

## LA PSEUDO-REACCIÓN DE BIOMASA, EL MAYOR DESAFÍO DEL MODELIZADO METABÓLICO DE MICROORGANISMOS

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

<sup>1</sup> Grupo de Control Aplicado (GCA), Instituto LEICI (CONICET - Fac. de Ingeniería, UNLP)  
Calle 48 esq. 116 s/n, La Plata, Buenos Aires.

<sup>2</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET-UNLP)  
✉ castaneda@biotec.quimica.unlp.edu.ar

**Palabras clave:** Modelizado metabólico, pseudo-reacción de biomasa, FBA, *Rhodospiridium toruloides*, Modelos de escala genómica

### 1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente en bioprocesos se han utilizado modelos no estructurados que tienen en cuenta la dinámica de las especies extracelulares y la influencia de parámetros extrínsecos. Los modelos no estructurados, también denominados de caja negra, son de utilidad para describir la evolución de sustratos y productos en el biorreactor, sin embargo, ignoran por completo lo que ocurre intracelularmente como resultado del metabolismo microbiano. La incertidumbre y la falta de información sobre el metabolismo y la fisiología microbiana lleva a que usualmente las plantas se operen en regímenes demasiado conservadores, subóptimos y no intensivos, desaprovechando su potencialidad. A los efectos de que los microorganismos puedan utilizarse como verdaderas fábricas celulares, es necesario conocer sus rutas metabólicas más relevantes para lograr manipularlas en función del producto que se desea producir. A tal fin pueden emplearse modelos metabólicos que describen en detalle lo que sucede a nivel intracelular y su influencia con el entorno extracelular.

Los modelos metabólicos son modelos estructurados que describen matemáticamente los componentes (metabolitos, genes, enzimas) que conforman el metabolismo y las interacciones entre ellos [1]. Desde la publicación del primer modelo metabólico a escala genómica (GEM) en 1991 [2], 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 [3]. 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), que hace uso de programación lineal [4]. Algunos ejemplos de aplicaciones relevantes de este tipo de modelos es el desarrollo de nuevas cepas para producción de químicos biobasados y biomateriales, determinación de blancos terapéuticos para ciertos patógenos, la predicción de la funcionalidad de enzimas, la interacción entre múltiples microorganismos y la comprensión de algunas enfermedades en humanos [3].

Las inferencias sobre el metabolismo, realizadas por medio de FBA empleando modelos metabólicos, dependen en gran medida de la función objetivo empleada, siendo la más utilizada la denominada pseudo-reacción de biomasa [5]. 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 [1, 4]. Además de los precursores de biomasa, es fundamental la correcta cuantificación del poder reductor y la energía en forma de ATP necesaria para los procesos de biosíntesis que conforman el anabolismo. La determinación de la composición de la biomasa y de los requerimientos energéticos se lleva a cabo experimentalmente. En caso no poder obtener la composición completa del microorganismo en estudio, puede obtenerse información a partir del genoma del mismo o de microorganismos similares [1].

En este trabajo se analizó 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 *Rhodospiridium toruloides*. Esta es una cepa de relevancia para la industria ya que puede producir altas concentraciones de lípidos microbianos para la producción de biodiesel de tercera generación [6, 7], enzimas de interés farmacéutico [8, 9] y carotenoides, entre otros productos [10]. Se tomó como base un modelo metabólico desarrollado por nuestro grupo de trabajo [6], se propusieron modificaciones a la pseudo-reacción de biomasa en función de la información disponible en GEMs recientemente publicados [11, 12] y se evaluaron las implicancias de las modificaciones realizadas.

## 2. DESARROLLO

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

En este trabajo se utilizó como base un modelo metabólico de *R. toruloides*, publicado por nuestro grupo de trabajo [6]. El mismo está compuesto por 93 metabolitos, 104 reacciones y 116 genes. Entre las principales rutas representadas se encuentran la glicólisis, ruta de pentosas fosfato, ciclo de Krebs, ciclo de glioxilato, metabolismo central de nitrógeno y fosforilación oxidativa. Estas reacciones se localizan o bien en el compartimento mitocondrial o en el citoplasmático. En este modelo, la pseudo-reacción de producción de biomasa (*Cell\_mass\_Eqn*) fue obtenida a partir de una reconstrucción previa, basada en la composición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [13]. Originalmente esta reacción fue balanceada en masa y carga, y se adicionaron los metabolitos de *glut* (glutamato) y *glum* (glutamina), como precursores del resto de los aminoácidos y demás compuestos nitrogenados. Los coeficientes estequiométricos que acompañan a *glut* y *glum* en la pseudo-reacción de biomasa se calcularon en aquella oportunidad a partir del balance de nitrógeno global considerando que la biomasa era el único producto nitrogenado y que tenía una fórmula elemental promedio de  $\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.58}\text{N}_{0.16}$  [6].

