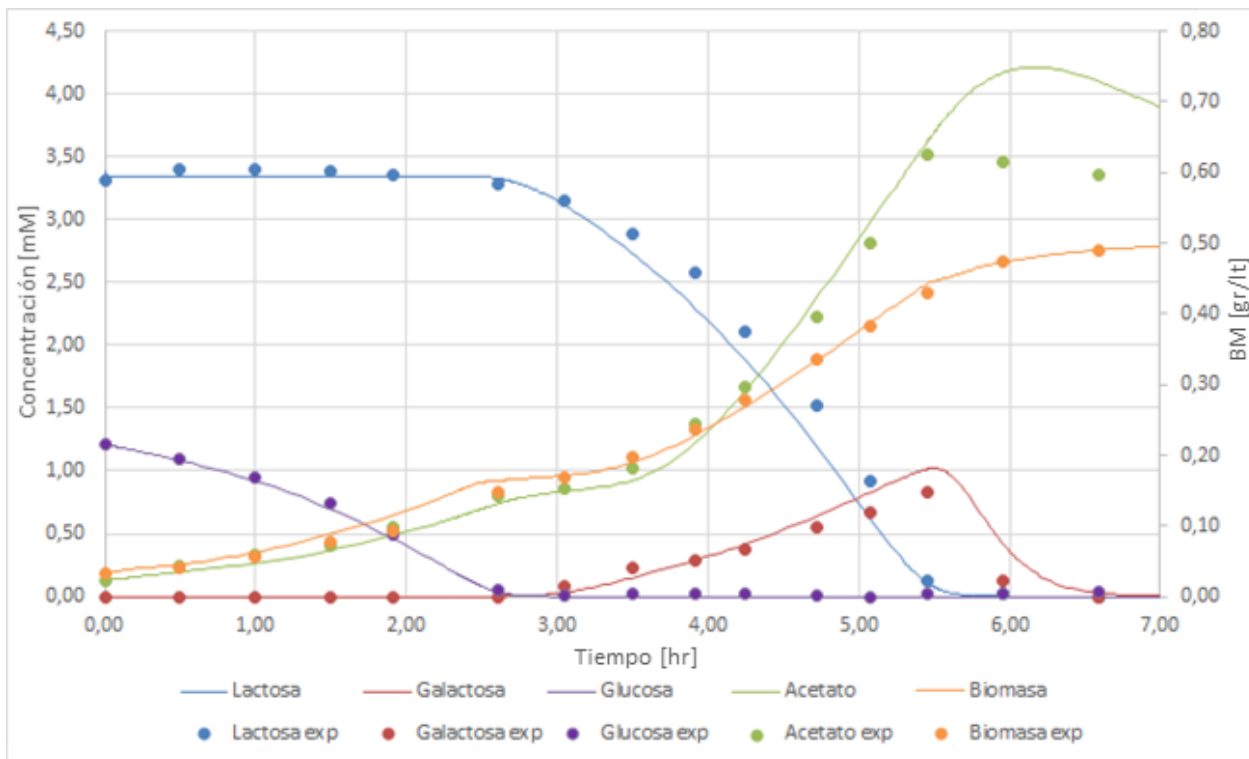


Figura 12 "Simulación de crecimiento de *E. coli*."

IV. Conclusiones

A partir de los datos e información recolectados, se logró construir una red metabólica, y un modelo matemático continuo que la represente e incorporando información de la regulación genética de ésta. El modelo permitió la representación cuantitativa del crecimiento de *E. coli* en glucosa, lactosa y galactosa-acetato.

El modelo fue capaz de representar el crecimiento en diferentes fuentes de carbono utilizando un mismo set de ecuaciones y de parámetros. Esto se logró gracias a la implementación de regulación génica de la red metabólica a través de la simulación integrada de síntesis enzimática.

El modelo de la red metabólica consta de 43 metabolitos relacionados a través de 45 flujos. Las relaciones entre los metabolitos están constituidas por cinéticas que incluyen la ley de acción de masas, cinéticas enzimáticas y ecuaciones de transporte, así como también, represión e inducción de enzimas que regulan las vías de la red.

