

**4. TRACTAMENT QUANTITATIU DEL
METABOLISME CEL·LULAR
D'*Escherichia coli* k12**

4. TRACTAMENT QUANTITATIU DEL METABOLISME CEL·LULAR D'*Escherichia coli* K12

4.1 INTRODUCCIÓ

Com s'ha evidenciat al capítol anterior, i en molts altres treballs de la bibliografia, l'equilibri entre creixement, consum de glucosa, generació de subproductes, especialment acetat, i expressió de proteïna recombinant és un aspecte clau per definir estratègies de millora en processos basats en *Escherichia coli*, sobretot tenint en compte el fet demostrat de que la generació d'acetat és de caràcter constitutiu. Per aquest interès es planteja en aquest capítol l'abordatge d'una descripció quantitativa del metabolisme, que permeti intepretar més profundament el comportament cel·lular en aquests aspectes.

L'anàlisi qualitatiu del metabolisme que es planteja es basa en obtenir l'estimació dels fluxos metabòlics intracel·lulars mitjançant el desenvolupament d'un model matemàtic del metabolisme de la soca d'*Escherichia coli* K12 utilitzada en aquest treball. Aquest model es basa en l'estequiometria de les principals reaccions del metabolisme de la cèl·lula i en la determinació experimental de les velocitats específiques de consum i producció dels principals metabòlits i substrats, i dels components cel·lulars. Amb la resolució del model es poden determinar els fluxos metabòlics intracel·lulars de les reaccions considerades. Un cop modelitzat el procés de creixement d'*Escherichia coli* la seva anàlisi ha de permetre identificar quina reacció o reaccions s'haurien de modificar, augmentant o disminuint-ne el seu flux, per tal de fer més eficient el procés de oxidació de la glucosa com a font principal de carboni i energia.

La teoria del model matemàtic emprat per a l'estimació dels fluxos metabòlics d'*Escherichia coli* K12 es presenta en els següents apartats i, posteriorment el model matemàtic desenvolupat s'utilitza per a l'obtenció dels valors dels fluxos

metabòlics intracel·lulars a partir de les dades experimentals de que es disposa. Els càlculs algebraics que permeten la resolució de les equacions de balanç del model s'han realitzat mitjançant un programari dissenyat especialment per aquest fi, per un company de grup. Els resultats es presenten i discuteixen en els darrers apartats d'aquest capítol. En base a la discussió dels resultats s'escolliran aquelles reaccions susceptibles de ser modificades, treball que constitueix el capítol 5 d'aquesta memòria, en el que el model matemàtic s'utilitza de nou per tal d'interpretar les re-distribucions introduïdes al metabolisme com a conseqüència de les modificacions genètiques introduïdes.

4.2. MODELITZACIÓ MATEMÀTICA DEL METABOLISME: ANÀLISI DE FLUXOS METABÒLICS

La modelització matemàtica del metabolisme té un especial interès dintre la biotecnologia. Representa una eina molt útil a l'hora d'interpretar i predir els fenòmens naturals i els resultats experimentals en bioquímica i enginyeria (Bailey, 1991). S'ha de tenir en compte que els models matemàtics són de fet una simplificació del fenomen real i, per tant, és possible establir diferents models matemàtics per explicar el mateix fenomen, depenent dels fets que es pretengui explicar a través del model i, de les mesures que es puguin realitzar (Bailey, 1998). Hi ha hagut varies temptatives de desenvolupament de models matemàtics per a descriure les funcions cel·lulars, ja sigui a nivell de processos cel·lulars concrets o del procés del metabolisme en general. En el camp de la biotecnologia té especial interès el tractament del metabolisme cel·lular en general, ja que pot ser explotat per a la producció de compostos d'interès. Per sobre de la caracterització del metabolisme en complexes xarxes metabòliques, amb centenars de reaccions entrecreuades, el metabolisme d'una cèl·lula està sotmès als mecanismes de control i regulació propis de la cèl·lula. Aquests mecanismes són més difícils de modelitzar, ja que no estan del tot dilucidats i, per tant, són molt difícils de quantificar (Gombert i Nielsen, 2000). Els models que descriuen el comportament cel·lular en termes de metabolisme proveeixen d'una base teòrica per a proposar hipòtesis i, a

la pràctica, per a escollir i comparar diferents possibilitats de modificació de processos cel·lulars específics.

En els estudis tradicionals de processos de fermentació es mesuren tant la concentració de biomassa com la dels metabòlits extracel·lulars (tant substrats com productes). Els models que es poden formular, basant-se en aquesta informació, són de fet limitats i la seva aplicació en la interpretació del comportament cel·lular i comparació de la fisiologia cel·lular en diferents condicions de cultiu s'ha de prendre com una aproximació teòrica. La constant millora en les tècniques analítiques de mesura de concentracions de metabòlits intracel·lulars i activitats enzimàtiques ha de permetre la formulació de models més estructurats, amb menys incògnites i restriccions, que augmentin les possibilitats d'interpretació de la fisiologia cel·lular. La biocomputació també juga un important paper en la resolució de les equacions plantejades en el desenvolupament de models matemàtics cada cop més complexos. Per últim, el desenvolupament de noves tècniques analítiques com l'espectrometria de masses i l'electroforesi bi-dimensional permet un anàlisi més detallat del metabolisme i alhora, desenvolupar models més fiables que descriuen el conjunt de funcions cel·lulars d'una cèl·lula en creixement (Szypersky *et al.* 1995).

En l'anàlisi de fluxos metabòlics (AFM) els balanços de matèria per a tots els metabòlits intracel·lulars s'utilitzen per a calcular els fluxos a través dels diferents punts de bifurcació de les vies metabòliques de la xarxa de reaccions considerades com a representatives del metabolisme global. Els fluxos poden ser calculats a partir de mesures experimentals d'uns pocs fluxos amb càlculs algebraics i d'optimització lineal (Varma i Palsson, 1994). Més recentment, l'ús de substrats marcats isotòpicament en combinació amb la mesura de l'estat de marcatge dels metabòlits intracel·lulars, sigui per ressonància magnètica nuclear (RMN) o per cromatografia de gasos-espectrometria de masses (GC-MS) s'ha emprat per l'estimació més acurada de fluxos específics (Szyperski, 1998;

Christensen i Nielsen, 1991). Quan els balanços de matèria es combinen amb els balanços dels metabòlits intracel·lulars marcats, els models permeten l'estimació més acurada dels fluxos i un anàlisi del metabolisme més realista. Aquestes aproximacions permeten especular sobre punts clau del metabolisme cel·lular així com la identificació de vies metabòliques que permeten aprofundir encara més en el coneixement dels mecanismes que operen en una cèl·lula en creixement.

Les tècniques de marcatge de metabòlits emprant marcadors isotòpics detectables per ressonància magnètica nuclear (RMN) poden subministrar valors d'estimació dels fluxos metabòlics que operen *in vivo*. Les cèl·lules es fan créixer en presència d'un substrat marcat en un àtom específic i es mesura la seva incorporació als productes finals de la xarxa metabòlica considerada. No obstant, aquestes mesures només són aplicables a petita escala, degut al seu elevat cost, o en experiments molt específics (Fitzpatrick *et al.* 1993; Mancuso *et al.* 1994, Martinelli *et al.* 1999; Paredes *et al.* 1998; Sharftein *et al.* 1994). La baixa sensibilitat de la RMN o la dificultat que planteja quantificar la incorporació d'isòtops en els metabòlits, inhibeix l'ús generalitzat d'aquests mètodes d'AFM en cultius de cèl·lules *in vitro*. A més a més, la reversibilitat d'algunes reaccions complica la determinació dels fluxos en algunes vies degut a que es produeix una redistribució dels metabòlits marcats.

Els fluxos metabòlics són determinants fonamentals de la fisiologia d'una cèl·lula i un paràmetre crític d'una via metabòlica. Defineixen en certa manera la mínima informació necessària per relacionar i descriure la fisiologia amb el metabolisme. Es pot considerar els fluxos com el paràmetre preferit per descriure l'estat metabòlic d'una cèl·lula i la seva fisiologia sota condicions ambientals determinades. Els fluxos metabòlics i, en particular, els canvis en els fluxos metabòlics en resposta a pertorbacions genètiques o ambientals, són crítics per comprendre les causes de la seva redistribució i, el control que exerceix la cèl·lula sobre el metabolisme general. L'anàlisi de fluxos metabòlics permet, per exemple, comparar

respostes metabòliques a diferents concentracions de substrats, d'oxigen dissolt o de formació de subproductes de manera quantificada. Aquesta informació permet dissenyar potencials estratègies d'alimentació, formulació de medis de cultiu o modificacions genètiques específiques que permetin millorar el comportament del cultiu (Bonarius *et al.* 1996; Paredes *et al.* 1998; Zupke *et al.* 1995).

Més en concret, l'AFM és una metodologia matemàtica que permet determinar els fluxos metabòlics intracel·lulars en xarxes metabòliques a partir d'algunes determinacions externes de fluxos clau (Vallino i Stephanopoulos, 1990; Wielsen i Villadsen, 1994). Aquests fluxos clau poden ser velocitats específiques de consum de diversos substrats, com per exemple la glucosa, de producció de diferents productes metabòlics, com per exemple l'acetat, el lactat, l'etanol, el CO₂, o fins i tot proteïnes recombinants. També s'incorporen fluxos que representen el creixement cel·lular, com per exemple la velocitat específica de formació de macromolècules com proteïnes, carbohidrats, lípids i àcids nucleics.

L'AFM també pot ser una metodologia útil per a l'estudi de la influència de vies alternatives sobre la distribució de fluxos en un microorganisme o línia cel·lular incloent la incorporació d'una nova via en la xarxa metabòlica. Aquest estudi teòric pot representar una bona base per a decidir quina via s'ha de modificar per a la producció d'un producte metabòlic, quantificant l'efecte de la nova via clonada en la cèl·lula modificada genèticament (Bailey, 1991). Finalment l'AFM pot ser utilitzat en el càlcul de rendiments teòrics de metabòlits específics en una xarxa metabòlica definida (Jorgensen *et al.* 1999).

Respecte la determinació experimental de fluxos metabòlics, en primer lloc cal tenir en compte que els mètodes es basen en determinacions analítiques i per tant, la fiabilitat en la seva determinació dependrà de l'exactitud i sensibilitat dels mètodes analítics que s'utilitzin. També cal considerar en quines condicions s'han realitzat les determinacions experimentals. Un tret fonamental comú de tots els

mètodes és que la determinació de fluxos metabòlics s'ha de considerar que es realitza a partir de mesures obtingudes en condicions d'estat estacionari o quasi-estacionari del creixement. Aquesta consideració es deu a que per a determinar els fluxos metabòlics no hi ha d'haver canvis significatius en les concentracions dels metabòlits intracel·lulars implicats ni acumulació de productes que no es puguin mesurar. Experimentalment, l'estat estacionari s'assoleix en cultiu en bioreactor en continu després de varis temps de residència. En aquestes condicions els fluxos metabòlics assoleixen l'estat estacionari i es poden aplicar els mètodes d'estimació més adients. Tot i que el cultiu en continu és el mètode recomanat per a l'obtenció de dades experimentals per a l'estimació dels fluxos metabòlics intracel·lulars, també es poden obtenir dades de consum i producció dels metabòlits majoritaris en cultius en discontinu o discontinu-alimentat. En aquest cas s'ha d'aplicar la hipòtesi de l'estat quasi-estacionari que permet suposar que, en determinades condicions, no hi ha variació en la concentració de metabòlits i, per tant, no hi ha acumulació intracel·lular de metabòlits. Més endavant es tornarà a fer èmfasi en aquest aspecte. L'obtenció de dades experimentals a partir de cultius en discontinu permet reduir els temps d'experimentació. No obstant, en aquest cas, només una fracció de les dades experimentals o del nombre total de punts (nombre de mostres analitzades per a la determinació analítica de les concentracions de metabòlits) és útil en el context de la determinació dels fluxos metabòlics. Només s'utilitzen les dades recollides durant el període en que les condicions es mantenen relativament invariables, per exemple durant la fase del creixement exponencial en que les cèl·lules creixen a la seva velocitat específica màxima, i es pot considerar que el seu comportament està balancejat i exent de limitacions i/o inhibicions.

És important també destacar que tots els models de determinació de fluxos es basen, a més a més del coneixement de l'estequiometria d'una cèl·lula, en la seva composició cel·lular. Aquesta varia de cèl·lula a cèl·lula segons les condicions de creixement i dels medis de cultiu emprats. Per tant, la determinació dels fluxos metabòlics inclou la identificació del material que conforma l'estructura cel·lular i

la seva quantificació. Aquest fet exigeix de precises i acurades determinacions elementals per tècniques físico-químiques per tal de determinar la composició química d'una cèl·lula particular en les condicions a les que ha estat sotmesa durant l'experiment.

Per un altre costat, el balanç de matèria pels components i elements d'una xarxa metabòlica representativa del metabolisme cel·lular, a partir dels fluxos metabòlics de metabòlits determinats extracel·lularment, proveeix d'una ràpida i efectiva metodologia per a la determinació dels fluxos metabòlics i la seva distribució. En general, els balanços de matèria són el mètode més àmpliament escollit per a la estimació dels fluxos metabòlics intracel·lulars. Malgrat tot, els balanços de matèria poden no ser suficients per a determinar tots els fluxos quan s'apliquen a xarxes complexes, ja que el nombre de fluxos desconeguts pot excedir el nombre de fluxos determinats a partir dels metabòlits quantificables extracel·lularment (models indeterminats). En aquest cas s'utilitzen criteris d'optimització lineal per reduir l'espai de la solució i simplificar la seva obtenció (Bonarius *et al.* 1996; Varma i Palsson, 1994). Alternativament, la xarxa metabòlica es pot simplificar agrupant una sèrie de reaccions lineals en una de sola i centrar-se en les vies amb fluxos significatius (Zupke i Stephanopoulos, 1995). Diferents autors han demostrat que els fluxos metabòlics obtinguts per balanç de matèria són consistents amb la quantificació de la distribució de metabòlits utilitzant tècniques de RMN amb ^{13}C (Zupke i Stephanopoulos, 1995; Paredes *et al.* 1998).

En els següents apartats d'aquest capítol es presenta la base teòrica pel desenvolupament d'un model metabòlic de tipus estequiomètric en el que es fonamenta el plantejament i resolució d'equacions de balanç de matèria per descriure el metabolisme.

A la figura següent s'exposen de manera sintetitzada els principis de la modelització estequiomètrica del metabolisme (figura 4.1).

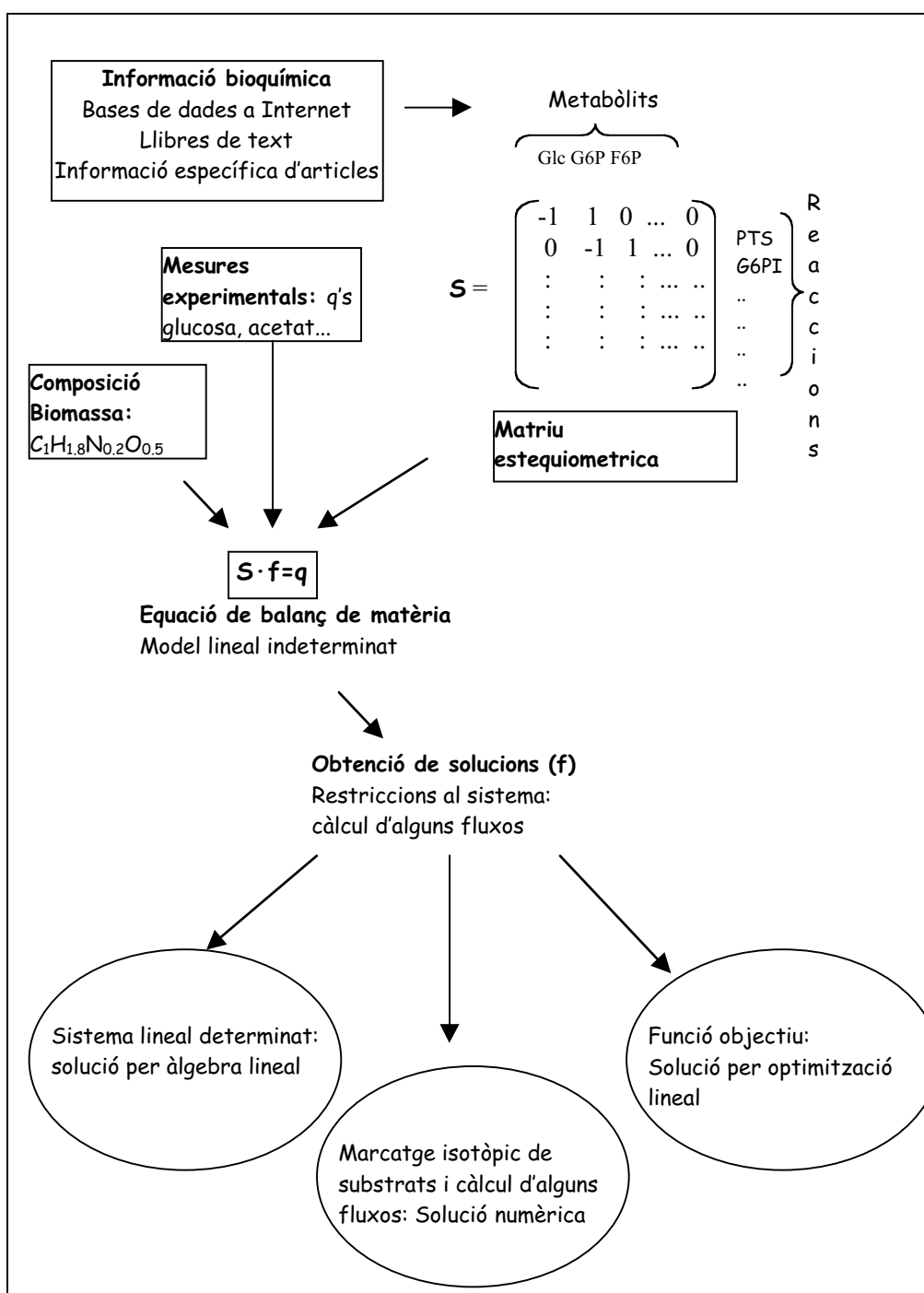


Figura 4.1: principis de la modelització estequiomètrica del metabolisme cel·lular. S representa la matriu dels coeficients estequiomètrics dels metabòlits que participen en les reaccions considerades. q és el vector de velocitats específiques de consum o producció. f és el vector dels fluxos metabòlics estimats per mitjà del model.

Si es coneix l'estequiometria de les reaccions intracel·lulars més rellevants (informació bibliogràfica) i la composició cel·lular (informació bibliogràfica i/o determinació experimental) i es disposa de mesures de la velocitat de creixement, de consum de substrats i de producció dels metabòlits clau (determinacions experimentals), es pot construir un model matemàtic que descrigui quantitativament les reaccions que sostenen el procés (matriu estequiomètrica i vector q de velocitats específiques). Aquest model permet calcular els fluxos metabòlics intracel·lulars (fluxos f) utilitzant les equacions de balanç apropiades i resolent el sistema d'equacions mitjançant operacions de càlcul algebraic i/o d'ajust numèric (optimització lineal).

Així per construir un model matemàtic del metabolisme cal:

- en primer lloc establir la xarxa metabòlica, és a dir el conjunt de metabòlits i reaccions que participen en el procés de creixement cel·lular i són característiques del tipus cel·lular en estudi.
- En segon lloc s'ha de definir la matriu estequiomètrica i obtenir el vector de velocitats específiques de reacció que defineixen les equacions de balanç del model.
- I per últim, en tercer lloc, s'ha de calcular el valor dels fluxos metabòlics per resolució algebraica de la matriu S . Aquest càlcul es pot dur a terme per diferents vies en funció dels objectius de l'anàlisi i de l'abast del model:
 - a) És possible imposar algunes restriccions, per exemple realitzant algunes mesures de fluxos i acotar el nombre de solucions del sistema (sistema determinat) i obtenir la resolució de l'equació per àlgebra lineal simple. En aquest cas es parla de balanç de fluxos.
 - b) Si s'imposen més restriccions al sistema mesurant el patró de marcatge isotòpic d'alguns metabòlits és possible combinar el balanç de fluxos amb el balanç dels metabòlits marcats i el sistema es resol numèricament. En aquest cas s'obté una millor estimació dels fluxos.

c) Si el sistema no pot acceptar o no es disposa de més restriccions es pot aplicar optimització lineal per obtenir el màxim o mínim d'una funció objectiu i la solució amb menys error del sistema d'equacions plantejat.

