

**ANÁLISIS DE MODOS ELEMENTALES PARA LA EVALUACIÓN DE
RUTAS METABÓLICAS QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DE
POLÍMEROS TIPO POLIHIDROXIALCANOATO EN *Ralstonia eutropha*
H16.**



JAIME LEONARDO MORENO GALLEGO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar por el título de

Microbiólogo Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C. 2012**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N°13 de Julio de 1946.

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral Católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**ANÁLISIS DE MODOS ELEMENTALES PARA LA EVALUACIÓN DE
RUTAS METABÓLICAS QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DE
POLÍMEROS TIPO POLIHIDROXIALCANOATO EN *Ralstonia eutropha*
H16.**



JAIME LEONARDO MORENO GALLEGO

APROBADO

Ingrid Schuler Ph.D
Decana Académica

Janeth Arias Palacios M.Sc, M.Ed
Directora de Carrera

**ANÁLISIS DE MODOS ELEMENTALES PARA LA EVALUACIÓN DE
RUTAS METABÓLICAS QUE INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN DE
POLÍMEROS TIPO POLIHIDROXIALCANOATO EN *Ralstonia eutropha*
H16.**



JAIME LEONARDO MORENO GALLEGO

APROBADO

Vladimir Moreno Gutiérrez M.Sc

Director

Ivonne Gutiérrez Rojas M.Sc.

Codirectora

Raúl Poutou Piñales Ph.D.

Jurado

Tabla de Contenido

Resumen.....	7
Introducción.....	8
Planteamiento y Justificación del Problema.....	9
Objetivos.....	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos.....	10
Marco Teórico.....	11
1. Polímeros.....	11
2. Plásticos.....	11
3. Polihidroxicanoatos.....	11
4. Estructura de los Polihidroxicanoatos.....	11
5. <i>Ralstonia eutropha</i> H16.....	12
6. Análisis de rutas metabólicas.....	13
7. Modos elementales.....	14
Metodología.....	16
1. Construcción del modelo metabólico.....	16
2. Análisis de modos elementales – Análisis computacional.....	16
Resultados y Discusión.....	17
Conclusiones.....	24
Recomendaciones.....	25
Bibliografía.....	26
Anexos.....	28
Anexo 1. Archivo de entrada para METATOOL.....	28
Anexo 2. Nomenclatura de los metabolitos que intervienen en el modelo...30	30

Anexo 3. Modos elementales productores de PHA.....	32
Anexo 4. Mapas metabólicos de los grupos involucrados en la producción de polihidroxicanoatos.....	34
Anexo 5. Descripción de las reacciones implicadas en cada uno de los modos elementales productores de polihidroxicanoatos.....	38

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopolímeros acumulados en forma de inclusiones citoplasmáticas en una gran variedad de microorganismos, poseen propiedades similares a las de los plásticos derivados del petróleo, y se constituyen en la alternativa más atractiva para remplazarlos. Dada la gran cantidad de esfuerzos realizados para optimizar procesos de producción y siendo *Ralstonia eutropha* H16 el microorganismo más estudiado para la producción de estos biopolímeros, se empleó un modelo metabólico que comprende 68 reacciones metabólicas para evaluar las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de PHAs. Como técnica de evaluación se empleó el análisis de modos elementales que, luego de una “traducción” de un sistema bioquímico a un lenguaje matemático, permite el desarrollo de sistemas de desigualdades lineales basándose en las propiedades del análisis convexo y cuya solución representa aquellas rutas metabólicas o modos elementales que son estequiométrica y termodinámicamente posibles dentro del modelo bioquímico inicialmente dado. En total 688 modos elementales fueron obtenidos de los cuales 40 permiten la producción de PHAs. Luego de una comparación del rendimiento PHA/sustrato y ATP/sustrato el modo elemental número 134 fue seleccionado como aquel que maximiza la producción de PHA y ATP con un rendimiento de 1mol/mol fructosa y 7 mol/mol fructosa, respectivamente.

Palabras clave: *Ralstonia eutropha* H16, Polihidroxicanoatos, análisis de modos elementales.

Introducción

En la actualidad, la comunidad científica se encuentra trabajando en alternativas que permitan reemplazar los productos derivados de los combustibles fósiles dado que estos son catalogados como una fuente no renovable y sus productos derivados un problema de contaminación. Uno de los productos derivados de los combustibles fósiles es el plástico, material no renovable y no biodegradable pero de infinitas aplicaciones (1).

La alternativa más atractiva para reemplazar el plástico son los polihidroxicanoatos (PHAs), biopolímeros con propiedades similares a los plásticos, biodegradables y obtenidos a partir de fuentes renovables. Sin embargo, el alto costo de producción es el principal factor que limita su comercialización (1-3).

Con el fin de optimizar los procesos de producción se han empleado diferentes métodos, siendo los más satisfactorios aquellos métodos que utilizan técnicas de biología molecular; sin embargo, debido a la complejidad de los sistemas biológicos y con el fin de obtener mejores resultados es necesario dirigir las modificaciones a realizar. Para conseguir dicho propósito es de vital importancia conocer que cualidades metabólicas posee el organismo involucrado, así como encontrar un método que permita comparar cuantitativamente las capacidades conocidas. Lo primero es posible gracias a la genómica, dado que una vez un genoma ha sido completamente secuenciado y anotado la red metabólica que representa todas las reacciones metabólicas que tienen lugar en la célula puede construirse, mientras que para lo segundo, técnicas que tienen como base el análisis convexo han surgido desde los 90's, las cuales permiten evaluar las capacidades metabólicas y el desempeño de una red metabólica. Una de las técnicas es conocida como análisis de modos elementales (EMA, de sus siglas en inglés), a través de la cual es posible definir y describir todas las rutas estequiométrica y termodinámicamente posibles de obtener a partir de un sistema de reacciones (4-6).

En este proyecto se evaluó, mediante el uso del análisis de modos elementales, la capacidad que posee el microorganismo *Ralstonia eutropha* para producir PHAs, para así contribuir a futuros procesos que busquen la optimización del biopolímero en su producción.

Planteamiento y Justificación del Problema

Se sabe que en varias ocasiones productos biotecnológicos no llegan a la etapa de comercialización debido a que su costo de producción impide que su valor de venta logre competir con los productos homólogos que se encuentran bien establecidos en el mercado. Este es el caso de los PHAs, que tras varios intentos de ser empleado comercialmente, los bajos precios de su homólogo, el plástico, no lo han permitido. Además, el plástico, debido a sus diferentes propiedades tales como bajo costo, estabilidad, durabilidad, entre otras, se ha convertido en un material ideal para diferentes aplicaciones, haciendo que su producción crezca significativamente. Este crecimiento, sumado al uso cotidiano de los productos plásticos, conlleva a un problema serio de contaminación, pues a pesar de sus útiles propiedades físico-químicas los plásticos son polímeros obtenidos a partir de fuentes no renovables, no biodegradables y sus procesos de tratamiento y eliminación generan compuestos aún más tóxicos y nocivos (1).

Es por esto que diferentes alternativas han sido empleadas para optimizar su producción, siendo las técnicas moleculares las más exitosas a la hora de aumentar rendimientos; más aún, el objetivo no ha sido alcanzado.

Teniendo en cuenta que es el metabolismo celular quien determina las capacidades biológicas que posee un organismo y que los objetivos metabólicos son alcanzados debido a sofisticados procesos de control que distribuyen y procesan los recursos metabólicos a través de la red metabólica celular, es de interés emplear técnicas que permitan navegar en dicha red metabólica y reconocer sus objetivos, pensando en adquirir un mayor conocimiento sobre los procesos de control metabólico para así favorecer ciertos objetivos frente a otros de menor interés(4). Técnicas como el Análisis de Modos Elementales, fundamentadas en el análisis convexo que posibilita la solución de sistemas de desigualdades lineales, permiten definir y describir de manera comprensiva todas las rutas metabólicas que son, estequiométrica y termodinámicamente, posibles de obtener a partir de una red metabólica por lo que se constituye en una útil herramienta para determinar rendimientos máximos, submáximos y, en general, para determinar la capacidad que posee un microorganismo para lograr sus objetivos metabólicos (6, 7).

Dado que *Ralstonia eutropha* ha sido considerado como el microorganismo modelo para la producción de PHAs, emplear técnicas como el Análisis de Modos Elementales para evaluar y analizar su metabolismo permitirá contribuir en futuros procesos que busquen la optimización de la obtención del biopolímero en su producción.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la capacidad metabólica de biosíntesis de PHAs para la optimización de su producción en *Ralstonia eutropha* empleando como herramienta el Análisis de Modos Elementales.

Objetivos específicos

1. Construcción de un modelo metabólico que refleje la producción de PHAs en *Ralstonia eutropha*.(Identificar la topología del metabolismo de *Ralstonia eutropha* a partir de su matriz estequiométrica).
2. Identificar el conjunto de modos elementales de interés para la biosíntesis de PHAs en *Ralstonia eutropha*.
3. Determinar el conjunto de rutas con rendimientos óptimos para la producción de PHAs.