Mediante la programación y simulación del modelo se logró simular los perfiles de concentración de metabolitos extracelulares durante el crecimiento de *E. coli*. Estas simulaciones entregaron perfiles de glucosa, lactosa, galactosa, acetato y biomasa que tuvieron coeficientes de correlación de 0.84 para acetato y superiores a 0.94 para los demás metabolitos. Con estos resultados, y teniendo en cuenta además que los datos experimentales acarrearán siempre errores de medición, la simulación fue considerada exitosa.

El diseño del modelo y la obtención de parámetros se basó en una metodología implementada en un trabajo anterior,* logrando aplicarla en un escenario de mayores proporciones y obteniendo resultados de similares características en cuanto a la representación cuantitativa del crecimiento microbiano.

Finalmente, cabe destacar que el modelo logró representar el crecimiento del microorganismo de manera relativamente precisa utilizando una pequeña cantidad de información (consumo y producción de metabolitos en tres momentos del crecimiento), logrando simular el estado transiente a partir de información de los estados estacionarios. Por lo anterior, se considera esta metodología como una herramienta de gran utilidad y se propone continuar con su desarrollo de acuerdo a las recomendaciones y análisis planteados en este trabajo.

* La metodología que se busca validar es implementada en el trabajo descrito por P. Moisset.[1]

V. Bibliografía

- [1] P. Moisset, D. Vaisman, a Cintolesi, J. Urrutia, I. Rapaport, B. a Andrews, and J. a Asenjo, “Continuous modeling of metabolic networks with gene regulation in yeast and in vivo determination of rate parameters.,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 9, pp. 2325–39, Sep. 2012.
- [2] M. W. Covert, N. Xiao, T. J. Chen, and J. R. Karr, “Integrating metabolic, transcriptional regulatory and signal transduction models in *Escherichia coli.*,” *Bioinformatics*, vol. 24, no. 18, pp. 2044–50, Sep. 2008.
- [3] E. Noor, E. Eden, R. Milo, and U. Alon, “Central carbon metabolism as a minimal biochemical walk between precursors for biomass and energy.,” *Mol. Cell*, vol. 39, no. 5, pp. 809–20, Sep. 2010.
- [4] D. a Fell, “Evolution of central carbon metabolism.,” *Mol. Cell*, vol. 39, no. 5, pp. 663–4, Sep. 2010.
- [5] M. Emmerling, M. Dauner, A. Ponti, M. Hochuli, T. Szyperski, K. Wüthrich, E. Bailey, U. Sauer, J. Fiaux, K. Wu, and J. E. Bailey, “Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in *Escherichia coli.*,” *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 1, pp. 152–64, 2002.
- [6] J. Monod, “The Growth of Bacterial Cultures,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 3, pp. 371–94, 1949.
- [7] C. Andersson, D. Hodge, K. a Berglund, and U. Rova, “Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli.*,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 23, no. 2, pp. 381–8, 2007.
- [8] W. P. Hempfling and S. E. Mainzer, “Effects of Varying the Carbon Source Limiting Growth on Yield and Maintenance Characteristics of *Escherichia coli* in Continuous Culture,” *J. Bacteriol.*, vol. 123, no. 3, pp. 1076–87, 1975.
- [9] H. Holms, “Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli.*,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 19, no. 2, pp. 85–116, Dec. 1996.
- [10] B. Görke and J. Stülke, “Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 8, pp. 613–24, Aug. 2008.
- [11] B. L. Bassler, “How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing.,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 2, no. 6, pp. 582–7, Dec. 1999.
- [12] B. Magasanik, “Catabolite Repression,” *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 26, pp. 249–56, 1961.

