

## BALANCES EN PROCESOS DE FERMENTACION: ANALISIS DE CONSISTENCIA Y DE FLUJOS METABOLICOS

### FERMENTATION PROCESS BALANCES: CONSISTENCY AND METABOLIC FLUX ANALYSIS

O. Soto-Cruz \* y J. Páez-Lerma

*Departamento de Ingenierías Químicas y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Durango Blvd. Felipe Pescador 1830 Ote. Col. Nueva Vizcaya, 34080, Durango, Dgo. México*

Recibido 22 Junio 2004; Aceptado 14 Marzo 2005

#### Resumen

Los balances estequiométricos en procesos de fermentación son esenciales para su entendimiento y/o aplicación. El cálculo de flujos metabólicos resulta fundamental en estudios cuantitativos de fisiología celular. Una poderosa herramienta para la determinación de los flujos en la red de reacciones bioquímicas es el análisis de flujos metabólicos, en el cual los flujos intracelulares son calculados usando un modelo estequiométrico que describe la bioquímica del microorganismo. El análisis de flujos metabólicos es particularmente útil en conexión con estudios de producción de metabolitos, donde el objetivo es dirigir tanto carbono como sea posible desde un sustrato hacia un producto metabólico, además de permitir el cálculo de flujos extracelulares no medidos y rendimientos teóricos máximos, identificación de vías metabólicas alternas y puntos ramificados de control metabólico. En este trabajo se presenta una revisión de las metodologías de análisis de consistencia y análisis de flujos metabólicos y su aplicación a sistemas de fermentación.

*Palabras clave:* balances elementales, metabolismo, modelo estequiométrico.

#### Abstract

Stoichiometric balances in fermentation processes are essential for their understanding and/or application. The calculation of metabolic flows is fundamental in quantitative studies of cellular physiology. Metabolic flux analysis is a powerful tool for the determination of the flows in the network of biochemical reactions. Intracellular fluxes are calculated using a stoichiometric model that describes the biochemistry of the microorganism. Metabolic flux analysis is particularly useful in connection with studies of metabolite production, where the objective is to direct as much carbon as it is possible from a substrate towards a metabolic product, besides to allow the calculation of non-measured extracellular fluxes and maximum theoretical yields, identification of alternating metabolic pathways and branched nodes of metabolic control. This work presents a revision of methodologies of consistency and metabolic flux analysis and their application to fermentation systems.

*Keywords:* elemental balances, metabolism, stoichiometric model.

#### 1. Introducción

Los procesos de fermentación, son caracterizados por el crecimiento de una población de microorganismos, que degradan un sustrato, formando algún(os) producto(s) de fermentación, por lo que los balances del proceso son esenciales para su entendimiento y/o aplicación. El cálculo de flujos metabólicos es una herramienta de la ingeniería metabólica y una determinación fundamental en estudios cuantitativos de fisiología celular, ya que permite organizar el

conocimiento metabólico de un microorganismo en una red de reacciones bioquímicas y provee una medida del grado de ajuste entre varias vías metabólicas (Varma y Palsson, 1994; Stephanopoulos y col., 1998; Nielsen, 2001). El grado de ajuste entre vías metabólicas se entiende como la producción de intermediarios en unas y el consumo de los mismos en otras, por ejemplo, cuando las condiciones ambientales cambian los flujos metabólicos son redistribuidos de manera que se mantenga el

\*Autor para la correspondencia: E-mail: [soto@itdurango.edu.mx](mailto:soto@itdurango.edu.mx)  
Tel/Fax: (61) 88186936

balance de óxido-reducción en la célula (Varma y Palsson, 1994; Torres y Voit, 2002). Una poderosa herramienta para la determinación de los flujos en la red de reacciones bioquímicas es el análisis de flujos metabólicos (AFM), en el cual los flujos intracelulares son calculados usando un modelo estequiométrico que describe la bioquímica del microorganismo (Jørgensen y col., 1995; Nissen y col., 1997; Stephanopoulos y col., 1998). Sin embargo, ya que el análisis cuantitativo del metabolismo requiere datos experimentales, es importante que la consistencia de los datos sea confirmada, antes de utilizarlos en la determinación de flujos metabólicos (Stephanopoulos y col., 1998).

El AFM puede considerarse como un campo de importancia fundamental y práctica, que puede proporcionar contribuciones básicas, en la medición y entendimiento del control de flujos in vivo, que lleva a cabo la célula (Stephanopoulos y col., 1998; Nielsen, 2001). Esto es particularmente útil en conexión con estudios de producción de metabolitos, donde el objetivo es dirigir tanto carbono como sea posible desde un sustrato hacia un producto metabólico (Nissen y col., 1997). Por otra parte, el AFM es de gran utilidad para (Nissen y col., 1997; Stephanopoulos y col., 1998):

### 1.1 Calcular flujos extracelulares no medidos

En algunos casos, el modelo estequiométrico y los flujos extracelulares medidos permiten calcular, además de los flujos intracelulares, flujos extracelulares no medidos o incluso algunos que sí fueron medidos pero fueron intencionalmente omitidos en los cálculos. En éste último caso, el grado de concordancia entre los flujos medidos y las predicciones del modelo, pueden servir para validarlo.

### 1.2 Calcular rendimientos teóricos máximos

Con base en el modelo estequiométrico y la especificación de algunas restricciones en el metabolismo, es posible calcular el rendimiento teórico máximo para un metabolito (van Gulik y Heijnen, 1995). Por ejemplo, Jørgensen y col. (1995) calcularon el rendimiento teórico máximo de penicilina a partir de glucosa para *Penicillium chrysogenum* en un medio complejo, bajo la suposición de ausencia de crecimiento, mientras que Causey y col., (2004) realizaron un estudio similar para la conversión de glucosa en piruvato por *Escherichia coli*.

### 1.3 Identificar vías alternativas

La formulación del modelo estequiométrico requiere de una información bioquímica detallada. Sin embargo, en muchos casos algunos detalles son desconocidos o puede no saberse si una vía determinada está activa bajo las condiciones de experimentación. Además, puede haber varias isoenzimas con funciones que no son conocidas en detalle. Calculando los flujos metabólicos con diferentes arreglos de vías bioquímicas, puede ser posible identificar cuál de los arreglos es el que más probablemente esté activo. Este uso del AFM fue ilustrado por Aiba y Matsuoka (1979), en el que se considera el primer trabajo de aplicación del AFM, donde se examinaron varias vías anapleróticas en la producción de ácido cítrico por *Candida lipolytica*. Por otra parte, Zhao y col. (2004) estudiaron los cambios en el metabolismo central de *E. coli* por cambios genéticos en la vía de las pentosas fosfato.

### 1.4 Identificación de puntos ramificados de control metabólico (rigidez de nodos)

Mediante la comparación de la distribución de flujos bajo diferentes condiciones de operación es posible identificar si un nodo es flexible o rígido.