### 2.2. Actualización de la reacción de biomasa empleando GEMs recientemente publicados

Para la actualización de la reacción de biomasa se emplearon dos modelos a escala genómica publicados recientemente [11, 12]. En particular el GEM de Tiukova et. al. [11] fue elegido como base debido a que la estructura de su pseudo-reacción de biomasa está definida en función de las cuatro biomoléculas principales (glúcidos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos). Una particularidad de este GEM, es que los lípidos que componen la biomasa son calculados a partir del algoritmo SLIMEr [14]. Este algoritmo permite representar la amplia variedad de clases de lípidos en entidades medibles considerando no solo la clase de lípidos, sino que también tiene en cuenta la distribución de las cadenas y sus diferentes grados de saturación. El procedimiento de actualización de la pseudo-reacción de biomasa consistió en seleccionar las rutas biosintéticas más probables en *R. toruloides* para calcular los requerimientos estequiométricos de nuestros precursores necesarios para producir monómeros y a partir de ellos las diferentes biomoléculas que componen la célula. Para ello, además de los GEMs, se utilizó información de bases de datos como YeastPathways [15] y MetaCyc [16]. En cuanto a los requerimientos energéticos, esto es, el ATP necesario para el crecimiento (GAM) y mantenimiento de la cepa (NGAM), se determinaron mediante el método descrito en [12], empleando datos experimentales en cultivo continuo [17]. El método consiste en calcular los flujos metabólicos mediante FBA, empleando la reacción ATPM como función objetivo, sujeto a los valores experimentales de  $q_S$  y  $D$ . Luego, mediante regresión lineal de los flujos máximos obtenidos para cada  $D$  puede obtenerse el valor de GAM de la pendiente y el NGAM de la ordenada al origen, respectivamente.

### 2.3. Cálculo de parámetros estequiométricos y consistencia de balances globales

Con la finalidad de determinar la influencia de los cambios realizados en la ecuación de biomasa de nuestro modelo, se calcularon los flujos de las reacciones extracelulares ( $v$ ) mediante FBA, empleando la reacción de biomasa como función objetivo. Con estos flujos se determinaron los rendimientos en biomasa ( $y_{x/s}$ ), dióxido de carbono ( $y_{CO_2/s}$ ) y en oxígeno ( $b$ ) respecto a la fuente de carbono y energía (glucosa) y el rendimiento de biomasa respecto a la fuente de nitrógeno ( $y_{x/n}$ ) (Ec. 1-4).

$$y_{x/s} = \frac{v_{\text{Cell.mass.Eqn}}}{v_{\text{EX\_GLC}}} \quad (1)$$

$$y_{CO_2/s} = \frac{v_{\text{EX\_CO2}}}{v_{\text{EX\_GLC}}} \quad (2)$$

$$b = \frac{v_{\text{EX\_O2}}}{v_{\text{EX\_GLC}}} \quad (3)$$

$$y_{x/n} = \frac{v_{\text{Cell.mass.Eqn}}}{v_{\text{EX\_NH4}}} \quad (4)$$

Con los rendimientos calculados se determinaron el balance de carbono (Ec. 5), el balance de grado de reducción (Ec. 6), el balance de nitrógeno (Ec. 7) y el cociente respiratorio (Ec. 8) para el modelo con la nueva reacción de biomasa y se contrastó estos valores con el modelo original y con los GEMs de *R. toruloides*.

$$BC = y_{x/s} + y_{CO_2/s} \quad (5)$$

$$B\gamma = y_{x/s} * \frac{\gamma_x}{\gamma_s} + b * \frac{4}{\gamma_s} \quad (6)$$

$$BN = 0,16 * y_{x/n} \quad (7)$$

$$CR = \frac{v_{\text{EX\_CO2}}}{v_{\text{EX\_O2}}} \quad (8)$$

Todos los rendimientos y balances se expresaron en unidades de Cmol o mol dependiendo de la especie, para un mejor análisis y comparación.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Pseudo-reacción de biomasa actualizada a partir de los GEMs

En la Fig. 1 se esquematiza el procedimiento llevado a cabo para encontrar la relación entre los precursores del GEM de *R. toruloides* y los precursores de nuestro modelo. El proceso necesario para obtener la equivalencia entre precursores resultó muy laborioso, ya que la pseudo-reacción de biomasa en los GEMs contienen múltiples especies cuya síntesis es compleja y se ramifica en múltiples puntos.