- [13] M. H. Saier and F. Herbert, "Regulation of Carbon Metabolism in Bacteria," *Res. Microbiol.*, vol. 147, no. 6–7, pp. 439–47, 1996.
- [14] a Ullmann, "Catabolite repression: a story without end.," *Res. Microbiol.*, vol. 147, no. 6–7, pp. 455–8, 1996.
- [15] M. Crasnier, "Cyclic AMP and catabolite repression.," *Res. Microbiol.*, vol. 147, no. 6–7, pp. 479–82, 1994.
- [16] P. D. Karp, I. M. Keseler, A. Shearer, M. Latendresse, M. Krummenacker, S. M. Paley, I. Paulsen, J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, M. I. Peñaloza-Spínola, C. Bonavides-Martinez, and J. Ingraham, "Multidimensional annotation of the Escherichia coli K-12 genome.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 22, pp. 7577–90, Jan. 2007.
- [17] I. M. Keseler, C. Bonavides-Martínez, J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, R. P. Gunsalus, D. A. Johnson, M. Krummenacker, L. M. Nolan, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, A. G. Shearer, and P. D. Karp, "EcoCyc: a comprehensive view of Escherichia coli biology.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. Database issue, pp. D464–70, Jan. 2009.
- [18] K. Al Zaid Siddiquee, M. J. Arauzo-Bravo, and K. Shimizu, "Metabolic flux analysis of pykF gene knockout Escherichia coli based on ¹³C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 63, no. 4, pp. 407–17, Jan. 2004.
- [19] J. Zhao and K. Shimizu, "Metabolic flux analysis of Escherichia coli K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method.," *J. Biotechnol.*, vol. 101, no. 2, pp. 101–17, Mar. 2003.
- [20] J. Monod, "Recherches sur la croissance des cultures bactériennes," Hermann Éditions, Paris, 1941.
- [21] S. Parche, M. Beleut, E. Rezzonico, F. Arigoni, and F. Titgemeyer, "Lactose-over-Glucose Preference in Bifidobacterium longum NCC2705: glcP , encoding a Glucose Transporter, is Subject to Lactose Repression," *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 4, pp. 1260–65, 2006.
- [22] T. Inada, K. Kimata, and H. Aiba, "Mechanism responsible for glucose–lactose diauxie in Escherichia coli: challenge to the cAMP model," *Genes to Cells*, vol. 1, no. 3, pp. 293–301, 1996.
- [23] G. N. Stephanopoulos, A. A. Aristidou, and J. Nielsen, "Metabolic Flux Analysis," in *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, New York, USA: Academic Press, 1998, p. 669.

- [24] M. P. Merino, B. a Andrews, and J. a Asenjo, "Stoichiometric model and metabolic flux analysis for *Leptospirillum ferrooxidans*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 107, no. 4, pp. 696–706, Nov. 2010.
- [25] K. Bettenbrock, S. Fischer, A. Kremling, K. Jahreis, T. Sauter, and E.-D. Gilles, "A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 5, pp. 2578–84, Feb. 2006.
- [26] H. L. Kornberg, "The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*," *Biochem. J.*, vol. 99, no. 1, pp. 1–11, Apr. 1966.
- [27] B. G. Hall, "Transgalactosylation activity of ebg beta-galactosidase synthesizes allolactose from lactose," *J. Bacteriol.*, vol. 150, no. 1, pp. 132–140, 1982.
- [28] J. B. Russell and G. M. Cook, "Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions," *Microbiol. Rev.*, vol. 59, no. 1, pp. 48–62, Mar. 1995.
- [29] M. Bhattacharya, L. Fuhrman, a Ingram, K. W. Nickerson, and T. Conway, "Single-run separation and detection of multiple metabolic intermediates by anion-exchange high-performance liquid chromatography and application to cell pool extracts prepared from *Escherichia coli*," *Anal. Biochem.*, vol. 232, no. 1, pp. 98–106, Nov. 1995.
- [30] L. Peng and K. Shimizu, "Effect of fadR gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* based on analyses of protein expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 38, no. 3–4, pp. 512–520, Feb. 2006.
- [31] L. Peng, M. J. Arauzo-Bravo, and K. Shimizu, "Metabolic flux analysis for a ppc mutant *Escherichia coli* based on ¹³C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 235, no. 1, pp. 17–23, Jun. 2004.
- [32] B. D. Bennett, E. H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S. J. Van Dien, and J. D. Rabinowitz, "Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 593–9, Aug. 2009.
- [33] M. A. Hoque, H. Ushiyama, M. Tomita, and K. Shimizu, "Dynamic responses of the intracellular metabolite concentrations of the wild type and pykA mutant *Escherichia coli* against pulse addition of glucose or NH₃ under those limiting continuous cultures," *Biochem. Eng. J.*, vol. 26, no. 1, pp. 38–49, Nov. 2005.
- [34] a Buchholz, R. Takors, and C. Wandrey, "Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques," *Anal. Biochem.*, vol. 295, no. 2, pp. 129–37, Aug. 2001.