En un nodo flexible las proporciones de los flujos en las diferentes ramas se ajustan de acuerdo a las condiciones de cultivo, mientras que en un nodo rígido las proporciones son constantes independientemente de las condiciones de cultivo (Stephanopoulos y Vallino, 1991). Por ejemplo, en la producción de lisina por *Corynebacterium glutamicum*, se determinó que los nodos de glucosa-6-fosfato, piruvato y oxalacetato son flexibles, mientras que el nodo de fosfoenolpiruvato es rígido (Vallino y Stephanopoulos, 1993; Tryfona y Bustard, 2005). En este trabajo se presenta una revisión de las metodologías de análisis de consistencia y análisis de flujos metabólicos y su aplicación a sistemas de fermentación. En lo subsiguiente, como caso de estudio, se utilizan los sistemas lineales derivados del proceso de fermentación estudiado por Soto-Cruz (2002), en el que se realizó cultivo continuo de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*. Las reacciones metabólicas consideradas se presentan en la Fig. 1 y se detallan en la Tabla 2. Pueden distinguirse tres tipos de compuestos. Sustratos, como el L-lactato, productos como biomasa, acetato y CO<sub>2</sub> y; compuestos intermediarios, como Acetil CoA, ATP y Eritrosa4P. El ATP proviene de la fosforilación del ADP, el cual se omite por simplicidad, en este tipo de estudios. Así mismo, debe señalarse que cuantificación de los flujos metabólicos no toma en cuenta la regulación metabólica, lo que es tema del análisis de control metabólico. La comparación de los mapas de flujos metabólicos, obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo o utilizando diferentes cepas, permiten determinar el impacto de perturbaciones genéticas o ambientales (Stephanopoulos y col., 1998; Torres y Voit, 2002).

## 2. Análisis de consistencia de datos experimentales

El análisis de consistencia de datos experimentales puede realizarse aplicando la

*redundancia de datos*. Esta se introduce cuando se emplean sensores múltiples para medir la misma variable, o cuando las mediciones obtenidas guardan ciertas restricciones, tales como cumplir con balances elementales (Nielsen y Villadsen, 1994). La redundancia de datos también puede ser usada para la identificación sistemática de fuentes de errores gruesos en las mediciones (van der Heijden, y col., 1994b; Stephanopoulos y col., 1998). Para que el análisis de consistencia pueda funcionar, los datos experimentales que se empleen deben tener las siguientes características (Stephanopoulos y col., 1998):

a) Completos. Se deben medir todos los sustratos y productos presentes en cantidades significativas, lo que implica el uso de medios químicamente definidos. Cuando se utilizan medios complejos, los balances elementales no se cumplen si se considera el metabolismo en su conjunto (catabolismo y anabolismo), por lo cual el estudio se restringe generalmente al catabolismo sin considerar el crecimiento de la biomasa.

b) Libres de ruido (tanto como sea posible). Ya que las tasas de reacción son derivadas de las mediciones de concentración, el ruido en tales mediciones introduce incertidumbre en las variables derivadas.

En el modelo de caja negra todas las reacciones celulares son agrupadas en una sola reacción y el método básicamente consiste en la validación de balances elementales, considerando a la biomasa como una caja negra que intercambia materiales con el medio. Los flujos de entrada y salida de la caja negra son, por una parte, las tasas específicas de consumo de sustrato (elementos del vector  $r_s$ ) y, por otra parte, las tasas específicas de formación de producto (elementos del vector  $r_p$ ). Además existe acumulación de biomasa dentro de la caja, la cual es representada como un flujo de salida con tasa específica  $\mu$ .

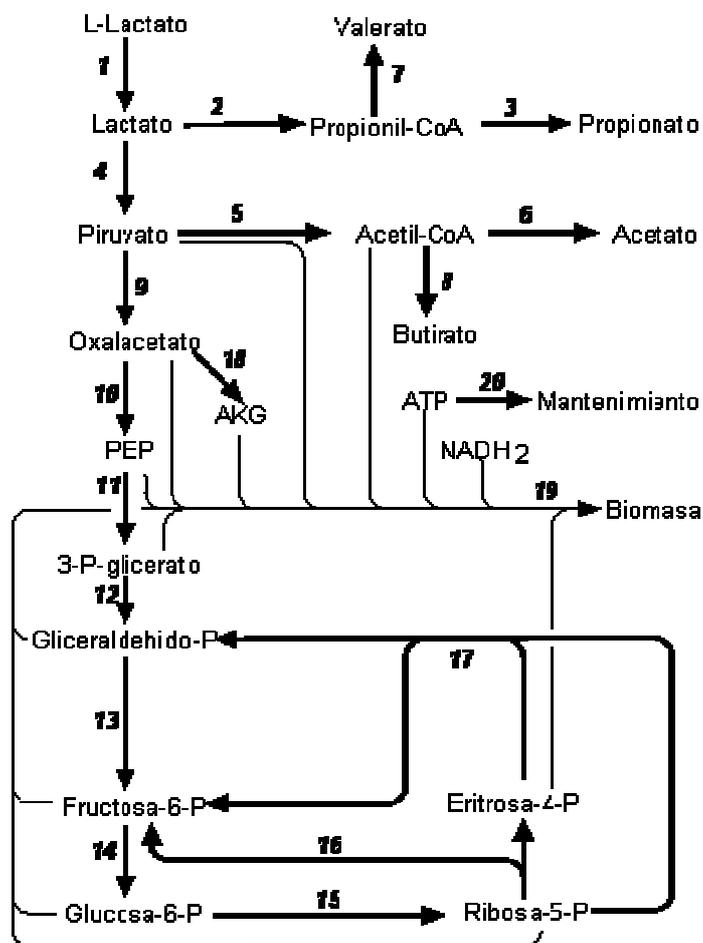


Fig. 1. Red metabólica considerada para el caso de estudio.

Tabla 1. Valores de la distribución  $\chi^2$  hasta cinco grados de libertad (Tomada de Stephanopoulos y col., 1998).

Grados de libertad	Nivel de confianza					
	0.500	0.750	0.900	0.950	0.975	0.990
1	0.46	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63
2	1.39	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21
3	2.37	4.11	6.25	7.81	9.35	11.30
4	3.36	5.39	7.78	9.49	11.10	13.30
5	4.35	6.63	9.24	11.10	12.80	15.10

Ya que todas las reacciones celulares están agrupadas en una sola reacción, los coeficientes estequiométricos de esta reacción global están dados por los coeficientes de rendimiento con respecto a la biomasa. La reacción global es:

$$X + \sum_{i=1}^M Y_{XP_i} P_i - \sum_{i=1}^N Y_{SP_i} S_i = 0 \quad (1)$$

Dónde:

$X$  = Biomasa

$Y_{XP_i} = \frac{r_{P_i}}{r_X}$  = Coeficiente de rendimiento del producto  $i$  con respecto a la biomasa.

$P_i$  = Producto  $i$

$Y_{SP_i} = \frac{r_{S_i}}{r_X}$  = Coeficiente de rendimiento del sustrato  $j$  con respecto a la biomasa.

$S_i$  = Sustrato  $i$

Como el coeficiente estequiométrico de la biomasa es uno, la tasa de reacción está dada por la tasa específica de crecimiento de la biomasa, la cual, junto con los coeficientes de rendimiento especifican completamente el sistema. En la aplicación del modelo de caja negra para el análisis de consistencia, se puede utilizar cualquiera de los siguientes conjuntos de datos (Stephanopoulos y col., 1998):

1. Un conjunto de coeficientes de rendimiento como los que aparecen en la reacción global, junto con la tasa específica de crecimiento.