Abans d'exposar com s'ha construït la xarxa metabòlica i com s'han obtingut les mesures experimentals de consum i aparició de productes metabòlics, a partir de les quals es calculen les velocitats específiques per tal de modelitzar el metabolisme, es considera oportú introduir la base de la teoria matemàtica dels models estequiomètrics d'estimació de fluxos metabòlics intracel·lulars que es presenta a continuació.

4.3. PLANTEJAMENT MATEMÀTIC DEL MODEL ESTEQUIOMÈTRIC DE DETERMINACIÓ DE FLUXOS

A la figura 4.2 es mostra de manera esquemàtica la visió macroscòpica d'una cèl·lula. Els substrats necessaris pel seu creixement es converteixen en més cèl·lules i productes per mitjà d'un conjunt de reaccions intracel·lulars on intervenen nombrosos compostos intermedis o intracel·lulars. Als substrats i productes excretats per la cèl·lula els anomenem compostos extracel·lulars.

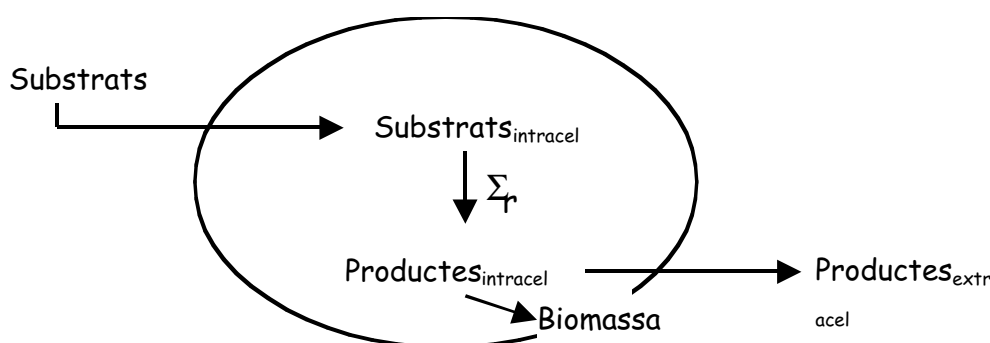


Figura 4.2. Representació macroscòpica d'una cèl·lula.

Balanç per components

Si es considera una cèl·lula en el metabolisme de la qual hi intervenen C compostos en R reaccions i, cadascun d'aquests C compostos amb una quantitat N_i de mols dins la cèl·lula, s'intercanvien amb l'exterior amb uns fluxos molars d'entrada n_i^e i de sortida n_i^s , el balanç de matèria per un compost C_i aplicat a aquest sistema és:

$$\text{Entrada } C_i + \text{Generació } C_i = \text{Sortida } C_i + \text{Acumulació } C_i \quad 4-1$$

que en termes matemàtics per un compost i que participa en K reaccions, s'escriuria,

$$n_i^e + V_c (v_{i1}r_1 + v_{i2}r_2 + \dots + v_{iK}r_K) = n_i^s + \frac{dN_i}{dt} \quad 4-2$$

on V_c és el volum cel·lular, v_{ij} és el coeficient estequiomètric del compost i en la reacció j , i r_j és la velocitat específica neta de formació o consum del compost en la reacció j , i n_i és el nombre de mols de cada un dels C compostos, que entren i surten de la cèl·lula amb uns fluxos molars d'entrada n_i^e i de sortida n_i^s . L'últim terme de l'equació representa el terme d'acumulació del compost i . En el cas que el compost i sigui un reactiu o substrat en la reacció j el seu coeficient estequiomètric serà negatiu, mentre que serà positiu quan sigui un reactant o producte i serà zero quan no intervingui en aquella reacció. D'acord amb això es pot estendre el terme $V_c(v_{i1}r_1 + v_{i2}r_2 + \dots + v_{iK}r_K)$ no només a les K reaccions on intervé el compost i , sinó a les R reaccions que tenen lloc a l'interior cel·lular. Per tant el balanç de matèria pel compost i quedarà

$$n_i^e + V_c \sum_{j=1}^{j=R} v_{ij} r_j = n_i^s + \frac{dN_i}{dt} \quad 4-3$$

Aquesta mateixa expressió es pot aplicar als C compostos que intervenen en el metabolisme cel·lular,

$$\sum_{j=1}^{j=R} v_{1j} V_c r_j = (n_1^s - n_1^e) + \frac{dN_1}{dt}$$

$$\sum_{j=1}^{j=R} v_{ij} V_c r_j = (n_i^s - n_i^e) + \frac{dN_i}{dt} \quad 4-4$$

$$\sum_{j=1}^{j=R} v_{Cj} V_c r_j = (n_C^s - n_C^e) + \frac{dN_C}{dt}$$

que en forma matricial s'expressaria,

$$\begin{pmatrix} v_{11} & \dots & v_{1R} \\ \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots \\ v_{C1} & \dots & v_{CR} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} V_c r_1 \\ \dots \\ V_c r_R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} n_1^s - n_1^e \\ \dots \\ \dots \\ n_C^s - n_C^e \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \frac{dN_1}{dt} \\ \dots \\ \dots \\ \frac{dN_C}{dt} \end{pmatrix} \quad 4-5$$

que simbòlicament es representarà per l'equació

$$S^T \cdot f = q + a \quad 4-6$$

on S és la matriu estequiomètrica definida per Roels (1983) i S^T és la seva transposta, amb tantes files com reaccions R , i tantes columnes com a compostos C (matriu de dimensió $m \times n$, on m és el nombre de metabòlits i n el nombre de reaccions). S representa el conjunt de coeficients estequiomètrics de cada compost en cadascuna de les reaccions cel·lulars (Roels, 1983). f és un vector amb tants components com a reaccions, R . Representa els mols per unitat de temps i per cèl·lula que apareixen o desapareixen en cadascuna de les R reaccions cel·lulars. q és un vector amb tants components com compostos, C . Representa la quantitat de mols per cèl·lula de cadascun dels compostos que s'intercanvien amb l'exterior per unitat de temps. Per últim, a és un vector amb tants components com a compostos, C . Representa la variació amb el temps del nombre de mols de cadascun dels compostos a l'interior cel·lular.

L'equació anterior (4-6) forma la base de l'anàlisi de fluxos metabòlics (AFM) per a la determinació dels fluxos metabòlics intracel·lulars. Aquest vector representa el balanç pels C metabòlits intracel·lulars en les J reaccions.

Aquesta notació facilita l'anàlisi de l'estequiometria de les reaccions doncs es poden realitzar operacions algebraiques per resoldre-les. Hi ha varis programaris que realitzen càlculs complexes d'operacions algebraiques i que ajuden a realitzar aquestes operacions de manera senzilla quan les matrius són de dimensió considerable. Quan s'ha formulat l'estequiometria en notació algebraica és senzill obtenir la participació dels diferents components en varies reaccions simplement observant la columna pel component en la matriu apropiada.

Balanç per elements

De la mateixa manera que es pot establir l'expressió del balanç per a cadascun dels C compostos, també es pot establir l'equació de conservació per a cadascun dels elements químics que constitueixen aquests compostos. Si bé la quantitat de mols de compostos no té per què ser una quantitat conservada, la quantitat de àtoms de cada element químic sí que ho ha de ser. Si s'anomena e_{ai} al nombre d'àtoms de l'element químic a en el compost i , llavors es pot establir l'equació del balanç per a cadascun dels elements químics que intervenen en el metabolisme cel·lular

$$E = S + A \quad 4-7$$

$$(S - E) + A = 0 \quad 4-8$$

$$\sum_{i=1}^{i=C} e_{ai} \left[(n_i^s - n_i^e) + \frac{dN_i}{dt} \right] = 0 \quad 4-9$$

Si això s'aplica per tots i cadascun dels elements químics presents a l'interior cel·lular s'arriba a l'expressió

$$\sum_{i=1}^{i=C} e_{li} \left[(n_i^s - n_i^e) + \frac{dN_i}{dt} \right] = 0$$

$$\sum_{i=1}^{i=C} e_{hi} \left[(n_i^s - n_i^e) + \frac{dN_i}{dt} \right] = 0 \quad 4-10$$

$$\sum_{i=1}^{i=C} e_{Ei} \left[(n_i^s - n_i^e) + \frac{dN_i}{dt} \right] = 0$$

o en notació matricial

$$\begin{pmatrix} e_{11} & \dots & \dots & e_{1C} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ e_{E1} & \dots & \dots & e_{EC} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} n_1^s - n_1^e \\ \dots \\ \dots \\ n_C^s - n_C^e \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \frac{dN_1}{dt} \\ \dots \\ \dots \\ \frac{dN_C}{dt} \end{pmatrix} = 0 \quad 4-11$$

que es representa simbòlicament com

$$E^T [q + a] = 0 \quad 4-12$$

on E és la matriu de composicions elementals definida per Roels (1983) i E^T és la seva transposta. E té tantes files com a compostos, C , i tantes columnes com a elements químics, E . Un element e_{hi} és el nombre d'àtoms de l'element h en el compost i , i és per això que tots els elements d' E han de ser més grans o iguals que zero. El fet de treballar amb la matriu transposta es deu a que el nombre de incògnites (els fluxos) és superior al d'equacions (balanços de matèria), i el càlcul es realitza pseudo-invertint la matriu estequiomètrica E .

Ara bé, tenint en compte l'equació 4.6 es pot escriure que

$$E^T S^T f = 0 \quad 4-13$$

El terme $E^T S^T f = 0$ s'ha de complir per a qualsevol vector f ja que en una reacció química el nombre d'àtoms d'un determinat element és una quantitat conservada. Per tant s'acomplirà que:

$$E^T S^T = 0 \quad 4-14$$

$$SE = 0 \quad 4-15$$

Hipòtesi de l'estat quasi-estacionari

Un dels inconvenients més grans que presenta l'aplicació de l'equació 4.6 és la necessitat de conèixer el terme d'acumulació intracel·lular, a . Afortunadament, en determinades circumstàncies, és possible simplificar l'equació 4.6. El cas més directe és el cultiu en continu. En aquest cas, donat que les mostres s'analitzen en els diferents estats estacionaris, el terme d'acumulació serà zero. En el cas del cultiu discontinu, en que les condicions van canviant al llarg del procés, el terme d'acumulació pot simplificar-se només quan es pot aplicar la hipòtesi de l'estat quasi-estacionari, el que es pot fer a la fase de creixement exponencial quan el creixement està balancejat. En general s'accepta que hi ha un gran recanvi de la majoria de metabòlits intracel·lulars. Com a resultat, la concentració dels diferents metabòlits del conjunt de reaccions s'ajusten ràpidament a nous nivells de concentració. Des d'aquest punt de vista es pot considerar que el conjunt de metabòlits intracel·lulars està en estat quasi-estacionari. Aquest fet implica que es pot considerar que no hi ha acumulació de metabòlits intracel·lulars.

Cada tipus de reacció i procés de transport que tenen lloc en una cèl·lula té un temps de relaxació característic. Aquest temps de relaxació és el temps que es triga en arribar a l'estat estacionari després d'una pertorbació. A la figura 4.3 es mostren els valors d'aquests temps per a diferents processos cel·lulars. L'aspecte a considerar és la relació entre l'escala de temps dels canvis en el medi ambient que envolta les cèl·lules en qüestió i els temps de relaxació dels processos cel·lulars. Els processos cel·lulars que responen molt ràpid als canvis ambientals es poden considerar en un estat quasi-estacionari. En l'altre extrem, quan els temps de relaxació per un procés cel·lular és molt més gran que l'escala de temps dels canvis ambientals es pot considerar que es mantenen en el seu estat inicial. Per

exemple, normalment no s'esperen canvis genètics significatius durant un cultiu discontinu.

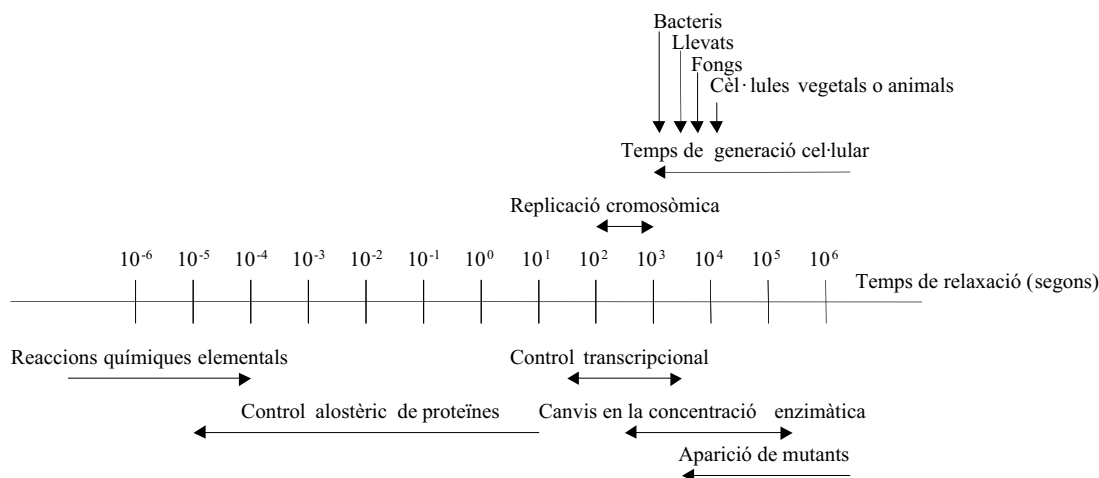


Figura 4.3. Temps de relaxació característics d'alguns processos biològics

Si bé és cert que, canvis en les concentracions extracel·lulars canvien la dinàmica metabòlica, observacions de la glucòlisi en cèl·lules quiescents ("resting cells") i extractes cel·lulars de *Sacharomyces cerevisiae* mostren que la regulació del metabolisme té lloc en segons (Rizzi *et al* 1997; Theobald *et al.* 1997). Donat que en els cultius en discontinu l'única font de variació de les concentracions extracel·lulars són les pròpies cèl·lules, aquestes variacions mai són sobtades, sinó suaus al llarg del temps. És a dir, la dinàmica dels canvis ambientals és molt més lenta que la dels canvis de concentració dels metabòlits intracel·lulars. Per tant, aquestes concentracions es poden considerar en un estat quasi-estacionari respecte les primeres. Es pot considerar doncs que, donat que la variació de les concentracions extracel·lulars és molt més lenta que la dinàmica de la regulació del metabolisme, les concentracions dels metabòlits intracel·lulars es troben en un estat quasi-estacionari i per tant es pot simplificar l'equació 4.6 eliminant el terme d'acumulació, amb el que l'expressió queda ara:

$$S^T \cdot f = q \quad 4-16$$

D'igual forma es pot eliminar el terme d'acumulació de l'equació 4.14 obtenint-se

$$E^T \cdot f = q \quad 4-17$$

L'equació 4.16 és l'equació del model que cal resoldre per a obtenir el valor dels fluxos metabòlics intracel·lulars.

Resolució matemàtica de l'equació $S^T \cdot f = q$

La resolució matemàtica de les equacions de fluxos representades per l'equació $S^T \cdot f = q$ i l'obtenció del conjunt de fluxos metabòlics intracel·lulars es basa en trobar el valor dels fluxos que satisfacin millor les velocitats de desaparició i aparició dels metabòlits extracel·lulars mesurats i la formació de nou material cel·lular. Es tracta de trobar els R components del vector f que fan que els errors entre les velocitats específiques trobades calculant $S^T \cdot f$ i les velocitats específiques experimentals sigui mínima. Aquesta és la funció objectiu a minimitzar. El procediment més usual per tal de trobar aquest conjunt de paràmetres és el mètode dels mínims quadrats. Es tracta de trobar el conjunt de fluxos, f_j , tal que facin mínima l'expressió:

$$x^2 = \sum_{i=1}^{i=C} \left(\frac{q_{estim} - q_{calc}}{\sigma_i} \right)^2 \quad 4-18$$

on χ^2 representa la llargada del vector de diferències entre els valors calculats i els valors experimentals, q_{estim} és la velocitat específica de consum o producció estimada a partir del model (fila i de la matriu estequiomètrica pel valor de flux estimat pel compost i), q_{calc} és la velocitat específica de consum o producció calculada experimentalment pel compost i , i σ_i la seva desviació estàndard.

Per tal de garantir que la solució s'ajusti bé a totes les velocitats mesurades, independentment de la seva magnitud, aquestes es normalitzen. Això es fa per mitjà d'un factor de pes: $10^2/q_i$. La utilització de pesos presenta una doble utilitat. Per una part dona compte dels diferents ordres de magnitud de les reaccions metabòliques. En segon lloc s'inclou l'absència d'acumulació de metabòlits intracel·lulars. Per aquells metabòlits que haurien de complir la hipòtesi de l'estat quasi-estacionari s'utilitza un factor de pes de 10^{-4} . Això implica que petites desviacions del compliment d'aquesta hipòtesi són fortament penalitzades.

Usualment, la matriu S presenta reaccions linealment dependents entre elles (Bonarius *et al.* 1996). Aquest fet es degut a la presència de cicles, com el cicle dels àcids tricarboxílics (CAT). Per tant, és necessària la utilització d'una restricció addicional per tal de trobar una solució única entre totes les possibles. La restricció emprada és que la solució ha de presentar la mínima norma euclidiana. Aquesta reacció és conseqüent amb la idea que el flux a través de les diferents rutes bioquímiques és proporcional a la seva importància (Bonarius *et al.* 1996; Zupke i Stephaopoulos, 1995). Els detalls de la resolució matemàtica (algorisme SVD de resolució de problemes d'ajust per mínims quadrats) queden fora de l'abast d'aquesta tesi, tot i que poden trobar-se en la literatura especialitzada (Press *et al.* 1992). En tot cas, aquest mètode dona la millor solució en el sentit d'error mínim quadràtic. En aquest treball s'ha emprat un programari específicament dissenyat per tal de trobar els valors de fluxos que s'ajusten millor a les dades experimentals. Aquest programari forma part del treball de Tesi Doctoral d'un company de grup (Paredes C. 1998. Anàlisi i redistribució dels fluxos metabòlics en cèl·lules animals. Dept. Enginyeria Química. UAB).

Una conseqüència de l'assumpció de l'estat quasi-estacionari és que només s'han de considerar els metabòlits posicionats en els punts de bifurcació d'una via metabòlica. Tots els passos de la via en seqüència de reacció linear poden ser agrupats, en el que s'anomena "lumping".

Un cop plantejada la base teòrica del model s'exposa a continuació la construcció dels elements que el caracteritzen: la construcció de la matriu estequiomètrica S^T , les determinacions experimentals i el càlcul del vector q de velocitats específiques de desaparició i aparició de productes metabòlics.

4.4. ESTABLIMENT DE LA XARXA METABÒLICA I CONSTRUCCIÓ DE LA MATRIU DE COEFICIENTS ESTEQUIOMÈTRICS

El primer requisit per a realitzar un tractament matemàtic del metabolisme és l'establiment de la xarxa metabòlica representativa de la cèl·lula en estudi i la seva representació en notació matricial.

El concepte de xarxa metabòlica és molt important en el sentit que té en compte tot el conjunt de reaccions de manera integrada més que no pas el d'un conjunt de reaccions bioquímiques aïllades. L'estequiometria del conjunt de reaccions que operen a *Escherichia coli* (xarxa metabòlica) es troba disponible a la bibliografia científica i, avui en dia, l'accés a aquest tipus d'informació s'ha vist enormement facilitat per la presència de bases de dades científiques a través d'internet. Si bé en un principi es va cercar aquest tipus d'informació en llibres de tipus més genèric (Lehninger, 1980; Alberts, 1989) i publicacions de divulgació científica (Neidhart Ed's., 1987) així com en cartes de rutes metabòliques com la de Boheringer Mannheim (Biochemical Pathways. 1992. Gerhard Michal Ed., 3^a edició.) o la de Sigma-Aldrich (P/N 3907), darrerament s'ha pogut accedir a bases de dades molt complertes que inclouen tota la informació publicada actualitzada. En aquest sentit, ha estat de gran utilitat la obtenció de tota la informació detallada sobre el metabolisme d'*Escherichia coli* en una base de dades anomenada Ecocyc (Karp *et al* 1996; <http://ecocyc.pangeasystems.com>) que està en permanent revisió i ampliació (versió 5.0; 1999).

S'entén per xarxa metabòlica el conjunt de reaccions bioquímiques integrades en vies o rutes metabòliques no aïllades. És a dir, es considera el metabolisme com un tot on cada reacció determinada d'una ruta o via metabòlica té un pes específic en la via i en la xarxa metabòlica d'aquell microorganisme o sistema cel·lular, en unes determinades condicions. S'entén per flux metabòlic la velocitat a la que un material és processat o convertit a través d'una via metabòlica. Tot i que el concepte de flux metabòlic no és nou *per se*, el concepte aplicat a una xarxa

metabòlica composta per un conjunt de reaccions integrades d'un microorganisme, i en especial, aplicat a l'anàlisi i control del fluxos metabòlics *in vivo*, és un enfoc nou enfatitzat per l'enginyeria metabòlica.