VI. Anexos

Tabla 4. Expresiones Cinéticas del Modelo.

| | | |
|----|----------------|--|
| 1 | V_{inLac} | $K_{vinLac} \left(\frac{[Lac_{x0}]}{K_{convLac}} - [Lac_x] \right)$ |
| 2 | $V_{LacTrans}$ | $\frac{K_{vLac1}[Lac_x]}{K_{Lac2} + [Lac_x]}$ |
| 3 | V_{BG4} | $K_{BG4f}[Lac] - K_{BG4r}[Allo]$ |
| 4 | V_{BG1} | $K_{BG1}[Lac]$ |
| 5 | V_{BG2} | $K_{BG2}[Allo]$ |
| 6 | V_{inGal} | $K_{inGal} \left(\frac{[Gal_{x0}]}{K_{convGal}} - [Gal_x] \right)$ |
| 7 | V_{difGal} | $K_{difGal f}[Gal_x] - K_{difGal r}[Gal]$ |
| 8 | V_{GK} | $K_{GK}[Gal][ATP]$ |
| 9 | V_{GUT} | $K_{GUT}[G1P]$ |
| 10 | V_{HK} | $K_{HK}[Glc][ATP]$ |
| 11 | V_{inGlc} | $K_{vinGlc} \left(\frac{[Glc_{x0}]}{K_{convGlc}} - [Glc_x] \right)$ |
| 12 | V_{PTS} | $\frac{K_{PTS1}[Glc_x][PEP]}{K_{PTS2} + [Glc_x] K_{PTS3} + [PEP]}$ |
| 13 | V_{PGI} | $K_{PGI f}[G6P] - K_{PGI r}[F6P]$ |
| 14 | V_{PFK} | $K_{PFK}[F6P][ATP]$ |
| 15 | V_{ALD} | $K_{ALD f}[FBP] - K_{ALD r}[DHAP]$ |
| 16 | V_{TIM} | $K_{TIM}[DHAP] - K_{TIM r}[GAP]$ |
| 17 | V_{GDH} | $K_{GDH}[GAP][NAD] - K_{GDH r}[BPG][NADH]$ |
| 18 | V_{lpPEP} | $K_{lpPEP f}[BPG][ADP] - K_{lpPEP r}[PEP][ATP]$ |
| 19 | V_{PKPTS} | $K_{PK}[PEP][ADP] + V_{PTS}$ |
| 20 | V_{PDH} | $K_{PDH}[Pyr][NAD][CoA]$ |
| 21 | V_{PTA} | $K_{PTA}[ACoA] - K_{PTA r}[ACTP][CoA]$ |
| 22 | V_{AcK} | $K_{AcK f}[ACTP][ADP] - K_{AcK r}[Ac][ATP]$ |
| 23 | V_{difAc} | $K_{difAc f}[Ac] - K_{difAc r}[Ac_x]$ |
| 24 | V_{outAc} | $K_{outAc} \left([Ac_x] - \frac{[Ac_{x0}]}{K_{convAc}} \right)$ |
| 25 | V_{PPC} | $K_{PPC}[PEP]$ |
| 26 | V_{Cit1} | $K_{Cit1}[ACoA][OAc]$ |
| 27 | V_{Cit2} | $K_{Cit2}[Cit]$ |
| 28 | V_{IDH} | $K_{IDH}[Isocit][NAD]$ |
| 29 | V_{KGD} | $K_{KGD}[AKG][NAD]$ |
| 30 | V_{SCS} | $K_{SCS}[SCoA][ADP]$ |
| 31 | V_{SDH} | $K_{SDH}[Suc]$ |
| 32 | V_{FUM} | $K_{FUM}[Fum]$ |
| 33 | V_{MDH} | $K_{MDH}[Mal][NAD]$ |
| 34 | $V_{storage}$ | $K_{storage}[G6P][ATP]$ |
| 35 | V_{PPP} | $K_{PPP}[G6P][ATP]$ |