Marco Teórico

1. Polímeros

Los polímeros son compuestos naturales o sintéticos conformados por la unión de dos o más monómeros, iguales o diferentes según sea un homopolímero o un heteropolímero, mediante enlaces químicos (1).

2. Plásticos

El plástico es un material generalmente derivado del petróleo con propiedades físico-químicas que le permite ser moldeable para la fabricación de objetos en un sin número de aplicaciones, por lo cual ha venido desplazando otros materiales como la madera, el metal, el vidrio, entre otros, en diferentes industrias. Sin embargo, debido a que el plástico no es biodegradable el uso indiscriminado de este material se ha convertido en un problema ambiental pues constituye el 60-80% de los desechos marinos y 1/3 del volumen de los desechos municipales. Además su fabricación requiere de 150 millones de toneladas de combustible fósil y la producción de compuestos tóxicos durante la incineración del plástico incrementa la gravedad del problema (1).

3. Polihidroxialcanoatos

En general, en la naturaleza se producen diferentes tipos de biopolímeros, todos con características y propiedades diferentes y no todos biodegradables. Los bioplásticos más conocidos son los polihidroxialcanoatos (PHAs) los cuales son producidos por una gran variedad de microorganismos y poseen propiedades similares a las de los plásticos derivados del petróleo, siendo además biodegradables y producidos a partir de fuentes renovables; por lo cual se constituyen como la mejor opción para remplazar al plástico derivado del petróleo (1-3, 8).

4. Estructura.

Los PHA se componen de monómeros de Ácido-3-hidroxialcanoico (Ver figura 1). El grupo carboxilo de un monómero se une al grupo funcional alcohol del carbono

tres del monómero siguiente formando un enlace éster. Por último el carbono tres del monómero posee un radical R que puede ser o no saturado (1).

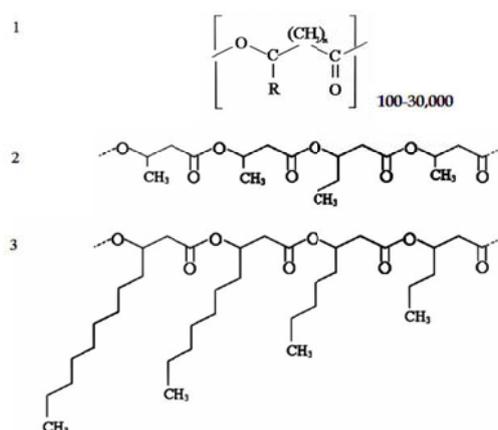


Figura1. Estructuras químicas de los PHAs. 1. Estructura de los monómeros de PHA. 2. Copolímero polihidroxibutirato-co-polihidroxivalerato. 3. PHAs de cadena media. Tomado de (1).

5. *Ralstonia eutropha* H16

*Ralstonia eutropha*H16 es un microorganismo Gram-negativo, facultativo, quimiolitotrofo perteneciente al orden *Betaproteobacteria*. Dadas sus características metabólicas es un microorganismo de gran interés biotecnológico y quizás es microorganismo mejor examinado en lo que a producción de polihidroxicanoatos se refiere.

Bajo condiciones limitantes de crecimiento, siempre que halla disponibilidad en exceso de una fuente de carbono *R. eutropha*H16 acumula grandes cantidades de carbono en forma de inclusiones citoplasmáticas de polihidroxibutirato (PHB). La síntesis de PHB ocurre en tres pasos y es mediada por las enzimas acetil-CoA aciltransferasa (PhaA) (E.C.2.3.1.B2), que cataliza la conversión de dos moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA; la enzima acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) (E.C. 1.1.1.36) que reduce el acetoacetil-CoA a R-3-hidroxibutiril-CoA y finalmente la enzima clave PHB sintasa (E.C. 2.3.1.B2) que cataliza la polimerización de R-3-hidroxibutirilCoA (9).

6. Análisis de rutas metabólicas.

Con el desarrollo de la genómica la modelación de rutas metabólicas ha generado especial interés con el fin de realizar desarrollos en aplicaciones biotecnológicas y la tecnología del ADN recombinante abre las posibilidades de redirigir flujos metabólicos hacia un producto deseado o incrementar el rendimiento de una biotransformación ya existente. Para el desarrollo de este tipo de aplicaciones se requiere considerar las propiedades estructurales de las redes bioquímicas más que las propiedades cinéticas, ya que las propiedades cinéticas son variables y por lo tanto desconocidas, mientras que la estructura bioquímica del sistema en términos de cómo los metabolitos están conectadas unas con otras mediante reacciones bioquímicas puede considerarse una propiedad constante y conocida (10).

El análisis metabólico consiste en identificar la topología del metabolismo celular basándose únicamente en la estructura estequiométrica del mismo, es decir, identificar las características y capacidades de un metabolismo basándose únicamente en aquella propiedad invariable que es la estructura bioquímica (6).

En general, el análisis se basa en el principio de conservación de la masa y en la descripción de un sistema de reacciones químicas como:

$$\frac{d}{dt} C = S \cdot V - \mu \cdot C \quad [1]$$

Donde: C es el vector de concentraciones (mol/L) de m metabolitos internos; V es el vector de tasas de reacción de n reacciones que transforman los metabolitos; S es la matriz estequiométrica de tamaño m x n $-s_{ij}$ representa el coeficiente estequiométrico del metabolito i en la reacción j- ; y μ es la tasa de dilución específica asociada al cambio de volumen.

En un sistema biológico, como una célula, la tasa de dilución específica es mucho menor a la tasa de consumo del metabolito por lo que μ se considera despreciable. Además, dado que las tasas de reacción deben satisfacer condiciones de equilibrio donde no hay acumulación de metabolitos internos, el sistema de ecuaciones tendrá la siguiente forma:

$$S \cdot V = 0 \quad [2]$$

En términos matemáticos esto quiere decir que el vector de tasas de reacción, V , (flujo metabólico) debe encontrarse en el espacio nulo o kernel de la matriz S . Este espacio nulo puede ser representado por sus vectores generadores, así que es de interés del análisis metabólico encontrar aquellos vectores generadores que pueden tener una interpretación biológica (6, 7, 10, 11).

7. Modos elementales

Con el fin de describir totalmente el sistema de biotransformaciones descrito anteriormente se debe agregar la siguiente condición:

$$V_j \geq 0 \quad [3]$$

Donde: V_j es el valor de la tasa de reacción de la reacción j en la matriz S . Dicha restricción a cada tasa de reacción implica que cada reacción es no negativa evitando dividir una reacción reversible en dos y definiéndolas como aquellas reacciones que pueden proceder en cualquier dirección y que no están sujetas a la condición (6, 7, 10, 11).

Además, de las implicaciones conceptuales esta restricción tiene implicaciones al momento de resolver el sistema de biotransformaciones. Dicha desigualdad implica que los conceptos del álgebra lineal no sean suficientes para solucionar el sistema, por lo cual surge la necesidad de emplear el análisis convexo, capaz de tratar con sistemas de desigualdades lineales. Además define el espacio solución del sistema pues en el análisis convexo el conjunto solución de cualquier conjunto de desigualdades lineales es un conjunto convexo que corresponde geoméricamente a un cono poliédrico convexo en R^n (12).

En dicho conjunto solución o cono convexo podemos encontrar un subconjunto de vectores flujo que cumplen con las siguientes características:

- i) Condición de equilibrio.
- ii) Factibilidad termodinámica
- iii) Elementalidad, No existe un vector flujo V^* tal que V' y V'' cumplan con:
 - ✓ $V^* = V' + V''$
 - ✓ V' y V'' Cumplan i) y ii).

- ✓ V' y V'' contengan el mismo número de ceros y al menos uno contenga más ceros que V^* , es decir que sean mas elementales que V^* .

Así cada vector flujo que cumple con las características mencionadas anteriormente será definido como un modo elemental (6, 7, 10, 11).

Metodología

1. Construcción del modelo metabólico.

Para la construcción de un modelo metabólico se utilizó el modelo reconstruido por Park y colaboradores (13). Dicho modelo representa todas las reacciones metabólicas que tienen lugar en el metabolismo de *R. eutropha* debido a que para ello emplearon información genómica y bioquímica específica del microorganismo. La información genómica fue obtenida mediante el uso de la totalidad del genoma secuenciado y anotado del microorganismo –disponible en NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>–, mientras que la información referente a las reacciones bioquímicas fue obtenida a partir de diferentes bases de datos tales como: KEGG, BioSilico, Metacyc y UMBBD. Dicho modelo posee 1391 reacciones metabólicas y 1171 metabolitos.

Dada la complejidad del modelo realizado por Park y colaboradores sólo un subconjunto de este fue tomado como modelo metabólico. El subconjunto seleccionado fue aquel que representa el metabolismo central del microorganismo (glucolisis, ciclo de los ácidos tricarbóxicos –TCA- y vía de las pentosas fosfato) y la síntesis de PHA (metabolismo del butanoato).

