



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

Departamento de Ciencia y Tecnología  
Licenciatura en Biotecnología

# SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

Estudio del metabolismo energético de  
*Geotrichum klebahnii*

Diego Jorge Baruque

**Dirección**

**Dr. Carlos Fernando Mignone**

**Co-dirección**

**Dr. Sebastián Fernando. Cavalitto**

Bernal, Argentina  
Diciembre de 2003

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Carlos F. Mignone y el Dr. Sebastián F. Cavalitto en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

## Índice temático

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<i>Geotrichum klebahnii</i>	1
Estudio del crecimiento de <i>G. klebahnii</i>	2
Balances de materia en cultivo	9
Cultivos batch	10
Cultivos continuos	11
Análisis de Flujos Metabólicos (AFM)	13
<b> Materiales y métodos</b>	<b>16</b>
Cepa.	16
Mantenimiento de la cepa.	16
Medios de cultivo	16
Cultivos en batch	17
Cultivos continuos	20
Análisis Matricial	22
<b>Resultados y Discusión</b>	<b>23</b>
Cultivo Batch	23
Cultivo Continuo	25
Análisis de Flujos Metabólicos (AFM)	27
Modelo Metabólico sencillo (Modelo A)	28
Modelo Metabólico complejo (Modelo B)	35
Cálculo del $y_{x/ATP}$ y la relación P/O	46
<b>Conclusiones</b>	<b>50</b>
<b>Referencia bibliográfica</b>	<b>51</b>

## Introducción

### ***Geotrichum klebahnii***

Ha habido dudas por largo tiempo acerca de la taxonomía de este microorganismo. Hasta la década del '70 fue catalogado como perteneciente al género de levaduras, *Trichosporon*. Este género se caracteriza por tener células gemante de forma muy variable, presentar micelio verdadero y por la formación de artrosporas <sup>1</sup>. En 1977 el *T. penicillatum* fue transferido al género *Geotrichum* y clasificado como un hongo <sup>2</sup>. Actualmente se lo denomina *Geotrichum klebahnii*.

El género *Geotrichum* esta comprendido dentro del phylum ascomycota. Los miembros de este género son hongos levaduriformes caracterizados por hifas estrechas con ramificaciones escasas y cortas. No poseen blastoconidias, conidioforos ni pseudohifas pero si presentan artroconidias con un tamaño promedio de 6-12 x 3-6  $\mu\text{m}$ , unicelulares, en cadena, hialinas que resultan de la fragmentación de hifas indiferenciadas por fisión mediante la formación de septos dobles. Pueden ser rectangulares o poseer los extremos redondeados asemejándose a pequeños barriles. La ausencia de células vacías que al fragmentarse produzcan la liberación de las artroconidias (células separadoras) es típica de este genero <sup>3, 4</sup>.

*Geotrichum* posee en medio sólido un crecimiento rápido con la formación de colonias blancas secas con aspecto de algodón. En medios ricos al final de la fase de crecimiento genera un fuerte aroma a fruta <sup>3, 4</sup>.

Cuando se cultiva en medio líquido, el ciclo morfológico es sencillo. Si un medio líquido se inocua a partir de medio sólido, *Geotrichum* se presenta como artrosporas. La evolución morfológica es la siguiente: germinación de la artrospora; crecimiento e hifas ramificadas; fragmentación con formación de artrosporas de las hifas fértiles (con septo visibles en algunas de ellas); artrosporas en el final de la fermentación.

Durante el cultivo, las hifas se rompen fácilmente y, como consecuencia de ello no forma pellets sino una suspensión homogénea. Esto es un factor positivo, debido a que la difusión de oxígeno y nutrientes en los pellets es a menudo limitante durante los cultivos con hongos.

Es poca la información que existe acerca del metabolismo de *G. klebahnii* aparte de aquella utilizada para la taxonomía. Solo se conocen algunos requerimientos nutricionales, dentro de ellos están: crecimiento utilizando como fuente de carbono y energía (FCE) D-glucosa, D-galactosa, D-ribosa, Lactato, Etanol, etc.; crecimiento usando como fuente de nitrógeno (FN) urea.

Fue reportado por Cavalitto <sup>5</sup> un valor de  $\mu_{\max}$  de  $0,45 \text{ h}^{-1}$  para el *G. klebahnii* creciendo en batch con glucosa como FCE y urea como FN.

*G. klebahnii* es un microorganismo que posee un pool pobre de enzimas hidrolíticas extracelulares. Sólo se ha reportado y caracterizado la presencia de PPasa-SE. Químicamente es una glicoproteína con un peso molecular de 40000 D (medido por SDS Page) que el microorganismo secreta directamente al medio de cultivo. La misma fue purificada, parcialmente caracterizada e identificada como una endopoligacturonasa.

### **Estudio del crecimiento de *G. klebahnii***

El modelo más sencillo para el estudio del crecimiento de un microorganismo es el llamado de “Modelo de caja negra”. En él, las células se consideran como una caja negra, no teniendo en cuenta nada acerca del metabolismo interno celular, sólo son considerados como variables medibles los flujos de entrada y salida. Recibiendo un flujo de FCE, uno de fuente de nitrógeno y uno de  $\text{O}_2$  y surgiendo flujos de biomasa,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , algún producto (si lo hubiera) y energía (como calor). En la figura 1 se observa un esquema del modelo de caja negra.

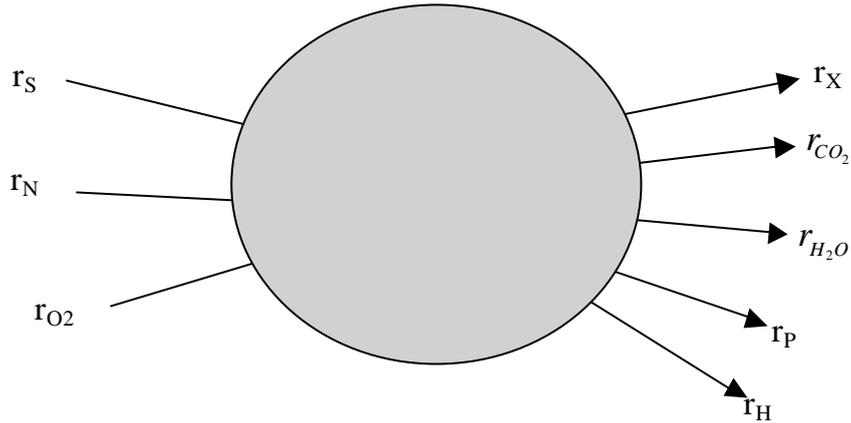
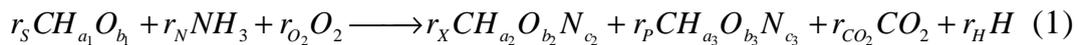


Figura 1. Esquema del crecimiento celular según el modelo de caja negra

A fin de facilitar los cálculos debido a la complejidad de los compuestos involucrados (especialmente la biomasa) se define una cantidad determinada de cada sustancia denominada carbono-mol (cmol) como la cantidad de cualquier compuesto carbonado que contiene 12 g de carbono.

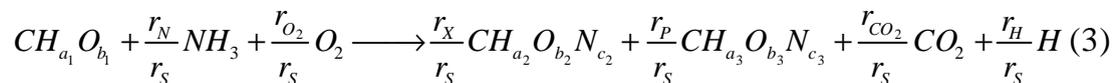
La suma de los flujos de cada uno de los elementos que ingresa al sistema, debe ser igual a la suma de los flujos de salida de ese elemento. Esto se representa en la siguiente ecuación.



La conveniencia del uso del cmol queda en evidencia de esta forma ya que si se expresan los flujos en  $cmol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$  se observa que:

$$r_S = r_X + r_{CO_2} + r_P \quad (2)$$

Si se divide a la primera ecuación por  $r_S$  se obtiene la siguiente ecuación:



Las relaciones de flujos resultan ser los coeficientes estequiométricos de cada uno de los componentes participantes de la ecuación de crecimiento. Por convención los mismos toman la siguiente denominación:

$$\frac{r_N}{r_S} = a \quad \frac{r_{O_2}}{r_S} = b \quad \frac{r_X}{r_S} = y_{X/S} \quad \frac{r_P}{r_S} = y_{P/S} \quad \frac{r_{CO_2}}{r_S} = y_{CO_2/S} \quad \frac{r_H}{r_S} = Q \quad (4)$$

Los coeficientes correspondientes a los productos son las cantidades que se obtiene de cada uno de ellos cada vez que se consume un cmol de FCE y se los denomina rendimientos.

Para calcular los coeficientes estequiométricos de la ecuación de crecimiento se deben medir todas las variables del cultivo, biomasa, FCE, velocidad de consumo de O<sub>2</sub> y de producción de CO<sub>2</sub> y concentración de producto (si lo hubiera). El modo de cálculo de los rendimientos en cada sistema de cultivo se explica más adelante.

La composición macromolecular (cantidad y calidad de hidratos de carbono, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) de los diferentes microorganismos es muy variable. Incluso existe una gran variabilidad dentro de la misma especie en los diferentes estadios de crecimiento sin embargo, la composición elemental es altamente conservada<sup>6,7</sup>.

Analizando la composición elemental de una gran cantidad de microorganismos, tanto eucariotes como procariotes, se ha encontrado que existe una regularidad en la "fórmula mínima" de los mismos. Se puede definir un microorganismo estándar o promedio como aquel que posee la siguiente composición: CH<sub>1.8</sub>O<sub>0.5</sub>N<sub>0.2</sub>, siendo estos componentes el 95% en masa del microorganismo (el 5% restante son sales), esta fórmula estándar resulta de mucha utilidad cuando no se cuenta con información acerca de la composición exacta del microorganismo bajo estudio.

Si se consume un C-mol de FCE (12 g de carbono) y la fuente de nitrógeno no aporta carbono, por la ley de conservación de la materia deberá haber 12 g de carbono del lado de los productos. Si los rendimientos se expresan en carbono

mol de biomasa, CO<sub>2</sub> o producto por carbono mol de FCE, la suma de los rendimientos de biomasa, CO<sub>2</sub> y producto debe ser igual a uno.

De un balance similar al anterior pero para los electrones surge que, en un cultivo aerobio, todos los electrones disponibles de la fuente de carbono y energía deben repartirse entre el O<sub>2</sub>, la biomasa y los productos (si los hubiera). Para cuantificar la cantidad de electrones disponibles de una sustancia se define un parámetro llamado grado de reducción ( $\gamma$ )<sup>8</sup>. Este parámetro es igual a la cantidad de electrones que una sustancia puede entregar durante su combustión hasta un nivel de referencia dado, usualmente CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y NH<sub>3</sub>. Los mismos se toman como estado de referencia y como tal tienen un valor de  $\gamma$  igual a 0 ya que no tienen electrones disponibles. Mediante el uso de balances elementales se demuestra formalmente que para un cmol de cualquier sustancia genérica CH<sub>a</sub>O<sub>b</sub>N<sub>c</sub>, el valor de  $\gamma$  viene dado por:

$$\gamma = 4 + a - 2b - 3c. \quad (5)$$

Como ejemplo de estos parámetros la tabla 1 muestra los valores de la fórmula molecular, fórmula del C-mol y  $\gamma$  de algunos compuestos usualmente relacionados con diferentes cultivos microbianos.

Compuesto	Fórmula molecular	C-mol	Peso de un c-mol	$\gamma^*$
ácido oxálico	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	CHO <sub>2</sub>	45	1
ácido fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46	2
ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> O	30	4
glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	CH <sub>2</sub> O	30	4
biomasa (estándar)	-----	CH <sub>1.8</sub> O <sub>0.5</sub> N <sub>0.2</sub>	25.8	4.2
glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	CH <sub>2.66</sub> <sup>o</sup>	30.66	4.67
etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	CH <sub>3</sub> O <sub>0.5</sub>	23	6
metanol	CH <sub>4</sub> O	CH <sub>4</sub> O	32	6
metano	CH <sub>4</sub>	CH <sub>4</sub>	16	8

\* Tomando como referencia H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>.

Tabla I. Fórmula molecular, fórmula mínima y valores de grado de reducción para algunos compuestos carbonados comunes.

Matemáticamente, estos dos balances quedan expresados como:

$$y_{X/S} + y_{CO_2/S} + y_{P/S} = 1 \quad \text{Balance de carbono} \quad (6)$$

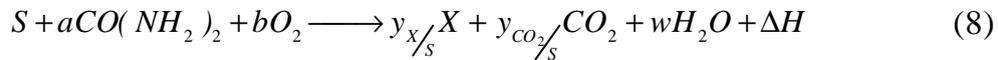
$$g_s - 4b = y_{X/S}g_X + y_{P/S}g_P$$

o, reordenando Balance de grado de reducción (7)

$$\frac{y_{X/S}g_X}{g_s} + \frac{y_{P/S}g_P}{g_s} + \frac{4b}{g_s} = 1$$

donde  $4b$  son los electrones de la fuente de carbono que van a parar al  $O_2$  para obtener energía a través de la cadena respiratoria. En caso de que la fuente de nitrógeno posea carbono, el mismo debe ser considerado dentro del balance correspondiente.