| | | |
|----|----------------|-------------------------------|
| 36 | V_{LIP} | $K_{lip}[DHAP]$ |
| 37 | V_{PROT1} | $K_{PROT1}[BPG][ATP]$ |
| 38 | V_{PROT2} | $K_{PROT2}[PEP][ATP]$ |
| 39 | V_{PROT3} | $K_{PROT3}[Pyr][ATP]$ |
| 40 | V_{PROT4} | $K_{PROT4}[ACoA][ATP]$ |
| 41 | V_{PROT5} | $K_{PROT5}[OAC][ATP]$ |
| 42 | V_{PROT6} | $K_{PROT6}[AKG][ATP]$ |
| 43 | $V_{consNADH}$ | $K_{consNADH}[NADH]^2[ADP]^2$ |
| 44 | V_{consum} | $K_{consum}[ATP]$ |
| 45 | V_{CO2} | $K_{CO2}([CO2] - [CO2_{x0}])$ |

Tabla 5. Parámetros del Modelo.

| | | | |
|------------|-----|-----------|-------|
| K_{mRNA} | 7 | K_{glc} | 0,325 |
| K_{enz} | 3,5 | K_{lac} | 0,157 |
| α | 10 | K_{gal} | 0,05 |

Tabla 6. Factores de Importancia Relativa en Ajuste de Parámetros.

| | |
|--------------|---------|
| α_w | 1 |
| β_w | 10 |
| γ_w | 0,001 |
| δ_w | 0,00001 |
| ϵ_w | 150 |
| φ_w | 10000 |