2. Análisis de Modos Elementales – Análisis Computacional

El análisis del modelo metabólico construido fue realizado mediante el uso del programa de libre acceso METATOOL (versión 5.1). METATOOL permite la obtención sistemática de los Modos Elementales presentes en el modelo, es decir, permite obtener todas las rutas metabólicas “mínimas” que son estequiométrica y termodinámicamente realizables en el modelo construido (14).

Como entrada METATOOL requiere la declaración de las reacciones metabólicas reversibles e irreversibles, así como la declaración explícita tanto de los metabolitos externos como de los metabolitos internos involucrados en dichas reacciones, por lo cual la información empleada para realizar el modelo metabólico se escribió en la sintaxis deseada para el buen funcionamiento de METATOOL (Anexo 1).

Finalmente, con el fin de organizar los resultados obtenidos y encontrar aquellos modos elementales que optimizan la producción de PHA se desarrolló un programa en lenguaje de programación C++ denominado MyOptiMode e inspirado en el programa desarrollado por Ferdinand Moldenhauer denominado OptiMode –

disponible en <http://pinguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik->. A diferencia de OptiMode, el programa desarrollado recibe como entrada únicamente la estequiometría de los modos elementales encontrados luego del análisis con METATOOL y al igual que Optimode ordena los modos elementales que allí se encuentran de acuerdo al radio de producción de un producto a partir de un sustrato especificado, detectando así los modos elementales con el mayor rendimiento molar.

Resultados y Discusión

Modelo metabólico.

El modelo metabólico construido constituye una pequeña parte del modelo realizado por Park y colaboradores (13). En él se representa el metabolismo central de *R. eutropha*, subsistema seleccionado para el desarrollo del modelo debido a que se considera como la “columna vertebral” del metabolismo celular, a partir de la cual, se obtienen diversos metabolitos para la síntesis de una gran cantidad de componentes celulares tales como: nucleósidos, ribosa, desoxirribosa, ácidos grasos, y fosfolípidos (15). Además del metabolismo central el modelo también refleja la producción de PHAs –PHA sintasa (E.C. 2.3.1.B2) R51-, el consumo de PHAs –PHA depolimerasa (E.C. 3.1.1.75), R52- y los metabolitos y reacciones que intervienen en dicho proceso –metabolismo del butanoato- (Figura 2).

El modelo posee 57 metabolitos internos, 15 metabolitos externos y 68 reacciones metabólicas –de las cuales 38 son consideradas reacciones reversibles y 30 irreversibles- (Anexo 1). Es importante aclarar que con fines del modelo las moléculas NAD y NADH fueron consideradas iguales que las moléculas NADP y NADPH respectivamente y que las enzimas que intervienen en el ciclo del glioxilato, a saber: malato sintasa (E.C. 2.3.3.9) e isocitrato liasa (E.C. 4.1.3.1), fueron mantenidas en el modelo ya que aunque estudios previos demuestran una menor expresión de los genes implicados en la síntesis de dichas enzimas cuando se emplea un carbohidrato como sustrato la expresión de los genes no es reprimida en *R. eutropha* (16). La fuente de carbono en el modelo es fructosa puesto que, quizás debido a los transportadores de glucosa, *R. eutropha* no sustenta su desarrollo a partir de glucosa (9).

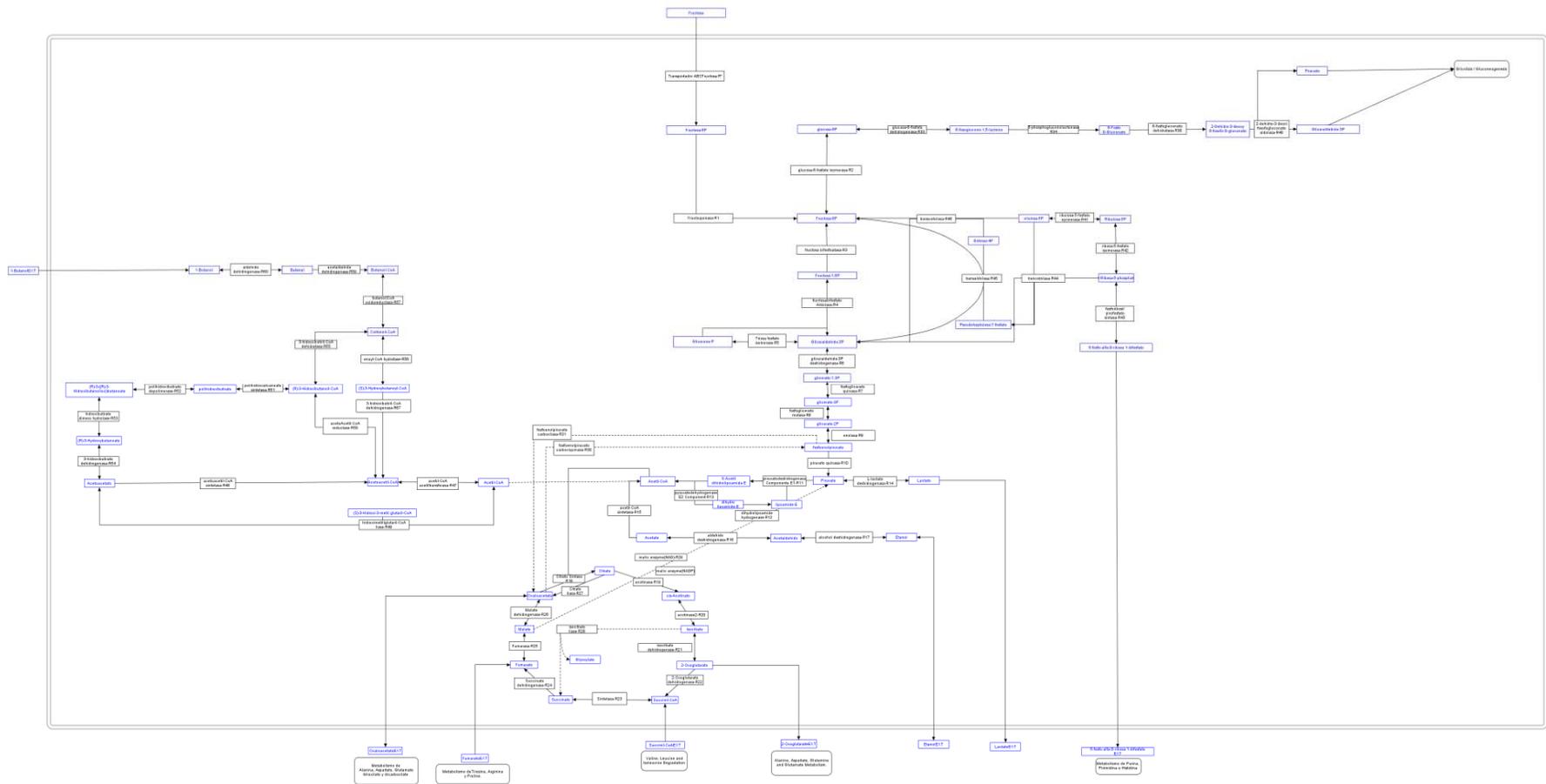


Figura 2. Modelo metabólico de *R.eutropha*. La estequiometría de las reacciones puede verse en el anexo 2.

Análisis de Modos Elementales-Análisis computacional.

Luego del análisis del modelo metabólico con METATOOL, 688 modos elementales fueron encontrados y como particularidad es importante destacar que todos los modos elementales que degradan la fructosa realizan dicho proceso vía Entner-Doudoroff. Esta particularidad se debe a que el modelo refleja la ausencia de la enzima fosfofructoquinasa (E.C 2.7.1.11) en *R. eutropha* quien no posee el gen para la expresión de dicha enzima clave en la ruta de degradación Embden-Meyerhoff-Parnas (9). Esto resalta la importancia de emplear información metabólica precisa del microorganismo para realizar el análisis de modos elementales pues de no haberse empleado correctamente la información de *R. eutropha* modos elementales que lleven a cabo la degradación de la glucosa vía Embden-Meyerhoff-Parnas hubieran podido obtenerse.

En total, 40 de los 688 modos permiten la producción de PHAs a partir de fructosa (Anexos 3 y 5) haciendo uso para su síntesis de 3 enzimas clave en el proceso: acetil-CoA aciltransferasa o β -cetotiolasa (E.C. 2.3.1.9) –R47-, la enzima NADPH dependiente acetoacetyl-CoA reductasa (E.C.1.1.1.36) –R50-y polihidroxialcanoato sintasa (E.C. 2.3.1.B2) –R51-(17).

Los 40 modos elementales identificados para la producción de PHAs fueron agrupados en 7 grupos metabólicos, donde cada grupo metabólico representa una ruta metabólica empleada por varios modos elementales para la producción del polímero y donde cada modo elemental se diferencia únicamente en algunas reacciones de fosforilación oxidativa.