2. Un conjunto de coeficientes de rendimiento con respecto a otra referencia (por ejemplo un sustrato), junto con la tasa específica de consumo/formación de ese compuesto de referencia.

3. Un conjunto de tasas específicas de todos los sustratos y productos, incluida la biomasa.

4. Un conjunto de tasas volumétricas de todos los sustratos y productos, incluida la biomasa.

Cualquiera de los arreglos anteriores proporciona los mismos resultados. Lo más usual es utilizar coeficientes de rendimiento expresados con respecto a uno de los sustratos, usualmente la fuente de carbono. Antes de presentar los balances elementales, es conveniente introducir la expresión de las fórmulas elementales de los compuestos involucrados, normalizados con respecto a su contenido de carbono. Por ejemplo, la fórmula elemental de la glucosa, que es  $C_6H_{12}O_6$ , se expresa como  $CH_2O$  en base a un átomo de carbono. Así, el balance de carbono, en base C-mol y considerando un solo sustrato, es expresado como:

$$\sum_{i=1}^M Y_{SP_i} + Y_{SX} + Y_{SC} = 1 \quad (2)$$

Dónde:

$Y_{SP_i} = \frac{r_{P_i}}{r_S}$  = Coeficiente de rendimiento del producto  $i$  con respecto al sustrato.

$Y_{SX} = \frac{r_X}{r_S}$  = Coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto al sustrato.

$Y_{SC} = \frac{r_{CO_2}}{r_S}$  = Coeficiente de rendimiento del  $CO_2$  con respecto al sustrato.

En la Ec. 2 los coeficientes de rendimiento tienen unidades de C-mol por cada C-mol de sustrato. El  $CO_2$  se considera separado de los demás productos, ya que no contribuye al balance generalizado de grado de reducción:

$$\sum_{i=1}^M Y_{SP_i} \gamma_{P_i} + Y_{SX} \gamma_X = \gamma_S \quad (3)$$

Dónde:

$\gamma_S$  = grado de reducción del sustrato

$\gamma_{P_i}$  = grado de reducción del producto  $i$

$\gamma_X$  = grado de reducción de la biomasa

Este balance fue introducido por Roels (1983), como una generalización del trabajo de Erickson y *col.* (1978), quienes definieron el grado de reducción de un compuesto como el número de electrones disponible para transferirse al oxígeno en la combustión del compuesto. En el balance generalizado de grado de reducción, el grado de reducción de un compuesto es un factor de cálculo que se elige por conveniencia, de manera arbitraria, de modo que los coeficientes estequiométricos para el dióxido de carbono, el agua, la fuente de nitrógeno, la fuente de azufre y la fuente de fósforo, desaparezcan del balance generalizado de grado de reducción (Nielsen y Villadsen, 1994). Es decir, no hay una definición física del grado de reducción; éste es únicamente un factor de cálculo y el planteamiento de Erickson y *col.* (1978) es un caso particular. Para obtener el grado de reducción de un compuesto dado, se debe tomar en cuenta lo siguiente. En primer lugar, se elige al átomo de hidrógeno como la unidad de grado de reducción.

En seguida se selecciona un compuesto con grado de reducción cero para cada elemento: H<sub>2</sub>O para oxígeno, CO<sub>2</sub> para el carbono, NH<sub>3</sub> para el nitrógeno, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para el azufre y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para el fósforo. Estas dos elecciones permiten establecer que el grado de reducción de cada uno de los átomos involucrados es -2 para el oxígeno, 4 para el carbono, -3 para el nitrógeno, 6 para el azufre y 5 para el fósforo. Así, puede obtenerse el grado de reducción de los compuestos más comunes que intervienen en procesos

biológicos. De esta manera, las Ecs. 2 y 3 establecen que el carbono y el grado de reducción que se introduce a la caja negra, debe ser recuperado en los productos que salen de ella. Es importante mencionar que la composición elemental de la biomasa, normalizada con respecto a su contenido de carbono, que tiene la forma CH<sub>a</sub>O<sub>b</sub>N<sub>c</sub>, depende de su contenido macromolecular (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) y, por lo tanto, de las condiciones de cultivo. Sin embargo, excepto para situaciones extremas, es razonable usar la composición promedio (CH<sub>1.81</sub>O<sub>0.52</sub>N<sub>0.21</sub>, con un 6% p/p de cenizas), cuando la composición exacta de la biomasa no es conocida (Stephanopoulos y *col.*, 1998).

De una manera similar al balance de carbono que se presenta en la Ec. 2, pueden escribirse balances para los otros elementos que participan en la reacción expresada en la Ec. 1. Estos balances pueden ser convenientemente escritos colocando la composición elemental de la biomasa, sustratos y productos en las columnas de una matriz **E**, cuyos renglones representan a cada uno de los elementos involucrados. Para el caso de un proceso en el que, además de la biomasa, se tengan  $M$  productos y  $N$  sustratos, que incluyan  $I$  elementos (normalmente C, H, O y N) en su composición, se tendrá una matriz **E** de  $I$  renglones por  $M+N+1$  columnas. Este es un sistema con  $I$  restricciones (balances elementales que se deben cumplir) y  $M+N+1$  tasas de reacción ( $r$ ), el cual puede ser representado por:

$$\mathbf{E}r = \mathbf{0} \quad (4)$$

Los grados de libertad ( $F$ ) del sistema son  $F = M+N+1-I$ . Si se tienen exactamente  $F$  tasas de reacción medidas, es posible calcular las demás, pero no hay redundancias para validar la consistencia de los datos.

De manera que es recomendable planear la medición de más mediciones que los grados de libertad del sistema. En el caso de un sistema en el que se tenga un número mayor de mediciones experimentales, que de grados de libertad, el sistema se denomina sobredeterminado. En éste caso, la redundancia de las mediciones puede ser usada para:

- Calcular las tasas no medidas.
- Incrementar la exactitud de las mediciones disponibles.
- Identificar si existe una fuente de errores gruesos en las mediciones.

Para el caso de estudio, el análisis de los datos comienza planteando los balances elementales de C, H, O y N, lo cual se conoce como modelo de caja negra, considerando

todos los compuestos que intervienen en el proceso, expresados en base C-mol, y sus tasas netas de consumo/producción. Los balances se escriben como sigue.

Cada renglón de la matriz E contiene los coeficientes estequiométricos de un balance elemental (de arriba a abajo, C, H, O y N) y cada columna contiene los coeficientes de la fórmula, en base C-mol, de los compuestos que intervienen en el proceso (de izquierda a derecha, lactato, biomasa, acetato, propionato, butirato, valerato, NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O). Se tienen dos sustratos (lactato y NH<sub>3</sub>) y siete productos (biomasa, acetato, propionato, butirato, valerato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O), por lo tanto, los grados de libertad del sistema son:  $F = 2 + 7 - 4 = 5$ . De manera que se deben medir al menos cinco compuestos para que el sistema tenga solución única.