El punt de partida de l'anàlisi de fluxos metabòlics és la xarxa de reaccions estequiomètriques que descriu com els substrats són convertits en productes i constituents de la biomassa. El resultat global de la totalitat de les reaccions cel·lulars és la conversió de substrats en energia lliure i productes metabòlics com metabòlits primaris, productes més complexos com metabòlits secundaris, proteïna extracel·lular i constituents de la biomassa, i finalment proteïnes cel·lulars, àcids nucleics i lípids. Aquestes conversions inclouen un gran nombre de metabòlits, des dels precursors fins als constituents de la pròpia cèl·lula. Es poden diferenciar aquests metabòlits en:

- *Substrat*: substància present en el medi de cultiu estèril que pot ser metabolitzada o incorporada directament a la cèl·lula. Serien les fonts de carboni, nitrogen i energia i varis minerals essencials per les funcions cel·lulars. En molts casos només es consideren les fonts de carboni i nitrogen i en medis de cultiu definits simples es redueixen a glucosa i amoni.
- *Producte metabòlic*: substància produïda per les cèl·lules que és excretada al medi extracel·lular. Pot ser un metabòlit del metabolisme central com per exemple el diòxid de carboni, l'etanol, l'acetat o el lactat o bé un metabòlit del metabolisme secundari com una proteïna heteròloga secretada al medi.
- *Constituents de la biomassa*: són les macromolècules que constitueixen la pròpia cèl·lula. Inclou les proteïnes, els àcids nucleics, els lípids i carbohidrats, així com els productes que s'acumulen dins la cèl·lula com polisacàrids, biopolímers o proteïnes heteròlogues no secretades.
- *Metabòlits intracel·lulars*: són totes les altres substàncies intracel·lulars com els intermediaris de les diferents reaccions bioquímiques.

Aquesta distinció es basa en l'escala de temps del recanvi cel·lular d'aquestes substàncies. Els metabòlits petits, com els intermediaris glucolítics o els

aminoàcids, tenen un temps de recanvi molt ràpid en comparació amb les macromolècules. Es pot assumir l'estat quasi-estacionari per aquests respecte els primers. Per un altre costat, els constituents de la biomassa varien molt lentament durant el creixement i es poden considerar també en estat quasi-estacionari respecte el creixement.

El resultat global de la totalitat de les reaccions cel·lulars és la conversió de substrats en energia lliure i productes metabòlics. Per tal de procedir a la construcció de la matriu estequiomètrica S^T que donarà compte del metabolisme d'*Escherichia coli* cal definir en primer lloc quines són les reaccions més significatives o rellevants que conformaran la xarxa metabòlica del model. Cal considerar les vies degradatives del metabolisme que tenen lloc a partir dels substrats principals, així com la seva conversió anabòlica en els constituents del material cel·lular.

Al igual que tots els organismes vius, els bacteris requereixen per a créixer una font d'energia externa i tota una sèrie de composts d'on puguin obtenir el carboni, nitrogen, i ions inorgànics necessaris per a sintetitzar totes les molècules que conformen el material cel·lular.

La font de carboni entra a la cèl·lula a través d'un sistema específic de transport (Sistema de la fosfotransferasa: PTS) i alimenta les vies centrals del metabolisme (VCM) que suporten majoritàriament la producció de biomassa, energia i productes metabòlics. Aquestes vies són: la glucòlisi, la via de les pentoses fosfat i el cicle dels àcids tricarboxílics. A més a més s'han considerat una sèrie de reaccions que actuen de nexa d'unió entre les VCM com són la reacció catalitzada per la piruvat-deshidrogenasa (PDH) que catalitza la conversió de piruvat en Acetil-CoA i la fosfoenolpiruvat-carboxilasa (PEPC) que permet el reompliment del CAT a nivell de l'oxalacetat, ambdós nexa d'unió de la glucòlisi i el cicle dels àcids tricarboxílics (CAT).

Les VCM contenen uns 30 compostos, la majoria són composts fosforilats, alguns són àcids carboxílics, i dos són tiol-ésters del Coenzim A. La interconversió dels intermediaris està catalitzada per una sèrie d'enzims organitzats en les tres vies representatives de les VCM. El nombre d'enzims involucrats en les VCM és superior al d'intermediaris que hi participen, doncs moltes reaccions fan servir més d'un enzim segons la direcció en la que es donen. Moltes reaccions involucren, a més a més, cofactors com els fosfat de dinucleòtid d'adenina i nicotinamida, dinucleòtids de flavina i adenina o els tri-, di- o monofosfats d'anedosina: NADP/NADPH, FAD/FADH, ATP/ADP/AMP i, ions inorgànics com Mn^{2+} i PO_4^{4-} . Una part dels intermediaris de les VCM són precursors de la biosíntesi i cadascun d'ells és punt de partida per a la síntesi de monòmers. Aquests s'ensamblen en polímers per donar les macromolècules de la cèl·lula, que es poden agrupar en quatre grans grups: polisacàrids, lípids, proteïnes i àcids nucleics. Cada una d'aquestes classes de macromolècules es caracteritza pel tipus d'unitats bàsiques que s'han polimeritzat per formar-les: nucleòtids en el cas dels àcids nucleics, aminoàcids en el cas de les proteïnes i sucres simples (monosacàrids) en el cas dels polisacàrids. Els lípids són més heterogenis en quant a la seva composició. Els seus precursors són àcids grassos, polialcohols, sucres simples, amines o aminoàcids.

De manera simplificada es pot dir que amb unes 60 unitats bàsiques es podrien formar quasi totes les grans macromolècules d'una cèl·lula: per la síntesi de RNA cal combinar 4 bases nitrogenades, pel DNA quatre més, per a la síntesi de les proteïnes una combinació dels 20 aminoàcids naturals, pels polisacàrids una combinació de majoritàriament 15 sucres monosacàrids i pels lípids, amb unes 20 unitats bàsiques variables es poden sintetitzar quasi tots.

A més a més de les unitats bàsiques que formen els polímers, la cèl·lula ha de sintetitzar determinats compostos que juguen un paper important en la síntesi tant de les macromolècules com de les unitats bàsiques o monòmers. Aquests

compostos inclouen 20 cofactors o coenzims i els diferents components de la cadena de transport electrònic.

Aquests processos anabòlics requereixen, per a poder-se realitzar, energia en forma d' ATP i poder reductor [2H]. Alhora les VCM proveeixen reaccions de regeneració d'aquestes molècules en composts d'alta energia mitjançant les anomenades reaccions amfibòliques. El poder reductor generat és utilitzat en la cadena de transport electrònic cedint finalment els electrons a l'acceptor universal: l'oxigen molecular. El nivell de cofactors reduïts es manté constant gràcies al flux d'electrons i protons associat a través de la cadena de transport d'electrons (CTE), que permet la fosforilació oxidativa del ADP en ATP. Els cofactors són reciclats contínuament i així, el nivell d'aquests metabòlits es manté constant. Els composts d'alta energia són mantinguts per les VCM a través de reaccions bioquímiques acoblades a la síntesi o degradació dels intermediaris. L'entrada d'oxigen a la cèl·lula es dona des de l'aigua. L'oxigen molecular (O_2) no és utilitzat directament en les VCM, sinó que és utilitzat com a acceptor final d'electrons en la cadena de transport electrònic o cadena respiratòria. Aquesta cadena de transport d'electrons va associada a l'entrada de protons en contra de gradient i, és la reacció que permet la fosforilació de l'ADP per formar ATP en el metabolisme aeròbic (fosforilació oxidativa).

En conjunt, per tal de sintetitzar una nova cèl·lula es necessiten unes 150 molècules simples. La principal funció de les VCM és doncs proveir a la cèl·lula de precursors per a la biosíntesi de macromolècules i energia per el seu processament.

L'entrada de glucosa a les VCM ha de satisfer tots els fluxos derivats de les pròpies VCM. Aquestes han de satisfer la demanda de precursors en la quantitat requerida pel manteniment dels fluxos cap als monòmers i d'aquests cap als polímers. Com a mínim l'entrada de glucosa ha de satisfer la demanda d'ATP i [2H]

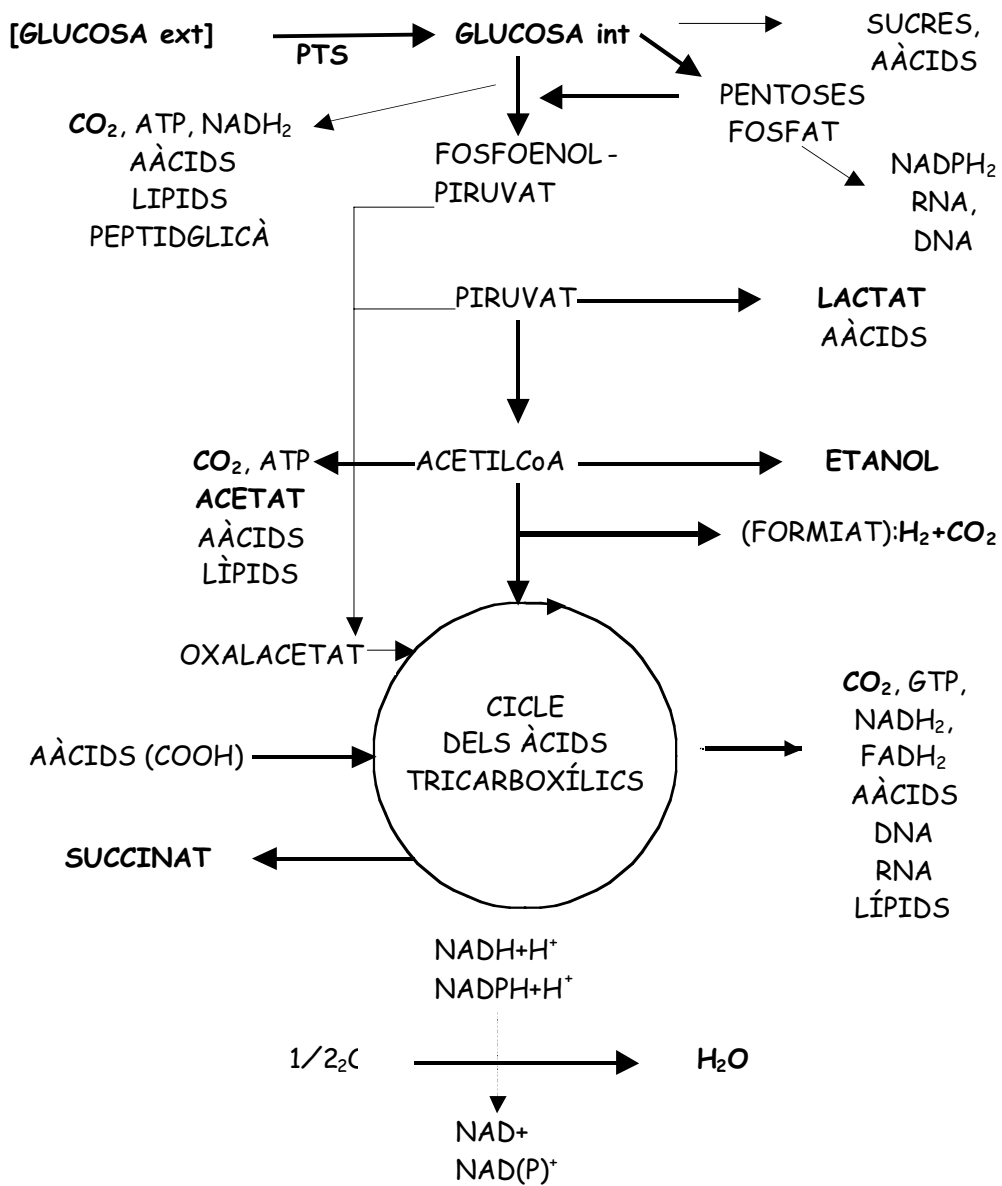


Figura 4.4: rutes bioquímiques considerades en l'elaboració de la xarxa metabòlica d'*Escherichia coli*: des de l'entrada del substrat principal (PTS), passant per la seva oxidació a les VCM (Glucòlisi i Cicle de les Pentoses), fins a la síntesi de monòmers a partir dels precursors (CAT i reaccions anabòliques) i mecanismes de generació d'energia (CTE).

La xarxa metabòlica considerada com a representativa del metabolisme d'*Escherichia coli* quan creix en medis de cultiu de composició totalment definida amb glucosa com a única font de carboni i energia va incloure finalment les rutes metabòliques següents:

Les vies centrals del metabolisme de la glucosa (VCM):

- glucòlisi o via d'Emden-Meyerhof (VEM)
- via dels fosfats de Pentoses o cicle de les pentoses (VFP)
- síntesi d'Acetil-CoA
- cicle dels àcids tricarboxílics (CAT)

Les vies d'obtenció/consum d'energia:

- fosforilació oxidativa
- cicle fútil de l'ATP

I a més a més, les reaccions següents:

- reacció anapleròtica de la fosfoenolpiruvat-carboxilasa (PEPC)
- via de síntesi de l'acetat

I, com a vies de síntesi del material cel·lular representatives del metabolisme anabòlic:

- síntesi de sucres o polisacàrids
- síntesi de fosfolípids de membrana (fosfatidiletanolamina i fosfatidilglicerol)
- via de síntesi i conversió de l'àcid tetrafòlic (cofactor en moltes reaccions de síntesi d'aminoàcids, purines i pirimidines)
- síntesi dels 20 aminoàcids naturals
- síntesi de corismat, àcid prefènic, àcid diaminopimelic, àcid aspartic- β -semialdehid, homoserina, àcid isovaleric i AICAR (intermediari de la síntesi d'histidina i purines) tots relacionats amb la síntesi de diferents aminoàcids.
- síntesi de proteïna segons la composició d'aminoàcids promig d'una proteïna d'*E.coli*

- síntesi dels àcids nucleics segons composició de nucleòtids promig del DNA i RNA d'*E.coli*.
- síntesi de Carbamilfosfat i 5-Ribosilpirofosfat relacionada amb la síntesi d'àcids nucleics
- assimilació d'amoníac
- assimilació de sulfat
- síntesi de pèptidglicà

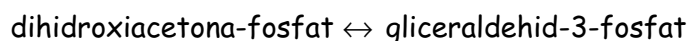
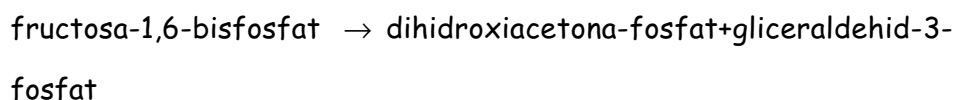
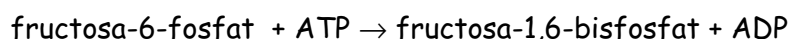
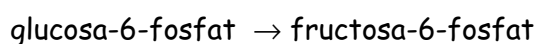
En totes aquestes reaccions es va incloure el balanç d'energia tant en forma d'ATP com de $\text{NADH} + \text{H}^+$ i FADH_2 . També es van considerar els fluxos dels principals elements: C, N, H, O, P i S.

Per tal de simplificar el tractament del model i, poder aplicar-lo a la pràctica, es van establir unes premisses amb l'objectiu de simplificar la xarxa metabòlica. Aquestes premisses foren:

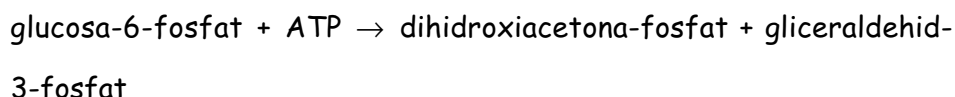
- Si un compost es produeix al llarg del cultiu no s'inclou la seva ruta de degradació.
- Si un compost es consumeix al llarg del cultiu no s'inclou la seva ruta de síntesi.
- No es consideren de forma explícita els processos de recanvi i degradació de material cel·lular donat que, en la fase creixement exponencial predominen els processos de síntesi de nou material cel·lular, per sobre dels de la seva degradació.
- Les soques d'*Escherichia coli* K12 no acumulen polímers de reserva quan el flux cap als donadors d'amines és suficient i, per tant, no es consideren les reaccions de síntesi de material de reserva (Holms, 1996).
- *Escherichia coli* no utilitza la via del glioxilat quan disposa de glucosa per obtenir precursors i energia (Holms i Bennet, 1970), i per tant, aquesta reacció no s'inclou.
- Donat que la major part de la massa cel·lular és aigua no s'inclou aquest compost en l'elaboració de la xarxa.

La xarxa metabòlica primària que es va considerar com a representativa del metabolisme d'*Escherichia coli*, contenia uns 180 compostos que intervenien en unes 200 reaccions químiques. Aquestes reaccions presenten majoritàriament un caràcter lineal, és a dir, l'esquelet carbonat de les molècules roman intacte, de tal forma que si es sumen i es substitueixen per la reacció global, no es produeix una pèrdua significativa d'informació i, al mateix temps, s'elimina un compost i una reacció, rebaixant així la complexitat del sistema resultant. Idealment, aquest procés d'eliminació es pot aplicar fins a trobar un conjunt d'espècies que siguin productes en una o més reaccions i reactius en més d'una reacció, excepte alguns compostos que són substrats inicials d'una ruta degradativa.

Per exemple, les reaccions implicades en la transformació de glucosa-6-fosfat a gliceraldehid-3-fosfat són:



Si es sumen aquestes tres reaccions, la reacció global serà:



eliminant-se així dos compostos i dues reaccions si tenint en compte, a més a més, que la DHA-P i el GA-3-P són isòmers i que la reacció d'isomerització és molt ràpida i reversible. La utilització d'aquesta estratègia de simplificació va permetre reduir el nombre de compostos i reaccions que intervenen en la xarxa metabòlica a 71 compostos que intervenen en 59 reaccions. El llistat d'aquestes reaccions es presenta a continuació.