En el caso particular de *G. klebahnii* creciendo aeróbicamente con urea como fuente de nitrógeno y en condiciones en las que no genera producto, la ecuación estequiométrica se reduce a:



El balance de carbono resulta ser:

$$y_{X/S} + y_{CO_2/S} = 1 + a \quad (9)$$

En cuanto al balance de grado de reducción, no se ve alterado si se utiliza como nivel de referencia para el nitrógeno a la urea.

No toda la FCE que se consume se utiliza para la producción de biomasa o productos. En todos los cultivos de microorganismos existe una fracción de FCE que se degrada a fin de obtener energía para mantener a las células viables. Esta energía se destina al recambio de proteínas, de mRNA, en las bacterias gram positivas, al recambio de pared, a mantener gradientes de pH, electroquímicos u

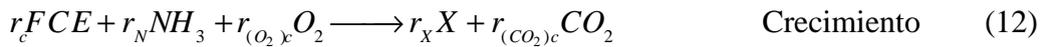
osmóticos y también se gasta en ciclos fútiles. A esta fracción de FCE se le llama energía de mantenimiento.

Para explicar este concepto es conveniente volver a la ecuación (1) e introducir en ella el postulado de Pirt <sup>9</sup> que dice que existe un cierto flujo de FCE, proporcional a la cantidad de biomasa, que se destina al mantenimiento celular.

$$r_m = m_s \cdot X \quad (10)$$

Si la ecuación 1 se desdobra en una que contenga al flujo de FCE destinado al crecimiento  $r_c$  y otra que incluya al flujo destinado al mantenimiento  $r_m$ , queda el siguiente sistema. Por simplicidad se considera que no hay formación de producto (aunque el tratamiento en ese caso es exactamente el mismo).

$$r_s = r_c + r_m \quad (11)$$



El rendimiento observado resulta, tal como se derivó de la ecuación 1, de dividir el flujo de biomasa por el flujo total de FCE.

$$y_{X/S} = \frac{r_X}{r_s} = \frac{r_X}{r_c + r_m} \quad (14)$$

Si se divide  $r_X$  por  $r_c$  se obtiene el valor del rendimiento verdadero  $y_{X/S}^{\max}$  que representa la cantidad de biomasa que se obtendría a partir de un carbono mol de FCE si no existiera mantenimiento.

$$y'_{X/S} = \frac{r_X}{r_c} \quad (15)$$

Si se invierte la ecuación 14 queda:

$$\frac{r_s}{r_x} = \frac{r_c}{r_x} + \frac{r_m}{r_x}$$

Como  $r_x = \mu X \Rightarrow$

$$\frac{1}{y_{x/s}} = \frac{1}{y_{x/s}^{\max}} + \frac{m_s}{\mu} \quad (16)$$

Sabiendo que los rendimientos pueden ser expresados como una relación de velocidades, la ecuación (12) puede expresarse como:

$$r_s = \frac{r_x}{y_{x/s}^{\max}} + m_s X \quad (17)$$

La ecuación 17 se conoce como ecuación de Pirt.

El rendimiento verdadero y el coeficiente de mantenimiento celular dependen principalmente del microorganismo pero también dependen en forma muy marcada del entorno en el cual el mismo debe crecer. Cuando el microorganismo crece en las condiciones optimas de temperatura, pH y presión osmótica los valores de  $m_s$  se hacen mínimos y pueden aumentar más de diez veces cuando dichas condiciones se modifican. En la tabla 2 se hace referencia a algunos datos de bibliografía que ilustran este comportamiento<sup>9, 10</sup>.

Microorganismo	FCE	FN	Condiciones de crecimiento	$m_s$ $g_s g_x^{-1} h^{-1}$
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Triptofano	NH <sub>4</sub> Cl (2 g/L)	Anaeróbico	2.88
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Triptofano	NH <sub>4</sub> Cl (4 g/L)	Anaeróbico	3.69
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Glucosa	NH <sub>4</sub> Cl	Aeróbico	0.06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa	NH <sub>4</sub> Cl	Aerobico C.C. a D = 0.15	0.016
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa		Anaeróbico	0.036
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa		anaeróbico NaCl 1M	0.360
<i>Azotobacter vinelandii</i>		N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> disuelto 0.2 Atm	1.5
<i>Azotobacter vinelandii</i>		N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> disuelto 0.02 Atm	0.15
<i>Bacillus coagulans</i>	Glucosa	NH <sub>4</sub> Cl	C.C. D = 0.4 h <sup>-1</sup>	0.16

**Tabla II.** Valores del coeficiente de mantenimiento para diferentes condiciones de cultivo.

## Balances de materia en cultivo

La figura 1 muestra un esquema general de un cultivo en un biorreactor. En el mismo se indica el flujo de entrada ( $F_1$ ) y salida ( $F_2$ ),  $S_R$  indica la concentración de FCE en el deposito de alimentación (puede ser el limitante o no),  $X$ ,  $S$  y  $P$  son las concentraciones de biomasa, FCE y producto respectivamente en el biorreactor y, si se acepta la hipótesis de mezclado perfecto, como la composición del reactor es homogénea, es también la concentración de dichas sustancias en el flujo de salida.

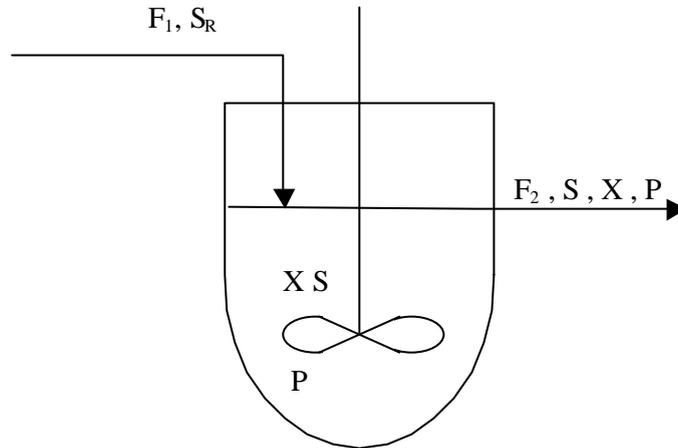


Figura II. Diagrama esquemático de un cultivo en biorreactor.

Dependiendo del sistema de cultivo que se use algunos de los flujos arriba mencionados pueden ser nulos. En un sistema batch,  $F_1$  y  $F_2$  son nulos y el sistema es cerrado para la fase líquida, en un sistema tipo batch alimentado,  $F_1$  es distinto de cero y  $F_2$  es nulo y en un sistema de cultivo continuo,  $F_1$  y  $F_2$  son iguales entre si y distintos de cero.

Para llevar a cabo un estudio cinético de un cultivo se realiza un balance para las diferentes propiedades de estado del cultivo (biomasa, FCE, producto, etc) teniendo en cuenta para cada una de ellas la cantidad que entra, la que sale, la que se genera dentro del reactor y la que se consume dentro del mismo.

En forma general, matemáticamente dicho balance queda expresado como:

$$\frac{dAV}{dt} = F_1 A_r - F_2 A_e \pm V r_A \quad (18)$$

donde  $dAV/dt$  es la velocidad de acumulación de la propiedad extensiva A (como cantidad absoluta), V es el volumen del cultivo,  $F_1$  y  $F_2$  son los caudales de ingreso y egreso de medio al reactor en litros por hora,  $A_r$  y  $A_e$  son las concentraciones de A en la alimentación y en el reactor respectivamente, V es el volumen de cultivo y  $r_A$  es la velocidad volumétrica de producción o consumo de A respectivamente. Si el mezclado es perfecto,  $A_e$  dentro del reactor y  $A_e$  en la corriente de salida, son iguales.

### Cultivos batch

Tal como se indicó anteriormente, en los cultivos en batch no entra ni sale medio de cultivo por lo que los flujos  $F_1$  y  $F_2$  son nulos y el volumen es constante durante todo el cultivo.

Para este caso en particular, los balances de materia quedan representados por:

$$\frac{dXV}{dt} = V r_x \Rightarrow \frac{dX}{dt} = r_x \quad (19)$$

$$\frac{dSV}{dt} = V r_s \Rightarrow \frac{dS}{dt} = r_s \quad (20)$$

Debido a que en este tipo de cultivos es imposible medir en forma precisa el valor de  $r_x$  y  $r_s$ , no pueden calcularse los rendimientos como una relación de velocidades, tal cual surge de la relación de flujos (ecuación 4). En los cultivos en batch se calculan los rendimientos globales, utilizando para el calculo el valor integrado de cada una de las velocidades durante toda la fase de crecimiento.

De esta forma queda

$$y_{x/s} = \frac{dx}{ds} \approx -\frac{\Delta X}{\Delta S}$$

Análogamente

$$y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad y_{CO_2/s} = \frac{CO_{2(tot)}}{\Delta S} \quad b = -\frac{O_{2(tot)}}{\Delta S}$$

Una vez calculados los rendimientos, los balances de carbono y grado de reducción se calculan tal cual se indica en las ecuaciones 6 y 7.

### Cultivos continuos

El cultivo continuo tiene la particularidad de que  $F_1$  y  $F_2$  son iguales entre si, por lo que el volumen permanece constante, luego:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{F_1 A_r}{V} - \frac{F_2 A_e}{V} \pm r_A$$

a la relación  $F/V$ , que es constante si  $F$  es constante, se la denomina velocidad de dilución ( $D$ ) y es una variable experimental muy importante en este tipo de cultivo. La misma tiene unidades de  $h^{-1}$ . A la inversa de  $D$  se la denomina tiempo de retención y equivale al tiempo que transcurre mientras fluye por el reactor un volumen de medio igual al volumen del cultivo.

En estado estacionario:

$$\frac{dA}{dt} = DA_r - D\tilde{A} \pm r_A = 0$$

para cualquiera de las variables extensivas del cultivo.

Para el caso particular de la biomasa ( $X$ ), la misma no se incorpora con el medio ( $X_r = 0$ ) y sólo se produce dentro del reactor. La ecuación de balance para

biomasa es:

$$\frac{dX}{dt} = -DX + r_x = 0$$

$$\text{si } r_x = \mathbf{mX} \Rightarrow \mathbf{mX} - DX = 0 \Rightarrow$$

$$\mathbf{mX} = DX \Rightarrow$$

$$\mathbf{m} = D \quad \therefore$$

La velocidad de crecimiento será  $r_x = D \cdot \tilde{X}$

Como  $\mu$  queda fijo a través del caudal de alimentación y no depende de los componentes del medio de cultivo o de los parámetros físicos del cultivo (pH, temperatura, etc.), se puede estudiar el efecto de cualquiera de estas variables (por ejemplo diferente fuente de carbono) con la seguridad de que un cambio observado en un parámetro determinado estará causado por dicho cambio y no a la variación que este cambio produce en la velocidad de crecimiento.

La ecuación de balance para el FCE toma la siguiente forma:

$$\frac{dS}{dt} = DS_r - D\tilde{S} - r_s = 0$$

$$r_s = D(S_r - \tilde{S})$$

Dado que en este tipo de cultivo tanto las velocidades volumétricas como las específicas pueden ser calculadas con gran exactitud, los rendimientos se calculan en función de ellas y no de las cantidades globales como en el batch. En este caso tendremos:

$$y_{x/s} = \frac{r_x}{r_s} \quad , \quad y_{co_2/s} = \frac{r_{co_2}}{r_s} \quad \text{o} \quad b = \frac{r_{o_2}}{r_s}$$

## **Análisis de Flujos Metabólicos (AFM)**

Se denomina ruta o mecanismo a una secuencias de reacciones posibles y observables que conectan un grupo de metabolitos de entrada con un grupo de metabolitos de salida.

Una metodología poderosa para la determinación de rutas de flujos metabólicos es el análisis de flujos metabólicos (AFM), donde los flujos intracelulares se calculan usando un modelo estequiométrico para las reacciones intracelulares y aplicando balances de masa sobre todos los componentes (biomasa, sustrato, producto, oxígeno, dióxido de carbono, ATP, poder reductor, etc). Se usan un grupo de flujos extracelulares para los cálculos, típicamente la velocidad de consumo de sustrato y la velocidad de producción de metabolitos. El resultado final del cálculo de flujos es un mapa de flujos metabólicos que muestra un diagrama de las reacciones bioquímicas incluidas en los cálculos junto con una estimación de la velocidad en el estado estacionario (es decir, el flujo) a la cual cada reacción ocurre en el diagrama. Todos los flujos se calculan de balances de materia en torno a metabolitos intracelulares y a una medida de los flujos de compuestos intercambiados entre la célula y su entorno. El valor real de dichos flujos metabólicos esta dada en las diferencias de los flujos que se observan cuando los mapas de flujos obtenidos con distintas cepas o bajo distintas condiciones de crecimiento se comparan entre si. Es a través de dichas comparaciones que se puede determinar completamente el impacto de las perturbaciones ambientales y genéticas, así como la importancia de rutas específicas y reacciones que están descritas con exactitud dentro de los mecanismos.

Además de la cuantificación de flujo de rutas, el AFM puede proveer de información importante acerca de otras características importantes de la fisiología celular. Algunos ejemplos son:

- *Identificación de puntos de ramificación en el control de rutas celulares.*

En donde puede determinarse la flexibilidad o rigidez de los puntos de ramificación comparando los cambios producidos en dichos puntos por el uso de mutantes o por el cambio de condiciones operacionales.