Balance de carbono:

$$r_{lactato} + r_{biomasa} + r_{acetato} + r_{propionato} + r_{butirato} + r_{valerato} + r_{CO_2} = 0 \quad (5)$$

Balance de hidrógeno:

$$2r_{lactato} + 1.81r_{biomasa} + 2r_{acetato} + 2r_{propionato} + 2r_{butirato} + 2r_{valerato} + 3r_{NH_3} + 2r_{H_2O} = 0 \quad (6)$$

Balance de oxígeno:

$$r_{lactato} + 0.52r_{biomasa} + r_{acetato} + 2/3r_{propionato} + 1/2r_{butirato} + 2/5r_{valerato} + 2r_{CO_2} + r_{H_2O} = 0 \quad (7)$$

Balance de nitrógeno:

$$0.21r_{biomasa} + r_{NH_3} = 0 \quad (8)$$

Estas cuatro Ecs. constituyen un sistema lineal similar a la Ec. 4, que en este caso se escribe:

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 2 & 1.81 & 2 & 2 & 2 & 2 & 3 & 0 & 2 \\ 1 & 0.52 & 1 & 2/3 & 1/2 & 2/5 & 0 & 2 & 1 \\ 0 & 0.21 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{Lactato} \\ r_{Biomasa} \\ r_{Acetato} \\ r_{Pr\ propionato} \\ r_{Butirato} \\ r_{Valerato} \\ r_{NH_3} \\ r_{CO_2} \\ r_{H_2O} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (9)$$

Ya que se midieron seis compuestos (lactato, biomasa, acetato, propionato, butirato y valerato), el sistema es sobredeterminado y puede validarse la calidad de los datos experimentales, calculándose el índice de consistencia en el modelo de caja negra,  $h$  (Stephanopoulos y *col.*, 1998), para lo cual se utiliza la

metodología que se detalla a continuación. La matriz y el vector del lado izquierdo de la Ec. 9 pueden verse como vectores de dos componentes que tienen como entradas a la matriz  $\mathbf{E}_m$  y  $\mathbf{E}_c$ , y los vectores  $\mathbf{r}_m$  y  $\mathbf{r}_c$ , respectivamente, como se muestra a continuación:

$$\left( \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 2 & 1.81 & 2 & 2 & 2 & 2 \\ 1 & 0.52 & 1 & 2/3 & 1/2 & 2/5 \\ 0 & 0.21 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 3 & 0 & 2 \\ 0 & 2 & 1 \\ 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \right) \begin{bmatrix} r_{Lactato} \\ r_{Biomasa} \\ r_{Acetato} \\ r_{Pr opionato} \\ r_{Butirato} \\ r_{Valerato} \\ r_{NH_3} \\ r_{CO_2} \\ r_{H_2O} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (10)$$

o bien:

$$(\mathbf{E}_m \quad \mathbf{E}_c) \begin{pmatrix} \mathbf{r}_m \\ \mathbf{r}_c \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (11)$$

De manera que al hacer la multiplicación de matrices del lado izquierdo de la Ec. 11, se obtiene:

$$\mathbf{E}_m \mathbf{r}_m + \mathbf{E}_c \mathbf{r}_c = \mathbf{0} \quad (12)$$

La matriz  $\mathbf{E}_m$  contiene los coeficientes de la composición elemental de los compuestos medidos y el vector  $\mathbf{r}_m$  contiene las tasas de consumo/producción de tales compuestos. Por su parte, la matriz  $\mathbf{E}_c$  contiene los coeficientes de la composición elemental de los compuestos no medidos, mientras que el vector  $\mathbf{r}_c$  contiene las tasas de consumo/producción de los compuestos no medidos. Como el sistema es sobredeterminado y la matriz  $\mathbf{E}_c$  no es

cuadrada, la solución del sistema está dada por la Ec. (Noble y Daniel, 1977):

$$\mathbf{r}_c = -(\mathbf{E}_c^T \mathbf{E}_c)^{-1} \mathbf{E}_c^T \mathbf{E}_m \mathbf{r}_m \quad (13)$$

Una vez calculadas las tasas de consumo/producción no medidas, puede validarse la consistencia global de las tasas medidas y calculadas. Para esto, se inserta la Ec. 13 en la Ec. 12, con lo que se obtiene:

$$\mathbf{R} \mathbf{r}_m = \mathbf{0} \quad (14)$$

donde  $\mathbf{R}$  es la matriz de redundancia (van der Heijden y *col.*, 1994a, van der Heijden y *col.*, 1994b) que está dada por:

$$\mathbf{R} = \mathbf{E}_m - \mathbf{E}_c (\mathbf{E}_c^T \mathbf{E}_c)^{-1} \mathbf{E}_c^T \mathbf{E}_m \quad (15)$$

El rango de  $\mathbf{R}$ , es decir, el número de vectores renglón linealmente independientes, está relacionado con las variables medidas y especifica el número de ecuaciones independientes que tienen que satisfacerse.

Las Ecs. linealmente dependientes se eliminan, quedando la matriz de redundancia reducida,  $\mathbf{R}_r$ , la cual constituye la base del análisis posterior. Como consecuencia del error experimental, la Ec. 14 no se cumple exactamente. Al eliminar los renglones linealmente dependientes y multiplicar  $\mathbf{R}_r$  por  $\mathbf{r}_m$ , debería obtenerse un vector cero. Sin embargo, debido al error experimental lo que se obtiene es un vector de residuos,  $\boldsymbol{\varepsilon}$ , dado por:

$$\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{R}_r \mathbf{r}_m \quad (16)$$

De manera que, si se dispone de estimaciones de los errores de medición, se puede suponer que el vector de error es normalmente distribuido, con media cero y matriz de varianza-covarianza  $\mathbf{F}$ . van der Heijden y col. (1994b) demostraron que los residuos de la ecuación 16 también son normalmente distribuidos, con media cero y matriz de varianza-covarianza,  $\mathbf{P}$ , dada por:

$$\mathbf{P} = \mathbf{R}_r \mathbf{F} \mathbf{R}_r^T \quad (17)$$

La matriz  $\mathbf{F}$  es una matriz diagonal cuadrada, cuyos elementos de la diagonal principal se calculan elevando al cuadrado el producto de los correspondientes valores de las tasas medidas por sus desviaciones estándar (Wang y Stephanopoulos, 1983). Una vez que se tienen calculados el vector de residuos ( $\boldsymbol{\varepsilon}$ ) y su correspondiente matriz de varianza-covarianza ( $\mathbf{P}$ ), se puede calcular el índice de consistencia,  $h$ , dado por:

$$h = \boldsymbol{\varepsilon}^T \mathbf{P}^{-1} \boldsymbol{\varepsilon} \quad (18)$$

que es una función de prueba, la cual permite establecer si los residuos son significativamente diferentes de cero. Si esto ocurre, el modelo es incorrecto o existe error sistemático en al menos una medición (Stephanopoulos y col., 1998). Se ha demostrado que la función  $h$  sigue una