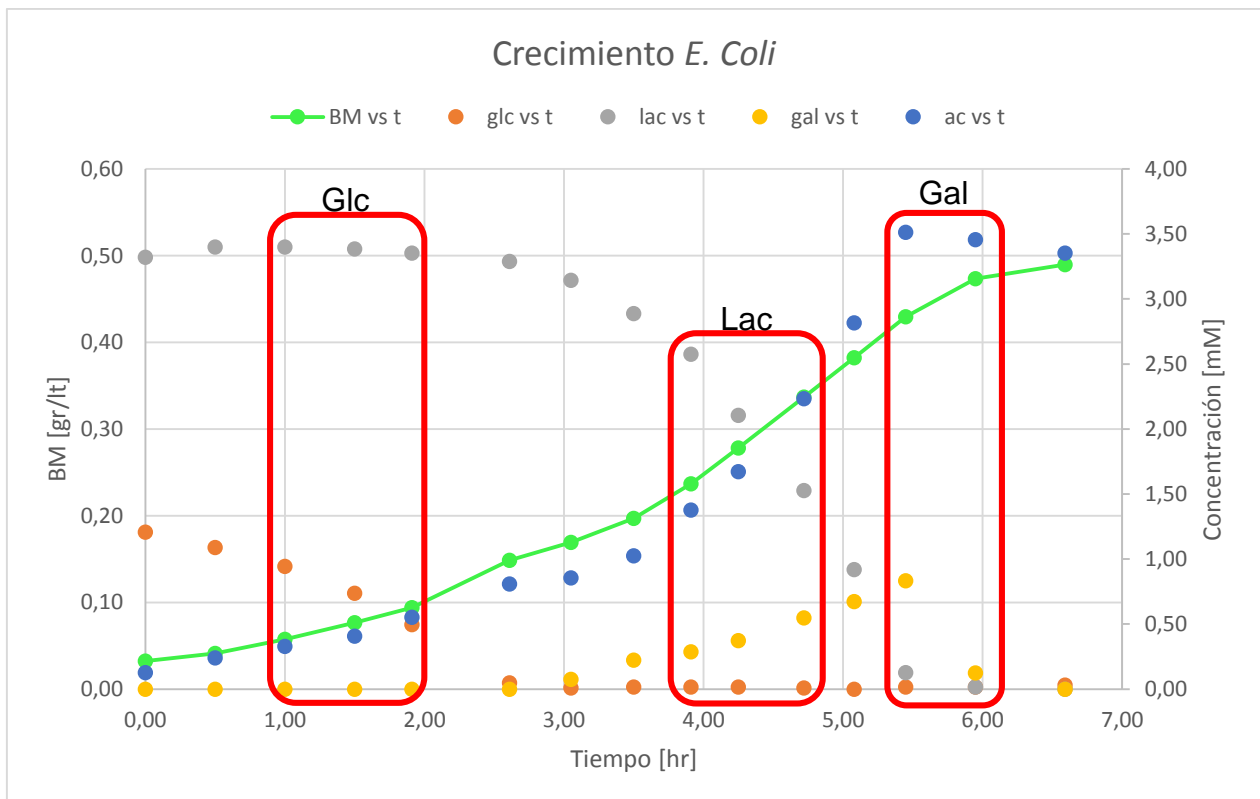


Figura 13. "Datos Experimentales Utilizados en MFA."

Tabla 7. Comparación de flujos MFA/Simulación (fase glucosa).

| | vinLac | vLacTrans | vBG4 | vBG1 | vBG2 | vinGal | vdifGal | vGK |
|-----------------------|---------------|------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|----------------|------------|
| Modelo | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| MFA | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Diferencia (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

| | vGUT | vHK | vinGlc | vPTS | vPGI | vPFK | vALD | vTIM |
|-----------------------|-------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Modelo | 0,00 | 0,00 | 5,77 | 6,30 | 6,35 | 6,37 | 6,38 | 6,32 |
| MFA | 0,00 | 0,00 | 6,55 | 6,55 | 5,50 | 5,50 | 5,50 | 5,43 |
| Diferencia (%) | 0,00 | 0,00 | 11,97 | 3,87 | 13,32 | 13,65 | 13,76 | 14,05 |

| | vGDH | vIpPEP | vPKPTS | vPDH | vPTA | vAcK | vdifAc | voutAC |
|-----------------------|-------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| Modelo | 12,70 | 12,49 | 17,36 | 11,57 | 2,80 | 2,81 | 2,83 | 2,79 |
| MFA | 10,93 | 10,21 | 8,46 | 7,23 | 3,34 | 3,34 | 3,34 | 3,34 |
| Diferencia (%) | 13,91 | 18,23 | 51,27 | 37,54 | 16,19 | 15,91 | 15,38 | 16,57 |

| | vPPC | vCit1 | vCit2 | viDH | vKGD | vSCS | vSDH | vFUM |
|-----------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Modelo | 0,67 | 7,19 | 7,19 | 7,19 | 6,95 | 6,95 | 6,95 | 6,95 |
| MFA | 1,46 | 2,49 | 2,49 | 2,49 | 1,93 | 1,93 | 1,93 | 1,93 |
| Diferencia (%) | 53,95 | 65,37 | 65,37 | 65,37 | 72,23 | 72,24 | 72,24 | 72,24 |

| | vMDH | vstorage | vPPP | vLIP | vPROT | vconsNADH | vconsum | vCO2 |
|-----------------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|------------------|----------------|-------------|
| Modelo | 6,95 | 0,10 | 0,85 | 0,06 | 2,70 | 5,27 | 32,34 | 59,14 |
| MFA | 1,93 | 0,11 | 0,94 | 0,07 | 5,10 | 24,51 | 40,51 | 11,13 |
| Diferencia (%) | 72,24 | 11,31 | 9,58 | 14,19 | 46,98 | 78,48 | 20,16 | 81,18 |

Tabla 8. Comparación de flujos MFA/Simulación (fase lactosa).