○ *Identificación de rutas alternativa.*

La formulación de la estequiometría de reacción, que es la base del AFM, requiere un conocimiento detallado de las rutas bioquímicas reales por las cuales los sustratos se convierten en productos. Esto sin embargo, no es claro para muchos organismos ya que se han identificado muchas rutas alternativas en distintos organismos que se saben que operan bajo condiciones distintas. El análisis de flujo metabólico es importante para identificar rutas que puedan reproducir las medidas de flujos macroscópicos de metabolitos extracelulares, eliminando mecanismos alternativos que no son posibles por su inhabilidad para satisfacer balances de materia.

○ *Calculo de flujos extracelulares no medidos.*

A veces el número de flujos extracelulares que pueden medirse es menor de lo necesario para calcular los flujos intracelulares desconocidos, en este caso, usando valores promedio de reacciones de flujos determinadas por experimentos previos es posible calcular los flujos extracelulares no medidos, por ejemplo, velocidad de producción de varios subproductos, por el uso de modelos estequiométricos y flujos medidos. Si las medidas están disponibles puede hacerse una correlación con las predicciones del modelo, lo cual podría usarse para una validación o revisión del sistema.

○ *Cálculo del Rendimiento Máximo teórico.*

El cálculo del rendimiento teórico esta basado en la estequiometría de una red metabólica configurada de manera de obtener un rendimiento máximo de un producto para un sustrato determinado. Se prefiere hacer una aproximación basada en AFM para la determinación rendimientos teóricos.

Un aspecto particular del análisis de flujos metabólicos es que la determinación estequiométrica de flujos metabólicos intracelulares puede estar basada en un número de balances de metabolitos iguales, mayores o menores, dependiendo de

el número de medidas disponibles. En el caso de ser iguales no existe redundancia, en cambio con más medidas se puede determinar rigurosamente la validez del proceso. Si hay menos medidas pueden introducirse variables optimizadas para cerrar las ecuaciones.

## **Materiales y métodos**

### **Cepa.**

Se utilizó en todos los caso el *Geotrichum klebahnii* (*G. klebahnii*) ATCC 42397. Como no se dispone de su composición elemental, se utilizo la propuesta por Dekkers y col<sup>11</sup> para *Saccharomyces cerevisiae* creciendo en medio definido limitado en glucosa ( $\text{CH}_{1.83}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.17}$ ). Con esta composición, suponiendo un 5 % de sales, el peso del carbono mol de biomasa es de 26.45 y el grado de reducción con respecto a la urea,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  es de 4.2.

### **Mantenimiento de la cepa.**

La cepa se conserva a  $-70^\circ\text{C}$  en glicerol al 15 % (V/V). La misma se repica en un medio de mantenimiento y se la mantiene bajo vaselina a  $4^\circ\text{C}$  durante aproximadamente 6 meses. Este cultivo es el que se utiliza para sembrar todos los cultivos realizados tanto en batch como en cultivo continuo.

### **Medios de cultivo**

#### *Medio de mantenimiento:*

Se utilizó el medio GYP reportado por Sakai y col<sup>12</sup> conteniendo (por litro): 5 g de peptona de carne; 5 g de extracto de levadura; 20 g de glucosa; 20 g de agar; pH 5.0

#### *Medio de referencia (MR):*

Para este trabajo se utilizo un medio sintético, descrito por Cavalitto y col<sup>13</sup> conteniendo (por litro): 5.0 g de glucosa; 1 g de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ ; 0.1 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.6 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.6 g de urea; 0.6 g de ácido cítrico; solución de micronutrientes C ml; solución de micronutrientes A ml; solución de vitaminas 1

ml Todo a pH 5.0.

La solución de vitaminas contiene (por litro): 6 mg de ácido fólico; 6 mg de *myo*-inositol; 6 mg de D – Biotina; 0.8 g de riboflavina; 0.8 g de pantotenato de calcio; 0.8 g de ácido p-aminobenzoico; 1.6 g de piridoxina. La solución mineral C de micronutrientes contiene (por litro): 0.6 g de ácido cítrico; 0.15 g  $\text{CoCl}_2$ ; 3 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 5 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 15 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.75 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; pH 1.5. La solución mineral A de micronutrientes contiene (por litro): 0.65 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 g KI; 0.1 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; pH 1.5.

Cabe resaltar que en los cultivos tipo batch se utilizó el MR al séxtuple de su concentración (30 g/l de glucosa), en cambio en los cultivos continuos se utilizó el medio de referencia al doble de concentración (10 g/l de glucosa). Otro punto a tener en cuenta es que el medio de cultivo se esterilizó en autoclave, a excepción de las vitaminas y la urea las cuales se esterilizaron por filtración y luego se agregaron al resto del medio estéril.

### **Cultivos en batch**

**Reactor:** para la realización de estos cultivos se utilizó un biorreactor LH Inceltech de 5 litros de capacidad, el cultivo se agitó a 500 RPM y se le suministró aire con un caudal variable entre  $0.13 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  (al comienzo del cultivo) y  $0,33 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  (al final del mismo). Dicho biorreactor se inoculó con un batch previo realizado en un biorreactor LH Inceltech de 1 litro de capacidad.

**Evolución del inóculo:** se sembró y se hizo crecer un tubo con agar inclinado por aproximadamente 40-48 hs. A partir de la resuspensión de dichos tubos se realizó un cultivo batch en reactor LH-inceltech con 1 litro de MR. Luego de 20-24 hs. de crecimiento, se utilizó como inóculo del biorreactor.

**Toma de muestras líquidas y gaseosas:** cada media hora se midieron los gases de salida del reactor. Las muestras líquidas fueron tomadas cada una hora, de la siguiente manera:

50 ml de cultivo fueron recogidos en una probeta de 100 ml colocada en baño de

hielo, de dicho volumen se tomaron 30 ml para determinar peso seco y el resto del volumen se centrifugo a 10000 RPM por 10 minutos a 4 °C. Del sobrenadante se guardaron 4 muestras en freezer a -18 °C para realizar posteriormente las medidas de glucosa y etanol.

**Medida de oxígeno disuelto:** durante el cultivo se midió el nivel de O<sub>2</sub> disuelto con un electrodo de tipo polarográfico (Ingold).

**Medida de gases:** los niveles de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el gas de salida del reactor se determinaron con un detector Servomex de tipo paramagnético y con un detector Horiba Pir 2000 con sensor infrarrojo respectivamente. Con estos datos y el valor del caudal de aire se determinaron las velocidades de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>.

La velocidad de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> se determinan a través de un balance de materia sobre la fase gaseosa. Midiendo la composición del gas a la salida del reactor pueden calcularse las velocidades de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> por medio de las siguientes ecuaciones.

$$r_{O_2} = -\frac{F \cdot 0.79}{V} \cdot \frac{T_0}{T \cdot 22.4} \cdot 60 \cdot \left( \frac{(\% O_2)_2}{100 - (\% O_2)_2 - (\% CO_2)_2} - \frac{(\% O_2)_1}{79} \right)$$

$$r_{CO_2} = \frac{F \cdot 0.79}{V} \cdot \frac{T_0}{T \cdot 22.4} \cdot 60 \cdot \left( \frac{(\% CO_2)_2}{100 - (\% O_2)_2 - (\% CO_2)_2} - \frac{(\% CO_2)_1}{79} \right)$$

En donde F es el caudal de alimentación de aire medido en litros por hora, 0.79 es el porcentaje de nitrógeno en el aire, V es el volumen del cultivo en litros, T<sub>0</sub> y T son 273 K y la temperatura de trabajo (la de los gases), 22.4 es el volumen ocupado por un mol de gas en condiciones normales de temperatura y presión.

En reactores grandes, de tipo industrial, este valor de velocidad debiera estar corregido además de por la temperatura, por la diferencia de presión entre la que existe en la entrada de gases y 1 Atm (CNTP) ya que la altura de líquido sobre la entrada de gases suele ser apreciable y además es normal trabajar con una presión

mayor de la atmosférica en el espacio cabeza del reactor. Sin embargo, para reactores pequeños como el usado en estas experiencias puede despreciarse dicha corrección. Los subíndices 1 y 2 representan porcentajes a la entrada y salida del reactor respectivamente. Las ecuaciones expresan la velocidad de consumo de  $O_2$  y producción de  $CO_2$  en moles por litro de medio y por hora.

La cantidad total de  $O_2$  consumido y  $CO_2$  producido durante el cultivo se calculan como la integral de la velocidad correspondiente en función del tiempo

$$O_2 \text{ total consumido} = \int_{t_0}^{t_f} r_{O_2} dt$$
$$CO_2 \text{ total producido} = \int_{t_0}^{t_f} r_{CO_2} dt$$

**Biomasa:** dado que el microorganismo no forma pellets compactos cuando se lo centrifuga, la determinación de peso seco no puede hacerse por centrifugación. Por ello la misma se realizó por filtración en membrana de celulosa. El filtro utilizado fue de 0,45  $\mu m$  de poro (E04WP04700, MSI, USA). La biomasa retenida se lavó y secó a peso constante a 80°C<sup>14</sup>.

**Consumo de fuente de carbono:** la glucosa se determinó por el método enzimático de glucosa oxidasa (Wiener lab. Argentina)<sup>15</sup>.

**Medidas de pH:** El mismo fue monitoreado con un electrodo de vidrio (Mettler Toledo)

**Medidas de etanol:** el etanol se determinó de dos formas diferentes:

- Utilizando el método de Nicloux<sup>16</sup> modificado, según se lo indica a continuación; a 1 ml del sobrenadante obtenido de la centrifugación de la muestra se le adicionan 20 ml de agua (pH: 7-8). Esta solución se destila hasta recoger 10 ml de destilado, el cual es recibido sobre 1,5 ml de  $H_2SO_4$  3N para retener el etanol destilado. Sobre 5 ml de esta solución se le adicionan 2 ml de  $Cr_2O_7K_2$  al 1,9 % (p/v) seguidos de 5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado. Se deja reposar 5 minutos y se enfría bajo canilla. Se agregan 2 gotas de O-Fenantrolina (indicador) y se titula

con  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  0,1 N hasta la aparición de color marrón.

Las muestras se midieron por duplicado y se realizaron varios blancos con 5 ml de agua.

En estas condiciones resulta:

$$\text{Etanol (g/l)} = 0,23 (V_{\text{bco}} - V_{\text{m}})$$

$V_{\text{bco}}$  = ml de  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  gastados en el blanco.

$V_{\text{m}}$  = ml de  $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  gastados con la muestra.

El método se probó con soluciones testigos de etanol, obteniéndose una correlación directa para concentraciones de etanol de 0,2 a 10 g/l (información no mostrada).

- Utilizando el método enzimático de la alcohol deshidrogenasa<sup>15</sup> (Boehringer Mannheim).

**Recuperación de etanol de los gases de salida del fermentador:** para minimizar los efectos de stripping, se hicieron pasar los gases por un refrigerante y posteriormente por un frasco lavador conteniendo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N. Luego se determinó la concentración de etanol en dicho recipiente.

Con todos estos datos, se realizaron los cálculos estequiométricos correspondientes.

## **Cultivos continuos**

Todos los cultivos se realizaron en un biorreactor Inceltech LH serie 210 de 1 L de volumen útil máximo, control automático de temperatura y pH y monitoreo de  $\text{O}_2$  con electrodo polarográfico. El volumen del medio utilizado en la fase estacionaria fue de 700 mL, el pH se mantuvo en 5 por el agregado de solución 1,0 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o NaOH. En todos los continuos se determinó "on line" temperatura, pH, agitación y  $\text{O}_2$  disuelto.

En lo que respecta a las variaciones en el nivel de oxígeno del cultivo, se

realizaron dos tipos de ensayos:

- Empleando una velocidad de dilución (D) variable (de aproximadamente  $0,2 \text{ h}^{-1}$  a  $0,37 \text{ h}^{-1}$ ), manteniendo la agitación constante (410 RPM).
- Empleando una velocidad de dilución (D) constante (cercana a  $0.3 \text{ h}^{-1}$ ), y bajando la agitación (950 a 350 RPM).

El valor de la transferencia de  $\text{O}_2$  fue previamente determinado para este reactor utilizando el metodo de Imai y col<sup>17</sup>. Se encontró una relación entre agitación y  $K_L a$  dada por  $K_L a (\text{h}^{-1}) = 5.076 \cdot 10^{-6} \times \text{RPM}^{2.767}$ .

El comienzo de todos los cultivos fue similar. El biorreactor, conteniendo un litro de medio de cultivo, fue sembrado directamente de un agar inclinado. Una vez agotado el sustrato limitante se abre el tubo de rebalse con lo que el volumen disminuye a 700 ml (volumen de trabajo) y se comienza con la alimentación del medio correspondiente. Como indicador del punto final del batch, se esperó a que el  $\text{O}_2$  disuelto comenzara a aumentar.

A fin de asegurar que se haya alcanzado el estado estacionario se dejó transcurrir alrededor de 10 tiempos de retención antes de tomar las muestras de cultivo para realizar las medidas correspondientes.

Para tomar la muestra correspondiente se recogió el efluente del biorreactor en un recipiente sobre hielo y esa muestra se fraccionó, 25 ml para medida de peso seco y el resto para determinaciones analíticas, FCE y etanol. De cada estado estacionario se tomaron tres muestras separadas al menos 4 tiempos de retención entre si.