distribución  $\chi^2$  y que los grados de libertad son iguales al rango de  $\mathbf{R}$  (Wang y Stephanopoulos, 1983; van der Heijden y col., 1994b, van der Heijden y col., 1994 c). Por lo tanto, comparando el valor calculado de la función  $h$  con los valores de la distribución  $\chi^2$  a los grados de libertad correspondientes [ $\text{rango}(\mathbf{R})$ ], es posible validar la calidad de los datos y la aplicabilidad del modelo (Stephanopoulos y col., 1998). Los valores de la distribución  $\chi^2$  se presentan en la Tabla 1. La manera de interpretar los datos obtenidos es la siguiente. Se rechaza la hipótesis de que la cantidad de error presente en las mediciones no es significativa, si  $h \geq \chi^2$  a un nivel de confianza y grados de libertad dados. Un nivel de confianza de 90 o 95% es usualmente adecuado (Wang y Stephanopoulos, 1983). Una vez que se ha determinado que no existen errores gruesos de medición, es decir, que la calidad de los datos se ha validado, se pueden calcular las tasas de consumo/producción no medidas que contiene el vector  $\mathbf{r}_c$ , utilizando la Ec. 13 (Stephanopoulos y col., 1998). Más aún, es posible calcular mejores estimados para las tasas medidas, utilizando la Ec:

$$\overline{\mathbf{r}}_m = \mathbf{r}_m + \boldsymbol{\delta} \quad (19)$$

donde  $\overline{\mathbf{r}}_m$  es el vector de estimados de las variables medidas y  $\boldsymbol{\delta}$  es el vector de los estimados de los errores de medición, que está dado por (van der Heijden y col., 1994b):

$$\boldsymbol{\delta} = \mathbf{F} \mathbf{R}_r^T \mathbf{P}^{-1} \mathbf{R}_r \mathbf{r}_m \quad (20)$$

Si, por otra parte, el valor de la función  $h$  es mayor o igual al correspondiente valor de  $\chi^2$ , indicando errores gruesos de medición, es posible identificar qué variable medida es la fuente de tales errores. El procedimiento consiste en eliminar cada una de las mediciones realizadas (una a la vez) del

vector de tasas medidas, colocarla en el vector de tasas no medidas y calcular la función  $h$ . Cuando al eliminar una medición del vector de tasas medidas y calcular la función  $h$ , se obtenga un valor más pequeño que el correspondiente de la función  $\chi^2$ , puede concluirse que la medición eliminada es la fuente de error (Stephanopoulos *y col.*, 1998) y corregirse su valor, calculándolo junto con las tasas no medidas, utilizando la Ec.13. La metodología anteriormente expuesta permite, mediante los balances elementales, validar calidad de los datos que se obtiene de una fermentación, detectar errores gruesos de medición y aún corregirlos, además de calcular los datos no medidos.

## 2. Análisis de flujos metabólicos

Una vez que la consistencia de los datos experimentales se ha validado y la red de reacciones bioquímicas ha sido determinada, la información se colecta en una matriz estequiométrica (**A**). Las tasas de reacción, o flujos metabólicos, son calculadas con base en una suposición de estado pseudoestacionario para las concentraciones intracelulares de los metabolitos (Vallino y Stephanopoulos, 1990). Una consecuencia importante de esta suposición es que todos los metabolitos que no se encuentren en una ramificación de la red metabólica pueden ser eliminados, dando como resultado que todas las reacciones que ocurren entre dos metabolitos localizados en ramificaciones pueden representarse con una sola reacción, sin que esto signifique ninguna pérdida de información (Vallino y Stephanopoulos, 1990; Vallino y Stephanopoulos, 1993), con lo que el modelo se hace más simple y más robusto (Vallino y Stephanopoulos, 1990; Schulze, 1995). Como entrada para los cálculos se utiliza un conjunto de flujos extracelulares medidos, típicamente tasas de consumo de sustratos y tasas de secreción de productos (Nissen *y col.*, 1997).

El producto final del cálculo es un mapa de flujos metabólicos que muestra la tasa (es decir el flujo) a la cual ocurre cada una de las reacciones (Stephanopoulos *y col.*, 1998). Sobre el sistema lineal contenido en la matriz **A**, se pueden hacer algunos comentarios que resultan valiosos y que es conveniente considerar antes de hacer experimento alguno. Si la matriz estequiométrica es singular, dos o más reacciones son linealmente dependientes y no existe una solución única del sistema (Nissen *y col.*, 1997; Vanrollegem y Heijnen, 1998). Una singularidad típica aparece cuando el ciclo de los ácidos tricarbónicos, el ciclo del glioxalato y la reacción anaplerótica de la piruvato carboxilasa se consideran juntas (Stephanopoulos *y col.*, 1998):

Ciclo de los ácidos tricarbónicos: Piruvato  $\rightarrow$   
 $3\text{CO}_2 + 4\text{NADH} + \text{FADH} + \text{GTP}$

Ciclo del glioxalato:  $2\text{Piruvato} \rightarrow 2\text{CO}_2 +$   
 Oxalacetato +  $4\text{NADH} + \text{FADH}$

Piruvato carboxilasa: Piruvato  $\rightarrow$  + ATP +  $\text{CO}_2$   
 Oxalacetato

Si ATP y GTP se consideran iguales (lo cual se hace frecuentemente en el análisis de reacciones celulares), es obvio que el ciclo del glioxalato es una combinación lineal de las otras dos vías. Las singularidades sólo pueden ser eliminadas cambiando la red metabólica, adicionando o removiendo reacciones, sin embargo, esto debe hacerse respetando los principios de la bioquímica fundamental (Nissen *y col.*, 1997). Una herramienta muy usada, para determinar la presencia o ausencia de reacciones, es la realización de ensayos *in vitro* de enzimas intracelulares (Nissen *y col.*, 1997; Stephanopoulos *y col.*, 1998).

Es importante señalar que cualquier modelo estequiométrico debe sujetarse a un análisis de sensibilidad, para lo cual el primer indicador es el número de condición ( $C$ ) de la

matriz estequiométrica (Vallino y Stephanopoulos, 1990), que se calcula de la siguiente manera (Noble y Daniel, 1977):

$$C(\mathbf{A}) = |\mathbf{A}| \times |\mathbf{A}^\#| \quad (21)$$

Dónde:

$||$  = alguna norma matricial

$\mathbf{A}^\#$  = pseudoinversa, dada por:

$$\mathbf{A}^\# = (\mathbf{A}^\top \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^\top \quad (22)$$

$C$  es un indicador del error numérico que puede acumularse al resolver el sistema. Si  $C$  es del orden de  $10^k$  y el vector de residuos es del orden de  $10^{-j}$  eudoinversa, dada por:

$\epsilon_j$ , puede esperarse un vector de errores del orden de  $10^{k-j}$  cuando se resuelve el sistema (Schulze, 1995). El análisis de sensibilidad del vector de flujos calculados ( $\mathbf{x}$ ) con respecto al vector de las tasas medidas ( $\mathbf{r}$ ) se hace calculando la matriz (Vallino y Stephanopoulos, 1990):

$$\frac{\delta \mathbf{x}}{\delta \mathbf{r}} = (\mathbf{A}^\top \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^\top \quad (23)$$