Los grupos metabólicos 1, 2 y 3 se caracterizan por presentar el mayor rendimiento producto sustrato, 1 mol de PHA por cada mol de fructosa consumida, y también por no presentar dentro de su ruta metabólica reacciones pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarbónicos, ni tampoco reacciones de transporte que dejen fuera metabolitos intermediarios en su ruta de producción (Anexo 4, Figuras 3, 4 y 5); por su parte, los otros grupos metabólicos, 4, 5, 6, y 7, prestan un rendimiento menor o igual a 0.5 molPHA/molFructosa (Tabla 1) y llevan a cabo o bien reacciones pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarbónicos o bien reacciones de transporte que dejen fuera metabolitos intermediarios en su ruta de producción de PHAs (Anexo 4, Figuras 6, 7, 8 y 9).

Tabla1. Distribución de los Modos Elementales productores de PHAs en sus respectivos grupos metabólicos. **Y(PHA/FRU):** rendimiento producto(PHA)-sustrato(fructosa).

Grupo Metabólico	Modos Elementales Participantes	Y(PHA/FRU)
1	149, 200, 282, 494, 495	1
2	134, 185, 267, 452, 455	1
3	140, 189, 271, 462, 463	1
4	136, 137, 187, 269, 454, 457, 458	0.5
5	138, 139, 188, 270, 459, 460, 640	0.5
6	135, 186, 268, 453, 456	0.5
7	348, 641	0.25

En particular los grupos metabólicos 4 y 5 realizan todo o parte del ciclo de los ácidos tricarbónicos, ruta metabólica que compite entonces por el acetyl-CoA, sustrato de la enzima β -cetotilasa (E.C. 2.3.1.9), afectando así el flujo de moléculas de carbono dirigido a la producción de PHAs. Según Senior y Dawes (18) bajo condiciones balanceadas que permitan el crecimiento celular, la molécula de acetyl Coa alimenta el ciclo de los ácidos tricarbónicos y el CoA-SH resultante inhibe la enzima β -cetotilasa (E.C. 2.3.1.9) (R47 en el modelo) y por lo tanto la síntesis de PHAs. Mientras que bajo limitaciones nutricionales y exceso de la fuente de carbono la concentración de NADH se incrementa inhibiendo la enzima citrato sintasa (E.C. 2.3.3.3) (R18 en el modelo), permitiendo que prevalezca la enzima β -cetotilasa (E.C. 2.3.1.9) para que catalice la condensación de dos moléculas de Acetyl Coa e inicie la síntesis de PHA.

Por su parte el grupo metabólico 6 hace uso de la reacción de transporte R92 eliminando del sistema el oxalacetato generado, mientras que el grupo metabólico 7 reduce el piruvato a lactato dejando muy poco para la producción de Acetyl-CoA y por lo tanto para la producción de PHAs.

Las características mencionadas de estos estados metabólicos demuestran, aunque no haya sido propósito modelar la generación de biomasa, que la producción de PHAs mientras el organismo crece será menor que la producción del biopolímero cuando el crecimiento es limitado ya que para que el microorganismo se reproduzca se requiere de la síntesis de nuevas biomoléculas, lo que direccionará el flujo de carbono hacia la producción de estas nuevas moléculas y no hacia la producción de PHAs tal y como lo muestra el grupo metabólico 6 en el cual parte del oxalacetato generado es expulsado del sistema y

dirigido a la síntesis de aminoácidos por lo que el rendimiento en la producción de PHAs se ve disminuido.

Finalmente, dado que el rendimiento de producción de PHAs no varía entre los modos elementales pertenecientes a un mismo grupo y ya que los grupos metabólicos 1, 2, y 3 presentan el mismo rendimiento para la producción de PHAs a partir de fructosa, un segundo factor fue tenido en cuenta durante el análisis, la producción de ATP para el mantenimiento celular. Este segundo factor fue tenido en cuenta ya que el desarrollo celular requiere más que la síntesis de macromoléculas, requiere además de la obtención de energía para mantener gradientes iónicos, reparar proteínas y polinucleótidos existentes y mantener la infraestructura bioquímica que permitirá responder a diversas condiciones a las que se enfrente el microorganismo (19). Además, la producción de NADH, otra molécula de alta energía al igual que el ATP, se ve favorecida en condiciones de crecimiento para suministrar la energía necesaria para la biosíntesis de nuevas macromoléculas esenciales para el crecimiento. Sin embargo, cuando los recursos no son suficientes para la generación de biomasa la mayor parte de moléculas de NADH se cambian a monedas circulantes de ATP y solo se genera NADH suficiente para satisfacer los requerimientos mínimos biosintéticos de la célula (15). Dado que, como se evidenció anteriormente, la producción de PHAs se ve favorecida en condiciones limitadas de crecimiento es posible considerar que la célula dará prioridad a aquellos modos elementales que permitan un mayor recambio energético, es decir, una mayor producción de ATP.

Tabla2. Modos Elementales productores de polihidroxialcanoato y ATP.
 Y(PHA/FRU): rendimiento producto(PHA)-sustrato(fructosa). Y(ATP/FRU):
 rendimiento producto(ATP)-sustrato(fructosa).

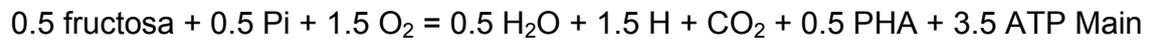
N° Modo Elemental	Grupo Metabólico	Y(PHA/FRU)	Y(ATP/FRU)
138:	5	0.5	16.0
136:	4	0.5	15.0
139:	5	0.5	15.0
137:	4	0.5	14.0
188:	5	0.5	8.5
187:	4	0.5	7.5
134:	2	1.0	7.0
149:	1	1.0	6.0
140:	3	1.0	5.0
135:	6	0.5	5.0
185:	2	1.0	4.0
200:	1	1.0	3.0

186:	6	0.5	2.5
189:	3	1.0	2.0

Dentro de los 688 modos elementales encontrados 102 modos producen ATP a partir de fructosa (datos no mostrados) y tan sólo 14 de ellos producen simultáneamente PHAs y ATP. Como se muestra la tabla 2 los modos elementales productores de ATP y PHAs que pertenecen a los grupos metabólicos 4 y 5 presentan un mayor rendimiento en la producción de ATP; sin embargo, no son tenidos en cuenta dado que se considera que estos modos se ven implicados en el crecimiento celular como se mencionó anteriormente. Es por esto que el modo elemental 134, perteneciente al grupo metabólico 2, se constituye en el modo elemental óptimo para la producción de PHAs en *R. eutropha* bajo el modelo metabólico construido.

Conclusiones

- La producción de PHAs es menor bajo condiciones óptimas para el desarrollo celular, por lo que fermentaciones tipo fed-batch son recomendadas para la producción biotecnológica del biopolímero.
- Según el modelo la ruta óptima para la producción de PHAs en *R. eutropha* está dada por el modo elemental 134 que presenta la siguiente estequiometría:



Recomendaciones

Según Schilling y Palson (20) una red metabólica puede ser subdividida de diferentes subsistemas discretos, considerando la gran cantidad de funciones biológicas inherentes en la red metabólica de un microorganismo. Por esto se recomienda realizar análisis de otros subsistemas metabólicos pertenecientes a *R. eutrophacon* el fin de obtener información más completa de sus capacidades metabólicas.

Por otra parte, es recomendable promover el desarrollo de software que permita la sistematización completa de la técnica, pues a pesar de que el programa METATOOL hace que el análisis de modos elementales sea fácil de aplicar a cualquier conjunto de reacciones la obtención de la información metabólica y el análisis de los resultados de METATOOL son procesos lentos, extenuantes y susceptibles a una sistematización que haría de esta técnica una herramienta mucho más poderosa y realmente aplicable a sistemas biológicos completos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Amara A (2008) Polyhydroxyalkanoates: From basic research and molecular biology to application. *IUM Engineering*9: 37-73.
- [2] Madison L, Huisman G (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*63(1): 21-53.
- [3] Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* 16, 81-96.
- [4] Schilling CH, Letscher D, Palsson BO (2000). Theory for systemic Definition of Metabolic Pathways and their Interpreting Metabolic Function from a Pathway-Oriented Perspective. *Journal of theoretical Biology* 203: 229-248.
- [5] Schuster S, Fell DA, Dandekar T (2000) A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Biotechnology Progress*18(3): 326-332.
- [6] Trinh C, Wlaschin A, Sreenc F (2009) Elementary mode analysis: A useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*81(5): 813-826.
- [7] Schuster S, Hilgetag C (1994) On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *Journal of Biological Systems*2(2): 165-182.
- [8] Rehm BH (2003) Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* 376(1): 15-33.
- [9] Pohlmann A, Fricke W, Reinecke F, Kusian B, Liesegang H, Cramm R, Eitinger T, Ewering C, Potter M, Schwartz E, Strittmatter A, Vo I, Gottschalk G, Steinbüchel A, Friedrich B, Bowien B (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature biotechnology*24: 1257-1262.
- [10] Schuster S, Hilgetag H, Woods JH, Fell DA (2002) Reaction routes in biochemical reaction system: Algebraic properties, validated calculation procedure and example from nucleotide metabolism. *Journal of Mathematical Biology*45: 153-181.