Reaccions de la xarxa del metabolisme d'*Escherichia coli*

PTS i glucòlisi (Embden-Meyerhof)

- (r26) $\text{Glc} + \text{PEP} \leftrightarrow \text{G6P} + \text{Pir}$
 (r27) $\text{G6P} \leftrightarrow \text{F6P}$
 (r28) $\text{F6P} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{G3P} + \text{DHAP} + \text{ADP}$
 (r29) $\text{G3P} \leftrightarrow \text{DHAP}$
 (r30) $\text{G3P} + \text{ADP} + \text{NAD}^+ + \text{Pi} \leftrightarrow \text{3PGli} + \text{ATP} + (\text{NADH} + \text{H}^+)$
 (r31) $\text{3PGli} \leftrightarrow \text{PEP} + \text{H}_2\text{O}$
 (r32) $\text{PEP} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{Pir} + \text{ATP}$

Cicle de les pentoses

- (r41) $\text{G6P} + 2 \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2 (\text{NADPH} + \text{H}^+) + 2 \text{H}^+ + \text{R5P}$
 (r43) $2 \text{ATP} + 3 \text{R5P} \leftrightarrow 2 \text{ADP} + 5 \text{G3P}$

Producció d'acetil-CoA

- (r46) $\text{Pir} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{AcCoA} + (\text{NADH} + \text{H}^+) + \text{CO}_2$

Síntesi d'acetat

- (r56) $\text{AcCoA} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HAc} + \text{CoA}$

Cicle dels àcids tricarboxílics (CAT)

- (r47) $\text{AcCoA} + \text{OAA} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \alpha\text{-KG} + \text{CoA} + \text{CO}_2 + (\text{NADH} + \text{H}^+)$
 (r48) $\alpha\text{-KG} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{CO}_2 + (\text{NADH} + \text{H}^+) + \text{SucCoA}$
 (r49) $\text{ADP} + \text{Pi} + \text{SucCoA} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{CoA-SH} + \text{Suc}$
 (r50) $\text{FAD}^+ + \text{Suc} \leftrightarrow (\text{FADH} + \text{H}^+) + \text{Fum}$
 (r51) $\text{Fum} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow (\text{NADH} + \text{H}^+) + \text{OAA}$

Cadena de transport electrons i fosforilació oxidativa

- (r52) $3 \text{ADP} + (\text{NADH} + \text{H}^+) + 0.5 \text{O}_2 + 3 \text{Pi} \leftrightarrow 3 \text{ATP} + \text{NAD}^+ + 4 \text{H}_2\text{O}$
 (r53) $2 \text{ADP} + (\text{FADH} + \text{H}^+) + 0.5 \text{O}_2 + 2 \text{Pi} \leftrightarrow 2 \text{ATP} + \text{FAD}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$

Cicles fútils

- (r57) $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$

Reacció anapleròtica de la PEPC

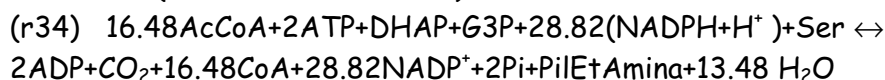
- (r58) $\text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{OAA} + \text{Pi}$

Biosíntesi de glúcids

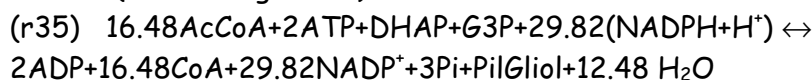
- (r45) $\text{G6P} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PoliSac} + \text{Pi}$
-

Biosíntesi de lípids

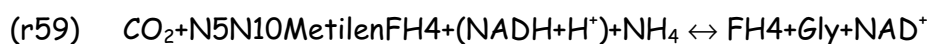
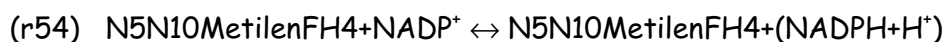
PilEtamina (Fosfatidiletanolamina)



PilGicol (Fosfatidilglicèrid)

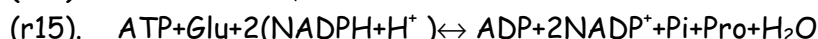
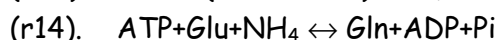
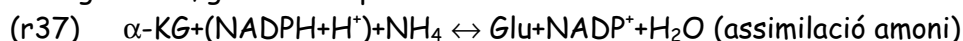


Síntesi i conversió de cofactors (tetrahidrofolat)

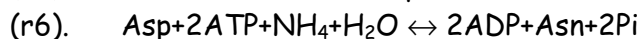
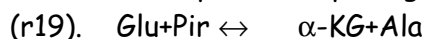


Biosíntesi d'aminoàcids

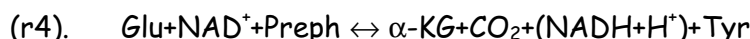
Àcid glutàmic, glutamina i prolina



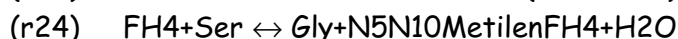
Alanina, àc. aspàrtic i asparragina



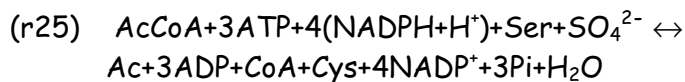
Tirosina



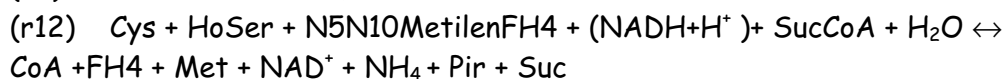
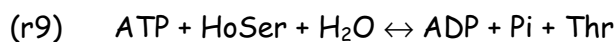
Serina i glicina



Cisteina



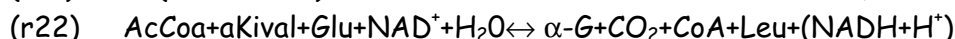
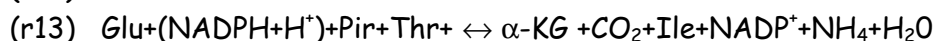
Treonina i metionina



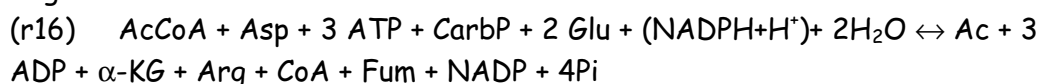
Lisina



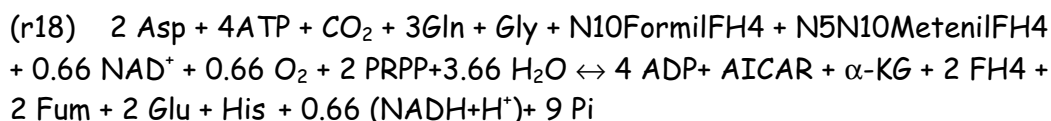
Valina, isoleucina i leucina



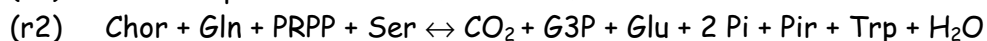
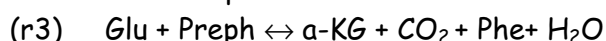
Arginina



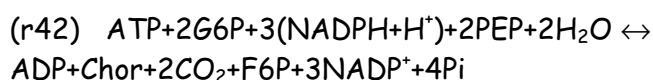
Histidina



Fenilalanina i triptòfan



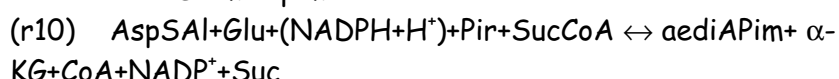
Síntesi corismat



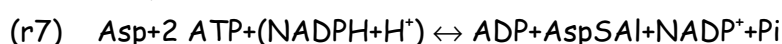
Síntesi àcid prefènic



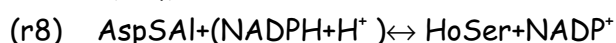
Síntesi àcid Diaminopimèlic



Síntesi Aspartic-semialdehid



Síntesi Homoserina

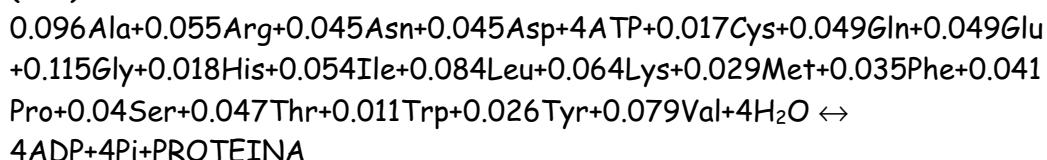


Síntesi àcid Isovaleric



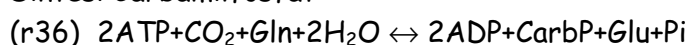
Biosíntesi de proteïnes

(r44)



Biosíntesi d'àcids nucleics

Síntesi Carbamilfosfat



Síntesi 5-Ribosilpirofosfat



Síntesi DNA

(r39)

$$0.5\text{AICAR} + 0.746\text{Asp} + 3.016\text{ATP} + 0.5\text{CarbP} + 0.508\text{Gln} + 0.5\text{N10FormilFH4} + 0.246\text{N5N10MetilenFH4} + 0.59\text{NAD} + 1.492(\text{NADPH} + \text{H}^+) + 0.082\text{O}_2 + 0.5\text{PRPP} \leftrightarrow 3.016\text{ADP} + 0.5$$

$$\text{CO}_2 + \text{DNA} + 0.746\text{FH4} + 0.246\text{Fum} + 0.508\text{Glu} + 0.59(\text{NADH} + \text{H}^+) + 1.49\text{NADP}^+ + 4.156\text{Pi} + 0.64\text{H}_2\text{O}$$

Síntesi RNA

(r40)

$$0.5841\text{AICAR} + 0.6778\text{Asp} + 2.582\text{ATP} + 0.4159\text{CarbP} + 0.522\text{Gln} + 0.5841\text{N10FormilFH4} + 0.5635\text{NAD}^+ + 0.0873\text{O}_2 + 0.4159\text{PRPP} \leftrightarrow 2.5825\text{ADP} + 0.4159\text{CO}_2 + \text{RNA} + 0.5841\text{FH4} + 0.2619\text{Fum} + 0.5222\text{Glu} + 0.5635(\text{NADH} + \text{H}^+) + 3.8302\text{Pi} + 0.1159\text{H}_2\text{O}$$

Síntesi AICAR (aminoimidazol carboxamide ribonucleotide: intermediari síntesi His i Purines)

(r38) $\text{Asp} + 4\text{ATP} + \text{CO}_2 + 2\text{Gln} + \text{Gly} + \text{N5N10MetilenFH4} + \text{PRPP} + 4\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 4\text{ADP} + \text{AICAR} + \text{FH4} + \text{Fum} + 2\text{Glu} + 6\text{Pi}$

Biosíntesi de pèptidglicà

(r33) $2\text{AcCoA} + \text{aediAPim} + 3\text{Ala} + 7\text{ATP} + 2\text{F6P} + 2\text{Gln} + (\text{NADPH} + \text{H}^+) + \text{PEP} + 3\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 7\text{ADP} + 2\text{CoA} + \text{Glu} + \text{NADP} + \text{Pepglicà} + 10\text{Pi}$

Taula 4.1: Llistat de les 59 reaccions representatives del metabolisme aerobi d'*Escherichia coli* considerades en l'elaboració de la xarxa del model. Les reaccions s'han ordenat per grups de reaccions o rutes metabòliques per a una major facilitat d'exposició i comprensió. Entre parèntesi s'indica el número de la reacció del model. En aquesta taula hi intervenen els 71 metabòlits considerats.

Un cop es disposa de totes les reaccions representatives de la xarxa metabòlica i de tots els metabòlits que hi participen, es construeix la matriu dels coeficients estequiomètrics. La matriu estequiomètrica del model desenvolupat en aquest treball té per dimensions 71 files i 59 columnes, que es corresponen amb els 71 metabòlits que participen en les 59 reaccions considerades. Per a cada compost que participa en una reacció, s'introdueix el seu coeficient estequiomètric en la columna corresponent a la reacció considerada: el coeficient pren valor negatiu o positiu segons sigui un reactant o un producte, respectivament, o bé, si no participa en la reacció, pren el valor zero. Donada la grandària de la matriu estequiomètrica,

no s'inclou aquesta en la present memòria. A tall d'exemple es mostra els valors de la matriu corresponents a les primeres reaccions de taula 4.1.

GLC	G6P	F6P	FDP	6PG	3PG	G3P	..	PEP	PIR	..	ATP	
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	(r1 a 25)
-1	+1	0	0	0	0	0	..	-1	+1	..	0	(r26)PTS
0	-1	+1	0	0	0	0	..	0	0	..	0	(r27) G6P↔F6P
0	0	-1	0	0	0	2	..	0	0	..	-1	(r28) F6P↔G3P
..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	(r29 a 59)

Figura 4.5: Exemple de la matriu estequiomètrica *S*. Es mostren les reaccions 25, 26, 27 i 28 que intervenen en la captació de glucosa i en les tres primeres reaccions considerades de la glucòlisi i les espècies que intervenen en aquestes reaccions. Per exemple en la reacció 26, per cada molècula de glucosa incorporada (coef. -1) es genera una molècula de glucosa-6-fosfat (coef. +1) amb el concurs d'una molècula de fosfoenolpiruvat (coef. -1) que rendeix una molècula de piruvat (coef.+1);

4.5. VECTOR DE VELOCITATS ESPECÍFIQUES q

L'estequiometria presentada fins ara descriu les quantitats relatives dels metabòlits consumits o produïts en cada reacció intracel·lular considerada però, no permet encara calcular la velocitat relativa de les reaccions a la qual, els productes metabòlics són excretats al medi. Per a realitzar aquest càlcul s'ha d'introduir la velocitat de cada reacció individual i, acoblar-les totes per obtenir la velocitat global de la reacció que porta a la producció del metabòlit en qüestió.

El vector de velocitats específiques de consum i producció de metabòlits q , s'obté a partir de les dades experimentals de mesures fisiològiques extracel·lulars d'un cultiu discontinu en medi mineral definit amb glucosa com a únic substrat (ahora font de carboni i energia). Durant l'interval del creixement en que la fase

exponencial es dona a velocitat específica de creixement màxima i constant, es pot considerar que el metabolisme intracel·lular està en estat estacionari respecte els canvis ambientals (hipòtesi de l'estat quasi-estacionari, exposada a l'apartat 4.3). En aquesta fase, els processos d'acumulació de metabòlits intracel·lulars són poc importants, de fet despreciables, ja que l'activitat cel·lular es troba dirigida vers la generació de noves cèl·lules. El fet que no hi hagi acumulació intracel·lular de cap dels productes intermediaris del metabolisme fa que la velocitat de síntesi de qualsevol d'aquests compostos pugui considerar-se, de manera raonable, igual a la seva velocitat neta de consum. Així doncs, els elements del vector q corresponents als compostos intermedis intracel·lulars seran zero, no així els seus fluxos individuals. A més a més, per a cèl·lules procariotes en creixement es pot considerar que no hi ha pràcticament metabolisme de manteniment (Varma i Palsson, 1993).

Per un reactor discontinu de tanc agitat el balanç de matèria aplicat a les cèl·lules és

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad 4-18$$

on μ és la velocitat específica de creixement en h^{-1} , X és la concentració de cèl·lules en g PSC/l i t és el temps en hores. Pel cas d'un compost C qualsevol i menyspreant la variació del seu contingut intracel·lular es pot escriure que:

$$\frac{dC}{dt} = q_C 10^{-3} X \quad 4-19$$

on q_c és la velocitat específica de consum o producció (Pirt, 1975) del compost C , en $\mu\text{mols/g PSC} \cdot h$ i, C és la concentració del compost estudiat en el temps t en mM.

La integració de totes dues equacions entre un temps inicial igual a zero amb una concentració cel·lular inicial X_0 i de compost C_0 , i uns límits genèrics porta a

$$X = X_0 \exp(\mu \cdot t) \quad 4.20$$

que representa la concentració de biomassa en un moment donat en funció de la concentració inicial de biomassa, la velocitat de creixement i el temps transcorregut, que aplicant a un compost (substituint els termes X i X_0 per C i C_0 i tenint en compte la variació de C deguda al creixement) queda

$$C = C_0 + \frac{q_C 10^{-3} X_0}{\mu} [\exp(\mu t) - 1] \quad 4.21$$

A partir de la velocitat de creixement és possible calcular la velocitat de producció dels diferents compostos que formen una cèl·lula per mitjà de l'expressió

$$q_{MC} = \frac{\mu n \alpha_{MC}}{FW_{MC}} 10^9 \quad 4.22$$

on n és el pes sec en grams, α_{MC} són els grams del constituent cel·lular per gram de pes sec i FW_{MC} és el pes fórmula del constituent cel·lular considerat

En el nostre cas només és possible trobar un valor experimental per a un nombre limitat de velocitats específiques de consum i/o producció. A partir de les mesures experimentals es calculen les velocitats específiques de producció del material cel·lular (μ), de consum de glucosa (q_{glc}) i de formació de subproductes del metabolisme, com l'acetat (q_{Ac}), com es descriu a l'apartat 4.7, fet que permet disposar dels corresponents valors de q . La resta de velocitats específiques, és a dir, dels metabòlits no mesurats directament, com el PO_4 , SO_4 i NH_3 , CO_2 , O_2 i H_2O s'obtenen d'una estimació a partir dels valors que proporciona el model, de manera que es quadrin els balanços elementals dels diferents elements. El model de fluxos que es presenta té per objectiu trobar els components del vector f que

fan que els errors entre les velocitats específiques calculades a partir del model i les velocitats específiques obtingudes experimentalment sigui mínim (funció objectiu: apartat 4.3)

Els fluxos que descriuen la velocitat a la qual és captat un substrat, convertit en producte, o excretat un subproducte, s'expressen en mmols/g PSC· h (o mmols/g·h).

Tant la xarxa metabòlica simplificada com les reaccions de les quals es determinen els fluxos es troben representats esquemàticament (en forma de diagrama) a la figura 4.9. Els resultats numèrics dels fluxos estimats per aquesta tècnica dels diferents cultius en discontinu que s'han realitzat, tant de la soca d' *Escherichia coli* salvatge com de les soques genèticament modificades es presenten en els següents apartats i en el darrer capítol.

S'ha de tenir en compte una sèrie de consideracions a l'hora de calcular les velocitats específiques de consum dels substrats, producció dels productes metabòlics o formació neta dels components de la biomassa (tant constituents com metabòlits intermediaris) segons el mode d'operació en bioreactor que s'hagi utilitzat per obtenir les dades experimentals:

- Una primera consideració és que, excepte en el cultiu en continu en condicions d'estat estacionari, la determinació de les velocitats específiques requereix el càlcul de derivades en el temps de concentracions. Aquestes derivades es poden obtenir a partir del pendent de la tangent a la corba de mesures de concentració obtingudes. Aquests càlculs poden comportar estimacions dolentes si les dades són massa espaiades o contenen soroll.

- Una altra consideració és obtenir una bona representació de les dades experimentals i calcular les velocitats específiques a partir de les funcions ajustades per regressió. Com que la majoria de processos segueixen comportaments exponencials, una bona aproximació, especialment per anàlisi de dades obtingudes de cultius en discontinu, és l'ús de models simples, com el model de Monod, que permet l'ajust de paràmetres i el càlcul directe de les velocitats específiques a partir del model. Com que els models com el de Monod són empírics en la natura, aquesta aproximació és, en principi, la mateixa que s'obtingria per altres ajustos de les dades experimentals.

4.6. COMPOSICIÓ CEL·LULAR

La composició bioquímica elemental d'una cèl·lula ens indica quins són els principals requeriments nutritius pel creixement. L'aigua suposa un 80-90 % del pes humit total de la cèl·lula i és, per tant, el component majoritari en termes quantitativs. La resta de material cel·lular es troba constituït per no més de deu elements. La matèria sòlida de les cèl·lules conté oxigen, hidrogen, carboni, nitrogen, fòsfor i sofre majoritàriament. Aquests elements suposen en conjunt més del 95% del pes sec total de la cèl·lula. A més d'aquests sis elements anomenats macroelements, hi ha tota una sèrie de nutrients també essencials requerits en quantitats més petites, els anomenats microelements. Són el potassi, magnesi, calci, ferro, manganès, cobalt, coure, molibdè, i zinc principalment. La composició de la biomassa pot expressar-se de dues formes:

- en funció dels elements: composició en C, H, O, N...
- en funció dels principals components bioquímics: composició de proteïnes, glúcids, lípids, àcids nucleics...

La composició bioquímica de la biomassa, així com la composició elemental varien en funció de les condicions de creixement. Una primera suposició general que s'utilitza en els models estequiomètrics és que, per unes mateixes condicions de creixement, la composició de la biomassa no varia (Neidhardt, 1987). La composició cel·lular

utilitzada en aquest treball es troba recollida en la taula 4.2. Aquesta composició deriva de la presentada per Neidhardt (1987).

La composició cel·lular és el que, en últim terme, determina la distribució dels fluxos metabòlics des dels substrats a través de les vies metabòliques de degradació, fins a les de síntesi de material cel·lular, destí final que ve representat per la mateixa composició cel·lular. En la següent taula es mostra la composició mitjana d'una cèl·lula d'*Escherichia coli*, considerant que el material cel·lular està constituït per un representant de cada grup i, expressant-la en tants per cent.

Component	% Pes sec
Proteïna	57,23
RNA	21,33
Fosfatidiletanolamina	8,87
Fosfatidilglicerol	2,42
Peptidglicà	2,60
Carbohidrats	4,32
DNA	3,23

Taula 4.2: Composició bioquímica elemental cel·lular mitjana d'una cèl·lula d'*Escherichia coli*.

De la mateixa font anterior (Neidhardt, 1987), s'obté la composició mitjana de cadascun dels components pels grups de molècules considerats: proteïnes, lípids i àcids nucleics, i a partir d'aquestes s'arriba a la composició elemental de la biomassa. En la taula següent s'especifiquen les formules moleculars pels constituents cel·lulars:

Compost	C	H	N	O	P	S	Pes Mol.
Proteïnes	4,792	9,668	1,370	2,396	0	0,046	126,16
RNA	9,584	12,307	3,952	6,954	1	0	324,912
DNA	9,746	12,738	3,754	6,00	1	0	309,246
Pep-glicà	40,00	64,00	8,00	18,00	0	0	944,0
Sucres	6,0	12,0	0	6,0	0	0	180,0
Pil-Etamina	37,96	73,64	1,00	8,00	1	0	702,16
Pil-glicer	38,96	74,64	0	10,00	1	0	733,16

Taula 4.3: Formula molecular dels components d' *Escherichia coli*.

Aquestes composicions tipus combinades amb el percentatge de cadascuna d'aquestes espècies permet calcular la següent formula empírica per una cèl·lula d' *Escherichia coli*.

	C	H	N	O	P	S	Pes.Mol.
Model	1,00	1,84	0,25	0,51	0,02	0,006	(26,536)n

Taula 4.4: Formula empírica basada en la composició elemental de la biomassa per una cèl·lula d' *Escherichia coli*.

La composició elemental de la biomassa permet definir el destí final de cadascun dels elements presents al medi de cultiu. Coneixent la composició del medi de cultiu, els elements que han anat a parar a subproductes metabòlics i tenint en compte la composició elemental presentada es poden ajustar els balanços de matèria a través de la xarxa metabòlica. Ara bé, per estimar els fluxos metabòlics cal tenir en compte les velocitats de formació i desaparició de cadascun dels components. Per això ens cal introduir el càlcul de les velocitats específiques de consum i producció que en el model ve representat pel vector q de velocitats específiques exposat anteriorment.