Los elementos de la matriz dada por la Ec. 23 permiten identificar qué flujos se verán afectados por determinadas mediciones. Por ejemplo, si el  $ij$ -ésimo elemento de la matriz es mayor que 1, quiere decir que el flujo  $i$  es particularmente sensible a errores en la medición de la tasa  $j$  (Schulze, 1995), lo que significa que habrá que hacer la medición de la tasa  $j$  con extremo cuidado. La determinación estequiométrica de los flujos metabólicos intracelulares puede basarse en igual número de balances de metabolitos, o en un número menor o mayor de tales balances, dependiendo del número de mediciones disponibles. En el primer caso no

se tiene redundancia y la solución es única, mientras que si se dispone de menos mediciones de las necesarias, se obtiene toda una familia de soluciones (Stephanopoulos y col., 1998). Si se requiere de una solución en particular, y no es posible medir más variables para hacer determinado el sistema, la programación lineal combinada con alguna función objetivo, es decir una restricción, puede usarse para obtener una solución deseada (Watson, 1986; Savinell y Palsson, 1992), por ejemplo, maximizar el rendimiento de algún componente dado (Fell y Small, 1986; Varma y col., 1993a) o minimizar algún costo (Varma y col., 1993b). Finalmente, con más mediciones de las necesarias para tener un sistema determinado, además del cálculo de los flujos metabólicos, la validez del proceso puede ser rigurosamente comprobada (Stephanopoulos y col., 1998).

Una vez que se ha determinado que los datos experimentales cumplen satisfactoriamente con los balances elementales, se retoma el modelo estequiométrico y se calcula la función índice de consistencia para el modelo estequiométrico propuesto,  $h_{ME}$ , para validar la suposición de estado pseudoestacionario (Stephanopoulos y col., 1998).

Cada una de las reacciones del modelo estequiométrico ocurre a una tasa de reacción desconocida hasta este momento. Para la  $i$ -ésima reacción,  $x_i$  representa su tasa de reacción (es decir, el flujo). La tasa global de cambio ( $r$ ), para cada metabolito intracelular, es la suma algebraica de los flujos de las reacciones en las que interviene multiplicados por los correspondientes coeficientes estequiométricos y, por la suposición de estado pseudoestacionario, es igual a cero. De manera que, para cada metabolito intracelular del caso de estudio, puede escribirse:

$$r_{Lactato} = x_1 - x_2 - x_4 = 0 \tag{24}$$

$$r_{PropionilCoA} = x_2 - x_3 - 3/5x_7 = 0 \tag{25}$$

$$r_{AcetilCoA} = 2/3x_5 - x_6 - 2/5x_7 - x_8 - 2/5x_{18} - 0.164x_{19} = 0 \tag{26}$$

$$r_{NADH} = -1/3x_2 + 1/3x_4 + 1/3x_5 - 2/5x_7 - 1/2x_8 - 1/3x_{12} + 1/3x_{15} + 1/5x_{18} - 0.2652x_{19} = 0 \tag{27}$$

$$r_{Piruvato} = x_4 - x_5 - 3/4x_9 - 0.094x_{19} = 0 \tag{28}$$

$$r_{ATP} = 1/2x_6 + 1/5x_7 + 1/4x_8 - 1/4x_9 - 1/4x_{10} - 1/3x_{12} - 0.9752x_{19} - x_{20} = 0 \tag{29}$$

$$r_{Oxalacetato} = x_9 - x_{10} - 4/5x_{18} - 0.1073x_{19} = 0 \tag{30}$$

$$r_{PEP} = 3/4x_{10} - x_{11} - 0.039x_{19} = 0 \tag{31}$$

$$r_{3Fosfoglicerato} = x_{11} - x_{12} - 0.1128x_{19} = 0 \tag{32}$$

$$r_{Glicerahdehido-3-fosfato} = x_{12} - x_{13} + 3/9x_{17} - 0.0097x_{19} = 0 \tag{33}$$

$$r_{Fructosa6P} = x_{13} - x_{14} + 3/5x_{16} + 6/9x_{17} - 0.0107x_{19} = 0 \tag{34}$$

$$r_{Glucosa6P} = x_{14} - x_{15} - 0.0308x_{19} = 0 \tag{35}$$

$$r_{Ribosa5P} = 5/6x_{15} - x_{16} - 5/9x_{17} - 0.1126x_{19} = 0 \tag{36}$$

$$r_{Eritrosa4P} = 2/5x_{16} - 4/9x_{17} - 0.036x_{19} = 0 \tag{37}$$

$$r\text{-}\alpha\text{-cetogluturato} = x_{18} - 0.0727x_{19} = 0 \tag{38}$$

Para el caso de la tasa global de cambio de cada metabolito en la red metabólica propuesta, las Ecs. 24 a 38, se expresan en forma matricial como:

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -3/5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2/3 & -1 & -2/5 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -2/5 & -0.164 & 0 \\ 0 & -1/3 & 0 & 1/3 & 0 & 0 & -2/5 & -1/2 & 0 & 0 & 0 & -1/3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/5 & -0.2652 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -3/4 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.094 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/2 & 1/5 & 1/4 & -1/4 & -1/4 & 0 & -1/3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.9752 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -4/5 & -0.1063 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 3/4 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.039 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.1128 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 3/9 & 0 & -0.0097 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 3/5 & 6/9 & 0 & -0.0107 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -0.0308 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 5/6 & -1 & -5/9 & 0 & -0.1126 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2/5 & -4/9 & 0 & -0.036 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -0.0727 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \\ x_5 \\ x_6 \\ x_7 \\ x_8 \\ x_9 \\ x_{10} \\ x_{11} \\ x_{12} \\ x_{13} \\ x_{14} \\ x_{15} \\ x_{16} \\ x_{17} \\ x_{18} \\ x_{19} \\ x_{20} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{39}$$

O bien:

$$Ax = 0 \tag{40}$$

Que es la Ec. del modelo estequiométrico. En las Ecs. 39 y 40 cada renglón de la matriz **A**

(15 metabolitos, 20 reacciones) representa una tasa global de cambio para un metabolito intracelular, mientras que las columnas contienen los coeficientes estequiométricos asociados a los compuestos de cada una de las reacciones que ocurren dentro de la

célula. Este sistema lineal es utilizado para validar la suposición de estado pseudoestacionario y, posteriormente para la determinación de flujos metabólicos, de acuerdo a la metodología detallada a continuación. La matriz  $\mathbf{A}$  es equivalente a la matriz  $\mathbf{E}$ , utilizada en el modelo de caja negra, por lo que puede ser separada en dos matrices  $\mathbf{A}_m$  y  $\mathbf{A}_c$  que contengan los coeficientes estequiométricos correspondientes a las tasas de reacción medidas y no medidas, respectivamente. De manera similar, el vector  $\mathbf{x}$  (vector de flujos desconocidos de las reacciones =  $[x_1, x_2, \dots, x_{20}]^T$ ) puede separarse en dos vectores  $\mathbf{x}_m$  y  $\mathbf{x}_c$  que contengan las tasas de reacción medidas y no medidas, respectivamente. Así, la Ec. 40 puede escribirse como:

$$\mathbf{A}_m \mathbf{x}_m + \mathbf{A}_c \mathbf{x}_c = \mathbf{0} \quad (41)$$