Luego de cada cambio de condición de cultivo se dejó transcurrir al menos 10 tiempos de retención a fin de asegurar que se hubiera llegado a un nuevo estado estacionario.

Las medidas de pH,  $\text{O}_2$  disuelto, gases a la salida, peso seco, etanol y FCE remanente se realizaron de igual forma que en los cultivos batch.

## **Análisis Matricial**

Para realizar el análisis matricial, y obtener el valor los flujos metabólicos a través de las distintas rutas se utilizó el programa Mathcad 2001 Professional. Dicho software también se emplea para el cálculo de la relación P/O y el  $y_{x/ATP}$ .

## Resultados y Discusión

### Cultivo Batch

La tabla III muestra los datos del cultivo realizado en batch en el reactor LH Inceltech utilizando un medio seis veces más concentrado que el MR.

Tiempo (horas)	Peso Seco (g/l)	Glucosa (g/l)	Etanol (g/l)	Oxígeno Disuelto	rO <sub>2</sub> (mmol/l.h)	rCO <sub>2</sub> (mmol/l.h)	CR
0	0,497	29,13	0,237	90,4	4,044	3,803	0,941
0,75				90,2	4,446	5,642	1,269
1,33	0,627	27,67		85,3	5,458	6,192	1,135
1,78				85,4	7,185	6,631	0,923
2,28	0,9	26,97		75	8,395	7,844	0,934
2,75				72,4	11,005	10,119	0,920
3,25	1,287	26,46		66,1	12,234	11,603	0,948
3,75				59,9	15,308	14,252	0,931
4,25	1,84	25,87		53,7	17,812	16,007	0,899
4,75				46,8	21,382	19,643	0,919
5,25	2,387	25,53		38,5	25,097	23,857	0,951
5,75				42,5	27,557	29,671	1,077
6,08	3,683	23,33	0,228	1,8	13,391	19,761	1,476
6,75				0,9	13,177	21,231	1,611
7,25	4,272	21,66	0,454	0	14,701	31,329	2,131
7,75				0	15,146	39,358	2,599
8,28	5,235	16,97	2,391	0	16,871	48,305	2,863
8,8				0	17,569	54,018	3,075
9,25	6,07	12,93	3,915	0	20,321	61,451	3,024
9,8				0	21,674	73,731	3,402
10,28	7,095	5,53	7,667	0	25,549	79,089	3,096
10,86				0	24,604	91,247	3,709
11,36	7,86	0,03	8,078	0	26,832	48,268	1,799

CR: coeficiente respiratorio (moles de CO<sub>2</sub>/ moles de O<sub>2</sub>)

**Tabla III.** Planilla de seguimiento del crecimiento de *G. klebahnii* en medio con glucosa, urea y sales; realizado en un tanque agitado LH de 5 litros.

Para realizar los cálculos de los balances de carbono y grado de reducción en cada una de las etapas, se tomaron desde el tiempo cero hasta las 6.08 horas en la fase sin limitación y desde las 7.25 a las 11.36 horas para la fase limitada en

oxígeno. Como puede verse en la tabla III, desde el comienzo del cultivo se observó la presencia de etanol proveniente del inóculo el cual posiblemente creció momentaneamente limitado en O<sub>2</sub>. El delta de producto en la período no limitado, se considero cero debido al error experimental en el método para medir alcohol.

En la tabla IV se indican las cantidades medidas para cada una de las variables así como el valor de los rendimientos y balances correspondientes.

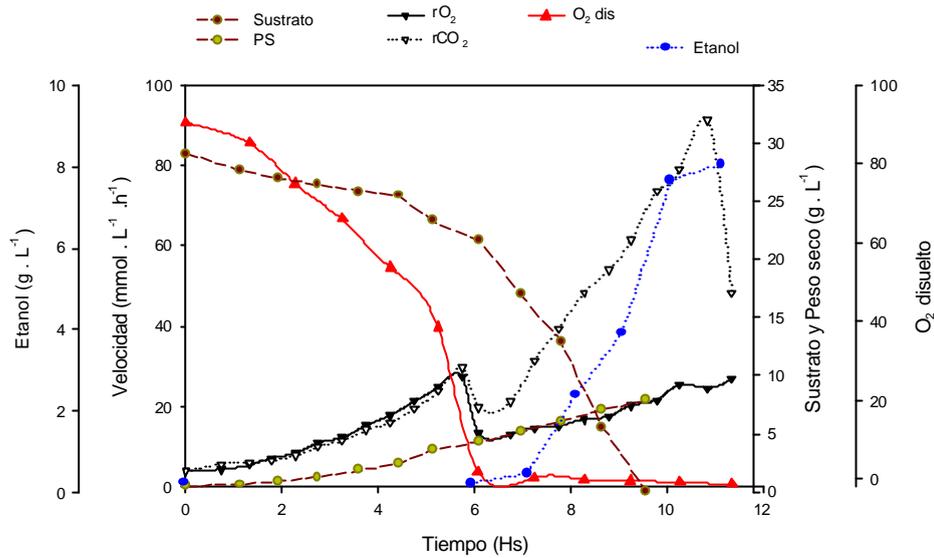
Condición	$\Delta S$ cmol/L	$\Delta X$ cmol/L	$\Delta P$ cmol/L	O <sub>2</sub> total mM	CO <sub>2</sub> total mM	$y_{x/s}$	$y_{co_2/s}$	$y_{p/s}$	b	BC	B $\gamma$
Sin limitación	0.193	0.120	0	0.0797	0.0785	0.622	0.407	0	0.413	1.03	1.06
Limitado en oxígeno	0.721	0.136	0.331	0.0837	0.2516	0.189	0.349	0.459	0.116	0.997	1.003

**Tabla IV.** Análisis estequiométrico del cultivo batch de *G. klebahnii*

Puede notarse como disminuye el  $y_{x/s}$  al limitar el cultivo en oxígeno, esto da una idea de lo poco eficiente desde el punto de vista energético que es *G. klebahnii* para crecer bajo condiciones de limitación en oxígeno.

Datos semejantes a los obtenidos bajo condiciones de oxígeno no limitante han sido informados para *Trichosporom cutaneum*. Fiechter reporta un rendimiento de 0,55 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>, un cociente respiratorio cercano a uno durante todo el cultivo y ninguna formación de productos distintos de biomasa y dióxido de carbono<sup>18</sup> en dicha etapa.

En el gráfico I se observa como varían de cada una de las medidas. La curva de formación de biomasa presenta dos partes, una de crecimiento exponencial (la no limitada) y otra de crecimiento lineal (la limitada). Como puede verse la curvas de velocidad de consumo de O<sub>2</sub> y velocidad de formación de CO<sub>2</sub> se mantienen juntas hasta que el cultivo se limita en oxígeno, en ese momento aumenta la producción CO<sub>2</sub> como consecuencia de una mayor descarboxilación en glucólisis para formar etanol. Notar que el aumento en la curva de formación de etanol va acompañado por un aumento en la producción de dióxido de carbono.



**Gráfico 1.** Curvas de crecimiento de *G. klebahnii*: Consumo de sustrato, formación de biomasa, O<sub>2</sub> disuelto, formación de etanol, velocidad de producción de CO<sub>2</sub> y velocidad de consumo de oxígeno.

Un dato interesante es que cuando el cultivo se limita en O<sub>2</sub>, genera algún tipo de producto que posee aroma a manzana. Este producto no ha sido identificado por nosotros pero G. Pastore y col<sup>19</sup> han reportado la presencia de etil-isovalerato y etil-hexanoato así como etil-butirato y etil-propionato en cultivos de *Geotrichum sp.* La cantidad de estos productos es mínima ya que no alteran los balances de carbono y grado de reducción.

## Cultivo Continuo

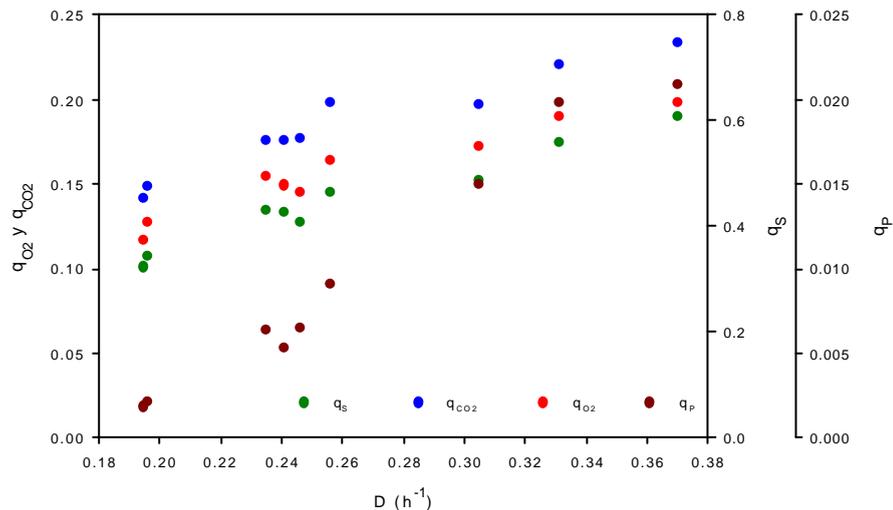
La tabla siguiente muestra las variables de proceso obtenidas en cultivo continuo a distintos D. Además se presentan los balances de carbono y grado de reducción a cada velocidad de dilución. En todos los casos los balances resultan muy próximos a 1, indicando una buena consistencia de los datos.

Biomasa g/l	$\mu(h^{-1})$	qS	qP	qO2	qCO2	$y_{x/s}$	$y_{p/s}$	b	$y_{co_2/s}$	BC	BGR
3.187	0.370	0.606	0.0209	0.198	0.233	0.610	0.0344	0.326	0.384	1.029	1.018
3.357	0.331	0.557	0.0198	0.190	0.220	0.595	0.0355	0.341	0.395	1.025	1.019
4.153	0.305	0.485	0.0147	0.172	0.197	0.629	0.034	0.356	0.407	1.070	1.067
4.037	0.256	0.462	0.0091	0.164	0.198	0.554	0.0197	0.355	0.429	1.003	0.966
4.7	0.246	0.408	0.0065	0.145	0.177	0.603	0.0158	0.356	0.434	1.053	1.013
4.91	0.241	0.425	0.0053	0.149	0.176	0.568	0.0126	0.352	0.414	0.995	0.967
4.515	0.235	0.430	0.0064	0.154	0.176	0.547	0.0148	0.357	0.408	0.969	0.954
5.06	0.196	0.342	0.0021	0.127	0.148	0.572	0.0063	0.372	0.432	1.010	0.982
4.835	0.195	0.322	0.0018	0.117	0.141	0.606	0.0056	0.362	0.438	1.049	1.007

**Tabla V.** Velocidades específicas de crecimiento ( $q$ ), rendimientos y balances de materia. Las  $q$  en unidades de  $cmol/(cmol.h)$ .

Debe notarse que, a diferencia del cultivo en batch, el  $y_{x/s}$  se mantiene aproximadamente constante debido a que la cantidad de etanol generado en cultivo continuo es muy pequeña y no modifica mayormente la cantidad de biomasa obtenida.

Como puede verse en el gráfico II, todas las velocidades específicas aumentan al aumentar la velocidad de dilución.



**Gráfico II.** Velocidades Específicas en función de D, obtenidas en cultivo continuo

Debido a que la velocidad de agitación se mantuvo constante, la transferencia de  $O_2$  fue siempre la misma. El cultivo se mantuvo limitado en  $O_2$  para todas las velocidades de dilución ( $O_2$  disuelto cero). Como la velocidad volumétrica de consumo de  $O_2$  ( $r_{O_2}$ ) queda determinada en condiciones de limitación por la transferencia de  $O_2$ , el microorganismo se encuentra “más limitado”, con lo que el valor de  $q_p$  aumenta marcadamente con el aumento de  $D$ .

### **Análisis de Flujos Metabólicos (AFM)**

El modelo de la caja negra que se utilizó hasta el momento para realizar los cálculos estequiométricos y poder obtener los distintos rendimientos y corroborar los balances de los cultivos, no nos da ninguna idea acerca del metabolismo del microorganismo. Como fue mencionado, en dicho modelo solo se tienen en cuenta los flujos que entran y salen del interior celular, sin considerar como son utilizados los sustratos, la formación de productos o como es que el organismo produce más biomasa. A fin de establecer el destino de cada uno de los nutrientes (especialmente la FCE) y determinar el valor de  $y_{x/ATP}$  (indicativo de la eficiencia energética en la formación de biomasa) y de la relación P/O, se recurrió al Análisis de Flujos Metabólicos<sup>20, 21, 22, 23</sup>. En ella se utiliza un modelo más complejo que el de la caja negra, que incorpora datos del metabolismo del microorganismo.

Para poder realizar este tipo de análisis se debe contar con mayor cantidad de información acerca del metabolismo del microorganismo a estudiar, ya que el objetivo de esta metodología es calcular el flujo de materia a través de las distintas rutas metabólicas empleando las medidas experimentales obtenidas en cada uno de los cultivos.