4.7. OBTENCIÓ DELS FLUXOS METABÒLICS INTRACEL·LULARS D'*Escherichia coli* K12 EN CULTIU DISCONTINU

Per tal d'obtenir mesures extracel·lulars i comprovar la capacitat del model de descriure la fisiologia i el metabolisme *in vivo* d'*Escherichia coli*, es van utilitzar les dades del cultiu en discontinu en bioreactor en medi mineral salí definit M9E, amb glucosa com a única font de carboni i energia i, en condicions de creixement aeròbic (figura 3.8). Les figures 4.6, 4.7 i 4.8 mostren els perfils de les dades experimentals del cultiu per concentració de biomassa, glucosa i acetat. Amb els valors recollits es van calcular tant la velocitat específica de creixement com les velocitats específiques de consum de glucosa i de producció d'acetat.

Donat que no hi ha acumulació de metabòlits intracel·lulars, la quantitat de matèria consumida ha de ser igual a la quantitat de matèria produïda. La verificació experimental de l'equació 4.16 només pot dur-se a terme si es mesuren tots els compostos consumits o produïts durant el cultiu. Aquest objectiu és del tot inabastable. Determinats compostos es produeixen en nivells tant petits que seria impossible detectar-los per mitjà d'anàlisis rutinaris. D'igual forma la mesura de compostos com per exemple l'aigua produïda durant el creixement cel·lular és de difícil implementació. El càlcul rigorós del vector q requereix l'optimització simultània de les equacions 4-20 de creixement, 4-21 de metabòlits com la glucosa, i 4-26 de material cel·lular. Donat que les equacions 4-21 i 4-26 es poden aplicar a més d'un metabòlit o component cel·lular, el sistema a optimitzar és de considerables dimensions. A més a més, cal recordar que l'equació matricial 4-16 no és res més que un conjunt de condicions de restricció.

Donada la dificultat de càlcul rigorós del vector q s'ha proposat el següent procediment:

- Determinació no experimental de la composició cel·lular.
- Ajust de l'equació 4-20 a les dades de creixement cel·lular.
- Ajust de l'equació 4-21 a les dades de cadascun dels metabòlits pels quals és aplicable.

- Ajust de l'equació 4-26 considerant com a material cel·lular la fórmula empírica de la soca, extreta de les dades bibliogràfiques.
- Càlcul dels elements del vector q per aquells compostos no mesurables: H_2O , O_2 , CO_2 , PO_4 , SO_4 i NH_3 , per mitjà de l'equació 4-16.
- Tots els cofactors, en l'estat estacionari de creixement, es mantenen constants per regeneració i per tant com que no hi ha un canvi net de concentració s'ignoren.

Emprant aquest procediment és possible arribar a complir el balanç de C, H, O i N.

En la següent taula es mostren els resultats durant l'interval de creixement considerat (3 a 6 hores d'edat de la població) que formen els elements del vector q determinats experimentalment:

Paràmetre	Valor
$\mu \quad (h^{-1})$	0.5173
$q_{glc} \quad (\mu mol/(h \cdot g \text{ PSC}))$	-9954.27
$q_{HAc} \quad (\mu mol/(h \cdot g \text{ PSC}))$	3525.42

Taula 4.5. Paràmetres del cultiu d'*Escherichia coli*: velocitat específica de creixement, i velocitats específiques de consum de glucosa i producció d'acetat.

En base a la fórmula empírica del microorganisme (taula 4.4) i per mitjà dels balanços elementals es possible estimar les velocitats específiques de la resta de termes de l'equació de creixement tal i com es mostra a la taula 4.6.

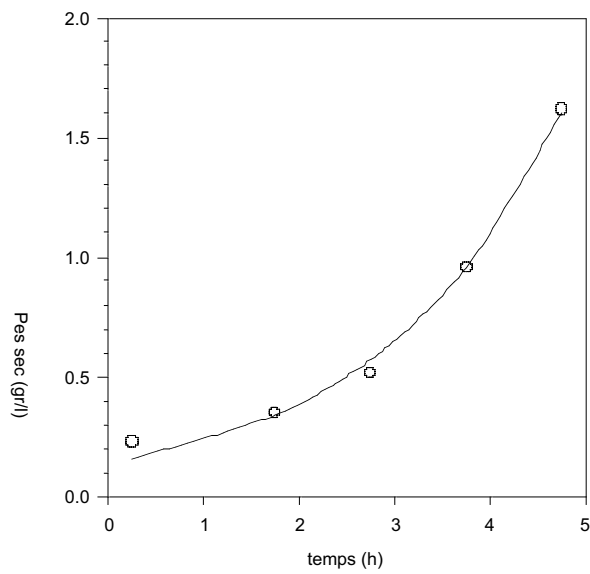


Figura 4.6. Perfil de creixement del cultiu d'*Escherichia coli*.

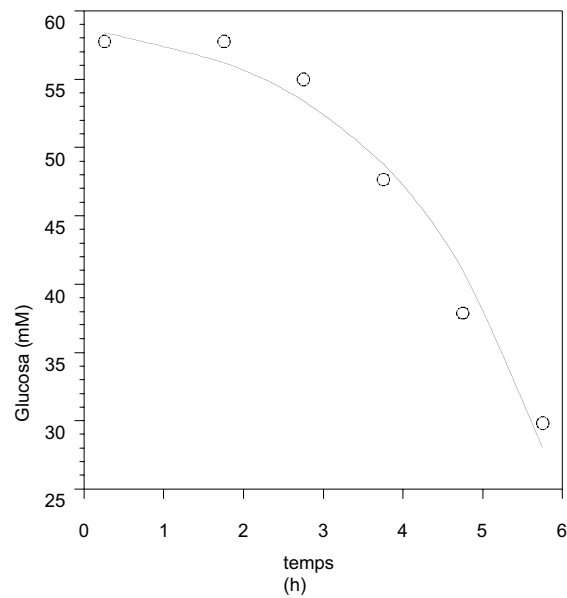


Figura 4.7. Perfil de consum de glucosa per un cultiu d'*Escherichia coli*

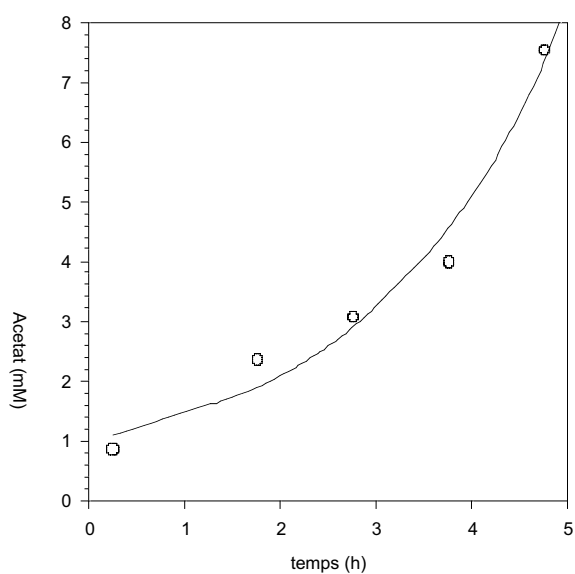


Figura 4.8. Perfil de producció d'acetat en un cultiu d'*Escherichia coli*.

Compost	Fórmula	q ($\mu\text{mols/g} \cdot \text{h}$)
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	-9954.27
Acetat	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	3525.42
Fosfòric	H_3PO_4	-476.09
Sulfúric	H_2SO_4	-107.98
Ammoniac	NH_3	-4938.36
Oxigen	O_2	-12153.33
CO_2	CO_2	13215.24
Aigua	H_2O	22923.17
Cèl·lules	$\text{C}_1\text{H}_{1.84}\text{N}_{0.25}\text{O}_{0.51}\text{P}_{0.02}\text{S}_{0.006}$	19494.76

Taula 4.6. Valors de les velocitats específiques de consum o producció, q , obtingudes a partir d'un cultiu d'*Escherichia coli* creixent en glucosa.

Amb la matriu S^T construïda anteriorment, formada pels coeficients estequiomètrics corresponents a les 71 espècies que participen en les 59 reaccions

considerades en la xarxa i el vector q , calculat a partir de les dades de mesures extracel·lulars per ajust de la recta de regressió es resol el sistema representat per l'equació 4-16, obtenint-se el conjunt de fluxos metabòlics intracel·lulars de la soca d'*Escherichia coli* estudiada (el conjunt complet dels fluxos es pot trobar a l'Annex 2). Els resultats es mostren en forma de diagrama de fluxos a la figura 4.9, expressats en mmols/g PSC·h, i el seu significat es discuteix al següent apartat.

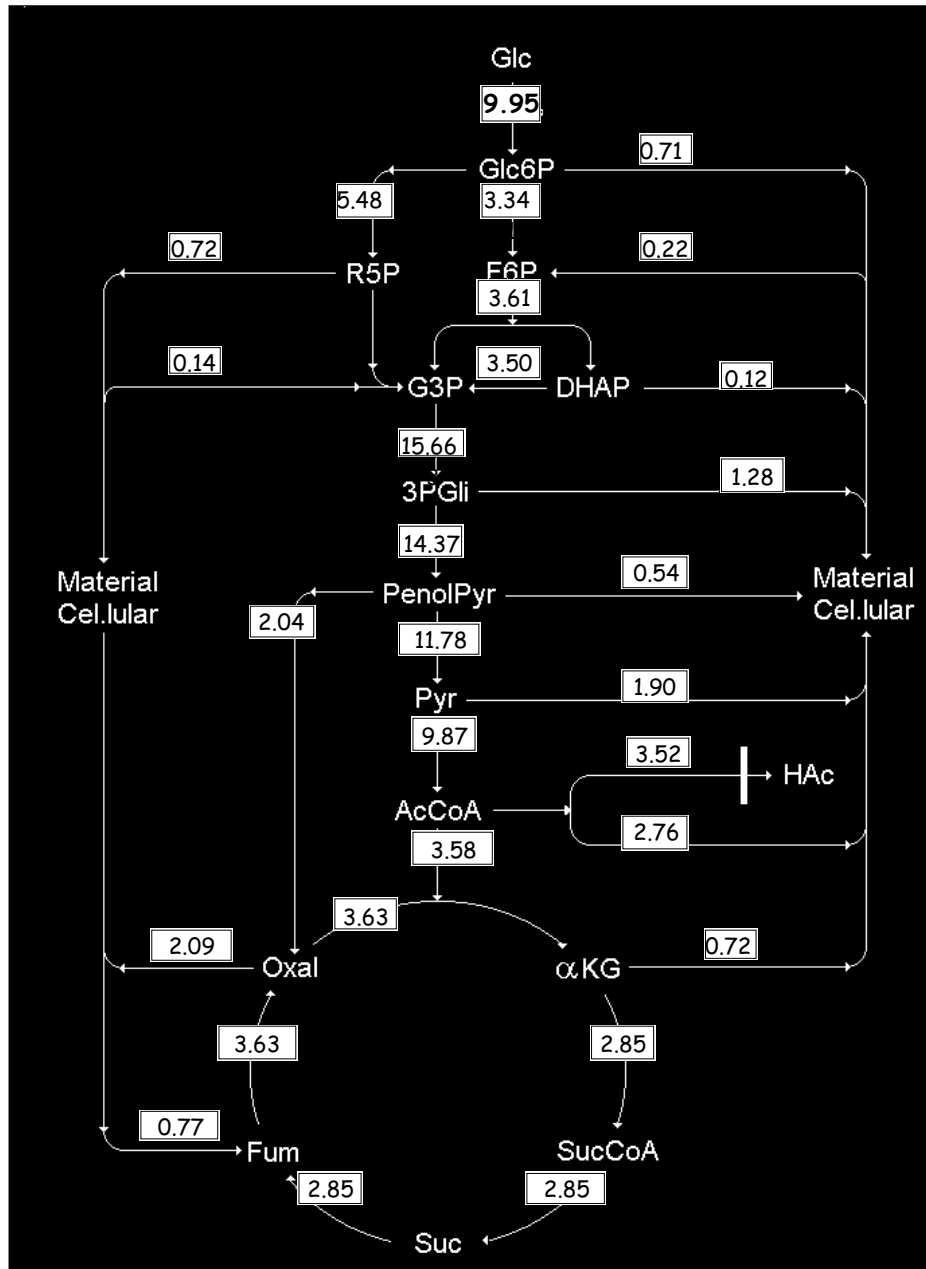


Figura 4.9: Distribució de fluxos metabòlics estimats per a un cultiu discontinu de la soca d'*Escherichia coli* K12. Només es mostren els metabòlits directament

associats als punts de bifurcació de les vies considerades pel balanç de matèria de la xarxa metabòlica del model estequiomètric.

4.8. DISTRIBUCIÓ DELS FLUXOS METABÒLICS DURANT EL CREIXEMENT AERÒBIC D' *Escherichia coli*

El flux de glucosa que entra a la cèl·lula a través del sistema de transport de la fosfotransferasa (PTS) fou de 9.95 mmols/g·h. Aquest valor de flux coincideix amb el flux de conversió de glucosa en glucosa-6-fosfat (G6P). A partir d'aquest primer intermediari fosforilat, els carbonis de la glucosa poden seguir diferents camins: bé seguir la glucòlisi convertint-se en fructosa-6-fosfat (F6P), bé incorporar-se al cicle de les pentoses (VFP) o bé servir de precursor per a la síntesi de material cel·lular.

Segons el diagrama de fluxos estimats, 5.48 mmols $g^{-1} h^{-1}$ de G6P entren al cicle de les pentoses on serveixen bàsicament per a la síntesi de ribulosa-5-fosfat (R5P) i altres sucres de 3, 4 i 5 carbonis (Rb5P i X5P) i, en últim terme, generen els esquelets carbonatats dels àcids nucleics: les purines i pirimidines que participen en la síntesi del RNA i del DNA. A més de generar gran quantitat de NADPH, aquesta via també proveeix de components als esquelets d'aminoàcids com la histidina i el triptòfan, i participa en la síntesi de folats i del Coenzim A. D'aquesta ruta cíclica en retornen a la glucòlisi en forma de gliceraldehid-3-fosfat (G3P) 8.53 mmols $g^{-1} h^{-1}$ dels 5.48 mmols $g^{-1} h^{-1}$ de sucres de 6 carbonis que havien entrat.

De la glucosa que flueix directament a fructosa-6-fosfat (F6P) 3.61 mmols $g^{-1} h^{-1}$ van cap dihidroxiacetona-fosfat (DHAP) i el mateix nombre cap a gliceraldehid-3-fosfat (G3P). D'aquests, per acció de la glicerofosfat-deshidrogenasa, es gasten 0.12 per a la síntesi de fosfat de glicerol que s'utilitza per a la síntesi de lípids. La resta es reincorpora a la glucòlisi, que junt amb els que provenen del cicle de les pentoses, donen un flux net cap a 3-fosfoglicerat de 15.66 mmols $g^{-1} h^{-1}$. La

glucòlisi, com es pot observar, absorbeix la major part de la glucosa que entra a la cèl·lula, com així ho indica el valor d'aquest flux.

D'aquests $15.66 \text{ mmols g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de 3-fosfoglicerat, 1.28 flueixen cap a la síntesi de material cel·lular (serina, glicina, cisteïna, triptòfan i purines principalment) i els 14.37 restants són dirigits cap a fosfoenolpiruvat (PEP). El flux que arriba en aquest punt ha de ser suficient per a subministrar grups fosfat per a la translocació de glucosa a través del PTS, ja que aquest sistema de transport és dependent del PEP per a cedir els grup fosfat a la glucosa i translocar-la a través de la membrana, per a la síntesi d'aminoàcids aromàtics i per a la formació de piruvat, últim intermediari de la glucòlisi. El fosfoenolpiruvat, al cedir el grup fosfat a la glucosa per a la seva translocació, es converteix simultàniament en piruvat i, es reincorpora a la glucòlisi de nou en el seu últim tram. Com es pot observar en el diagrama de fluxos, dels $14.37 \text{ mmols g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ que arriben a PEP, 0.54 van cap a la síntesi de material cel·lular, bàsicament aminoàcids aromàtics (triptòfan, fenilalanina i tirosina), 2.04 s'utilitzen en la provisió anapleròtica del CAT, reacció catalitzada per la fosfoenolpiruvat-carboxilasa, convertint-se en oxalacetat i, deixant-ne 1.82 per la síntesi de piruvat, per acció de la piruvat-quinasa, que junt amb els 9.95 que provenen del PTS dona un flux net cap a piruvat de $11.78 \text{ mmols g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

El piruvat és el nexe d'unió de vàries rutes metabòliques. Un flux de $1.90 \text{ mmols g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ serveixen per la biosíntesi de material cel·lular i 9.87 són descarboxilats per acció de la piruvat deshidrogenasa cap a AcCoA . D'aquests, 2.76 serveixen per a la síntesi de material cel·lular i, $3.58 \text{ mmols g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entren al CAT per acció de la citrat-sintasa. Aquests darrers junt amb els 3.63 provenint del propi funcionament del cicle, són convertits en citrat, resultant un flux molar de 3.58 cap a α -cetoglutarat (α -KG). Com que la primera reacció del cicle és 1:1, només pot absorbir els mateixos carbonis que circulen per el cicle. Els carbonis que no poden entrar al cicle són desviats cap a la síntesi d'acetat. El flux cap a la síntesi i finalment excreció d'acetat és de $3.52 \text{ mmols g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Aquest flux representa, en

termes molars, el 35% del flux d'entrada de glucosa a la cèl·lula. Un cop els carbonis arriben a AcCoA només la meitat aconsegueixen continuar la seva oxidació fins a CO_2 rendint per a la cèl·lula el màxim en termes d'energia.

Un cop al cicle dels àcids tricarboxílics els fluxos es reparteixen com segueix: l' α -cetoglutarat aporta per a la síntesi de material cel·lular $0.72 \text{ mmols g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. L'oxalacetat és un important precursor de la síntesi d'aminoàcids de la família de l'aspartat (aspartat, asparragina, metionina, treonina, isoleucina, leucina i lisina), com així ho reflexa el model amb els $2.09 \text{ mmols g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ que es desvien cap a la síntesi de material cel·lular. Altres intermediaris del cicle són proveïdors de carbonis per a la síntesi d'aminoàcids. Finalment les VCM en el seu paper catabòlic regeneren els nivells d'ATP, NAD^+ i $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Així, es tanca la funció dual de les VCM, amb la provisió de precursors i l'energia requerida per convertir-los en monòmers i finalment en biomassa.

4.9. ANÀLISI DELS FLUXOS METABÒLICS DURANT EL CREIXEMENT AERÒBIC D' *Escherichia coli* EN GLUCOSA

L'entrada de la font de carboni i altres substrats ha de satisfer com a mínim la demanda de precursors i energia per a la síntesi de nou material cel·lular. Els fluxos dels precursors venen predeterminats fenotípicament i la seva conversió a biomassa necessàriament determina la demanda d'ATP i de poder reductor $[2\text{H}]$ pel seu anabolisme. El carboni remanent de l'oxidació de la glucosa i dels subseqüents compostos s'allibera a la fi en la forma més reduïda de la glucosa, el CO_2 . En certa manera es pot dir que el CO_2 reflexa la capacitat de la cèl·lula d'atrapar l'energia, i en canvi el que no arriba a CO_2 representa un malbaratament de la font de carboni. Per una altra banda, l'excedent d'energia és alliberada en forma de calor.

La interpretació de la distribució dels fluxos estimats es simplifica si es pren el valor del flux d'entrada de glucosa com a valor 100% i la resta de valors es

normalitzen respecte aquest (en (mmols/g·h)·100/flux de la glucosa). Així en la figura següent es mostra el diagrama de fluxos "normalitzat" respecte el flux d'entrada de la glucosa.