- [11] Schilling CH, Schuster S, Palsson BO, Heinrich R (1999) Metabolic pathway analysis: Basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotechnology Progress* 15: 296-303.
- [12] Boyd S, Vandenberghe L (2004) *Convex Optimization*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.. 731p.
- [13] Park JM, Kim TY, Lee SY (2011) Genome-scale reconstruction and *in silico* analysis of the *Ralstonia eutropha* H16 for polyhydroxyalkanoate synthesis, lithoautotrophic growth and 2-methyl citric acid production. *BMC Systems Biology* 5: 101-112.
- [14] Kamp A, Schuster S (2006) Metatool 5.0: fast and flexible elementary mode analysis. *Bioinformatics Applications Note* 22(15): 1930-1931.
- [15] Karp G. (1998) *Biología celular y molecular*. Primera edición. McGraw-Hill Interamericana. Mexico D.F, Mexico. 746p.
- [16] Brigham C, Budde C, Holder J, Zeng Q, Mahan A, Rha C, Sinskey A (2010) Elucidation of β -Oxidation Pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by Examination of Global Gene Expression. *Journal of Bacteriology* 192(20):5454.
- [17] Cheng G (2010) *Plastics from bacteria: Natural Functions and Applications*. Primera edición. Springer. Münster, Alemania. 450p.
- [18] Senior PJ, Dawes EA (1973) The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal* 134: 225-238.
- [19] Carlson R, Srienc F (2004) Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: Identification of reactions. *Biotechnology and bioengineering* 85(1): 1-19.
- [20] Schilling CH, Palson BO. (2000) Assesment of the Metabolic Capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through a Genome-scale Pathway Analysis. *Journal of theorethical Biology* 203: 249-283.

Anexos

Anexo 1. Archivo de entrada para METATOOL (Contiene la información del modelo metabólico de *Ralstonia eutropha*)

--ENZREV (Reacciones Reversibles)

R54R55R65R14R50R47R19R20R17
R57R9R56R4R25R2R33R6R53R21R
26R66R8R7R43R52R51
R42R41R23R45R44R46R5R60R80R
81R82R83

--ENZIRREV (Reacciones Irreversibles)

R22R40R67R38R34R27R28R59R48
R15R16R18R12R3R1R49R68R69R7
1R29R30R31R11R13R10R24R*R90
R91R92

--METEXT (Declaración de los Metabolitos Externos)

fruExtllac
ethh2o_1bohpihco2pbhbcoaatpMaino
xyExtprppExtakgExtooaExt

--METINT (Declaración de los Metabolitos Internos)

prppakgoaappipppiglxfumsuccoafadfa
dh2atpadpampnadnadhfru_13pdg_2p
g_3h3mgcoa_3hbcoa_3pg_6pglaaco
aacacacacalacooaacn-
Cadlipobutanalc040coaccoacitd6pgcd
hapdlipoe4pf6pfdpg3pg6pikitkdpglipo
malmaltepeppyr3hbcoar3hbnr3hbnr2r
3rhbbr5prl5ps7psuccxu5p

--CAT (Reacciones)

#Glucolisis#

R* : fruExt => fru .

R1 : atp + fru => adp + f6p .

R2 : g6p = f6p .

R3 : fdp + h2o => f6p + pi .

R4 : fdp = dhap + g3p .

R5 : dhap = g3p .

R6 : g3p + nad + pi = _13pdg + nadh
+ 2 h .

R7 : _3pg + atp = _13pdg + adp .

R8 : _2pg = _3pg .

R9 : _2pg = h2o + pep .

R10 : adp + pep => atp + pyr .

R14 : llac + nad = pyr + nadh + h .

R11 : pyr + lipo + h => adlipo + co2 .

R13 : coa + adlipo => accoa + dlipo .

R12 : dlipo + nad => lipo + nadh + h .

R15 : ac + atp + coa + h => accoa +
amp + ppi .

R16 : acal + h2o + nad => ac + 2 h +
nadh .

R17 : eth + nad = acal + h + nadh

#Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos#

R18 : accoa + h2o + oaa => cit + coa
+ h .

R19 : cit = acon-C + h2o .

R20 : acon-C + h2o = icit .

R21 : icit + nad = akg + co2 + nadh .

R22 : akg + coa + nad => co2 + nadh
+ succoa .

R23 : atp + coa + succ + h = adp + pi
+ succoa .

R24 : succ + fad => fum + fadh2 .

R25 : fum + h2o = mal .

R26 : mal + nad = h + nadh + oaa .

R27 : cit => ac + oaa .

#Reacciones Anapleróticas#

R28 : icit => glx + succ .

R29 : mal + nad => co2 + nadh + pyr .

R30 : atp + h + oaa => adp + co2 + pep .

R31 : co2 + h2o + pep => h + oaa + pi

R68 : h2o + ppi => 2 pi .

R69 : h2o + pppi => pi + ppi .

R71 : accoa + glx + h2o => coa + h + mal .

#Pentosas Fosfato#

R33 : g6p + nad = _6pgl + 2 h + nadh.

R34 : _6pgl + h2o => d6pgc + h .

R38 : d6pgc => kdpq + h2o .

R40 : kdpq => g3p + pyr .

R41 : r15p = xu5p .

R42 : r5p = r15p .

R43 : atp + r5p = amp + prpp .

R44 : r5p + xu5p = g3p + s7p .

R45 : g3p + s7p = e4p + f6p .

R46 : e4p + xu5p = f6p + g3p

.#Metabolismo del butanoato#

R47 : 2 accoa = aacoa + coa .

R48 : atp + acac + coa + h => amp + ppi + aacoa .

R49 : _3h3mgcoa => accoa + acac .

R50 : r3hbcoa + nad = aacoa + nadh + 2 h .

R51 : r3hbcoa = pbhb + coa .

R52 : pbhb + h2o = r3hbn2 + r3rhbb + h .

R53 : r3rhbb + h2o = 2 r3hbn + h .

R54 : r3hbn + nad = acac + nadh + h .

R55 : r3hbcoa = ccoa + h2o .

R56 : _3hbcoa = ccoa + h2o .

R57 : c040coa + nad = ccoa + nadh + h .

R59 : butanal + coa + nad => c040coa + nadh + h .

R60 : butanal + h2o + nad = _1boh + 2 h + nadh .

R65 : succoa + acac = succ + aacoa .

R66 : malte = fum .

R67 : _3hbcoa + nad => aacoa + nadh + 2 h .

#Fosforilación oxidativa#

R80 : nadh + 2 adp + oxyExt = nad + 2 atp .

R81 : fadh2 + adp + oxyExt = fad + atp .

R82 : atp = adp + atpMain .

R83 : nadh + fad = nad + fadh2 .

#Reacciones de transporte#

R90 : prpp => prppExt .

R91 : akg => akgExt .

Anexo 2. Nomenclatura de los metabolitos que intervienen en el modelo metabólico.

fruExt: Fructosa Extracelular.
llac: Lactato.
eth: Etanol.
h2o: Agua
_1boh: Butanol.
pi: Fosfato.
h: hidrogeno
co2: Dióxido de Carbono
pbhb: Polihidroxicanoato
coa: Coenzima A.
atpMain: ATP para mantenimiento celular.
oxyExt: Oxígeno extracelular.
prppExt: 5-Fosfo-alfa-Ribosa 1-diFosfato Extracelular.
akgExt: 2-Oxoglutarato.
oaaExt: Oxalacetato extracelular.
prpp: 5-Fosfo-alfa-Ribosa 1-diFosfato.
akg: 2-Oxoglutarato.
oaa: Oxalacetato.
ppi: diFosfato
pppi: triFosfato
glx: Glioxilato.
fum: Fumarato.
succoa: Succinil-CoA.
fad: FAD
fadh2: FADH2
atp: ATP.
adp: ADP.
amp: AMP
nad: NAD.
nadh: NADH.
fru: Fructosa.
_13pdg: 3-Fosfo-D-glicerol Fosfato.
_2pg: D-Glicerato 2-fosfato.

_3h3mgcoa: (S)-3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA
_3hbcoa: (S)-3-Hidroxi-3-butanoil-CoA.
_3pg: 3-Fosfo-D-glicerato.
_6pgl: 6-Fosfo-D-gluconolactona.
aacoa: Acetoacetil-CoA.
ac: Acetato.
acac: Acetoacetato.
acal: Acetaldehido.
accoa: Acetil-CoA.
acon-C: Cis-Acotinato.
adlipo: S-Acetilhidrolipoamida-E.
butanal: Butanal.
c040coa: Butanoil-CoA.
ccoa: Crotonoil-CoA.
cit: Citrato.
d6pgc: 6-Fosfogluconato.
dhap: Glicerona fosfato.
dlipo: Dihidrolipoamida-E
e4p: Eritrosa 4-Fosfato.
f6p: Fructosa 6-Fosfato.
fdp: Fructosa 1.6-diFosfato.
g3p: Gliceraldehido 3-Fosfato.
g6p: Glucosa 6-Fosfato.
icit: Isocitrato.
kdp: 2-Dehidro-3-desoxi-6-fosfogluconato.
Lipo: Lipoamida-E.
mal: Malato.
malte: Maleato.
pep: Fosfoenolpiruvato.
pyr: Piruvato.
r3hbcoa: (R)-3-Hidroxi-3-butanoil-CoA.
r3hbn: (R)-3-Hidroxi-3-butanolato.
r3hbn2: (R)-3-Hidroxi-3-butanoil.
r3rhbb: (R)-3-((R)-3-Hidroxi-3-butanoloxi)butanolato.
r5p: Ribosa 5-Fosfato.
r5p: Ribulosa 5-Fosfato.
s7p: Sedoheptulosa 7-Fosfato.

succ: Succinato.

xu5p: Xilulosa 5-Fosfato.