Se plantearon dos modelos metabólicos de distinta complejidad (Modelo A y B). Operativamente se efectuaron dos tipos de cultivos para lograr el análisis deseado. Se realizaron una serie de cultivos batch en los que *G. klebahnii* creció durante un tiempo en forma completamente aeróbica y luego de un determinado

tiempo, limitado en  $O_2$ . De esta forma se consigue que aparezca un producto (etanol) en una de las fases de crecimiento (la limitada) y en la otra no. Además, se llevaron a cabo cultivos continuos en condiciones de baja transferencia de oxígeno, en los cuales se sabe que a altas velocidad de dilución (D) el cultivo se limita en oxígeno y *G. klebahnii* forma etanol, proceso que no ocurre a D bajos.

### Modelo Metabólico sencillo (Modelo A)

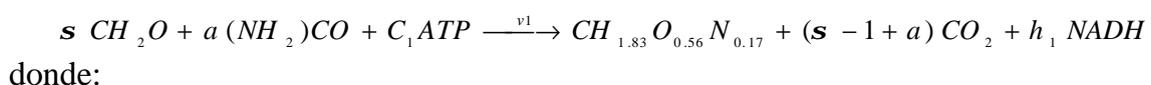
El primer modelo fue tomado del trabajo de Dekkers y col<sup>11</sup> en el que se estudia el crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae* (microorganismo Crabtree positivo) a distintas velocidades de dilución. Se basa en las siguientes suposiciones:

- *G. klebahnii* realiza glucólisis a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), completando la oxidación del sustrato en el ciclo de Krebs.
- Existe una transhidrogenasa que interconvierte NADH y NADPH.
- El NADH descargado en cadena respiratoria tiene un valor de P/O máximo posible de 3.

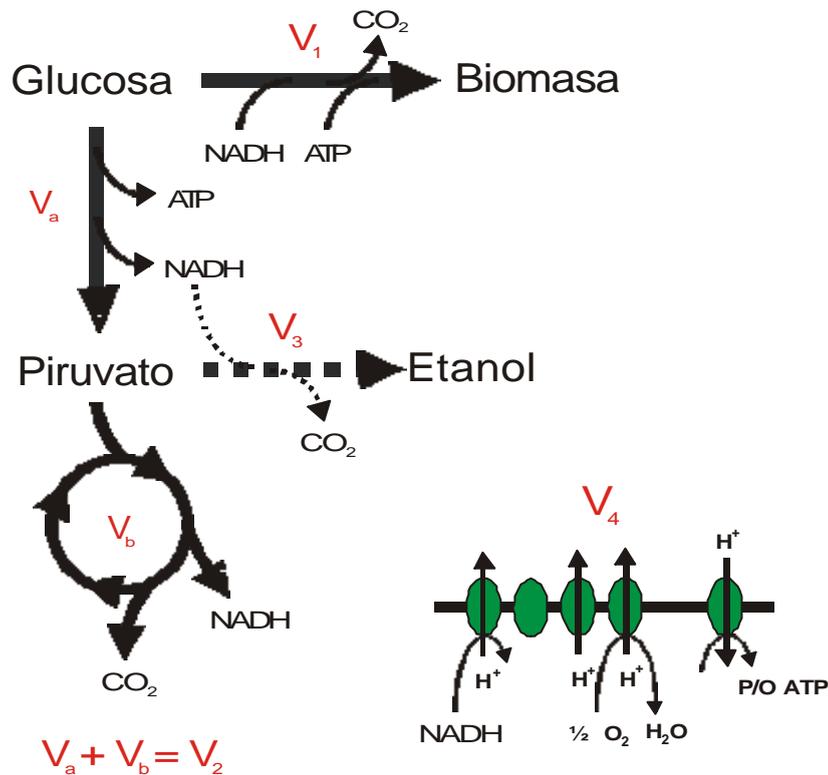
En la figura III se presenta un esquema del modelo metabólico considerado, notar que el flujo a través de  $v_2$  se considera como la suma del flujo en glucólisis ( $v_a$ ) y el flujo a través del ciclo de Krebs ( $v_b$ ).

El metabolismo de *G. klebahnii* según este modelo puede representarse mediante las siguientes ecuaciones:

1) Síntesis de biomasa



$\sigma$  es la cantidad de fuente de carbono (en carbono moles) necesarios para generar un carbono mol de biomasa. En general, para levaduras es ligeramente mayor que 1 debido a la pérdida de carbono como  $\text{CO}_2$ , producido por descarboxilación durante la síntesis de aminoácidos. Debido a que el valor de  $\sigma$  para *G. klebahnii* no se conoce, se pueden utilizar los valores reportados para *Sacharomyces cerevisiae* creciendo en medio sintético con glucosa y amonio; dicho valor es de  $1,106^{24}$ .



**Figura III.** Esquema del Modelo Metabólico Sencillo.  
 $V_1$  a  $V_4$  corresponden con los flujos considerados

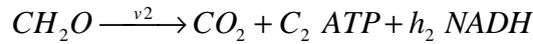
$C_1$  es la cantidad de ATP requerida para la síntesis de un carbono mol de biomasa.  $C_1$  es, numéricamente, la inversa del  $y_{X/ATP}$ .

$h_1$  es la cantidad de poder reductor que se genera durante la síntesis de biomasa. Puede calcularse a través del balance de grado de reducción.

$$h_1 = \frac{s g_s - g_x}{2}$$

Para el caso considerado resulta ser 0,112.

2) Obtención de NADH, ATP y CO<sub>2</sub> a través de la oxidación completa del sustrato (Glucólisis y ciclo de Krebs)

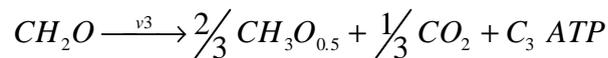


En esta ecuación C<sub>2</sub> es igual a 2/3 debido a que se considera que el GTP producido en el ciclo de Krebs es equivalente a un ATP.

Asimismo, h<sub>2</sub> se puede obtener del balance de grado de reducción tomando la forma:

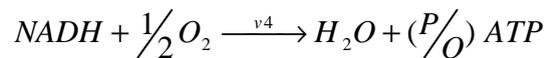
$$h_2 = \frac{g_s}{2} = 2$$

3) Glucólisis en limitación por oxígeno (con formación de etanol)



C<sub>3</sub> es el ATP producido en glucólisis, siendo de 1/3 mol<sub>ATP</sub>/cmol<sub>glucosa</sub>.

4) Reoxidación del poder reductor en la cadena de transporte de electrones



P/O, como ya se indicó, es la cantidad de ATP generado por cada par de electrones que pasan a través de la cadena de citocromos.

Una vez que se tiene armada la serie de reacciones que se desea considerar, se realiza un balance de materia en función de las velocidades para cada uno de los componentes involucrados en ellas. La suma algebraica de las velocidades de producción o consumo de cada componente, resultante del producto entre el flujo a través de cada reacción (v<sub>i</sub>) y el coeficiente estequiométrico del componente en

la misma, en todas las reacciones debe ser igual a la velocidad específica de formación o consumo de dicho componente.

Para ello se considera, por convención, como negativa a la velocidad de todo componente que sea consumido y como positiva a la velocidad de todo aquel que se produzca. Por ejemplo, la biomasa solo participa en la reacción 1 y su coeficiente estequiométrico es 1, por lo que

$$v_1 = \mu$$

Si consideramos a la FCE se gasta en la reacción 1 con un coeficiente de  $\sigma$  y en la 2 y 3 con un coeficiente de 1, el balance queda representado por  $-\sigma \cdot v_1 - v_2 - v_3 = q_s$ . Si realizamos el mismo procedimiento para el resto de las velocidades se obtiene el sistema de ecuaciones (a):

$$\begin{aligned} -s \cdot v_1 - v_2 - v_3 &= q_s \\ -C_1 \cdot v_1 + C_2 \cdot v_2 + C_3 \cdot v_3 + \left(\frac{P}{O}\right) \cdot v_4 &= q_{ATP} \\ h_1 \cdot v_1 + h_2 \cdot v_2 - v_4 &= q_{NADH} \\ v_1 &= m \end{aligned} \quad (a)$$

$$\begin{aligned} \left(s - 1 + \frac{0.17}{2}\right) \cdot v_1 + v_2 + \frac{1}{3} \cdot v_3 &= q_{CO_2} \\ -\frac{1}{2} \cdot v_4 &= q_{O_2} \\ \frac{2}{3} \cdot v_3 &= q_P \end{aligned}$$

Debido a que los componentes intracelulares no se acumulan durante el crecimiento, las velocidades  $q_{NADH}$  y  $q_{ATP}$  se consideran nulas.

### Análisis del Modelo A en cultivo continuo

A fin de determinar  $Y_{X/ATP}$  y la relación P/O, se siguió el método utilizado por Dekkers y col. para *Sacharomyces cerevisiae*<sup>11</sup> en cultivo continuo, empleando distintas velocidades de dilución.

Del modelo antes presentado se tomaron  $\mu$ ,  $q_s$ ,  $q_{ATP}$ ,  $q_{NADH}$  y  $q_P$ . De las cuales tres eran conocidas experimentalmente ( $\mu$ ,  $q_s$  y  $q_P$ ) y las otras dos no.

Reemplazando, reordenando los términos y resolviendo el sistema se obtiene que:

$$Y_{S/X} = \frac{\left[3\left(\frac{P/O}{2}\right) + \frac{3}{2}C_2 - \frac{3}{2}C_3\right]}{2\left(\frac{P/O}{2}\right) + C_2} Y_{P/X} + \frac{C_1 + C_2S + \frac{g_x}{2}\left(\frac{P/O}{2}\right)}{2\left(\frac{P/O}{2}\right) + C_2}$$

Como puede verse en la ecuación anterior, al graficar  $y_{S/X}$  versus  $y_{P/X}$  sería esperable obtener una recta, de la cual su pendiente sería P/O y la ordenada al origen  $C_1$ . Sin embargo, con los datos disponibles de los cultivos continuos, los puntos no ajustan a una recta. Esto puede deberse a la gran dispersión provocada por los  $y_{P/X}$  tan pequeños. Es evidente que *G. klebahnii* acopla catabolismo con anabolismo ya que queda glucosa sin consumir. La dinámica que impone el cultivo continuo impide que se acumule etanol.

La alternativa para resolver este problema fue el uso de un sistema en batch.

### Análisis del Modelo A en cultivo Batch

Para resolver este sistema, y poder estimar los valores de  $v_1$  a  $v_4$ , una vez obtenidos los valores de las diferentes velocidades específicas, se recurrió al cálculo matricial. Para ello debe definirse primero la matriz estequiométrica de tantas filas como componentes haya y tantas columnas como reacciones presente el modelo. Se completan las filas con todos los coeficientes estequiométricos (incluidos los nulos) para cada componente. En el ejemplo considerado la matriz A resulta ser:

$$A = \begin{matrix} & v_1 & v_2 & v_3 & v_4 & \\ \left( \begin{array}{cccc} -\delta & -1 & -1 & 0 \\ -C_1 & \frac{2}{3} & \frac{1}{3} & \frac{P/O}{2} \\ h_1 & h_2 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ \delta-1+\frac{0.17}{2} & 1 & \frac{1}{3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\frac{1}{3} \\ 0 & 0 & \frac{2}{3} & 0 \end{array} \right) & \begin{array}{l} S \\ ATP \\ NADH \\ X \\ CO_2 \\ O_2 \\ P(EtOH) \end{array} \end{matrix}$$

Si se define el vector de los flujos (V) y el vector de las velocidades (Q) como:

$$V = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \end{pmatrix} \quad Q = \begin{pmatrix} q_S \\ q_{ATP} \\ q_{NADH} \\ \mathbf{m} \\ q_{CO_2} \\ q_{O_2} \\ q_P \end{pmatrix}$$

Por lo que el sistema de ecuaciones (a) puede ser expresado como  $A \cdot V = Q$

Dado que hay más balances que incógnitas se pueden estimar los valores de los flujos por un mecanismo de cuadrados mínimos, dando de este modo valores más confiables (debido a que se utilizan todos los valores experimentales y no sólo algunos). Debido a que existen 4 incógnitas (de  $v_1$  a  $v_4$ ) y 7 ecuaciones, el número de grados de libertad es 3 (tomando en cuenta todos los balances). Como el balance de ATP resulta imposible utilizarlo bajo estas condiciones (no se conocen ni  $Y_{X/ATP}$  ni la relación P/O, los cuales sólo aparecen en esta ecuación), el número de grados de libertad del sistema pasa a ser de 2.

La solución del sistema por cuadrados mínimos está dada por  $V = A^\# \cdot Q$ , donde  $A^\#$  es la matriz pseudoinversa de A. Algebraicamente se define como  $A^\# = (A^T \cdot A)^{-1} \cdot A^T$  si A es de rango completo.

Cabe aclarar que como estas experiencias se realizaron en cultivos batch, las velocidades específicas de consumo de sustrato o producción de metabolitos se reemplazaron por cantidades totales consumidas o producidas en cada etapa. Sin embargo, el tratamiento matemático fue el mismo.

Los resultados experimentales fueron presentados con anterioridad en la tabla IV. Debido a que durante las dos etapas del cultivo se forma diferente cantidad de biomasa, se dificulta el análisis comparativo de los resultados. A fin de evitar este inconveniente, se normalizaron los experimentales a 1 carbono mol de biomasa. Dichos valores se muestran en la tabla VI.