Ya que se tienen 20 flujos intracelulares desconocidos y 15 balances estequiométricos, los grados de libertad del sistema son 5, es decir, se requiere medir al menos 5 flujos para poder resolver el sistema. Sin embargo, ya que se midieron 6 flujos, el sistema es sobredeterminado. Por la similitud de la matriz  $\mathbf{A}$  con la matriz  $\mathbf{E}$ , las ecuaciones 14 a 18 se utilizan para calcular la función  $h$ , usando  $\mathbf{x}_m$ ,  $\mathbf{A}_m$  y  $\mathbf{A}_c$  en lugar de  $\mathbf{r}_m$ ,  $\mathbf{E}_m$  y  $\mathbf{E}_c$ , para el modelo estequiométrico, con lo que se puede validar la suposición de estado pseudoestacionario (van der Heijden y col., 1994a, van der Heijden y col. 1994b, van der Heijden y col., 1994c). Para el caso de estudio, el vector  $\mathbf{x}_m$  está dado por:

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ x_3 \\ x_6 \\ x_7 \\ x_8 \\ x_{19} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_{Lactato} \\ r_{Propionato} \\ r_{Acetato} \\ r_{Valerato} \\ r_{Butirato} \\ r_{Biomasa} \end{pmatrix} \quad (42)$$

donde las tasas  $r_i$  corresponden a los flujos extracelulares medidos, lo cual puede deducirse de la Fig. 1. Por lo tanto, el vector  $\mathbf{x}_c$  contiene los restantes flujos metabólicos desconocidos. La matriz  $\mathbf{A}_m$  contiene las columnas 1, 3, 6, 7, 8 y 19 de la matriz  $\mathbf{A}$ , que corresponden a los flujos medidos, mientras que la matriz  $\mathbf{A}_c$  contiene las restantes columnas de la matriz  $\mathbf{A}$ . Una vez validada la suposición de estado pseudoestacionario, las Ecs. 13 y 19 podrían utilizarse para calcular los flujos metabólicos desconocidos, es decir, los elementos del vector  $\mathbf{x}_c$  (Stephanopoulos y col., 1998). Sin embargo, un método diferente descrito por Tsai y Lee (1988), proporciona los mejores estimados para los flujos metabólicos medidos y no medidos. En este método la Ec. 40 se reformula para expresarse como:

$$\begin{pmatrix} \mathbf{x}_m \\ \mathbf{0} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{I} & \mathbf{0} \\ \mathbf{A}_m & \mathbf{A}_c \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{x}_m \\ \mathbf{x}_c \end{pmatrix} = \mathbf{T} \mathbf{x} \quad (43)$$

donde  $\mathbf{I}$  es la matriz identidad de dimensión igual al número de flujos medidos (en caso de estudio, de 6X6). En la matriz  $\mathbf{A}$  las columnas se intercambian para que al principio se tengan juntas las columnas que corresponden a las reacciones cuyos flujos son medidos, mientras que otro tanto se hace con el vector  $\mathbf{x}$ . El primer renglón de la Ec. 43 simplemente establece que  $\mathbf{x}_m$  es igual a  $\mathbf{x}_m$ , mientras que el segundo renglón es idéntico con la Ec. 41. La Ec. 43 se escribe, para el caso de estudio, de manera extendida como se muestra Ec. 44:

Para mayor claridad, en la Ec. 44 las líneas separan a cada una de las matrices y vectores que componen el sistema. Las Ecs. 43 y 44 introducen una separación estricta entre los vectores de flujos medidos y no medidos. Para resolver el sistema, se debe hacer una partición diferente de la matriz  $\mathbf{T}$ , que se muestra Ec. 45



$$\overline{\mathbf{x}}_2 = -\mathbf{T}_{22}^{-1}\mathbf{T}_{21}\overline{\mathbf{x}}_1 \quad (49)$$

Las Ecs. 47 y 49 proporcionan los mejores estimados de todos los flujos en el modelo estequiométrico.

Tabla 2. Reacciones de la red metabólica para *M. elsdenii* creciendo sobre lactato. Los números antes de cada reacción corresponden a los indicados en la Fig. 1. Tomada de Soto-Cruz (2002).

- 
1. L -Lactato  $\rightarrow$  Lactato
  2. Lactato +  $\frac{1}{3}$ NADH<sub>2</sub>  $\rightarrow$  PropionilCoA
  3. PropionilCoA  $\rightarrow$  Propionato
  4. Lactato  $\rightarrow$  Piruvato +  $\frac{1}{3}$ NADH<sub>2</sub>
  5. Piruvato  $\rightarrow$   $\frac{2}{3}$ AcetilCoA +  $\frac{1}{3}$ NADH<sub>2</sub> +  $\frac{1}{3}$ CO<sub>2</sub>
  6. AcetilCoA  $\rightarrow$  Acetato +  $\frac{1}{2}$ ATP
  7.  $\frac{3}{5}$ PropionilCoA +  $\frac{2}{5}$ AcetilCoA +  $\frac{2}{5}$ NADH<sub>2</sub>  $\rightarrow$  Valerato +  $\frac{1}{5}$ ATP
  8. AcetilCoA +  $\frac{1}{2}$ NADH<sub>2</sub>  $\rightarrow$  Butirato +  $\frac{1}{4}$ ATP
  9.  $\frac{3}{4}$ Piruvato +  $\frac{1}{4}$ CO<sub>2</sub> +  $\frac{1}{4}$ ATP  $\rightarrow$  Oxalacetato
  10. Oxalacetato +  $\frac{1}{4}$ ATP  $\rightarrow$   $\frac{3}{4}$ Fosfoenolpiruvato +  $\frac{1}{4}$ CO<sub>2</sub>
  11. Fosfoenolpiruvato  $\rightarrow$  3Fosfoglicerato
  12. 3Fosfoglicerato +  $\frac{1}{3}$ ATP +  $\frac{1}{3}$ NADH<sub>2</sub>  $\rightarrow$  Gliceraldehido3P
  13. Gliceraldehido3P  $\rightarrow$  Fructosa6P
  14. Fructosa6P  $\rightarrow$  Glucosa6P
  15. Glucosa6P  $\rightarrow$   $\frac{5}{6}$ Ribosa5P +  $\frac{1}{3}$ NADH<sub>2</sub> +  $\frac{1}{6}$ CO<sub>2</sub>
  16. Ribosa5P  $\rightarrow$   $\frac{2}{5}$ Eritrosa4P +  $\frac{3}{5}$ Fructosa6P
  17.  $\frac{5}{9}$ Ribosa5P +  $\frac{4}{9}$ Eritrosa4P  $\rightarrow$   $\frac{6}{9}$ Fructosa6P +  $\frac{3}{9}$ Gliceraldehido3P
  18.  $\frac{4}{5}$ Oxalacetato +  $\frac{2}{5}$ AcetilCoA  $\rightarrow$  ( $\alpha$ )cetogutarato +  $\frac{1}{5}$ NADH<sub>2</sub> +  $\frac{1}{5}$ CO<sub>2</sub>
  19.  $\left[ \begin{array}{l} 0.0308\text{Glucosa6P} + 0.0107\text{Fructosa6P} + 0.1126\text{Ribosa5P} \\ + 0.0362\text{Eritrosa4P} + 0.0097\text{Gliceraldehido3P} \\ + 0.1128(3\text{Fosfoglicerato}) + 0.039\text{Fosfoenolpiruvato} \\ + 0.094\text{Piruvato} + 0.164\text{AcetilCoA} + 0.1073\text{Oxalacetato} \\ + 0.0727(\alpha)\text{cetogutarato} + 0.9752\text{ATP} + 0.2652\text{NADH}_2 \end{array} \right] \rightarrow \text{Biomasa}$
  20. ATP  $\rightarrow$  ‘Mantenimiento’
- 

### 3. Validación del modelo estequiométrico utilizado

Al trabajar con un sistema sobredeterminado, es posible eliminar de manera selectiva una de las tasas medidas del vector  $\mathbf{x}_m$ , para validar el modelo. Cuando se selecciona cualquiera de los compuestos medidos, el error de estimación debe ser similar al correspondiente error de medición.