N° Modo Elemental	Estequiometria del Modo Elemental	Y(PHA/FRU)
495:	0.166687 fructosa + 0.5 O2 = 0.5 h + 0.333313 co2 + 0.166687 PHA	1.00
494:	0.166687 fructosa + h2o + 0.5 O2 = pi + 0.5 h + 0.333313 co2 + 0.166687 PHA	1.00
463:	0.200012 fructosa + 0.200012 h2o + 0.599976 O2 = 0.200012 pi + 0.799988 h + 0.400024 co2 + 0.200012 PHA	1.00
462:	0.200012 fructosa + 1.20001 h2o + 0.599976 O2 = 1.20001 pi + 0.799988 h + 0.400024 co2 + 0.200012 PHA	1.00
455:	0.142883 fructosa + 0.142883 pi + 0.428589 O2 = 0.142883 h2o + 0.428589 h + 0.285706 co2 + 0.142883 PHA	1.00
452:	0.142883 fructosa + 0.857117 h2o + 0.428589 O2 = 0.857117 pi + 0.428589 h + 0.285706 co2 + 0.142883 PHA	1.00
347:	fructosa + h2o + butanol + O2 = 2 lactato + pi + 4 h + PHA	1.00
343:	fructosa + h2o + butanol + O2 = 2 lactato + pi + 4 h + PHA	1.00
282:	0.333313 fructosa + h2o + O2 = pi + h + 0.666687 co2 + 0.333313 PHA	1.00
271:	0.5 fructosa + 1.5 h2o + 1.5 O2 = 1.5 pi + 2 h + co2 + 0.5 PHA	1.00
267:	0.25 fructosa + 0.75 h2o + 0.75 O2 = 0.75 pi + 0.75 h + 0.5 co2 + 0.25 PHA	1.00
200*:	0.333313 fructosa + O2 = h + 0.666687 co2 + 0.333313 PHA + atpMain	1.00
189*:	0.333313 fructosa + 0.333313 h2o + O2 = 0.333313 pi + 1.33331 h + 0.666687 co2 + 0.333313 PHA + 0.666687 atpMain	1.00
185*:	0.333313 fructosa + 0.333313 pi + O2 = 0.333313 h2o + h + 0.666687 co2 + 0.333313 PHA + 1.33331 atpMain	1.00
149*:	0.5 fructosa + 1.5 O2 = 1.5 h + co2 + 0.5 PHA + 3 atpMain	1.00
140*:	0.5 fructosa + 0.5 h2o + 1.5 O2 = 0.5 pi + 2 h + co2 + 0.5 PHA + 2.5 atpMain	1.00
134*:	0.5 fructosa + 0.5 pi + 1.5 O2 = 0.5 h2o + 1.5 h + co2 + 0.5 PHA + 3.5 atpMain	1.00
137*:	0.333313 fructosa + h2o + 2.5 O2 = 2.33331 h + 1.33331 co2 + 0.166687 PHA + 4.66669 atpMain	0.50
136:	0.333313 fructosa + h2o + 2.5 O2 = 2.33331 h + 1.33331 co2 + 0.166687 PHA + 5 atpMain	0.50

458:	0.0714111 fructosa + 1.21429 h2o + 0.535706 O2 = pi + 0.5 h + 0.285706 co2 + 0.0357056 PHA	0.50
640:	fructosa + h2o + 0.5 butanol + 0.5 O2 = 2 lactato + pi + 4 h + 0.5 PHA	0.50
634:	fructosa + h2o + 0.5 butanol + 0.5 O2 = 2 lactato + pi + 4 h + 0.5 PHA	0.50
461:	0.0666504 fructosa + 1.13336 h2o + 0.5 O2 = 0.93335 pi + 0.466675 h + 0.266663 co2 + 0.0333252 PHA	0.50
460:	0.0625 fructosa + 0.125 h2o + 0.0625 pi + 0.46875 O2 = 0.4375 h + 0.25 co2 + 0.03125 PHA	0.50
459:	0.0625 fructosa + 1.125 h2o + 0.46875 O2 = 0.9375 pi + 0.4375 h + 0.25 co2 + 0.03125 PHA	0.50
457:	0.0666504 fructosa + 0.200012 h2o + 0.5 O2 = 0.466675 h + 0.266663 co2 + 0.0333252 PHA	0.50
454:	0.0666504 fructosa + 1.20001 h2o + 0.5 O2 = pi + 0.466675 h + 0.266663 co2 + 0.0333252 PHA	0.50
268:	0.400024 fructosa + h2o + O2 = pi + 2 h + 0.200012 PHA + 0.400024 oaaExt	0.50
186*:	0.400024 fructosa + O2 = 2 h + 0.200012 PHA + atpMain + 0.400024 oaaExt	0.50
139*:	0.5 fructosa + h2o + 0.5 pi + 3.75 O2 = 3.5 h + 2 co2 + 0.25 PHA + 7.5 atpMain	0.50
138*:	0.5 fructosa + h2o + 0.5 pi + 3.75 O2 = 3.5 h + 2 co2 + 0.25 PHA + 8 atpMain	0.50
135*:	fructosa + 2.5 O2 = 5 h + 0.5 PHA + 5 atpMain + oaaExt	0.50
270:	0.117676 fructosa + 1.23529 h2o + 0.882324 O2 = 0.882324 pi + 0.823547 h + 0.470581 co2 + 0.0588379 PHA	0.49
456:	0.200012 fructosa + 0.5 O2 = h + 0.0999756 PHA + 0.200012 oaaExt	0.49
453:	0.200012 fructosa + h2o + 0.5 O2 = pi + h + 0.0999756 PHA + 0.200012 oaaExt	0.49
269:	0.133362 fructosa + 1.40002 h2o + O2 = pi + 0.93335 h + 0.533325 co2 + 0.0666504 PHA	0.49
188*:	0.133362 fructosa + 0.266663 h2o + 0.133362 pi + O2 = 0.93335 h + 0.533325 co2 + 0.0666504 PHA + 1.13336 atpMain	0.49
187*:	0.133362 fructosa + 0.400024 h2o + O2 = 0.93335 h + 0.533325 co2 + 0.0666504 PHA + atpMain	0.49
348:	1.5 fructosa + 1.5 h2o + 1.5 O2 = 2 lactato + 1.5 pi + 6 h + co2 + 0.5 PHA	0.33
641:	fructosa + h2o + 0.5 O2 = 1.66669 lactato + pi + 4 h + 0.333313 co2 + 0.166687 PHA	0.16

Anexo 3. Modos Elementales productores de PHA. Y(PHA/FRU)= moles de PHA/moles de fructosa.

*Producción de ATP.

Anexo 4. Mapas metabólicos de los grupos involucrados en la producción de polihidroxicanoatos.

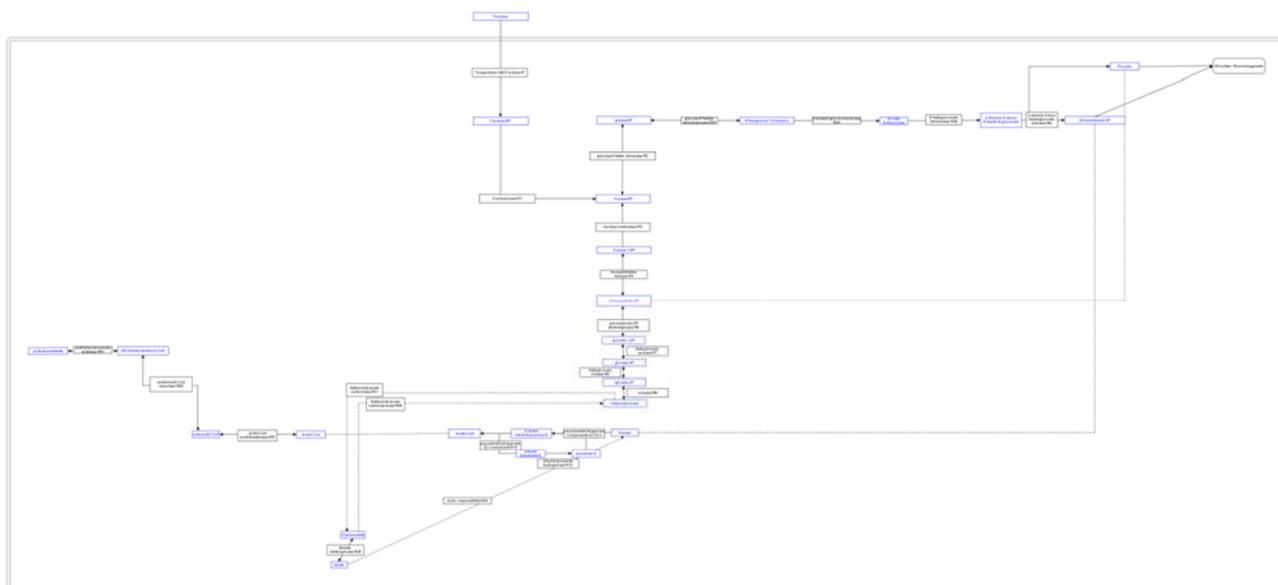


Figura 3. Reacciones metabólicas implicadas en los modos elementales pertenecientes al Grupo Metabólico 1.