Condición	$\Delta X$ cmol/L	$\Delta S$ cmol/L	CO <sub>2</sub> total mM	O <sub>2</sub> total mM	$\Delta P$ cmol/L
Sin limitación	1	-1.608	0.654	-0.665	0
Limitado en O <sub>2</sub>	1	-5.301	1.850	-0.615	2.434

**Tabla VI.** Consumo de sustrato y oxígeno, formación de dióxido de carbono, biomasa y etanol para *G.klebahnii* en cada una de las condiciones de crecimiento.

En la tabla VII se observan los valores hallados para las velocidades.

Condición	v <sub>1</sub>	v <sub>2</sub>	v <sub>3</sub>	v <sub>4</sub>
Sin limitación	1	0.533	-0.036	1.217
Limitado en O <sub>2</sub>	1	0.500	3.601	1.130

**Tabla VII.** Flujos obtenidos empleando el modelo bajo condiciones de con y sin limitación en O<sub>2</sub>.

Para validar el modelo metabólico empleado, se estiman los valores experimentales utilizando las velocidades obtenidas realizando  $A \cdot V = Q'$  ( $Q'$  es una matriz con valores estimados). Los datos obtenidos se muestran en la tabla VIII.

Condición	$\Delta X$ cmol/L	$\Delta S$ cmol/L	$\Delta CO_2$ mM	$\Delta O_2$ mM	$\Delta P$ cmol/L
Sin limitación	0.120	-0.192	0.086	-0.073	$-2.86 \times 10^{-3}$
Limitado en O <sub>2</sub>	0.138	-0.718	0.261	-0.078	0.331

**Tabla VIII.** Valores estimados de consumo de sustrato y oxígeno, formación de dióxido de carbono, biomasa y etanol para *G.klebahnii* en cada una de las condiciones de crecimiento.

Como puede verse los datos estimados son buenos presentando la mayor diferencia en el caso del consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono (errores del 7 y 8 % respectivamente). En el resto de las medidas los valores estimados y reales son muy próximos. Esta falla en los valores estimados de  $\Delta O_2$  y  $\Delta CO_2$  pudo ser causada por errores en la forma en como se estima la composición de la salida de gases del reactor causada por una mala calibración

de los equipos de medida o de los tubos de gases utilizados para dicha calibración. Sin embargo, los balances de carbono y grado de reducción indican que no hay errores groseros en las medidas. Realizando un estudio estadístico al modelo, se encuentra una suma de diferencia de cuadrados entre los valores reales y los estimados de  $1.207 \times 10^{-4}$  y  $1.197 \times 10^{-4}$  para las etapas sin y con limitación respectivamente.

### **Modelo Metabólico complejo (Modelo B)**

El modelo B propuesto para el crecimiento de *G. klebahnii* se realizó en base al conocimiento del metabolismo de eucariotes. Posee un grado de detalle superior al anterior lo cual permite realizar un estudio más exhaustivo del destino de la fuente de carbono y energía durante el crecimiento. Se basa en las siguientes suposiciones:

- *G. klebahnii* realiza glucólisis a través de la ruta EMP.
- Tal como ocurre en hongos <sup>26</sup> y en levaduras <sup>27, 28</sup>, no existe una transhidrogenasa que interconvierta NADH y NADPH.
- El paso de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato en el ciclo Krebs (en la mitocondria) está catalizado por una enzima NADH dependiente . Por lo que *G. klebahnii* no puede obtener NADPH a través de este paso como ocurre en bacterias.
- El NADPH se obtiene a partir de la ruta de las pentosas fosfato (PP) o a partir de una isocitrato deshidrogenasa citoplasmática que requiere del transporte de isocitrato del espacio mitocondrial al citoplasma.
- El NADH descargado en la cadena respiratoria tiene un valor de P/O máximo posible de 3, si es de origen mitocondrial, pero si es generado en el citoplasma su poder reductor debe ser transportado al interior de la mitocondria por el sistema de lanzadera de glicerol fosfato. Este sistema oxida el NADH citosólico y genera FADH<sub>2</sub> en la membrana interna de las mitocondrias. Este

FADH<sub>2</sub> transfiere dos electrones al acarreador móvil de electrones, Q, el cual transporta entonces los electrones a la ubiquinol-citocromo c reductasa (Complejo III), lo cual significa que se forman 2 moléculas de ATP en lugar de tres<sup>29</sup>.

o *G. klebahnii* posee un coeficiente de mantenimiento celular (m<sub>s</sub>) de 0.0268 cmol . cmol<sup>-1</sup> . h<sup>-1</sup> <sup>5</sup>. Debido a que el valor es muy bajo, puede despreciarse la contribución del mantenimiento al consumo de ATP.

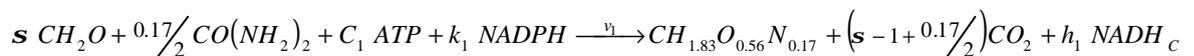
En base a estas condiciones el metabolismo puede dividirse en dos, por un lado la síntesis de biomasa a partir de la FCE, ATP, FN y NADP, y por otro lado, las reacciones catabólicas en las que *G. klebahnii* obtiene la energía, poder reductor y etanol.

Los componentes que se incluyen en el armado del modelo son: Glucosa (FCE), NADPH, biomasa, ATP, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, ácido pirúvico, etanol (P), FADH<sub>2</sub> y NADH (discriminando entre el producido en el citoplasma, NADH<sub>C</sub> y el producido en el espacio mitocondrial, NADH<sub>M</sub>).

El esquema metabólico utilizado se muestra en la figura III.

En base a dicho esquema, el metabolismo puede representarse mediante las siguientes ecuaciones:

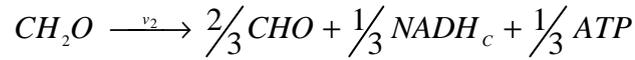
#### 1- Síntesis de biomasa



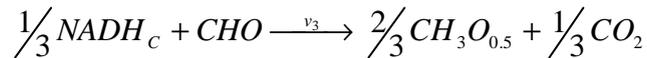
Donde, a diferencia del modelo anterior, k<sub>1</sub> es la cantidad de NADPH requerida para generar un carbono mol de biomasa. El resto de los coeficientes representan lo mismo explicado anteriormente.

Como no se conocen los valores de σ, h<sub>1</sub> y k<sub>1</sub> para *G. klebahnii* se recurren a los reportados por Bruinenberg y col.<sup>24</sup> para *S. cerevisiae* creciendo en un medio sintético con glucosa como FCE. Dichos valores son: 1,106 , 0,3374 y 0,2326 respectivamente.

- 2- Obtención de  $NADH_c$ , piruvato y ATP a través de la ruta EMP.



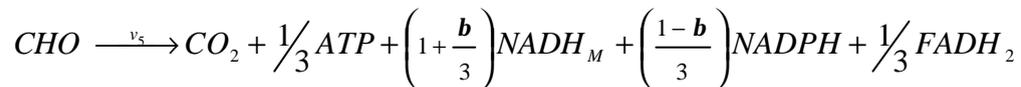
- 3- Reoxidación del  $NADH_c$  con formación de etanol (sólo ocurre en condiciones de limitación por oxígeno).



- 4- Obtención de NADPH a través de la ruta de PP (en su función oxidativa)

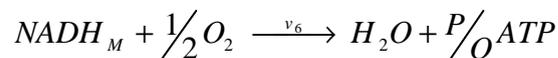


- 5- Ingreso del ácido pirúvico en el ciclo de Krebs con formación de  $NADH_M$ , NADPH,  $FADH_2$  y ATP.



El parámetro  $\beta$  se define como la proporción de NADPH que se forma en PP y la que se forma por reducción de isocitrato fuera de la mitocondria <sup>27</sup>. Si  $\beta$  vale 1, todo el NADPH se obtiene en PP, si vale 0 se obtiene en la ruta alternativa. Como por cada isocitrato que se reduce fuera de la mitocondria se produce un NADPH a expensas de un NADH que se hubiese formado en el ciclo de Krebs, la estequiometría de ambos metabolitos se ve afectada por  $\beta$ .

- 6- Reoxidación del poder reductor mitocondrial en la cadena de transporte de electrones con producción de ATP.



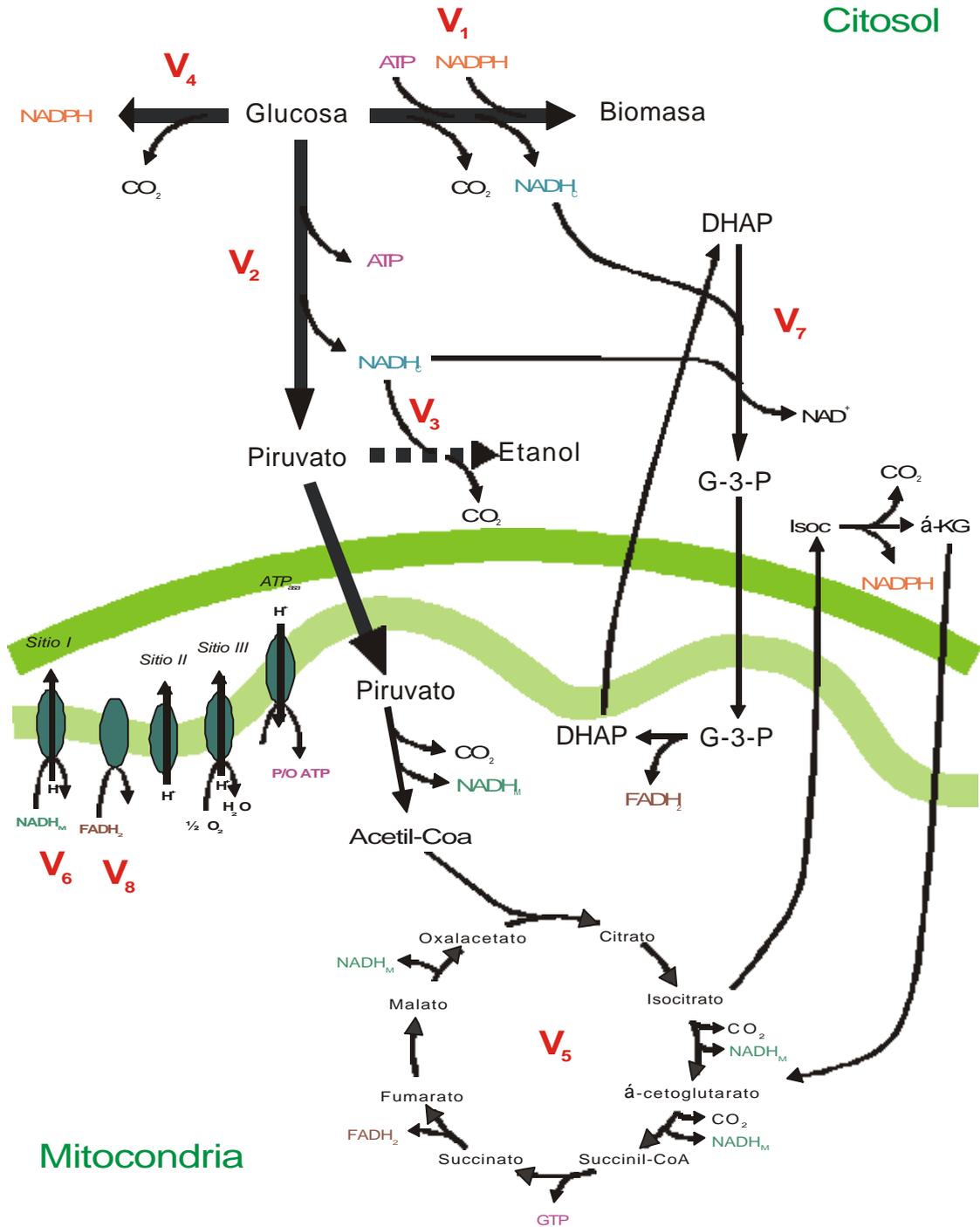
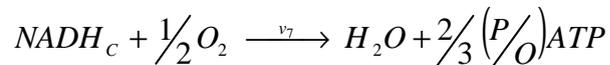
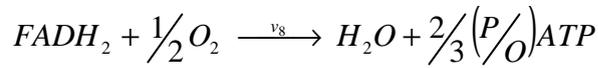


Figura IV. Esquema metabólico utilizado para el diseño del modelo complejo.  $V_1$  a  $V_8$  indican los flujos considerados.

7- Reoxidación del poder reductor citoplasmático en la cadena de transporte de electrones con producción de ATP.



8- Reoxidación del  $FADH_2$  en la cadena de transporte de electrones con producción de ATP.