| | vinLac | vLacTrans | vBG4 | vBG1 | vBG2 | vinGal | vdifGal | vGK |
|-----------------------|---------------|------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|----------------|------------|
| Modelo | 4,97 | 5,50 | 0,57 | 4,93 | 0,57 | -1,58 | -1,71 | 3,99 |
| MFA | 4,70 | 4,70 | 0,49 | 4,21 | 0,49 | -1,13 | -1,13 | 3,57 |
| Diferencia (%) | 5,43 | 14,56 | 14,50 | 14,65 | 14,66 | 28,55 | 33,79 | 10,43 |

| | vGUT | vHK | vinGlc | vPTS | vPGI | vPFK | vALD | vTIM |
|-----------------------|-------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Modelo | 3,99 | 5,50 | 0,00 | 0,00 | 9,38 | 9,39 | 9,38 | 9,29 |
| MFA | 3,57 | 4,70 | 0,00 | 0,00 | 7,39 | 7,39 | 7,39 | 7,33 |
| Diferencia (%) | 10,53 | 14,59 | 0,00 | 0,00 | 21,23 | 21,31 | 21,19 | 21,08 |

| | vGDH | vlpPEP | vPKPTS | vPDH | vPTA | vAcK | vdifAc | voutAC |
|-----------------------|-------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| Modelo | 18,66 | 18,48 | 17,61 | 17,37 | 5,69 | 5,72 | 5,85 | 5,32 |
| MFA | 14,72 | 14,12 | 12,65 | 11,62 | 3,71 | 3,71 | 3,71 | 3,71 |
| Diferencia (%) | 21,13 | 23,58 | 28,16 | 33,11 | 34,75 | 35,17 | 36,57 | 30,22 |

| | vPPC | vCit1 | vCit2 | viDH | vKGD | vSCS | vSDH | vFUM |
|-----------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Modelo | 0,75 | 9,03 | 9,00 | 8,99 | 8,71 | 8,61 | 8,59 | 8,58 |
| MFA | 1,22 | 6,74 | 6,74 | 6,74 | 6,27 | 6,27 | 6,27 | 6,27 |
| Diferencia (%) | 38,75 | 25,33 | 25,11 | 25,00 | 28,02 | 27,20 | 27,01 | 26,89 |

| | vMDH | vstorage | vPPP | vLIP | vPROT | vconsNADH | vconsum | vCO2 |
|-----------------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|------------------|----------------|-------------|
| Modelo | 8,56 | 0,14 | 1,24 | 0,09 | 3,71 | 20,42 | 55,16 | 89,15 |
| MFA | 6,27 | 0,09 | 0,79 | 0,06 | 4,27 | 45,62 | 76,18 | 24,20 |
| Diferencia (%) | 26,79 | 36,99 | 36,51 | 32,15 | 13,08 | 55,24 | 27,59 | 72,85 |

Tabla 9. Comparación de flujos MFA/Simulación (fase galactosa).

| | vinLac | vLacTrans | vBG4 | vBG1 | vBG2 | vinGal | vdifGal | vGK |
|-----------------------|---------------|------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|----------------|------------|
| Modelo | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,41 | 10,25 | 3,13 |
| MFA | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,14 | 3,14 | 3,14 |
| Diferencia (%) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 8,01 | 69,37 | 0,32 |

| | vGUT | vHK | vinGlc | vPTS | vPGI | vPFK | vALD | vTIM |
|-----------------------|-------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Modelo | 3,07 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,59 | 6,65 | 7,03 | 6,99 |
| MFA | 3,14 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,75 | 2,75 | 2,75 | 2,72 |
| Diferencia (%) | 2,28 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 50,78 | 58,63 | 60,88 | 61,09 |

| | vGDH | vIpPEP | vPKPTS | vPDH | vPTA | vAcK | vdifAc | voutAC |
|-----------------------|-------------|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| Modelo | 14,03 | 13,82 | 13,12 | 12,71 | -0,23 | -1,53 | -2,64 | 2,40 |
| MFA | 5,47 | 5,20 | 4,55 | 4,10 | -0,34 | -0,34 | -0,34 | -0,34 |
| Diferencia (%) | 61,02 | 62,36 | 65,32 | 67,74 | 31,12 | 77,80 | 87,13 | -114,15 |