Una vez determinados los requerimientos totales de cada precursor del modelo para los procesos anabólicos, se comparó la nueva estequiometría con su equivalente en el modelo anterior (Fig. 2). La mayoría de los precursores no sufrieron importantes modificaciones respecto a la estequiometría original. En general, se observaron diferencias considerables en los metabolitos asociados a la energía necesaria para el anabolismo (atp[c], adp[c], h2o[c], pi[c] y h[c]). Estos valores resultan más confiables que los originales, ya que fueron obtenidos mediante cultivos continuos de *R. toruloides*. Del mismo modo, se determinó el requerimiento de ATP para el mantenimiento no asociado al crecimiento (NGAM), el cual resultó de 0,4788 mmol ATP/gh,

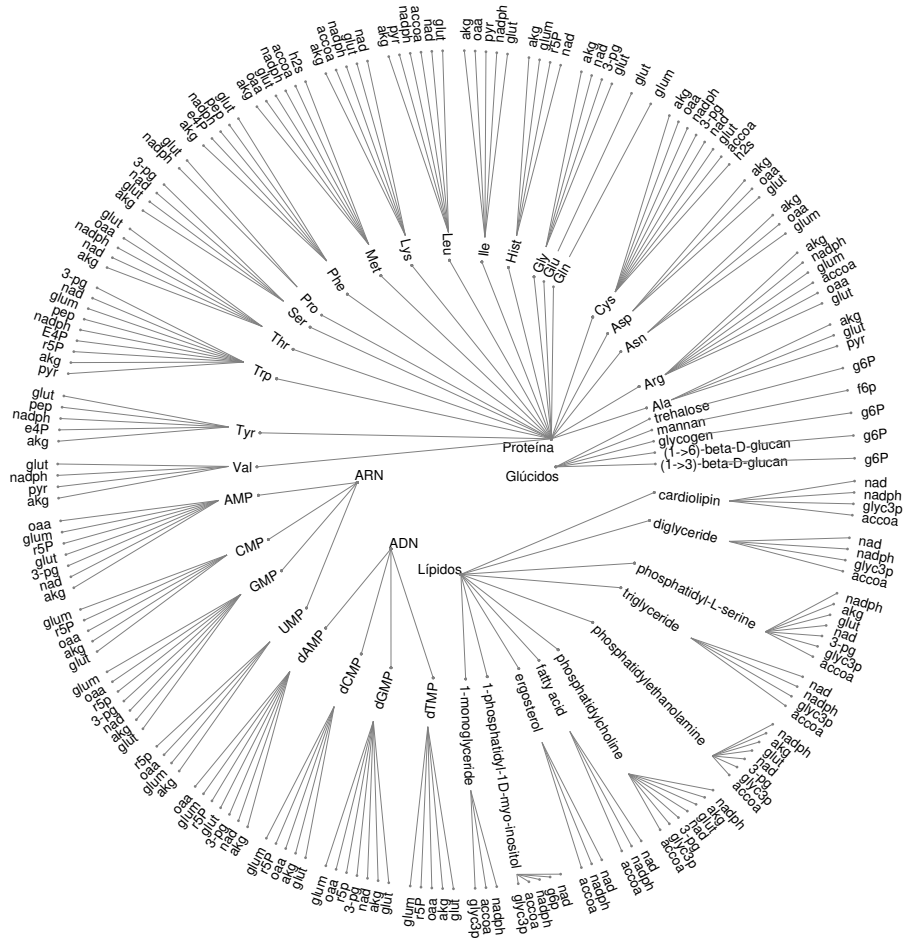


Figura 1: Relación entre los precursores del GEM [11] y los precursores de nuestro modelo. Del centro hacia afuera: macromoléculas (nivel 1), constituyentes y monómeros (nivel 2) y precursores de nuestro modelo (nivel 3).