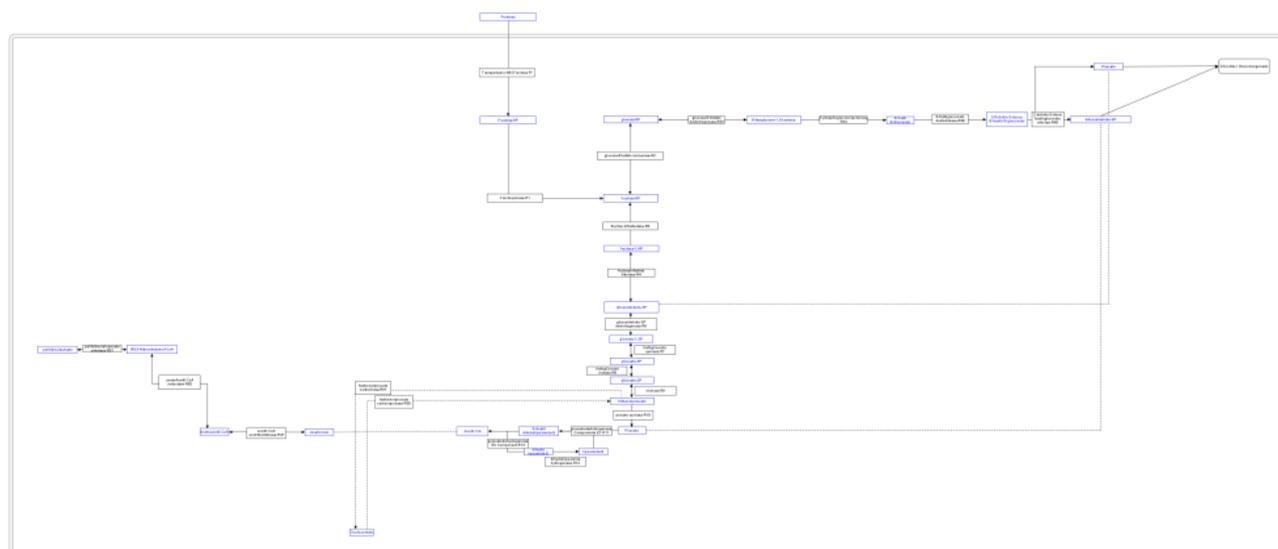


Figura 4. Reacciones metabólicas implicadas en los modos elementales pertenecientes al Grupo Metabólico 2.

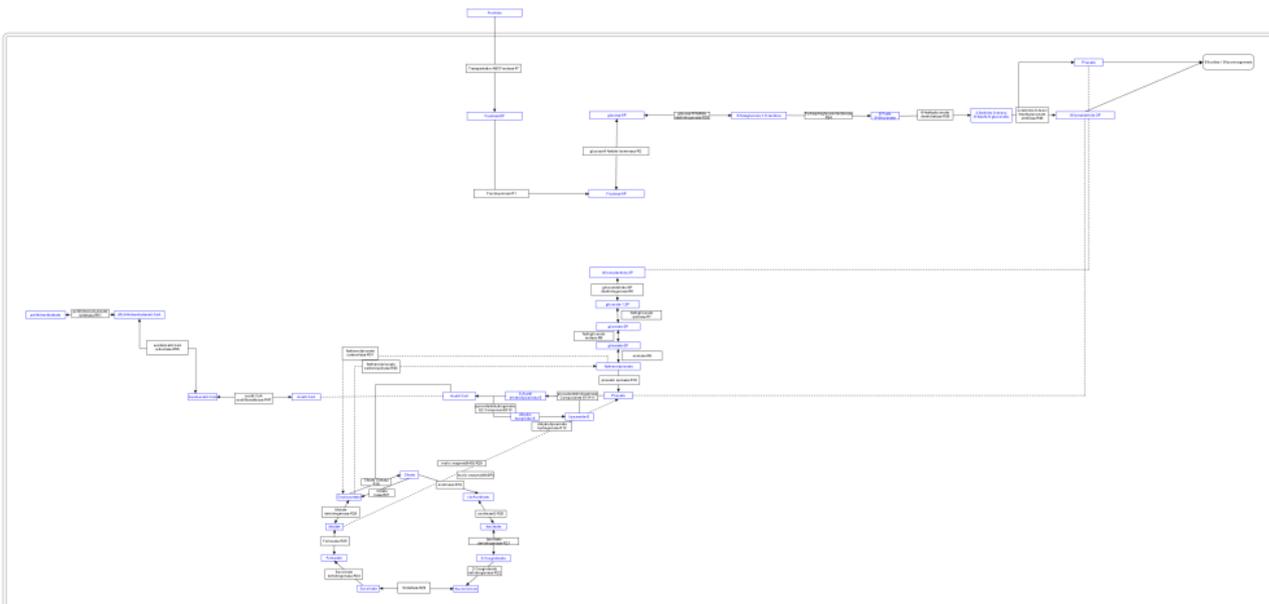


Figura 7. Reacciones metabólicas implicadas en los modos elementales pertenecientes al Grupo Metabólico 5.

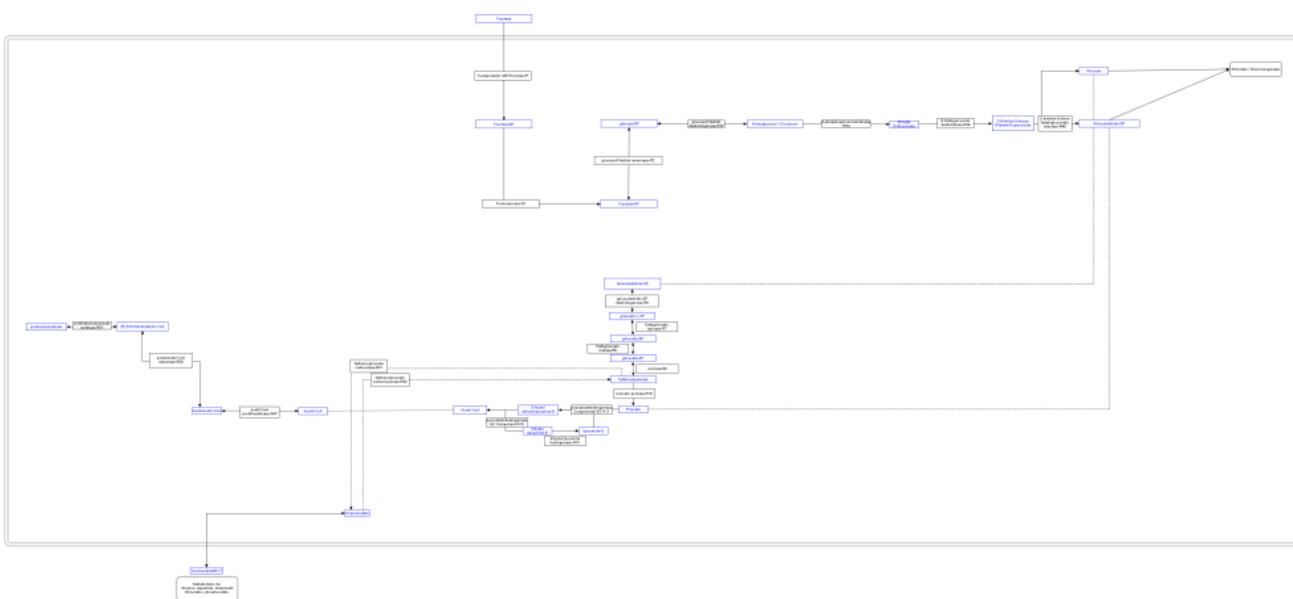


Figura 8. Reacciones metabólicas implicadas en los modos elementales pertenecientes al Grupo Metabólico 6.