| | vPPC | vCit1 | vCit2 | viDH | vKGD | vSCS | vSDH | vFUM |
|-----------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Modelo | 0,75 | 9,03 | 9,00 | 8,99 | 8,71 | 8,61 | 8,59 | 8,58 |
| MFA | 0,54 | 3,92 | 3,92 | 3,92 | 3,71 | 3,71 | 3,71 | 3,71 |
| Diferencia (%) | 27,73 | 56,57 | 56,44 | 56,38 | 57,41 | 56,92 | 56,81 | 56,74 |

| | vMDH | vstorage | vPPP | vLIP | vPROT | vconsNADH | vconsum | vCO2 |
|-----------------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|------------------|----------------|-------------|
| Modelo | 8,56 | 0,14 | 1,24 | 0,09 | 3,79 | 5,22 | 32,97 | 301,33 |
| MFA | 3,71 | 0,04 | 0,35 | 0,03 | 1,89 | 20,64 | 32,16 | 11,36 |
| Diferencia (%) | 56,68 | 71,99 | 71,87 | 66,07 | 50,20 | 74,69 | 2,45 | 96,23 |

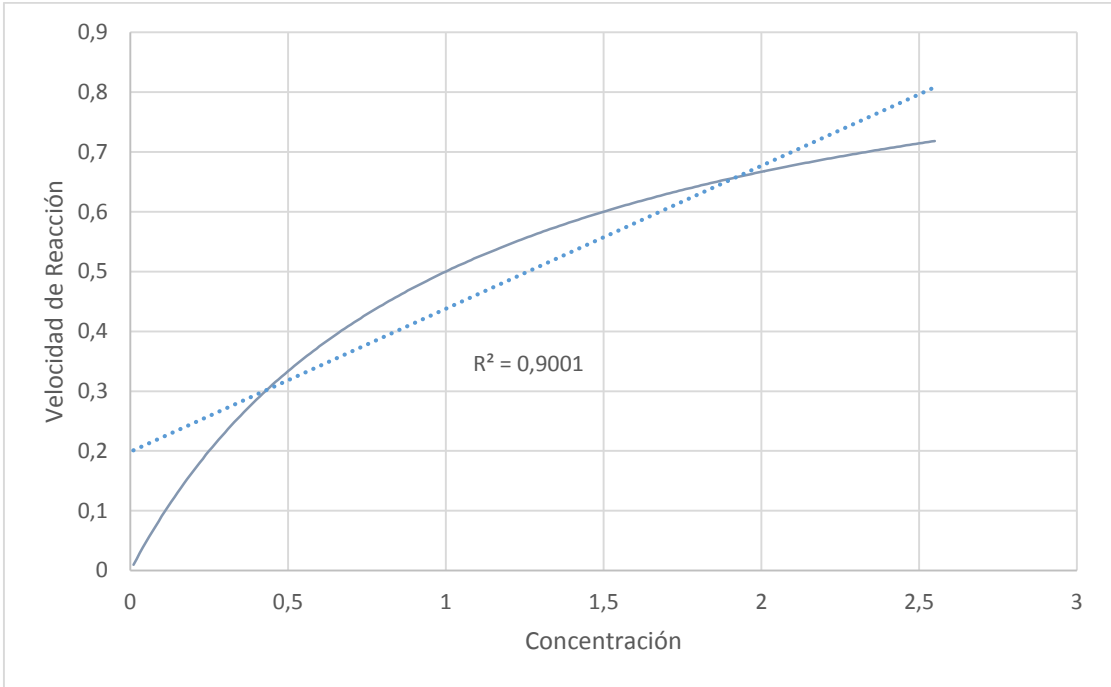


Figura 14. "Linealización de una cinética de Michaelis-Menten. $V_{max}=1$; $K_m=1$."