Como fuera realizado anteriormente, se obtienen los balances de materia en función de las velocidades para cada uno de los componentes. Estos son:

$$\begin{aligned} -s \cdot v_1 - v_2 - v_4 &= q_S \\ -C_1 \cdot v_1 + \frac{1}{3} \cdot v_2 + \frac{1}{3} \cdot v_5 + \frac{P}{O} \cdot v_6 + \frac{2}{3} \frac{P}{O} \cdot v_7 + \frac{2}{3} \frac{P}{O} \cdot v_8 &= q_{ATP} \\ -k_1 \cdot v_1 + 2 \cdot v_4 + \left(\frac{1-b}{3}\right) \cdot v_5 &= q_{NADPH} \\ v_1 &= \mathbf{m} \\ \left(s - 1 + \frac{0,17}{2}\right) \cdot v_1 + \frac{1}{3} \cdot v_3 + v_4 + v_5 &= q_{CO_2} \\ h_1 \cdot v_1 + \frac{1}{3} \cdot v_2 - \frac{1}{3} \cdot v_3 - v_7 &= q_{NADH_c} \\ \left(1 + \frac{b}{3}\right) \cdot v_5 - v_6 &= q_{NADH_m} \\ v_2 - v_3 - v_5 &= q_{Pir} \\ \frac{2}{3} \cdot v_3 &= q_{PETOH} \\ -\frac{1}{2} \cdot v_6 - \frac{1}{2} \cdot v_7 - \frac{1}{2} \cdot v_8 &= q_{O_2} \\ \frac{1}{3} \cdot v_5 - v_8 &= q_{FADH_2} \end{aligned} \quad (b)$$

Las velocidades  $q_{NADH}$ ,  $q_{FADH_2}$ ,  $q_{NADPH}$ ,  $q_{Pir}$  y  $q_{ATP}$  son nulas ya que, por ser intermediarios, no se acumulan .

La matriz estequiométrica B, para el sistema de ecuaciones (b) se define como:

$$\begin{array}{l}
 S \\
 ATP \\
 NADPH \\
 Biomasa \\
 CO_2 \\
 NADH_C \\
 NADH_M \\
 Pir \\
 P(ETOH) \\
 O_2 \\
 FADH_2
 \end{array}
 \begin{pmatrix}
 v_1 & v_2 & v_3 & v_4 & v_5 & v_6 & v_7 & v_8 \\
 -s & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 -C_1 & \frac{1}{3} & 0 & 0 & \frac{1}{3} & \frac{P}{O} & \frac{2}{3} & \frac{P}{O} \\
 -k_1 & 0 & 0 & 2 & \left(\frac{1-b}{3}\right) & 0 & 0 & 0 \\
 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 s - 1 + \frac{0.17}{2} & 0 & \frac{1}{3} & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 \\
 h_1 & \frac{1}{3} & -\frac{1}{3} & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & \left(1 + \frac{b}{3}\right) & -1 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & \frac{2}{3} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -\frac{1}{2} & -\frac{1}{2} & -\frac{1}{2} \\
 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{1}{3} & 0 & 0 & -1
 \end{pmatrix}$$

El vector de los flujos (V) y el de las velocidades específicas (Q) están dados por:

$$V = \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \end{pmatrix} \qquad Q = \begin{pmatrix} q_s \\ q_{ATP} \\ q_{NADPH} \\ \mathbf{m} \\ q_{CO_2} \\ q_{NADH_C} \\ q_{NADH_M} \\ q_{Pir} \\ q_{P(ETOH)} \\ q_{O_2} \\ q_{FADH_2} \end{pmatrix}$$

Por lo que el sistema de ecuaciones (b) queda expresado como  $B \cdot V = Q$

La matriz B, tiene 3 grados de libertad al igual que la matriz A. Sin embargo, debido a que no se cuenta con los valores del  $y_{X/ATP}$  y de la relación P/O se deja de lado el balance de ATP, pasando a tener 2 grados de libertad.

La solución del sistema por cuadrados mínimos esta dada por  $V = B^\# \cdot Q$  (donde  $B^\#$  es la pseudoinversa de B)

## Análisis del Modelo B en cultivos Batch

Como fue mencionado con anterioridad las velocidades específicas se reemplazaron por cantidades globales consumidas o producidas en cada etapa.

Los resultados experimentales fueron presentados con anterioridad en la tabla IV. Debido a que durante las dos etapas del cultivo se forma diferente cantidad de biomasa, se dificulta el análisis comparativo de los resultados. A fin de evitar este inconveniente, se normalizaron los experimentales a 1 carbono mol de biomasa. Dichos valores se muestran en la tabla IX.

Condición	$\Delta X$ cmol/L	$\Delta S$ cmol/L	$\Delta CO_2$ mM	$\Delta O_2$ mM	$\Delta P$ cmol/L
Sin limitación	1	-1.608	0.654	-0.665	0
Limitado en $O_2$	1	-5.301	1.850	-0.615	2.434

**Tabla IX.** Valores de consumo de sustrato, consumo de  $O_2$ , formación de  $CO_2$  y formación de etanol normalizados a un carbono mol de biomasa.

Resolviendo el sistema de ecuaciones por cálculo matricial se obtienen los valores de los 8 flujos (8 velocidades) para cada una de las condiciones de crecimiento. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla X.

Condición	$v_1$	$v_2$	$v_3$	$v_4$	$v_5$	$v_6$	$v_7$	$v_8$
Sin limitación	1	0.399	-0.029	0.105	0.418	0.579	0.503	0.162
Limitado en $O_2$	1	4.011	3.611	0.108	0.378	0.520	0.488	0.143

**Tabla X.** Flujos del modelo metabólico complejo con y sin limitación en oxígeno

El valor esperado de  $v_3$  sin limitación es debería ser cero, el modelo arroja un valor muy próximo pero negativo. Debe tenerse en cuenta que el cálculo de los distintos  $v_i$  se hizo por cuadrados mínimos, no correspondiendo con el resultado exacto del sistema (de ahí que  $v_3$  tome valores negativos).

Para obtener estos resultados se consideró un valor de  $\beta$  igual a 1. Si el valor de  $\beta$  toma valores de 0.5 (el NADPH se forma en partes iguales por PP y la ruta alternativa antes citada), los resultados de los flujos a través de las diferentes velocidades no sufren mayores cambios a excepción de  $v_4$  la cual disminuye aproximadamente un 35 % ( $v_4$  varía de 0.105 a 0.067 sin limitación y de 0.108 a 0.074 en condiciones de limitación en  $O_2$ ). Este cambio es razonable ya que  $v_4$  está directamente relacionada a la producción de NADPH.

Si se utilizan las velocidades calculadas para estimar los valores experimentales (por medio del producto matricial  $B.V = Q$ ), resultan en valores muy próximos a los reales. Estos valores se presentan en la tabla XI. Esta proximidad en los datos demuestra que el modelo B es aceptable.

Condición	$\Delta X$ cmol/L	$\Delta S$ cmol/L	$\Delta CO_2$ mM	$\Delta O_2$ mM	$\Delta P$ cmol/L
Sin limitación	0.120	-0.193	0.084	-0.074	$-2.30 \times 10^{-3}$
Limitado en $O_2$	0.138	-0.719	0.259	-0.079	0.331

**Tabla XI.** Valores experimentales estimados calculados a partir de los flujos del modelo metabólico B.

Como puede observarse los errores entre las medidas experimentales y los valores estimados de dichas medidas utilizando el modelo B son muy pequeños (menores al 1%) a excepción del  $O_2$  que presenta un error del 7%. La suma de diferencia de cuadrados entre los valores estimados y los reales es un poco menor que para el modelo anterior ( $1.175 \times 10^{-4}$  y  $1.112 \times 10^{-4}$  sin y con limitación en  $O_2$  respectivamente) lo que demuestra que el modelo aproxima ligeramente mejor a la realidad.

Una vez comprobada la validez del modelo propuesto, puede continuarse con el análisis de los flujos metabólicos indicados en la tabla VIII. Allí se observa claramente que las velocidades de reacción sufren drásticos cambios cuando las condiciones de cultivo son variadas. Las posibles razones de los cambios producidos en estos flujos se detallan a continuación:

➤ El consumo de sustrato para la obtención de energía ( $v_2$ ) aumenta enormemente debido a la menor eficiencia de las rutas fermentativas.

➤ La velocidad de producción de etanol ( $v_3$ ) toma valores esperados bajo condiciones de con y sin limitación. Muy cercanos a cero sin limitación y en condiciones de limitación en oxígeno  $v_3$  se hace importante. Esto se debe a que el aumento en el consumo de sustrato bajo condiciones de limitación, incrementa la cantidad del  $\text{NADH}_c$  lo que conlleva a una mayor producción de etanol (para evitar que este intermediario se acumule durante el crecimiento).

➤ La obtención de NADPH en la ruta de las pentosas fosfato ( $v_4$ ) no sufre cambios en ambas condiciones. Esto se debe a que  $v_4$  está íntimamente relacionado con la producción de biomasa ( $v_1$ ), la cual no varía. En adición a esto, vale la pena recordar que se consideró  $\beta = 1$  por lo que PP es la única fuente de este poder reductor.

➤ El flujo a través del ciclo de Krebs ( $v_5$ ) y las velocidades de descarga del poder reductor mitocondrial en la cadena respiratoria ( $v_6$  y  $v_8$ ) en la fase limitada disminuyen a un 90 % del valor hallado en la etapa sin limitación. Esto se debe a que estos tres flujos están directamente relacionados con el consumo de oxígeno y por ende, a la transferencia en la fase gaseosa (los cuales se mantienen aproximadamente constantes).

➤ La velocidad de descarga de  $\text{NADH}_c$  en la cadena respiratoria ( $v_7$ ) no se ve alterado ya que el incremento en la producción de  $\text{NADH}_c$  debido al aumento de  $v_2$  se ve compensado por el aumento de  $v_3$ .

### **Análisis del Modelo B en cultivo continuo**

Del mismo modo a lo realizado en el cultivo batch anteriormente mencionado, se obtuvieron el valor de los flujos (normalizados a un cmol de biomasa) para cada D. Como el sistema empleado fue cultivo continuo se utilizaron para el cálculo las velocidades específicas presentadas en la tabla V.

D	v <sub>1</sub>	v <sub>2</sub>	v <sub>3</sub>	v <sub>4</sub>	v <sub>5</sub>	v <sub>6</sub>	v <sub>7</sub>	v <sub>8</sub>
0.370	1	0.414	0.077	0.111	0.328	0.447	0.460	0.120
0.331	1	0.454	0.082	0.111	0.362	0.494	0.473	0.132
0.305	1	0.398	0.044	0.11	0.356	0.488	0.468	0.132
0.256	1	0.541	0.073	0.115	0.452	0.605	0.496	0.153
0.246	1	0.442	0.032	0.115	0.410	0.55	0.477	0.140
0.241	1	0.495	0.054	0.114	0.421	0.566	0.489	0.145
0.235	1	0.541	0.069	0.113	0.443	0.598	0.501	0.154
0.196	1	0.497	0.028	0.114	0.455	0.612	0.498	0.156
0.195	1	0.430	9.13x10 <sup>-5</sup>	0.115	0.420	0.563	0.481	0.143

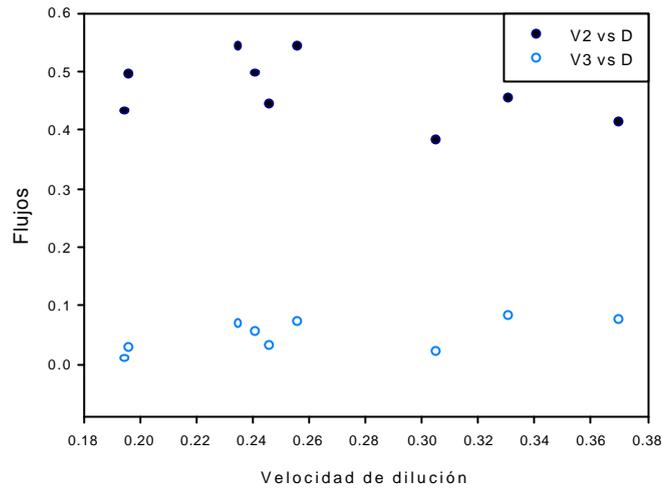
**Tabla XII.** Flujos del modelo B obtenidos para cada velocidad de dilución

Al analizar los flujos metabólicos obtenidos se observa claramente que las velocidades de reacción no sufren drásticos cambios cuando las condiciones de cultivo son variadas (al contrario de lo que ocurre en batch). Sin embargo, teniendo en cuenta que la escasa producción de etanol pueden elaborarse algunas conclusiones interesantes:

➤ v<sub>4</sub> se mantiene aproximadamente constante, como es de esperarse debido a que la cantidad de biomasa se mantiene constante.

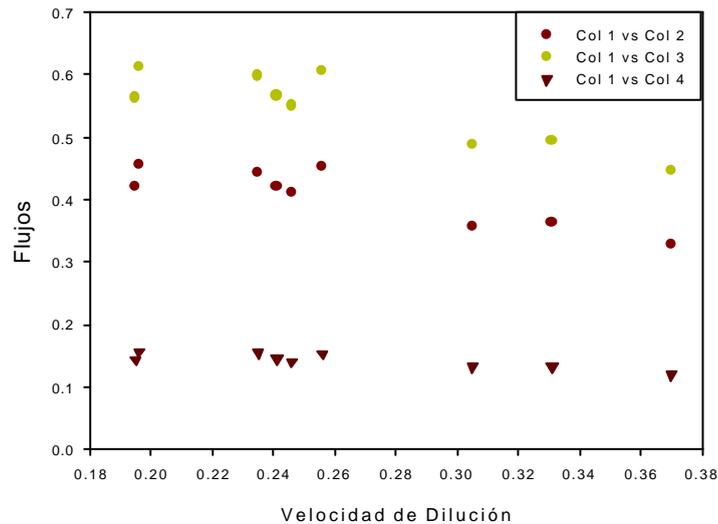
➤ Se observa que *Geotrichum klebahnii* acopla glucólisis y ciclo de Krebs. Tanto v<sub>2</sub> (glucólisis) como v<sub>5</sub> (ciclo de Krebs) aumentan en forma pareja con el aumento de D. En microorganismos como *S. cerevisiae*, en los que el metabolismo energético no es tan rígido, v<sub>2</sub> y v<sub>3</sub> aumentan notablemente con el aumento de D mientras que v<sub>5</sub> se mantiene prácticamente constante<sup>10</sup>.