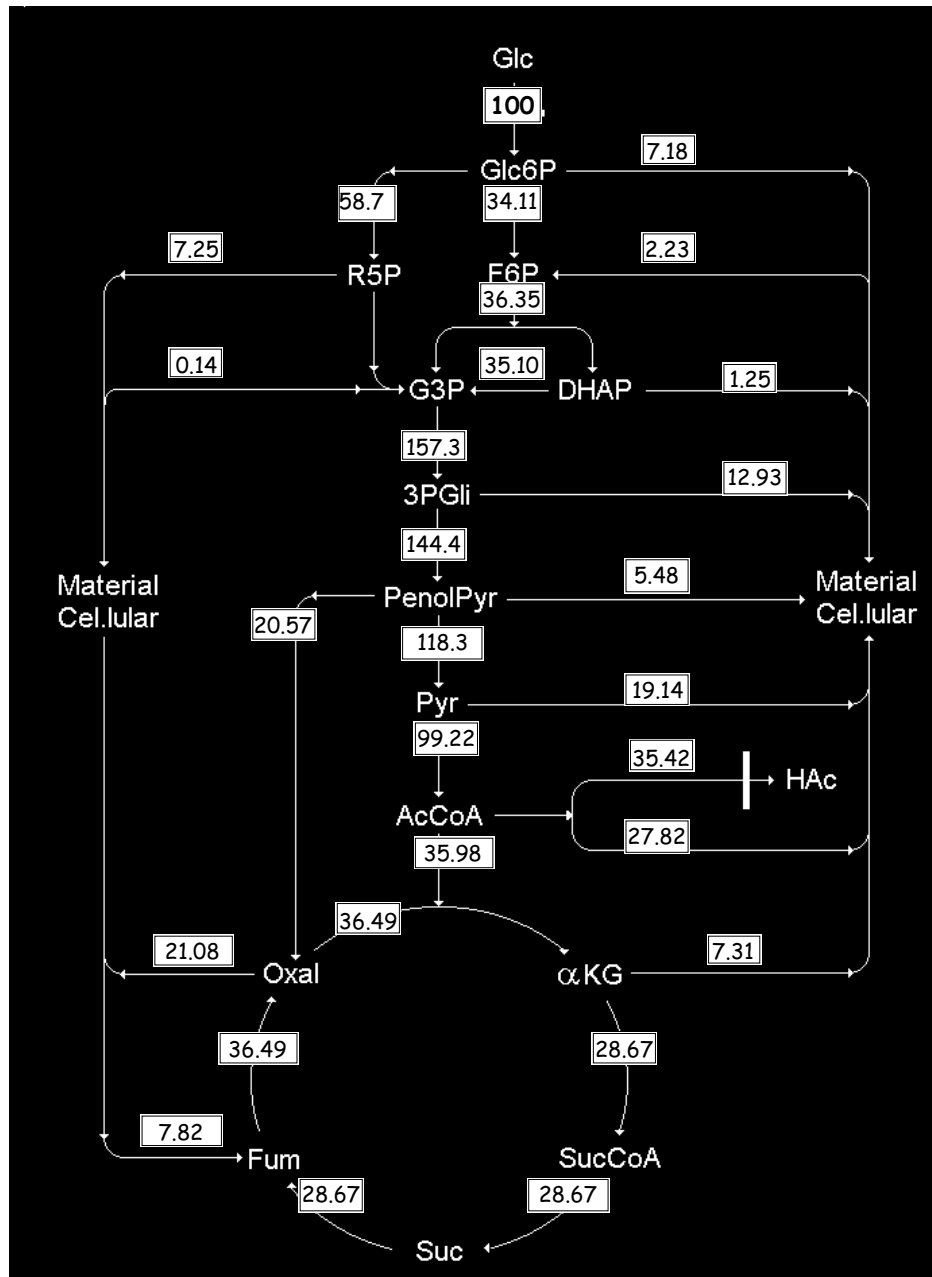


Figura 4.10: Distribució de fluxos normalitzats de la soca d' *Escherichia coli* K12 modelitzada. Només es mostren els metabòlits directament associats als punts de bifurcació de les vies considerades pel balanç de matèria de la xarxa metabòlica del model estequiomètric.

En les condicions en que es va realitzar l'experiment de cultiu de la soca salvatge d'*Escherichia coli*, del 100% de glucosa que va entrar per gram de pes sec i per hora, el 59.18 % (118.36 sobre 200) arribava directament a piruvat mitjançant la via glucolítica d'Embden-Meyerhof-Parnas.

Del 40 % i escaig de carboni que no arriba a piruvat, un 7.2 % és utilitzat per a la síntesi de sucres de 4 i 5 carbonis (ribosa-5-fosfat, eritrosa-4-fosfat i ribulosa-5-fosfat) a través de cicle de les pentoses. Un 2.2% és destinat a la síntesi de peptidglicà, component característic de la paret cel·lular de les bactèries. Un 1.2 % és utilitzat per a la síntesi de lípids a partir de les trioses-fosfat. Una fracció important del flux glucolític, el 12.9 %, abandona aquesta via a nivell del 3-fosfoglicerat per incorporar-se a la síntesi d'aminoàcids de la família de la serina, i d'altres components proteics.

Si se sumen tots els fluxos que participen en la síntesi de material cel·lular (considerant com a precursors principals de material cel·lular: G6P, R5P, G3P, PG, PEP, Pir, AcCoA, OAA, i OGA), es troba que de tota la glucosa que entra a la cèl·lula el 54% té com a destí la formació de precursors de la biomassa, fet que està d'acord amb els rendiments observats de 0.5 g PSC/g glucosa.

El fosfoenolpiruvat representa un intermediari clau en la distribució de fluxos. Un nombre de mols equivalent a l'entrada de glucosa ha de proveir al PTS de grups fosfat per tal de fosforilar la glucosa en el carboni 6 i permetre la seva translocació, evitant així la seva sortida de la cèl·lula. Com que el producte de la reacció de translocació és el piruvat i, aquest es reincorpora de nou a la glucòlisi, en termes molars absoluts és com si no es desvies de la ruta i seguís la via fins a piruvat. En condicions glucolítiques no hi ha síntesi de PEP a partir del piruvat: l'enzim fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) no està actiu (Liao *et al.* 1996). Malgrat això, una fracció important del PEP no arriba a piruvat, doncs el 20.5% és desviat directament al cicle dels àcids tricarboxílics per acció de la

fosfoenolpiruvat-carboxilasa (PEPC). Aquesta reacció, com es pot apreciar pel valor percentual de flux, és força important en termes molars i està d'acord amb altres valors que es troben a la bibliografia per diferents soques d'*Escherichia coli*, en les que pot representar fins el 24 % del flux d'entrada de glucosa (Holms, 1996). Per últim, un 5.4 % del flux d'entrada de glucosa és desviat en aquest mateix punt de la glucòlisi cap a la síntesi d'aminoàcids aromàtics i de components de l'envolta cel·lular. Del flux que arriba a piruvat un 19.4 % es desvia en aquest punt cap a la síntesi de material cel·lular. El piruvat col·labora entre d'altres en la síntesi d'àcids orgànics, aminoàcids i peptidglicà. El 99% restant es converteix en Acetil-CoA per acció de la Piruvat-deshidrogenasa. Això representa que la meitat del flux d'entrada de glucosa arriba a aquest component. El destí preferent de la glucosa en condicions aeròbiques, en termes de rendiment energètic és evidentment el CAT, però la meitat del flux d'entrada és desviat prèviament cap a la síntesi de material cel·lular. Arribats a aquest punt, com que l'estequiometria de la reacció de síntesi de citrat a partir de l'acetil-CoA i l'OAA, és 1:1, l'aport d'OAA per part del cicle ha de ser igual a la quantitat d'acetil-CoA que prové del piruvat.

Com es pot apreciar en el diagrama de fluxos, el cicle de Krebs no pot suportar un flux superior des de l'acetil-CoA, que el que circula a través del cicle a nivell de l'OAA i, per tant, el flux a través del cicle ha d'estar en concordança amb els requeriments anabòlics i velocitat d'aprovisionament de les reaccions catabòliques. El flux cap a AcCoA catalitzat per la Piruvat-deshidrogenasa (PirDH) produeix més AcCoA que el que pot ser utilitzat per a la síntesi de precursors i/o generació d'energia per fosforilació oxidativa. No s'observa excés de flux cap a cap altre precursor excepte l'AcCoA.

A partir dels resultats obtinguts es suggereix que el flux d'entrada de glucosa, excedeix la capacitat de les VCM, a nivell del CAT. No tota la glucosa que entra a la cèl·lula pot ser aprofitada per a síntesi de material cel·lular i, el balanç de matèria faria que l'excés de glucosa que arriba a piruvat s'excreti en forma de

subproductes com l'acetat. Tot i que la transformació d'AcCoA en acetat genera ATP, representa un malbaratament de la glucosa ja que si entrés al CAT rendiria més, tant en subministrament de precursors de biosíntesi de material cel·lular, com d'energia. Al no poder ser absorbit per part del CAT tot el piruvat que s'ha convertit en Acetil-CoA, el sistema reacciona desviant part dels intermediaris cap a altres destins. Aquesta és doncs, la condició general per la síntesi d'acetat a *Escherichia coli*.

A *Escherichia coli* la síntesi d'acetat representa la vàlvula d'escapament d'aquest excedent d'Acetil-CoA que no pot ser acomodat pel CAT. Aquesta observació és compartida per altres autors, que han arribat a similars resultats emprant models diferents (Holms, 1996).

Els sistemes que operen a *Escherichia coli* han sigut seleccionats durant milers de milions d'anys en condicions molt diferents a les que s'imposen quan es cultiven al laboratori. Fa 3500 milions d'anys, quan es suposa van aparèixer els primers microorganismes ancestrals, l'atmosfera en la que vivien no contenia d'oxigen (estava formada per hidrogen, metà, amoníac, diòxid de carboni i aigua (Lehninger, 1980)) i, per tant, el seu metabolisme estava adaptat a obtenir l'energia per un mecanisme de metabolisme anaerobi. Es creu que la majoria de bactèries eren fotosintètiques, tot i que realitzaven una fotosíntesi diferent de la de les plantes verdes actuals. Tot i que obtenien l'energia de la llum solar i el carboni del CO₂, l'hidrògen, en lloc d'obtenir-lo de la molècula de l'aigua l'obtenien del sulfhídric expulsat pels volcans. Aquests microorganismes, al ser cada cop més nombrosos, van anar esgotant les reserves de sulfhídric i van començar a apareixer noves vies metabòliques d'obtenció d'hidrogen. Els microorganismes van aprendre així, a obtenir l'hidrogen de l'aigua, fet que va comportar paral·lelament l'alliberació d'oxigen a l'atmosfera. No obstant, l'oxigen és molt reactiu i tòxic i resultava perillós inclòs pels microorgansimes que el produïen. Mentre hi havia gasos i metalls reduïts disponibles, l'oxigen es combinava amb aquests sense que

representés cap perill (formació dels òxids metàl·lics). Però un cop es van anar esgotant les substàncies que podien reaccionar amb l'oxigen, les bactèries van desenvolupar una nova via metabòlica per combatre'l: la respiració aeròbica. Aquest mecanisme, a més a més de protegir-los contra el gas tòxic, els hi va proporcionar una nova via d'obtenció d'energia molt més rendible que les anteriors. Aquest fet va comportar una disminució de l'augment d'oxigen a l'atmosfera. Aquesta adaptació va suposar un gran avenç en el mecanisme d'obtenció d'energia a partir de molècules orgàniques. L'atmosfera de la Terra conté un 79% de nitrogen, que és el producte final de varis processos de desnitrificació bacteriana, un 21% d'oxigen i un 0.036% de CO_2 . El nitrogen dilueix l'oxigen a l'aire que respiren els organismes aerobis, permetent la respiració sense destruir les cèl·lules. Així els microorganismes van aportar els mecanismes i les condicions necessàries per l'existència de tots els organismes aerobis del planeta. Per un altre costat, al ser els mecanismes d'obtenció d'energia anaerobis, anteriors a l'aparició de la respiració, molt menys rendibles que aquesta, l'evolució havia seleccionat sobretot, aquelles cèl·lules que eren més eficients en la captació de substrats, en especial els de més fàcil metabolització com la glucosa. Quan l'oxigen va esdevenir disponible, el sistema prèviament seleccionat en anaerobiosi va haver d'adaptar-se al nou mecanisme d'oxidació dels cofactors reduïts. La cèl·lula ancestral va adquirir la capacitat d'utilitzar l'oxigen com acceptor final d'electrons, augmentant així, la generació d'energia (en forma d'ATP) en un ordre de magnitud. No obstant, per utilitzar tota aquesta energia per a la generació de nova biomassa cel·lular s'havien d'incrementar també, els fluxos cap als precursors cel·lulars i el recanvi dels cofactors oxidats. La provisió d'aquests en les proporcions adequades venia limitada per la pròpia història de la maquinaria cel·lular, i aquest fet suposava una nova limitació metabòlica, l'excedent de carbonis que s'havia d'utilitzar un cop dintre la cèl·lula per a generar precursors. La selecció en condicions d'anaerobiosi havia forçat a les cèl·lules a balancejar el metabolisme des dels substrats als precursors i, per un altre costat, en les reaccions que permetien atrapar més quantitat d'energia útil per convertir els precursors en biomassa. La cèl·lula s'havia

adaptat a les noves condicions fent-se més eficient en la generació d'energia pel creixement, fet avantatjós evolutivament davant altres mecanismes menys productius. Però, suposadament, això podria haver creat un nou problema: si la captació de glucosa s'havia resolt amb transportadors molt eficients i, el subministrament d'energia per mecanismes oxidatius, l'excedent d'energia es podia dissipar en forma de calor i, l'excés de la font de carboni va haver de ser balancejada per algun altre mecanisme, com la formació de subproductes parcialment oxidats. L'excreció d'acetat representaria en aquest sentit un mecanisme de dissipació de l'excés de carboni que arriba a piruvat, escollit per algunes cèl·lules com a solució a l'elevada velocitat de captació de substrats en condicions aeròbies i paral·lelament podria representar un fre a la formació de nous cofactors reduïts. Finalment s'ha de tenir en compte que l'evolució bacteriana és flexible i que totes les bactèries poden intrecanviar el seu material genètic. En aquest sentit es pot considerar que la modificació genètica de la biotecnologia no és una novetat; durant mils de milions d'anys les bactèries han intercanviat el seu material genètic. Inclòs s'han arribat a establir "pactes de conveniència" que els hi han permès compartir propietats favorables i continuar amb l'evolució de la cèl·lula, cada cop més complexa, tant a nivell morfològic com fisiològic i metabòlic. Així, fruit d'aquestes relacions de simbiosi entre cèl·lules procariotes aeròbies i anaeròbies, van sorgir el núcli, les mitocondries i els cloroplasts de les cèl·lules animals i vegetals.

Des d'aquest enfoc globalista, es pot considerar que tots els organismes mantenen, també a nivell del seu metabolisme, la història de l'evolució, i que el pas dels mecanismes d'obtenció d'energia per mecanismes anaeròbis als mecanismes que utilitzen l'oxigen com acceptor final d'electrons, està present en tots ells. Posteriorment, les cèl·lules eucariotes també van organitzar-se en grups especialitzats en diverses funcions (organismes pluricel·lulars, teixits, animals i plantes) per fer-se més eficients i adaptar-se a les condicions ambientals canviants de la Terra. L'estigma del passat de tots els éssers vius es pot

reconeixer observant el seu comportament, inclòs quan es cultiven en sistemes com són els bioreactors.

Després d'aquesta disquisició sobre les possibles causes de la formació de subproductes, explicades en termes evolutius dels organismes, es pot apuntar que les cèl·lules, quan l'excés de carboni incorporat excedeix la capacitat metabòlica de les vies centrals del metabolisme, responen equilibrant el sistema per algun dels tres mecanismes següents (El-mansi i Holms, 1989):

- convertint l'excés de requeriments en material de reserva, com per exemple el glicògen.
- dissipant l'excedent de carboni en forma de CO_2 i l'excés d'energia en forma de calor.
- o bé dissipant l'excedent de carboni que no pot ser acomodat per les vies centrals del metabolisme en forma de subproductes (compostos de baix pes molecular) que s'excreten a l'espai extracel·lular.

Sigui quin sigui el mecanisme de compensació el resultat final és el mateix: els fluxos a través de les vies centrals del metabolisme per a proveir de precursors i energia són balancejats amb els fluxos cap a aquests components. L'acetat és un exemple del tercer mecanisme de compensació de l'excés de carboni.

Per intentar reduir la formació de subproductes el que caldrà és o bé regular la captació de glucosa per equilibrar-la amb la capacitat de la cèl·lula per a créixer, o bé reduir l'efecte de l'excés de carboni a nivell de les vies centrals del metabolisme. Les mesures per reduir la formació de subproductes que es suggereixen, i alguns exemples concrets de llocs d'actuació poden ser:

- La reducció de la velocitat específica de captació de glucosa a la cèl·lula a través del PTS (per disminució del nivell disponible de components del PTS), o la captació de glucosa a través d'un altre transportador alternatiu amb menys afinitat per la glucosa que el PTS ("Knock-out" del gen *ptsG* que codifica pel

component específic de translocació de la glucosa EIICB^{GlC} del PTS), o inclòs emprant sucres no-PTS de més lenta incorporació, com el glicerol. Alternativament es poden emprar anàlegs no metabolitzables de la glucosa, com l' α -metilglucòsid, que competeixin pel lloc actiu del transportador de la glucosa, disminuint-ne la seva incorporació neta.

- La disminució de l'acumulació d'acetil-CoA per disminució de l'activitat de la piruvat deshidrogenasa, o bé redirigint prèviament el piruvat cap a altres destins menys tòxics que l'acetat, com són l'acetoina (per exemple clonant el gen *als* que codifica per l'acetolactat sintasa), l'etanol (clonant els enzims de la piruvat decarboxilasa i l'alcohol deshidrogenasa) o el lactat (sobreexpressant el gen de la lactat deshidrogenasa).
- La disminució de la síntesi d'acetat directament per disminució de l'activitat de l'acetat quinasa (ACK) i/o la fosfotransacetilasa (PTA), o bé la seva eliminació ("Knock-out" del gen *pta* i/o *ack*)
- L'augment de la capacitat de processament del CAT, per exemple per augment de l'activitat de les reaccions anapleròtiques de la fosfoenolpiruvat carboxilasa (PEPC) o de la piruvat carboxilasa (PIRC), o bé augmentant l'activitat de la citrat sintasa (CS) al CAT.

El cultiu en continu permet regular la velocitat de creixement en l'estat estacionari i, per tant, suposadament s'hauria de poder arribar a trobar una velocitat de consum de glucosa que permetés a la cèl·lula créixer de manera balancejada sense produir acetat com a resultat de l'excedent d'Acetil-CoA. No obstant, com s'ha vist en el capítol 3, a *Escherichia coli* K12 no es pot eliminar l'excreció d'acetat ni reduint la disponibilitat de glucosa sense que la població cel·lular no es vegi obligada a minvar, ja que la seva síntesi és constitutiva. Sempre que es redueix la velocitat d'entrada de glucosa es redueix la d'excreció d'acetat però sempre en proporció s'ha de reduir més la de glucosa i, per tant, la única manera d'eliminar l'excreció d'acetat per complert és en alimentació de glucosa zero, fet que no permet el creixement de les cèl·lules.

En resum, d'aquest anàlisi del metabolisme es pot conceptualitzar la problemàtica de la cèl·lula pel que fa a l'acumulació d'acetat i s'identifiquen les modificacions genètiques que poden tenir un efecte en la re-distribució dels fluxos. Aquestes estratègies d'enginyeria metabòlica centren el treball que es presenta al Capítol 5. A més a més, per finalitzar el present capítol, s'ha cregut interessant comparar el comportament observat en *Escherichia coli*, amb altres tipus de cèl·lules, per tal de comprendre millor aquesta problemàtica i fer-ne una interpretació més generalitzada. Aquesta anàlisi s'ha pogut fer donat que es disposa de l'experiència per obtenir dades de creixement del cultiu d'altres tipus cel·lulars, com de llevats i cèl·lules d'hibridoma, a més a més de soques diferents d'*Escherichia coli*.

4.10. EXTENSIÓ A ALTRES SOQUES D'*Escherichia coli* I ALTRES TIPUS CEL·LULARS

Com s'ha comentat en la introducció d'aquesta memòria qualsevol sistema cel·lular adaptat a créixer en condicions de laboratori, i que pugui ser mantingut de forma estable en cultiu pur, és susceptible de ser utilitzat en un procés industrial. El denominador comú de tots aquests processos, tant de cultiu bacterià, de fongs i llevats com de cèl·lules animals, és l'ús de bioreactors emprant medis amb excés de nutrients (principalment glucosa) per tal d'assolir densitats cel·lulars elevades i productivitats interessants. Malgrat aquest factor comú, l'hàbitat o l'origen natural d'aquests tipus cel·lulars determina el seu comportament fisiològic i metabòlic dintre el bioreactor on es dona el creixement, i en últim terme el rendiment de cèl·lules i producte del procés.