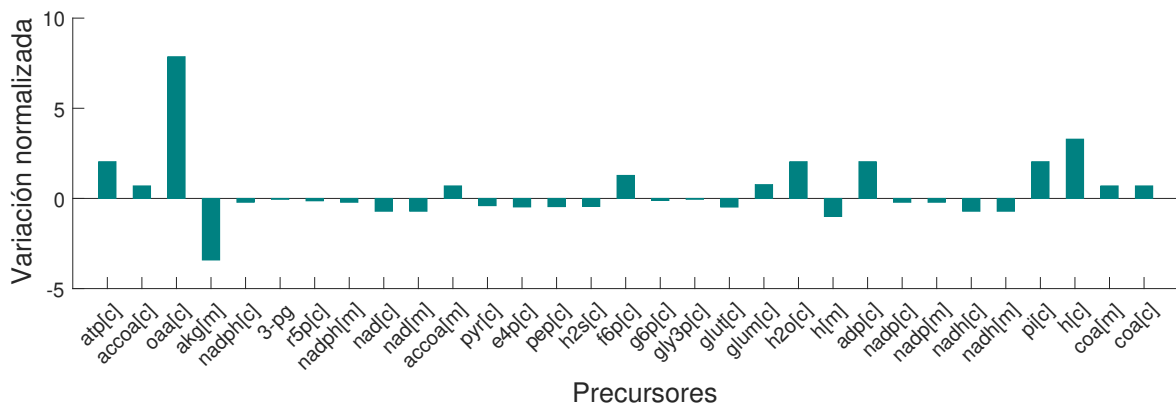


Figura 2: Variación normalizada de los coeficientes estequiométricos que acompañan a los precursores de la pseudo-reacción de biomasa, luego de las modificaciones realizadas.

ligeramente superior al valor del modelo original (0,422 mmol ATP/gh). Finalmente, se encontraron diferencias significativas en precursores como oxalacetato (oaa[c]) asociado a la síntesis de algunos aminoácidos y ácidos nucleicos, y en el oxoglutarato (akg[c]) el cual pasó a ser

Parámetro	Valor esperado	Modelo original	Modelo modificado	GEM Tiukova [11]	GEM Dinh [12]
$y_{x/s}$	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

Tabla 1: Cálculo de parámetros estequiométricos y balances globales a partir de los modelos metabólicos. \* Extraído de datos experimentales de [17]. \*\* Datos calculados a partir de balances y la estequiometría de la fórmula elemental de *R. toruloides* ( $CH_{1,76}O_{0,58}N_{0,16}$ ) [6]. Los flujos fueron expresados en unidades de Cmol, Nmol o mol, dependiendo el caso.

un producto del proceso de biosíntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y algunas especies lipídicas.

### 3.2. Análisis de consistencia de los balances globales

Para determinar la influencia de los cambios realizados en la pseudo-reacción de biomasa, se calcularon los rendimientos a partir de los flujos de las reacciones extracelulares obtenidos por medio de FBA. A partir de estos rendimientos, se calcularon los balances globales y se compararon con los GEMs publicados. Como puede verse en la Tabla 1, la modificación de la pseudo-reacción de biomasa tuvo incidencia en los rendimientos y en los balances globales. Particularmente, se observa una mejora considerable en cuanto a los balances de  $BC$  y  $B\gamma$ , asociada a la modificación en cuanto al  $CO_2$  producido y oxígeno consumido por Cmol de glucosa (rendimientos  $y_{CO_2/s}$  y  $b$ ). Al variar estos parámetros también se corrigió el cociente respiratorio ( $CR$ ). En el caso del nitrógeno, tal como fue descrito en la Sección 2.1, los coeficientes  $g_{lut}$  y  $g_{lum}$  se calcularon en el modelo original teniendo en cuenta la fórmula elemental de la biomasa con lo cual es esperable que el  $BN$  concuerde con el valor teórico esperado. No obstante, cuando utilizamos los datos del GEM de Tiukova el balance se aleja de la idealidad, problema que arrastra de dicho modelo. En rasgos generales podemos ver que aun 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 pseudo-reacción de biomasa es de carácter empírico, y por lo tanto, tiene asociado cierto error e incertidumbre.

## 4. CONCLUSIONES

Los modelos metabólicos han revolucionado en las últimas décadas la forma de analizar, simular y optimizar los procesos biotecnológicos. Si bien el proceso de modelizado metabólico de microorganismos es extenso y laborioso, permite obtener un conocimiento más acabado de lo que ocurre intracelularmente y sus consecuencias en el entorno en el cual se cultivan estos microorganismos. Además, el conocimiento detallado de los flujos metabólicos, las rutas activas y la relación entre los genes, enzimas y reacciones, permite desarrollar estrategias de mejoramiento genético de cepas para la sobreproducción de metabolitos de interés.