➤ Si bien el flujo a través de glucólisis (v<sub>2</sub>) varía a lo largo del cultivo, se observa una curva similar, pero con variaciones menos pronunciadas, para el flujo derivado a la obtención de producto (v<sub>3</sub>). Esta correlación entre v<sub>2</sub> y v<sub>3</sub> puede verse en el grafico III. Esto es esperable, debido a que como v<sub>7</sub> se mantiene aproximadamente constante a lo largo del cultivo, por lo que un aumento o una disminución en el flujo a través de v<sub>2</sub> generara una mayor o menor cantidad de NADH<sub>c</sub>, el cual será utilizado en la formación de etanol (a través de v<sub>3</sub>).



**Gráfico III.** Flujo de consumo de sustrato para obtener energía y flujo para obtener etanol, a cada D.

➤ Los flujos  $v_5$ ,  $v_6$  y  $v_8$  (ciclo de Krebs y descarga del poder reductor mitocondrial en la cadena respiratoria) muestran curvas de comportamiento similar, como consecuencia de que dichos flujos están íntimamente relacionados (Gráfico IV). Además se observa que los flujos obtenidos para  $v_6$  son un cuarto de los obtenidos para  $v_8$ . Esto es lógico, debido a que la cantidad de  $\text{NADH}_m$  obtenido en Krebs es 4 veces mayor a la cantidad de FADH producida en esa ruta.



**Gráfico IV.** Flujos a través del ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones a distintos D.

➤ El comportamiento de  $v_3$  con respecto a D es inverso al de  $v_5$ ,  $v_6$  y  $v_8$  indicando que, a mayor limitación por  $O_2$  es mayor la fracción de energía que se obtiene por fermentación en relación a la obtenida por respiración.

### **Cálculo del $y_{x/ATP}$ y la relación P/O**

Para calcular el valor de  $y_{x/ATP}$  y la relación P/O se utiliza el balance de ATP del sistema de ecuaciones b.

$$-C_1 \cdot v_1 + \frac{1}{3} \cdot v_2 + \frac{1}{3} \cdot v_5 + \frac{P}{O} \cdot v_6 + \frac{2}{3} \frac{P}{O} \cdot v_7 + \frac{2}{3} \frac{P}{O} \cdot v_8 = q_{ATP}$$

reordenando la ecuación, considerando que  $q_{ATP}$  es cero, se obtiene:

$$-\frac{1}{y_{x/ATP}} \cdot v_1 + \frac{P}{O} \cdot (v_6 + \frac{2}{3} \cdot v_7 + \frac{2}{3} \cdot v_8) = -\frac{1}{3} \cdot v_2 - \frac{1}{3} \cdot v_5$$

El sistema en este caso puede ser resuelto a partir de los datos en dos condiciones tales que las ecuaciones obtenidas no sean combinación lineal una de la otra. Para evitar este inconveniente es que se diseñan los cultivos de tal forma que en algunas de las condiciones se genere etanol y en otras no (a través de la limitación por  $O_2$ ).

Si se dispone de más de dos condiciones, como ocurre en los cultivos continuos, el sistema se resuelve por cuadrados mínimos, obteniendo en ese caso estimados de  $y_{x/ATP}$  y P/O con el respaldo estadístico dado por la utilización de todos los datos.

A pesar de la validez del modelo B presentado, cuando se intentó calcular  $C_1$  y la relación P/O, independientemente a si se utilizaron los datos de batch o continuo, se obtuvieron valores de  $y_{x/ATP}$  y de P/O completamente alejados de la realidad, bien valores mayores que el máximo teórico (1.2  $cmol_x/mol_{ATP}$  para  $y_{x/ATP}$  o mayores a 3 para P/O), bien valores negativos.

Esta falla en el modelo metabólico complejo pudo deberse a la presencia de algún producto no tenido en cuenta cuya concentración no sea lo suficientemente alta como para afectar los balances de materia en forma muy marcada, pero que altere en cierto grado la matriz estequiométrica del modelo presentado (modelo B).

Sin embargo, seleccionando juegos de datos en cultivo continuo tales que uno de ellos posea mayor generación de etanol que el otro, pudo obtenerse un resultado que se acomoda bien a los valores esperados.

En las tabla XIII y XIV se muestran los valores de las variables de cultivo y las velocidades obtenidas para los estados estacionarios utilizados para el cálculo.

Biomasa g/l	$\mu(h^{-1})$	qS	qP	qO2	qCO2	$y_{x/s}$	$y_{p/s}$	b	$y_{co_2/s}$	BC	BGR
4.037	0.256	0.462	0.0091	0.164	0.198	0.554	0.0197	0.355	0.429	1.003	0.966
5.06	0.196	0.342	0.0021	0.127	0.148	0.572	0.0063	0.372	0.432	1.010	0.982

velocidades en  $cmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$  y rendimientos en  $cmol \cdot cmol^{-1}$

**Tabla XIII:** Estados estacionarios seleccionados para el cálculo de  $y_{x/ATP}$  y P/O.

D	v <sub>1</sub>	v <sub>2</sub>	v <sub>3</sub>	v <sub>4</sub>	v <sub>5</sub>	v <sub>6</sub>	v <sub>7</sub>	v <sub>8</sub>
0.256	1	0.541	0.073	0.115	0.452	0.605	0.496	0.153
0.196	1	0.497	0.028	0.114	0.455	0.612	0.498	0.156

**Tabla XIII:** Flujos utilizados para el cálculo de  $y_{x/ATP}$  y P/O.

Los valores obtenidos en estas condiciones son:

$$y_{x/ATP} = 0.629 \frac{cmol_x}{mol_{ATP}}$$

$$P/O = 1.214 \frac{mol_{ATP}}{Atg_{O_2}}$$

No se encuentran en literatura valores metabólicos para el genero pero, dado que se comporta fisiológicamente como una levadura, se compararon los valores calculados con datos de *Sacharomyces cerevisiae* creciendo en medio mínimo

con glucosa como FCE. Decker y col<sup>11</sup> reportan valores de  $y_{X/ATP}$  y P/O de 0.567 y 0.92 respectivamente. Puede verse que los valores hallados son del orden, aunque ligeramente mayores a los de levadura.

Si bien estos datos no poseen el respaldo estadístico adecuado, indican que la metodología empleada es buena permitiendo determinar un posible valor de los parámetros fisiológicos buscados. Debido a la rigidez que presenta *G. klebahnii* desde el punto de vista metabólico junto con la dinámica del sistema empleado (cultivo continuo) no permiten que se acumule gran cantidad de etanol, lo que dificulta obtener un mayor número de datos confiables.

Introduciendo los valores de  $y_{X/ATP}$  y de P/O en el balance de ATP, puede calcularse cuál es la proporción de ATP que se genera a través de la fosforilación a nivel de sustrato (FNS)

$$qATP_{(FNS)} = \frac{1}{3} \cdot v_2 + \frac{1}{3} \cdot v_5$$

y cuál a través de la fosforilación oxidativa (FO).

$$qATP_{(FO)} = \frac{P}{O} \cdot v_6 + \frac{2}{3} \frac{P}{O} \cdot v_7 + \frac{2}{3} \frac{P}{O} \cdot v_8$$

Los valores obtenidos (en porcentaje del total) se indican en la tabla XIV.

D (h <sup>-1</sup> )	% ATP <sub>(FNS)</sub>	% ATP <sub>(FO)</sub>
0,370	19,64	80,36
0,331	19,98	80,02
0,305	18,91	81,09
0,256	20,81	79,19
0,246	19,57	80,43
0,241	20,28	79,72
0,235	20,71	79,29
0,196	19,96	80,04
0,195	19,25	80,75

**Tabla XIV:** proporciones de ATP generados por fosforilación a nivel de sustrato y por fosforilación oxidativa.

Se observa que las proporciones se mantienen constantes durante todo el rango de velocidades de dilución. De esta forma se observa mas claramente rigidez del metabolismo de *G. klebahnii*.

## Conclusiones

- El modelo metabólico propuesto en este trabajo para el crecimiento de *G. klebahnii* se aproxima bien a la realidad a pesar de ser conceptualmente muy sencillo.
- El metabolismo de *G. klebahnii* posee un fuerte acoplamiento entre glucólisis y ciclo de Krebs.
- En cultivo continuo, la fosforilación a nivel de sustrato aporta un 20 % del ATP generado independientemente de la velocidad de crecimiento.
- Los valores encontrados para  $y_{X/ATP}$  y P/O son del orden de los hallados para levaduras y demuestran que *G. klebahnii* es altamente eficiente para crecer en medios mínimos.
- Si bien en las condiciones de trabajo no permite realizar un análisis estadístico que refuerce los valores hallados, el método de análisis de flujos metabólicos demuestra una versatilidad enormemente superior a los modelos clásicos de caja negra.

## Referencia bibliográfica

1. **Hoog, G. S., M. T. Smith, and E. Guého.** 1986. A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. Academy of Sciences and Letters, Baarn.
2. **Von Arx, J. A.** 1977. Notes on dipodascus, Endomyces and Geotricum with the description of two new species. *Antonie van Leeuwenhoek* **43**:333-340.
3. **Sutton, D. A., A. W. Fothergill, and M. Rinaldi.** 1988. Guide to Clinically Significant Fungi. Baltimore.
4. **Larone.D.H.** 1995. Medically Important Fungi - A guide to Identification. Washington D.C.
5. **Cavalitto, S. F.** 2003. Crecimiento de *Geotrichum klebahnii* y expresión de protopectinasa SE. Tesis doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
6. **Roels, J. A.** 1983. Energetics and kinetics in biotechnology. Amsterdam
7. **Babel, W. and R. H. Müller.** 1985. Correlation between cell composition and carbon conversion efficiency in microbial growth: a theoretical study. *Appl Microbiol. Biotechnol* **22**:201-207.
8. **Erickson, L. E., I. G. Minkevich, and V. K. Eroshin.** 1978. Application of máss and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **20**:1595-1621.
9. **Pirt, S. J.** 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Oxford.
10. **Atkinson, B. and F. Mavituna.** 1991. Biochemical engineering and biotechnology handbook.
11. **Dekkers JG, E. de Kok H and Roels JA.** Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 426: Comparison of Anaerobic and Aerobic Glucose Limitation. *Biotechnology and Bioengineering* **23**: 1023-1035.
12. **Sakai, T. and M. Okushima.** 1982. Purification and crystallization of protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agriculture, Biology and Chemistry* **46**:667-676.
13. **Cavalitto SF, Hours RA and Mignone CF.** 2000. Growth and protopectinase production of *Geotrichum klebahnii* in batch and continuous cultures with synthetic media. *Journal of Microbiology & Biotechnology* **25**: 260-265.
14. **García-Garibay, M., L. Gomez-Ruiz, and E. Bárzana.** 1987. Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotech. Lett.* **9**:411-416.
15. **Bergmeyer, H. U. and E. Bernt.** 1977. Methods of enzymatic analysis. Academic press, New York.

16. **Kohn-Abrest, E.** *Précis de toxicologie*. Ed: G. Doin y Cie. Paris 1955
17. **Imai Y, Takei H and Matsumura M.** A simple Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> Feeding Method for K<sub>L</sub>a Measurement in Large-Scale Fermentors. *Biotechnology and Bioengineering* **24**: 982-993.
18. **Fiechter, A., O. Käppeli, and F. Meussdoerffer.** 1987. Batch and continuous culture, p. 99-130. In A. H. Rose and J. S. Harrison (eds.), *The yeast*. London.
19. **Pastore, G. M., H. H. Sato, and T. Yang.** 1994. Production of fruity aroma by newly isolated yeast. *Biotech. Lett.* **16**:389-392.
20. **Stephanopoulos, G., A. Aristidou, and J. Nielsen.** 1998. *Metabolic Engineering. Principles and Methodologies*.
21. **Herwig C. and Von Stockar, U.** 2002. A small metabolic flux model to identify transient metabolic regulations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **24**: 395-403.
22. **Van Urk H., Voll L.Scheffers, A. Van Dijken J.P.** 1990. Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeast. *Applied and Environmental Microbiology.* **56**: (5) - 281 - 287.
23. **Stephanopoulos, G, Vallino, J.J.** (1991). Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science.* **252**: 1675-1681.
24. **Bruinenberg P. M., Van Dijken J. and Scheffers W. A.** 1983. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeast. *Journal of General Microbiology* **129**: 953-964
25. **Ergon, RG.** 1963. Rate limiting effects of pyridine nucleotides on carbohydrate catabolic pathways in microorganisms. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* **12**:274-279.
26. **Lagunas R nd Gancedo JM.** 1973. Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **37**: 90-94.
27. **Bruinenberg P. M., Van Dijken J., Jonker R. and Scheffers W. A.** 1985. Utilization of formate as an additional energy source by glucose limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066. Evidence for the absence of transhydrogenase activity in yeast. *Archives of Microbiology* **142**:302-306.
29. **Watson K.** 1976. *Biotechnology and Bioengineering* **25**:2177-2208.