L'estudi que es presenta en aquest apartat es basa en la realització d'una sèrie de cultius discontinus en condicions aeròbies en els medis de cultiu més comunament emprats per aquests tipus cel·lulars. En el cas dels bacteris i el llevat es van utilitzar medis de composició definida mentre que, per al cultiu de cèl·lules animals això no és possible, ja que es requereix de fonts orgàniques complexes, com el

sèrum fetal boví, per al seu correcte creixement. Tots els cultius es van desenvolupar en bioreactor per tal de conferir a les cèl·lules les millors condicions ambientals i el control acurat dels principals paràmetres de cultiu (temperatura, pH, i pO_2 principalment). Es van realitzar cultius en discontinu en medi mineral salí i amb glucosa com a única font de carboni i energia, en condicions aeròbiques, de cèl·lules d'una estirp d'*Escherichia coli* diferent a les emprades en els anteriors apartats, la soca d'*Escherichia coli* d'estirp B: BL21, així com d'un llevat, una soca salvatge de *Saccharomyces cerevisiae*. Pel cultiu de cèl·lules animals es va emprar com a model una cèl·lula d'hibridoma. En aquest cas es va emprar el medi complex DMEM, ja que en aquest tipus cel·lulars és, ara per ara, molt complicat de dur a terme el creixement en medis completament definits o lliures de sèrum. En aquest darrer cas es va emprar un bioreactor adaptat al cultiu de cèl·lules animals en suspensió.

4.10.1. CULTIU D'*Escherichia coli* BL21

Les soques d'*Escherichia coli* K12 i totes les soques recombinants obtingudes a partir d'aquesta (derivades de la K12), són, bàsicament per raons històriques, les més àmpliament estudiades a nivell de metabolisme i fisiologia i les més utilitzades per a l'obtenció de productes d'interès, en especial de proteïnes recombinants. De fet les soques K d'*Escherichia* van ser les que inicialment es van utilitzar per a dur a terme treballs de genètica bacteriana i recombinació del DNA, més que no pas per a realitzar estudis sobre la seva fisiologia i comportament metabòlic en cultiu en bioreactor. Així, s'han continuat emprant de manera generalitzada, fos quina fos la seva finalitat.

Existeixen, no obstant, altres soques d'estirps diferents com les soques B o C d'*Escherichia coli*, menys estudiades i, per tant menys conegudes a nivell fisiològic que les K i també, menys utilitzades que les anteriors tant a nivell de recombinació del DNA com amb fins productius. De fet, hi ha pocs treballs publicats que comparin, en termes d'eficiència, unes i altres estirps. Sembla que, l'elecció d'una

soca o altra és més una qüestió de circumstàncies que no pas d'elecció fonamentada en rendiments. Per això, es va considerar interessant estudiar el seu comportament fisiològic i metabòlic, per tal d'apreciar-ne les similituds o diferències de comportament.

La soca BL21 d'*Escherichia coli* és una soca de l'estirp B considerada baixa productora d'acetat (Kleman i Strohl, 1994; Luli i Strohl, 1990). Es va escollir aquesta soca d'*Escherichia* degut a que el rang de rendiments de formació d'acetat en cultius aeròbics en discontinu descrit a la bibliografia, que va des del 5 al 30% de la font de carboni consumida, segons la soca, medi i condicions de cultiu (Majewski i Domach, 1990), fa que des del punt de vista de la inhibició del creixement i efecte sobre la producció de proteïnes recombinants, pugui ser més interessant treballar amb una i no una altra soca d'*Escherichia*.

Es va estudiar el creixement en cultiu aeròbic en discontinu en un medi mineral salí (M9E) amb 15 g/l de glucosa. Aquest experiment es va dur a terme en un bioreactor (Biostat-B) de 2 litres de volum a 37°C, pH 7.00, pO₂ al 30% de saturació i amb control en cascada de la pO₂ amb l'agitació (entre 250 i 900 rpm) i 2 l/m de cabal d'aire. Els resultats es mostren a la figura següent:

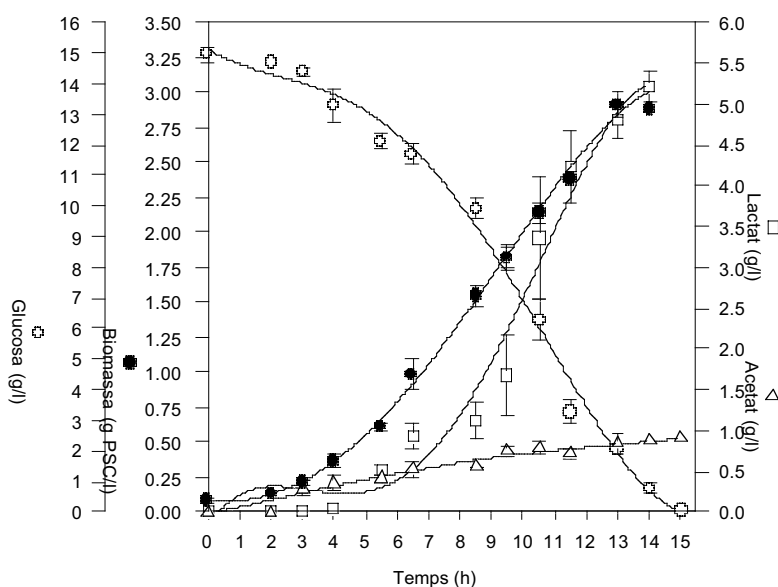


Figura 4.11: Cultiu en discontinu d' *Escherichia coli* BL21 en medi definit M9E amb 15 g/l de glucosa.

Com es pot observar es van obtenir, després de 15 hores de cultiu, 2.96 g PSC/l a partir dels 15 g/l de glucosa que hi havia inicialment al medi de cultiu. El rendiment de cèl·lules, després d'aquest temps, fou de 0.19 g PSC/ g glucosa. La velocitat específica màxima de creixement fou de 0.53 h^{-1} . L'excreció d'acetat va seguir una cinètica de producció similar a la descrita anteriorment amb la soca K12, obtenint-se una concentració màxima de 0.96 g/l. El rendiment de producció d'acetat fou de 0.06 g acetat/g glucosa consumida, similar al obtingut per la soca K12. No obstant, durant el cultiu es va observar una diferència significativa: es va acumular al brou, a més d'acetat, lactat. Aquest fet no s'havia detectat a la soca K12 en aquest medi i en les mateixes condicions de cultiu aeròbic. A *Escherichia coli* BL21 el lactat va passar a ser el subproducte metabòlic majoritari, fet que també han descrit alguns autors per soques d'aquesta mateixa estirp (Lawford i Rousseau, 1997). Al final del cultiu s'havien acumulat al medi fins 5.4 g/l de lactat, el que representa un rendiment de 0.35 g lactat/g glucosa, i explica en part el menor rendiment cel·lular observat.

D'entrada, el comportament d'aquesta soca suggereix que presenta la mateixa problemàtica que la K12. L'excés de glucosa en aquesta és compensat tant per la síntesi d'acetat com de lactat, tot i que aquest darrer acaba sent el subproducte majoritari. La major diferència entre la síntesi d'àcid acètic i d'altres subproductes, com el làctic o l'etanol, és l'absència del pas d'oxidació del NADH_2 en la síntesi d'acètic. La formació de lactat permet a la cèl·lula regenerar (oxidar) el NADH_2 format en la glucòlisi i restaurar els nivells de NAD^+ necessaris per l'oxidació de la glucosa a la glucòlisi, com s'ha comentat a l'apartat 3.8 (veure figura 3.13). Aquest fet pot ser avantatjós per la cèl·lula doncs l'acumulació de NADH_2 s'ha correlacionat també amb la disminució de l'activitat de la citrat-sintasa i per tant de la capacitat de processament del CAT (El-mansi i Holms, 1989). A més a més, s'ha suggerit que, a diferència del que succeeix a la soca K12, a la BL21 podria activar-se la via del glioxilat inclòs a elevades concentracions de glucosa, el que permetria a la cèl·lula utilitzar l'acetat produït com a font de carboni i explicar així

la menor acumulació d'acetat observada en aquesta soca (van de Walle i Shiloach, 1998). En altres estudis s'ha demostrat que la productivitat d'*E. coli* BL21 es veu també afectada negativament per la producció d'acetat (van der Walle i Shiloach, 1998), i per tant, el mecanisme escollit per aquesta soca es pot considerar, evolutivament, com una millora.

El lactat és un agent molt menys tòxic per a la cèl·lula que l'acetat quan s'acumula al brou de cultiu, i per tant, aquesta manera d'operar pot ser, a la llarga, avantatjosa per la cèl·lula. Està descrit que no és inhibitori pel creixement bacterià fins a concentracions de 30 g/l, mentre que l'acetat ho és, com a mínim, partir de 5 g/l (Lee *et al.* 1989). En aquest sentit es podria considerar que la soca BL21 hauria evitat en part el problema de l'acumulació d'acetat canviant la síntesi majoritària d'aquest àcid per la d'un altre potencialment menys tòxic, alhora que permet la regeneració del NADH₂. És possible que de cara a obtenir cultius d'alta densitat cel·lular, la soca BL21 sigui més adequada en comparació amb la soca K12. Tot i presentar rendiments de biomassa inferiors, si l'acetat acumulat no resulta inhibitori del creixement fins a concentracions del mateix ordre en ambdós soques, i tenint en compte que el cicle del glioxilat pot operar a elevades concentracions de glucosa, potencialment sigui més interessant treballar amb la BL21 ja que es podrà perllongar més el procés fins assolir-se la concentració inhibitoria del creixement. De fet, la major concentració cel·lular descrita correspon a un cultiu discontinu-alimentat amb *E. coli* B: 125 g PSC/l (Mori *et al.* 1979) o 140 g PSC/l en un cultiu discontinu-alimentat amb un mòdul de diàlisi per retirar els subproductes del brou (Landwall i Holme 1977).

4.10.2. CULTIU DEL LLEVAT *Saccharomyces cerevisiae*

En l'experiment que es presenta a continuació es pretén veure quin és el comportament d'aquest llevat creixent en un medi de composició mineral definida amb glucosa com a única font de carboni i energia en condicions aeròbiques. La soca que es va utilitzar fou una soca salvatge de *Saccharomyces cerevisiae* i, tant la

metodologia de desenvolupament del cultiu inòcul com les condicions es poden trobar descrites a material i mètodes (apartat 7.4). Els medis definits per al cultiu de llevats contenen, típicament, D-glucosa, sals de nitrogen, fòsfor, vitamines i elements traça metàl·lics. En aquest cas es va escollir el medi de Wickersham amb 10 g/l de glucosa com a font de carboni (apartat 7.3.2.2). El bioreactor que es va utilitzar fou el mateix equip que per al cultiu bacterià (Biostat-B de 2 litres de volum) amb les següents consignes d'operació: temperatura, 35°C, pH 5.5 (control per addició de NaOH 30% i H₂SO₄ 20%), pO₂ al 30% del valor de saturació màxim amb aire (a 1 vvm) i agitació en cascada amb la pO₂ entre 250 i 900 rpm. L'obtenció de mostres del brou de fermentació permet la determinació de la concentració de cèl·lules (1 U DO_{A450}= 0.20 g PSC/l) i dels metabòlits per cromatografia líquida (apartat 7.5). Els resultats es mostren a la figura 4.12.

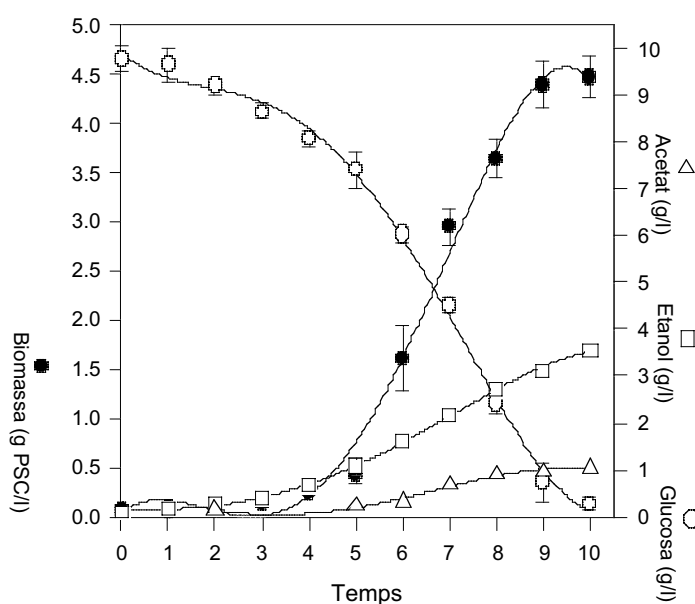


Figura 4.12: cultiu discontinu de *Saccharomyces cerevisiae* en medi mineral definit (Medi de Wickersham) amb glucosa (10 g/l) com a única font de carboni i energia.

En aquest experiment *Saccharomyces* va créixer exponencialment des de l'inici del cultiu fins el final del procés, que va durar 10 hores, assolint-se una concentració de biomassa màxima de 4.60 g PSC/l. La velocitat de creixement màxima fou de

0.28 h⁻¹. Després d'analitzar per HPLC els brous de fermentació clarificats es va trobar com a subproductes metabòlics del creixement etanol i acetat. Aquests productes es van acumular al brou fins a una concentració final de 3.56 g/l i 0.97 g/l respectivament. El rendiment de biomassa fou de 0.45 g PSC/ g glucosa consumida. El rendiment de formació d'etanol de 0.35 g etanol/g glucosa consumida i el d'acetat de 0.09 g/g.

D'entrada, com es desprèn d'aquests resultats, es troba que la formació d'etanol a *Saccharomyces* presenta similituds amb la formació d'àcid acètic o làctic a *Escherichia*, ja que tant un com altre subproducte són metabòlits parcialment oxidats de la glucosa que es formen en condicions d'aerobiosi quan hi ha glucosa en excés al medi. La formació de subproductes com l'etanol o l'acetat no només redueix el rendiment de biomassa, sinó que afecta negativament la velocitat de creixement i la formació de productes desitjats (van Dijken i Pronk, 1999), tal i com succeeix a *Escherichia*.

Tot i que qualitativament es troba aquesta similitud, les causes metabòliques de la seva formació no tenen perquè ser les mateixes. Seria d'esperar que aquest llevat pogués regular la velocitat de captació de glucosa i créixer en condicions balancejades, per tant obtenint-se només CO₂, H₂O i cèl·lules, sense haver de produir etanol i acetat. No obstant, com s'ha demostrat, el creixement en condicions aeròbies comporta la formació d'etanol com a subproducte metabòlic del creixement, quasi des de l'inici del procés, arribant a representar aquest subproducte el 35% de la glucosa consumida.

Les causes metabòliques del comportament observat es poden deduir a partir de l'observació del metabolisme que opera a *Saccharomyces* creixent en glucosa en condicions aeròbies (figura 4.13).

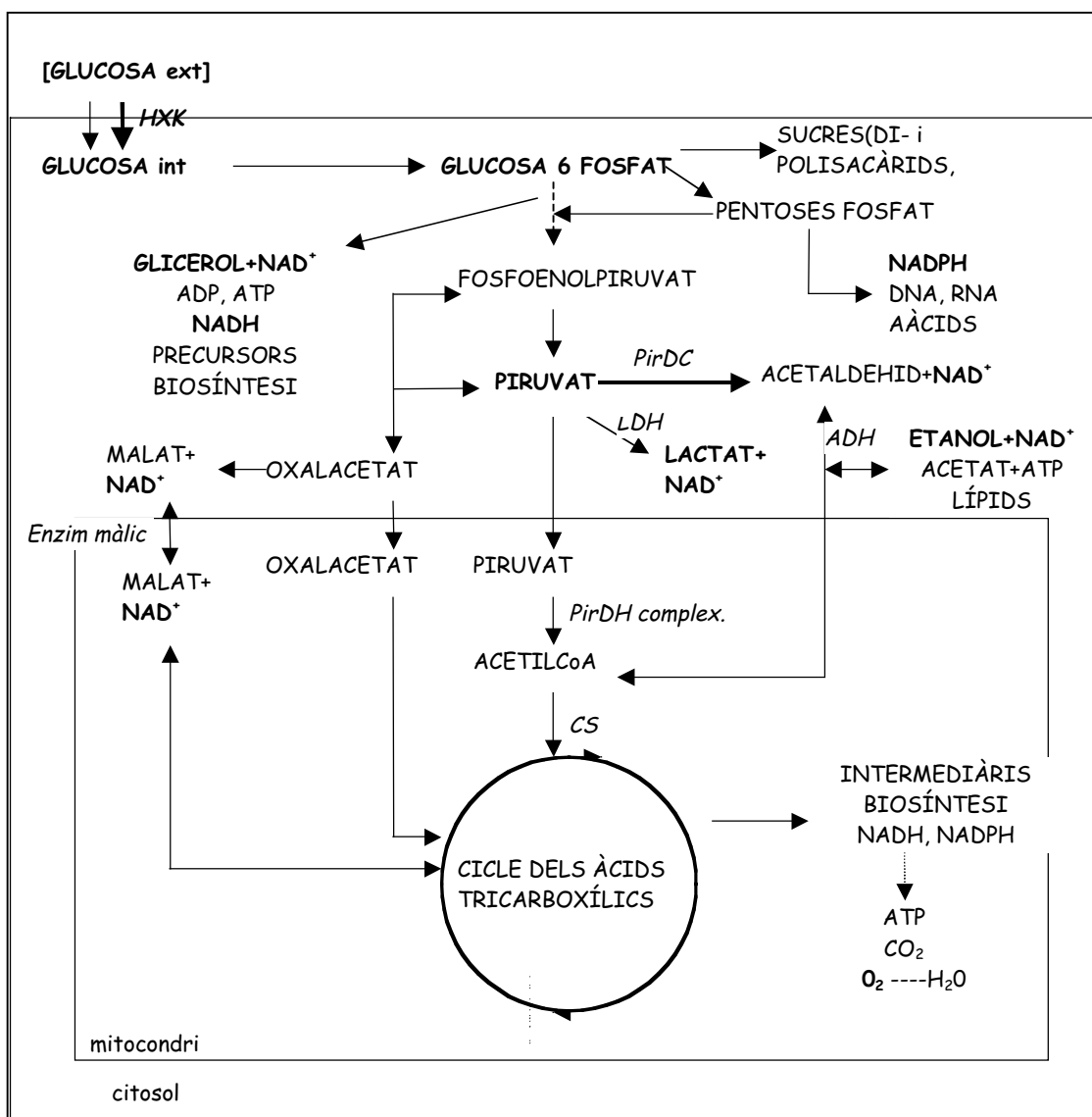


Figura 4.13: Esquema del metabolisme central de *Saccharomyces cerevisiae*. En cursiva s'indiquen els principals enzims implicats que apareixen en el text: *HKX*: Hexokinasa, *PirDC*: Piruvat Decarboxilasa, *LDH*: Lactat Deshidrogenasa, *ADH*: Alcohol Deshidrogenasa, *PirDH*: Complex de la Piruvat deshidrogenasa, *CS*: Citrat cintasa.

La glucosa, a *Saccharomyces*, entra a la cèl·lula per difusió passiva (hexoquinases). Un cop dintre la cèl·lula, és fosforilada a glucosa-6-fosfat. Posteriorment pot seguir tres camins. El primer, la via principal d'oxidació de sucres és la glucòlisi, tant per la respiració com per la fermentació (Via d'Embden-Meyerhof-Parnas). El producte final de la glucòlisi és el piruvat (Stryer 1988). Aquest piruvat citosòlic pot entrar al CAT per transport actiu. En segon lloc, pot entrar al cicle de les

pentoses on proveirà de sucres fosforilats de 5 carbonis per a la síntesi de nucleòtids i NADPH, que és utilitzat com a poder reductor per a funcions de biosíntesi, principalment per a síntesi d'aminoàcids (Pronk *et al.* 1996). En cultius amb medis definits el consum de NADPH és majoritari, ja que s'han de sintetitzar tots els aminoàcids i, per tant, el cicle de les pentoses és primordial en aquestes condicions i opera amb gran activitat. Per últim, en tercer lloc, la glucosa- 6-fosfat pot ensamblar-se en disacàrids i polisacàrids.

En condicions d'aerobiosi el NADH i el NADPH generats en la glucòlisi han de ser regenerats principalment per respiració a nivell del mitocondri. Aquests no poden travessar directament la membrana mitocondrial. No obstant, l'alcohol-deshidrogenasa és present tant al citoplasma com a la matriu mitocondrial i, l'acetaldehid provinent del piruvat pot ser reduït a etanol, per acció d'aquest enzim, amb la producció de NAD^+ en ambdós compartiments. La reacció de síntesi d'etanol és doncs, la principal manera que disposa la cèl·lula per regenerar el NADH produït durant la glucòlisi a nivell del gliceraldehid-3-fosfat.

La capacitat de captació de glucosa sembla ser que és superior a la capacitat de oxidació i per tant, la formació d'etanol respon a la necessitat de la cèl·lula d'acomodar el piruvat generat en la glucòlisi i a l'hora de proveir de NAD^+ aquesta via que presenta una elevada activitat. La formació d'etanol podria tenir un paper regulador essencial del metabolisme cel·lular, actuant com a mecanisme compensatori de l'elevada taxa glucolítica i de l'excés de piruvat generat en aquesta via en condicions d'excés de glucosa. En aquest sentit actuaria de vàlvula de seguretat de l'excés de piruvat i de la manca de NAD^+ .