Por ejemplo, si se escoge eliminar una tasa medida cualquiera (que pasa a formar parte de las tasas no medidas) y se resuelve el sistema, la predicción del modelo para esa tasa debe presentar un error de estimación dentro del rango del error experimental. Lo anterior contribuye a la validación del modelo, ya que este es capaz de reproducir las observaciones con un error de estimación similar al error experimental.

## Conclusiones

Se ha descrito la aplicación de balances estequiométricos a procesos de fermentación, como un método sistemático, que resulta valioso para la validación de los datos experimentales, así como para el estudio de redes metabólicas. Para el caso de estudio presentado, las metodologías descritas permitieron integrar y validar una red metabólica para la bacteria ruminal *M. elsdenii*, realizando así una contribución al conocimiento del metabolismo de dicho microorganismo, cuando el lactato es utilizado como fuente de carbono y energía.

## Referencias

- Aiba, S. y Matsuoka, M. (1979). *Identification of metabolic model: citrate production from glucose by Candida lipolytica*. *Biotechnology Bioengineering* 21, 1373-1386.
- Causey, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P. y Ingram, L. O. (2004). *Engineering Escherichia coli for efficient conversion of glucose to pyruvate*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 2235-2240
- Erickson, L. E., Minkevich, I. G. y Eroshin, V. K. (1978). *Application of mass and energy balance regularities in fermentation*. *Biotechnology Bioengineering* 20, 1595-1621.
- Fell, D. A. y Small, J. R. (1986). *Fat synthesis in adipose tissue. An examination of stoichiometric constraints*. *Biochemistry Journal* 238, 781-786.
- Jørgensen, H., Nielsen, J., Villadsen, J. y Mølgaard, H. (1995). *Metabolic flux distributions in Penicillium chrysogenum during fed-batch cultivations*. *Biotechnology Bioengineering* 46, 117-131.
- Madron, F., Veverka, V. y Vanecek, V. (1977). *Statistical analysis of material balance of a chemical reactor*. *AIChE Journal* 23, 482-486.
- Nielsen, J. (2001). *Metabolic engineering*. *Applied Microbiology Biotechnology* 55, 263-283.
- Nielsen, J. y Villadsen, J. (1994). *Bioreaction engineering principles*. Plenum Press. Nueva York, EUA.
- Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J. y Villadsen, J. (1997). *Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 203-218.
- Noble, B. y Daniel, J. W. (1977). *Applied linear algebra*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, NJ, EUA.
- Roels, J. A. (1983). *Energetics and kinetics in biotechnology*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, Holanda.
- Savinell, J. M. y Palsson, B. O. (1992). *Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization: I. Development of mathematical formalism*. *Journal Theoretical Biology* 154, 421-454.
- Schulze, U. (1995). *Anaerobic physiology of Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis. Technical University of Denmark. Lyngby, Dinamarca.
- Soto-Cruz, O. (2002). *Contribución al estudio de la fisiología y el metabolismo de la bacteria ruminal Megasphaera elsdenii. Uso de modelos no estructurados y análisis de flujos metabólicos*. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F.
- Stephanopoulos, G. y Vallino, J. J. (1991). *Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction*. *Science* 252, 1675-1681.
- Stephanopoulos, G., Nielsen, J. y Aristodou, A. (1998). *Metabolic engineering. Principles and methodologies*. Academic Press, Nueva York
- Torres, N. V. y Voit, E. O. (2002). *Pathway analysis and optimization in metabolic engineering*. Cambridge University Press, Reino Unido.
- Tryfona, T. y Bustard, M. T. (2005). *Fermentative production of lysine by Corynebacterium glutamicum: transmembrane transport and metabolic flux analysis*. *Process Biochemistry* 40, 499-5005.
- Tsai, S. P. y Lee, Y. H. (1988). *Application of metabolic pathway stoichiometry to statistical analysis of bioreactor*

- measurement data. Biotechnology Bioengineering* 32, 713-715.
- Vallino, J. J. y Stephanopoulos, G. (1990). Flux determination in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentation. En: *Frontiers in bioprocessing*. (S. K. Sikdar, M. Bierand y P. Todd eds.) Pp. 205-219. CRC Press. Boca Raton, Florida, EUA.
- van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. & Luyben, K. Ch. A. M. (1994a). *Linear constraint relations in biochemical reaction system: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. Biotechnology Bioengineering* 43, 3-10.
- van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. & Luyben, K. Ch. A. M. (1994b). *Linear constraint relations in biochemical reaction system: II. Diagnosis and estimation of gross errors. Biotechnology Bioengineering* 43, 11-20.
- van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. & Luyben, K. Ch. A. M. (1994c). *Linear constraint relations in biochemical reaction system: III. Sequential application of data reconciliation for sensitive detection of systematic errors. Biotechnology Bioengineering* 44, 781-791.
- van Gulik, W. M. y Heijden, J. J. (1995). *A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. Biotechnology Bioengineering* 48, 681-698.
- Vanrollegem, P. A. y Heijnen, J. J. (1998). *A structured approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients. Biotechnology Bioengineering* 58, 133-138.
- Varma, A. y Palsson, B. O. (1994). *Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. Biotechnology* 12, 994-998.
- Varma, A., Boesch, B. W. y Palsson, B. O. (1993a). *Biochemical production capabilities of Escherichia coli. Biotechnology Bioengineering* 42, 59-73.
- Varma, A., Boesch, B. W. y Palsson, B. O. (1993b). *Stoichiometric interpretation of Escherichia coli catabolism under various oxygenation rates. Applied Environmental Microbiology* 59, 2465-2473.
- Wang, N. S. y Stephanopoulos, G. (1983). *Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors. Biotechnology Bioengineering* 25, 2177-2208.
- Watson, M. R. (1986). *A discrete model of bacterial metabolism. Comprehensive Applied Bioscience* 2, 23-27.
- Zhao, J., Baba, T., Mori, H. y Shimizu, K. (2004). *Global metabolic response of Escherichia coli to gnd or zwf gene-knockout, based on C-13-labeling experiments and the measurement of enzyme activities. Applied Microbiology Biotechnology* 64, 91-98.