En el proceso de reconstrucción de redes metabólicas, la pseudo-reacción de biomasa por su carácter empírico y determinación experimental constituye el mayor desafío e influye significativamente, como se demostró en este trabajo, en las predicciones realizadas. En el caso particular de *R. toruloides* los nuevos datos suministrados por los GEMs, permitieron actualizar esta pseudo-reacción y acercarnos a los valores esperados tanto para los rendimientos como los balances globales. Dado que los GEMs tienen discrepancias con los valores esperados, en

futuros trabajos se deberá desarrollar estrategias que combinen la información disponible para una mejor aproximación.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por proyectos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2019-3635, PICT 2019-3476, PICT 2017-3211), CONICET (PIP 0837) y UNLP (UNLP I253).

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] I. Thiele and B. Ø. Palsson, "A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction," *Nature Protocols*, vol. 5, no. 1, p. 93, 2010.
- [2] J. S. Edwards and B. Ø. Palsson, "Systems properties of the *Haemophilus influenzae* Rd metabolic genotype," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 25, pp. 17410–17416, 1999.
- [3] C. Gu, G. B. Kim, W. J. Kim, H. U. Kim, and S. Y. Lee, "Current status and applications of genome-scale metabolic models," *Genome Biology*, vol. 20, no. 1, pp. 1–18, 2019.
- [4] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?," *Nature Biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 245–248, 2010.
- [5] D. Dikicioglu, B. Kirdar, and S. G. Oliver, "Biomass composition: the "elephant in the room" of metabolic modelling," *Metabolomics*, vol. 11, no. 6, pp. 1690–1701, 2015.
- [6] M. T. Castañeda, S. Nuñez, F. Garelli, C. Voget, and H. De Battista, "Comprehensive analysis of a metabolic model for lipid production in *Rhodospiridium toruloides*," *Journal of Biotechnology*, vol. 280, pp. 11–18, 2018.
- [7] M. T. Castañeda, S. Nuñez, C. Voget, and H. De Battista, "In silico optimization of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* by gene knockout strategies," *IFAC-PapersOnLine*, vol. 52, no. 1, pp. 94–99, 2019.
- [8] M. T. Castañeda, O. Adachi, and R. A. Hours, "Reduction of L-phenylalanine in protein hydrolysates using L-phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodospiridium toruloides*," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 42, no. 10, pp. 1299–1307, 2015.
- [9] M. T. Castañeda, O. Adachi, and R. Hours, "L-Fenilalanina amonio liasa (PAL) de *Rhodospiridium toruloides* NBRC 0559.," *Ingenio Tecnológico*, vol. 1, pp. e002–e002, 2019.
- [10] Y.-K. Park, J.-M. Nicaud, and R. Ledesma-Amaro, "The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications," *Trends in Biotechnology*, vol. 36, no. 3, pp. 304–317, 2018.
- [11] I. A. Tiukova, S. Prigent, J. Nielsen, M. Sandgren, and E. J. Kerkhoven, "Genome-scale model of *Rhodotorula toruloides* metabolism," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 116, no. 12, pp. 3396–3408, 2019.
- [12] H. V. Dinh, P. F. Suthers, S. H. J. Chan, Y. Shen, T. Xiao, A. Deewan, S. S. Jagtap, H. Zhao, C. V. Rao, J. D. Rabinowitz, *et al.*, "A comprehensive genome-scale model for *Rhodospiridium toruloides* IFO0880 accounting for functional genomics and phenotypic data," *Metabolic Engineering Communications*, vol. 9, p. e00101, 2019.
- [13] R. R. Bommareddy, W. Sabra, G. Maheshwari, and A.-P. Zeng, "Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates," *Microbial Cell Factories*, vol. 14, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [14] B. J. Sánchez, F. Li, E. J. Kerkhoven, and J. Nielsen, "SLIMER: probing flexibility of lipid metabolism in yeast with an improved constraint-based modeling framework," *BMC Systems Biology*, vol. 13, no. 1, pp. 1–9, 2019.
- [15] J. M. Cherry, "The *Saccharomyces* genome database: Exploring biochemical pathways and mutant phenotypes," *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2015, no. 12, pp. pdb–prot088898, 2015.
- [16] R. Caspi, R. Billington, I. M. Keseler, A. Kothari, M. Krummenacker, P. E. Midford, W. K. Ong, S. Paley, P. Subhraveti, and P. D. Karp, "The metacyc database of metabolic pathways and enzymes—a 2019 update," *Nucleic Acids Research*, vol. 48, no. D1, pp. D445–D453, 2020.
- [17] H. Shen, Z. Gong, X. Yang, G. Jin, F. Bai, and Z. K. Zhao, "Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*," *Journal of Biotechnology*, vol. 168, no. 1, pp. 85–89, 2013.