Des d'aquest enfoc es troba un comportament similar a l'observat a *Escherichia coli* a *Saccharomyces*. El caràcter compartimentalitzat de les cèl·lules eucariotes és el principal tret a tenir en compte alhora de comparar ambdós tipus cel·lulars. En les cèl·lules eucariotes tant la glucòlisi com el cicle de les pentoses tenen lloc al

citosol, mentre que el CAT i la respiració es realitzen al mitocondri. Per tant, s'han de tenir en compte alhora d'estudiar ambdós sistemes que en els llevats juguen un paper molt destacat els sistemes de transport entre els dos compartiments. La necessitat de regenerar el NADH glucolític es combina amb la d'acomodar l'excedent de piruvat, fent que la reacció de la piruvat-decarboxilasa i l'alcohol-deshidrogenasa, tant a nivell citosòlic com mitocondrial siguin reaccions imprescindibles pel creixement.

Per un altre costat, s'ha de tenir en compte que *Saccharomyces* és un llevat especial en contrast amb altres llevats. Es parla de llevats Crabtree positius i Crabtree negatius segons si produeixen etanol en condicions aeròbies o anaeròbies respectivament (van Dijken *et al.* 1993), per tant, *Saccharomyces* és considerat dins el primer grup, també anomenat dels respiro-fermentatius. En els llevats Crabtree negatius la producció d'etanol està relacionada exclusivament amb el creixement en condicions de limitació per oxigen. En aquests, sembla que l'entrada de glucosa podria estar més finament regulada que en els Crabtree positius. En els llevats Crabtree negatius, el sistema de transport operant en les mateixes condicions és de tipus protó-simport enlloc de difusió passiva, d'aquesta manera, s'evitaria l'acumulació de sucre a l'interior de la cèl·lula i alhora l'excessiva operació de la glucòlisi (van Urk *et al.* 1989).

Recapitulant tota aquesta informació, es pot considerar que la major complexitat de *Saccharomyces*, sobretot pel que fa a la compartimentalització cel·lular, incorpora nous mecanismes de transport que, al ser limitants del transport de NADH des del citosol al mitocondri, fan que la cèl·lula actuï per un costat compensant l'excedent de carboni procedent de l'elevada activitat glucolítica i alhora regenerant el NADH. Així la producció d'etanol compleix aquestes necessitats i permet a la cèl·lula seguir creixent, tot i disminuir el rendiment cel·lular.

4.10.3. CULTIU DE CÈL·LULES ANIMALS: L'HIBRIDOMA KB26.5

Com a model de comportament metabòlic i fisiològic de les cèl·lules animals s'ha escollit una línia cel·lular d'hibridoma (KB26.5), que produeix un anticòs monoclonal (contra l'antigen A₁ d'eritròcit) humà. Amb aquesta línia cel·lular s'han dut a terme cultius en discontinu en un bioreactor de 2 litres (Biostat MCD), equipat amb un sistema d'agitació mecànic de pales inclinades i un sistema d'aeració amb tub de silicona per tal de conservar la integritat de les cèl·lules. La velocitat d'agitació i la concentració d'oxigen dissolt s'han mantingut a 60 rpm i al 60% de la de saturació respectivament, la temperatura de cultiu ha estat de 37°C i el pH de 7.2. El medi utilitzat en el cultiu d'aquesta línia cel·lular és un medi base DMEM suplementat amb sèrum, insulina i β -mercaptoetanol. Entre els components d'aquest medi destaquen principalment la glucosa (2.25 g/l = 10 mM inicial) i la glutamina (4 mM inicial) com a fonts principals de carboni i energia. A la figura 4.14 es presenta l'evolució de la concentració cel·lular i dels metabolits principals en un cultiu en discontinu de cèl·lules d'hibridoma KB26.5.

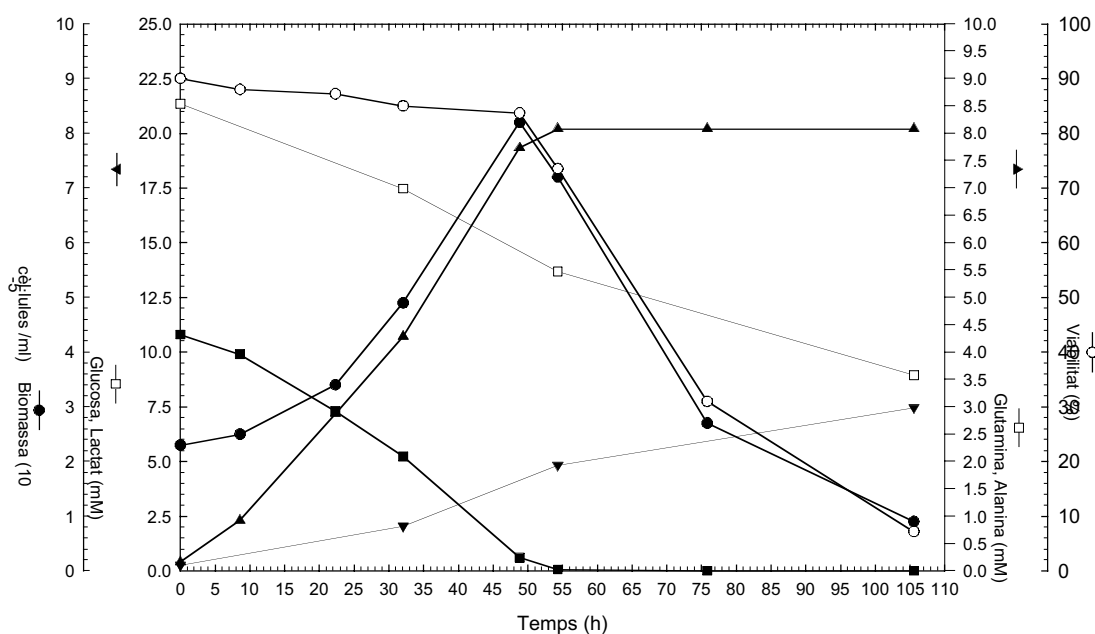


Figura 4.14: Evolució de la concentració cel·lular i dels metabolits principals en un cultiu en discontinu de l'hibridoma KB26.5.

L'evolució de la concentració cel·lular mostra com en una primera fase d'adaptació al medi (fase de latència) les cèl·lules viables disminueixen lleugerament fins que a partir de les 24 hores comencen a créixer exponencialment a velocitat específica màxima de creixement de 0.0301 h^{-1} . A les 50 hores de cultiu s'arriba a la màxima concentració cel·lular. Tot seguit, es produeix una ràpida davallada en la viabilitat cel·lular. El moment en que es produeix aquesta entrada en la fase de mort del cultiu coincideix amb l'exhauriment de la glucosa en el medi de cultiu, fet que posa de manifest el paper essencial d'aquest nutrient en el metabolisme de l'hibridoma. Com es pot veure, la glucosa és consumida ràpidament i en grans quantitats per les cèl·lules d'hibridoma. Simultàniament s'observa una acumulació de lactat que arriba a valors de 20 mM (aprox. 1.8 g/l, el que representa quasi un 80% de la glucosa consumida). A la mateixa figura es pot observar l'evolució de l'altre substrat principal del cultiu, la glutamina, que, de la mateixa manera que succeeix amb la glucosa, és consumida ràpidament per les cèl·lules i en quantitats molt superiors a la resta de components del medi. Paral·lelament al consum de glutamina s'observa també un augment considerable en la concentració d'amoni en el medi.

A la figura 4.15 es mostra un esquema de les principals rutes de metabolització de la glucosa i la glutamina en les cèl·lules animals. La funció principal de la glucosa, com ja s'ha comentat anteriorment, és la de font de carboni i energia. Com es pot veure, la degradació de la glucosa es produeix al llarg de la glucòlisi, des d'on pot donar lloc a la formació de sucres o de precursors per la síntesi de nucleòtids via la seva incorporació a la ruta de les pentoses fosfat. Per altra banda, seguint la ruta de la glucòlisi la glucosa genera quantitats importants de piruvat al mateix temps que consumeix el NAD^+ .

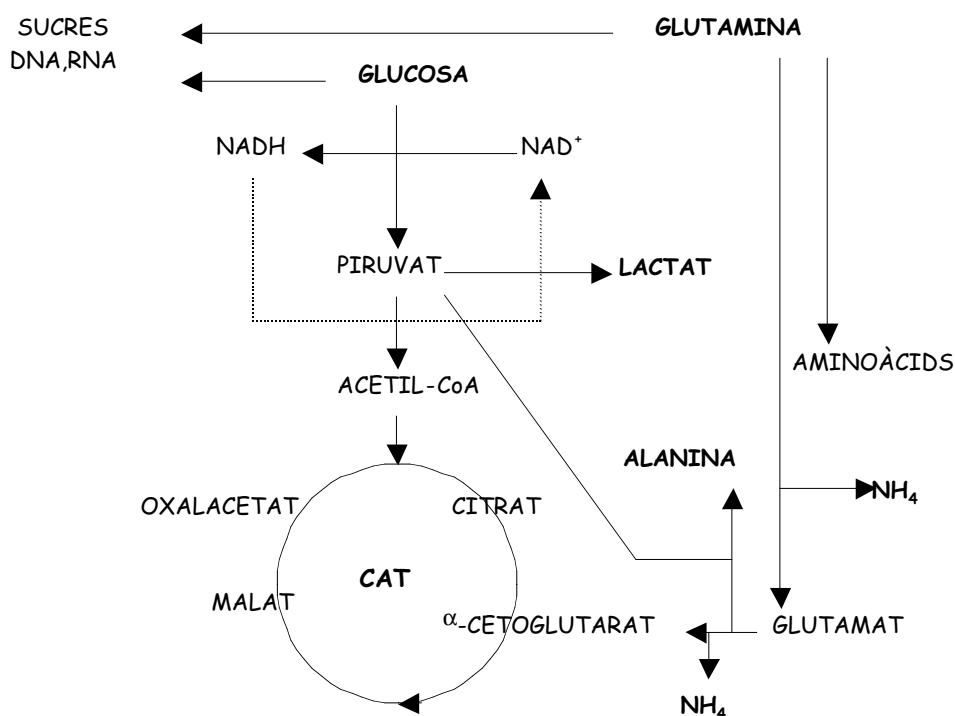


Figura 4.15: Esquema de les principals rutes de metabolització de la glucosa i la glutamina en cèl·lules animals.

Per tal que la glucòlisi pugui operar correctament cal que el $NADH$ format en aquest procés es regeneri a NAD^+ . Per aquest procés de regeneració la cèl·lula disposa de dos mecanismes principals, com es mostra a la figura 4.16. Per una banda el piruvat generat es pot incorporar al cicle dels àcids tricarboxílics per a la seva oxidació total fins a CO_2 , en un procés altament efectiu per a l'obtenció d'energia en forma d'ATP. Aquest mecanisme però, es troba limitat per la baixa velocitat de transport del $NADH$ (mitjançant la llançadora Malat-Aspartat) a l'interior del mitocondri, de manera que la cèl·lula fa ús d'un segon sistema per regenerar el $NADH$ basat en la conversió de piruvat a lactat. Aquest sistema però, és molt menys efectiu tant pel que fa al rendiment energètic com a l'aprofitament de la glucosa, ja que una gran proporció d'aquesta és desviada a la formació d'un producte, el lactat, que la cèl·lula no necessita per al seu creixement, com s'ha pogut veure de l'evolució de les concentracions de glucosa i lactat mostrada a la figura 4.14. Per altra banda, cal tenir en compte que l'acumulació de lactat provoca

alteracions en el pH del medi, les quals poden arribar a ser perjudicials per a la correcta evolució del cultiu.

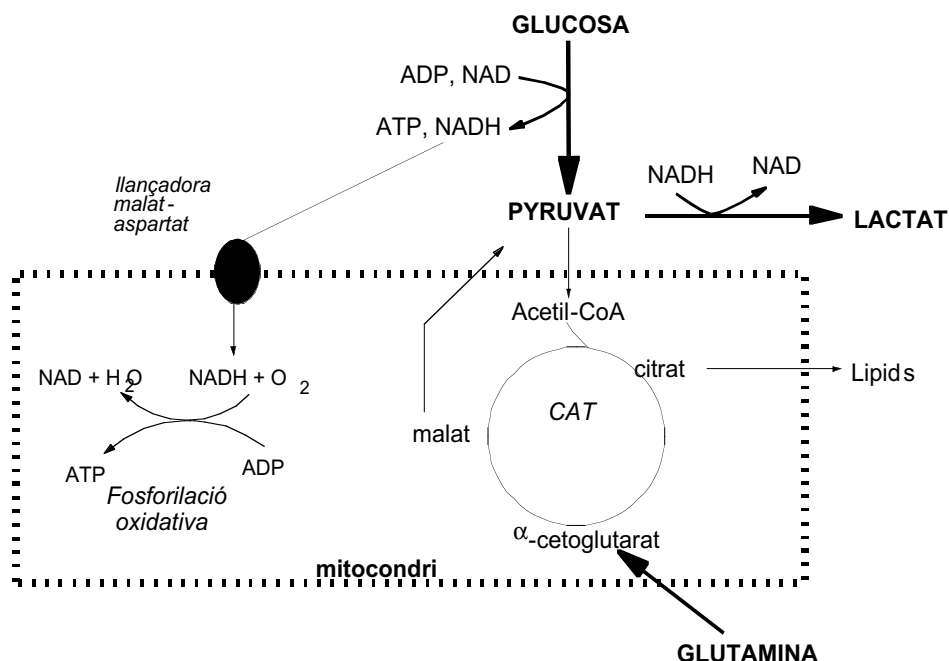


Figura 4.16: Mecanismes de regeneració del NADH generat en la glucòlisi en NAD^+ : Conversió de piruvat en lactat al citoplasma, i fosforilació oxidativa al mitocondri.

La glutamina actua principalment com a font secundària de carboni i energia, així com a font principal de nitrogen. Com es pot veure a la figura 4.15, la glutamina intervé en la síntesis de proteïnes, mitjançant la formació d'altres aminoàcids i la generació de nucleòtids per a la síntesi d'àcids nucleics. Per altra banda, la glutamina s'incorpora al cicle dels àcids tricarboxílics a partir de la formació de glutamat i la conseqüent transformació a α -cetoglutarat. En cada un d'aquests passos es generen ions amoni i, a més a més, la glutamina descomposa espontàniament per formar glutamat i ions amoni a les condicions de temperatura i pH a les que es realitzen els cultius de cèl·lules animals. Per tant, es pot dir que la metabolització de la glutamina és la font principal de formació de ions amoni, i la seva concentració augmenta durant el cultiu, com s'ha pogut veure en els resultats presentats a la figura 4.14.

Per la línia cel·lular KB26.5 estudis realitzats prèviament mostren que l'amoni presenta efectes inhibitoris a concentracions superiors a 4 mM. Un dels mecanismes dels que disposa la cèl·lula per reduir les elevades concentracions d'amoni és la transformació de glutamat en α -cetoglutarat mitjançant la reacció de transaminació amb el piruvat per donar lloc a la formació d'alanina, que constitueix un dels principals subproductes del cultiu de cèl·lules animals, tot i que en aquest cas la seva acumulació no presenta efectes tòxics sobre les cèl·lules.

Amb aquest estudi s'ha pogut observar com, en cultius en discontinu on el medi conté elevades concentracions de glucosa i glutamina, aquests dos substrats són consumits a altes velocitats en un procés molt poc eficient des del punt de vista energètic, ja que el punt final de la seva metabolització són principalment subproductes cel·lulars com el lactat, l'amoni i l'alanina. A banda del malbaratament de les fonts de carboni i energia que suposa la formació d'aquests subproductes, la seva acumulació en el medi al llarg del cultiu suposa l'alteració continua de l'entorn en que es troben les cèl·lules durant el procés. Aquest fet constitueix en molts casos una important limitació a l'hora d'assolir processos amb una més elevada concentració cel·lular màxima i una prolongació de la durada del cultiu, és a dir, una millor productivitat del procés.

Finalment, de tota la informació presentada en aquest apartat, es pot resumir que l'elevada captació de glucosa que es dona en condicions aeròbies tant a *Escherichia*, *Saccharomyces* com l'hibridoma KB26.5 comporta un desacoblament del metabolisme que es compensa per la generació de subproductes. En el cas d'*Escherichia* aquest desacoblament es deu a la manca de capacitat del CAT d'acomodar el piruvat generat en la glucòlisi. En els llevats el desacoblament es deu a la manca de capacitat de transport d'Acetil-CoA al mitocondri. A les cèl·lules animals es deu a la manca de capacitat del sistema d'entrada de NADH al mitocondri (llançadora Malat-Aspartat).

A *Escherichia*, pel fet de no haver-hi compartimentalització cel·lular, l'excedent de carboni que no pot ser acomodar al CAT és desviat cap a la síntesi d'acetat. Aquest mecanisme permet a la cèl·lula, a més a més d'acomodar el carboni excedentari, obtenir energia en forma d'ATP, tot i que comparativament amb menor rendiment que si entrés al CAT i s'utilitzés el poder reductor a la cadena respiratòria. Aquest mecanisme presenta uns límits imposats per la pròpia toxicitat de l'acetat quan s'acumula al medi de fermentació. S'ha explicat aquest fenomen en termes d'evolució metabòlica, sobretot arrel de l'aparició de la respiració quan els organismes van aprendre a obtenir l'hidrogen de l'aigua i emprar l'oxigen com acceptor final d'electrons. Però l'evolució va continuar, i les cèl·lules van adquirir noves característiques morfològiques, fruit de relacions de cooperativitat. L'aparició de les cèl·lules eucariotes i de nous sistemes de transport entre els compartiments va fer que prenguessin importància nous sistemes de transport, a més a més dels de captació de substrats extracel·lulars. La cèl·lula es va veure obligada a regenerar el NADH produït en la glucòlisi per continuar amb el procés de creixement. En aquest cas els sistemes de transport d'intermediaris reduïts cap al mitocondri van adquirir una rellevant importància. Aquests mecanismes van comportar noves relacions metabòliques entre els intermediaris metabòlics, i van aparèixer noves limitacions. S'havia de compensar l'elevada velocitat glucolítica tant pel que fa a carbonis com pel NADH, i els mecanismes de compensació van seguir obligant a la cèl·lula a produir subproductes metabòlics, que d'igual manera que passava *Escherichia*, inhibeixen el creixement quan s'acumulen al medi extracel·lular. Mentre a *Saccharomyces* la limitació d'incorporació d'Acetil-CoA al CAT per manca de capacitat de transport, obliga a la cèl·lula a regenerar el NADH reduint el piruvat fins etanol, a les cèl·lules animals, com l'hibridoma KB26.5, s'ha de compensar entrant el NADH a través de la llançadora Malat-aspartat, la qual presenta alhora una capacitat limitada i obliga a la cèl·lula a produir lactat en grans quantitats per compensar els nivells de NAD^+ necessaris per l'elevada activitat glucolítica.

Tot i que les conseqüències de l'elevada captació de glucosa i elevada activitat glucolítica són diferents per un i altres tipus cel·lulars, totes comparteixen com a causa comú la derivada del seu passat ancestral de metabolisme anaeròbic i elevada captació de substrats.

Tant els bacteris com els llevats creixen habitualment com a organismes unicel·lulars, poden obtenir l'energia per respiració o fermentació segons la disponibilitat d'oxigen i, a més a més, presenten una ampla capacitat d'adaptació a diferents situacions nutricionals i ambientals. Per una altra costat, les cèl·lules animals, de per sí confinades en teixits, requereixen per créixer condicions ambientals molt més controlades i constants i són, de fet, les cèl·lules més sensibles als canvis en l'ambient. Cap d'aquests tipus cel·lulars està en principi adaptat a créixer en excés de nutrients i per tant, quan es cultiven al laboratori, han de compensar l'excedent de la font de carboni per algun o altre mecanisme.

Per tant alhora de comparar aquests tipus cel·lulars s'ha tenir en compte sobretot, la compartimentalització de la cèl·lula eucariota. Mentre en els bacteris, d'estructura cel·lular procariota, no hi ha compartimentalització en orgànuls cel·lulars (l'única barrera és la membrana cel·lular) i els enzims operen a nivell citoplasmàtic, en els llevats i en les cèl·lules animals la compartimentalització, sobretot pel que fa al mitocondri (on opera el CAT i es realitza la respiració), exigeix de sistemes de transport addicionals als de membrana cel·lular, que permetin mantenir els nivells dels intermediaris i cofactors enzimàtics, com els dinucleòtids d'adenosina i nicotinamida, flavina, etc... en la seva forma oxidada o reduïda, a un i altre costat. En aquests, per tant, hi participen sistemes transportadors específics de cada compartiment que incorporen una major complexitat fisiològica i metabòlica.