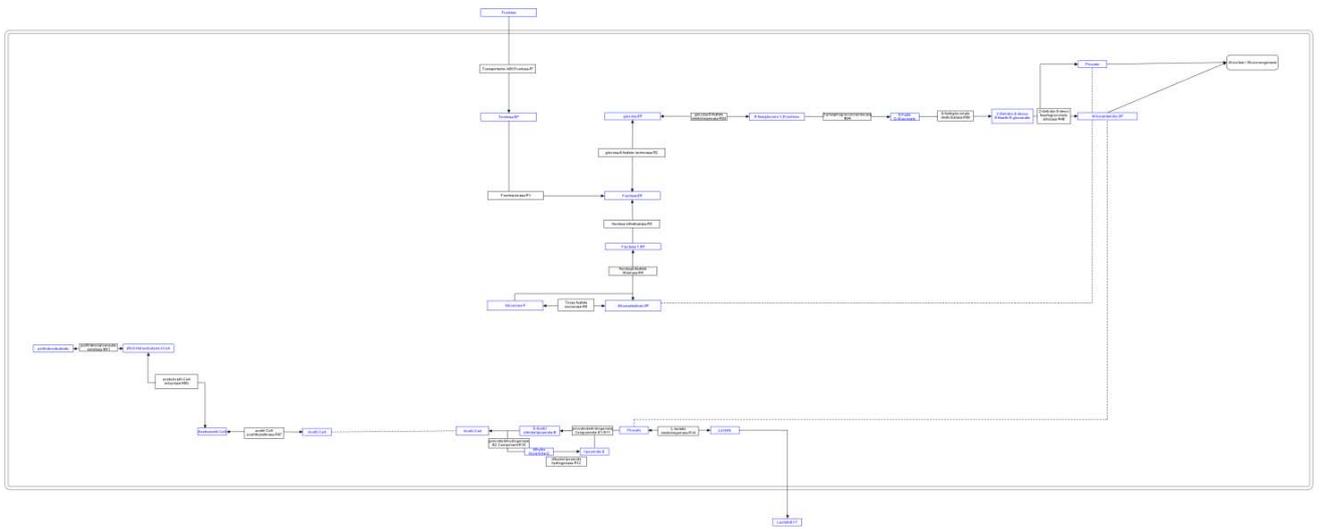


Figura 9. Reacciones metabólicas implicadas en los modos elementales pertenecientes al Grupo Metabólico 7.

Anexo 5. Descripción de las reacciones implicadas en cada uno de los Modos Elementales productores de PHAs.

134: 0.5 R40 0.5 R38 0.5 R34 R12 0.5 R1 R11 R13 0.5 R10 0.5 R* -0.5 R50 0.5 R47 0.5 R9 -0.5 R2 0.5 R33 0.5 R6 -0.5 R8 -0.5 R7 0.5 R51 1.5 R80 3.5 R82 irreversible

135: R40 R38 R34 R12 R1 R31 R11 R13 R* R92 -0.5 R50 0.5 R47 R9 -R2 R33 R6 -R8 -R7 0.5 R51 2.5 R80 5 R82 irreversible

136: 0.333313 R40 0.333313 R38 0.333313 R34 0.333313 R28 0.333313 R18 R12 0.333313 R1 0.333313 R71 0.666687 R29 0.333313 R31 R11 R13 0.333313 R24 0.333313 R* -0.166687 R50 0.166687 R47 0.333313 R19 0.333313 R20 0.333313 R9 0.333313 R25 -0.333313 R2 0.333313 R33 0.333313 R6 -0.333313 R8 -0.333313 R7 0.166687 R51 2.5 R80 5 R82 -0.333313 R83 irreversible

137: 0.333313 R40 0.333313 R38 0.333313 R34 0.333313 R28 0.333313 R18 R12 0.333313 R1 0.333313 R71 0.666687 R29 0.333313 R31 R11 R13 0.333313 R24 0.333313 R* -0.166687 R50 0.166687 R47 0.333313 R19 0.333313 R20 0.333313 R9 0.333313 R25 -0.333313 R2 0.333313 R33 0.333313 R6 -0.333313 R8 -0.333313 R7 0.166687 R51 2.16669 R80 0.333313 R81 4.66669 R82 irreversible

138: 0.5 R22 0.5 R40 0.5 R38 0.5 R34 0.5 R18 R12 0.5 R1 0.5 R29 0.5

R31 R11 R13 0.5 R24 0.5 R* -0.25 R50 0.25 R47 0.5 R19 0.5 R20 0.5 R9 0.5 R25 -0.5 R2 0.5 R33 0.5 R6 0.5 R21 -0.5 R8 -0.5 R7 0.25 R51 -0.5 R23 3.75 R80 8 R82 -0.5 R83 irreversible

139: 0.5 R22 0.5 R40 0.5 R38 0.5 R34 0.5 R18 R12 0.5 R1 0.5 R29 0.5 R31 R11 R13 0.5 R24 0.5 R* -0.25 R50 0.25 R47 0.5 R19 0.5 R20 0.5 R9 0.5 R25 -0.5 R2 0.5 R33 0.5 R6 0.5 R21 -0.5 R8 -0.5 R7 0.25 R51 -0.5 R23 3.25 R80 0.5 R81 7.5 R82 irreversible

140: R40 R38 R34 R12 0.5 R3 0.5 R1 R11 R13 0.5 R* -0.5 R50 0.5 R47 -0.5 R4 -R2 R33 0.5 R51 -0.5 R5 1.5 R80 2.5 R82 irreversible

149: 0.5 R40 0.5 R38 0.5 R34 R12 0.5 R1 0.5 R29 0.5 R31 R11 R13 0.5 R* -0.5 R50 0.5 R47 0.5 R9 -0.5 R2 0.5 R33 0.5 R6 -0.5 R26 -0.5 R8 -0.5 R7 0.5 R51 1.5 R80 3 R82 irreversible

185: 0.333313 R40 0.333313 R38 0.333313 R34 0.666687 R12 0.333313 R1 0.666687 R11 0.666687 R13 0.333313 R10 0.333313 R* -0.333313 R50 0.333313 R47 0.333313 R9 -0.333313 R2 0.333313 R33 0.333313 R6 -0.333313 R8 -0.333313 R7 0.333313 R51 R81 1.33331 R82 R83 irreversible

186: 0.400024 R40 0.400024 R38 0.400024 R34 0.400024 R12 0.400024 R1 0.400024 R31 0.400024 R11 0.400024 R13 0.400024 R* 0.400024 R92 -0.200012 R50 0.200012 R47 0.400024 R9 -0.400024 R2 0.400024 R33 0.400024 R6 -0.400024 R8 -0.400024 R7

0.200012 R51 R81 R82 R83
irreversible
187: 0.133362 R40 0.133362 R38
0.133362 R34 0.133362 R28
0.133362 R18 0.400024 R12
0.133362 R1 0.133362 R71 0.266663
R29 0.133362 R31 0.400024 R11
0.400024 R13 0.133362 R24
0.133362 R* -0.0666504 R50
0.0666504 R47 0.133362 R19
0.133362 R20 0.133362 R9 0.133362
R25 -0.133362 R2 0.133362 R33
0.133362 R6 -0.133362 R8 -0.133362
R7 0.0666504 R51 R81 R82
0.866638 R83 irreversible
188: 0.133362 R22 0.133362 R40
0.133362 R38 0.133362 R34
0.133362 R18 0.266663 R12
0.133362 R1 0.133362 R29 0.133362
R31 0.266663 R11 0.266663 R13
0.133362 R24 0.133362 R* -
0.0666504 R50 0.0666504 R47
0.133362 R19 0.133362 R20
0.133362 R9 0.133362 R25 -
0.133362 R2 0.133362 R33 0.133362
R6 0.133362 R21 -0.133362 R8 -
0.133362 R7 0.0666504 R51 -
0.133362 R23 R81 1.13336 R82
0.866638 R83 irreversible
189: 0.666687 R40 0.666687 R38
0.666687 R34 0.666687 R12
0.333313 R3 0.333313 R1 0.666687
R11 0.666687 R13 0.333313 R* -
0.333313 R50 0.333313 R47 -
0.333313 R4 -0.666687 R2 0.666687
R33 0.333313 R51 -0.333313 R5 R81
0.666687 R82 R83 irreversible
200: 0.333313 R40 0.333313 R38
0.333313 R34 0.666687 R12
0.333313 R1 0.333313 R29 0.333313
R31 0.666687 R11 0.666687 R13

0.333313 R* -0.333313 R50 0.333313
R47 0.333313 R9 -0.333313 R2
0.333313 R33 0.333313 R6 -
0.333313 R26 -0.333313 R8 -
0.333313 R7 0.333313 R51 R81 R82
R83 irreversible
267: .25 R40 0.25 R38 0.25 R34 0.5
R12 0.25 R1 R30 R31 0.5 R11 0.5
R13 0.25 R10 0.25 R* -0.25 R50 0.25
R47 0.25 R9 -0.25 R2 0.25 R33 0.25
R6 -0.25 R8 -0.25 R7 0.25 R51 0.75
R81 0.75 R83 irreversible
268: 0.400024 R40 0.400024 R38
0.400024 R34 0.400024 R12
0.400024 R1 R30 1.40002 R31
0.400024 R11 0.400024 R13
0.400024 R* 0.400024 R92 -0.200012
R50 0.200012 R47 0.400024 R9 -
0.400024 R2 0.400024 R33 0.400024
R6 -0.400024 R8 -0.400024 R7
0.200012 R51 R81 R83 irreversible
269: 0.133362 R40 0.133362 R38
0.133362 R34 0.133362 R28
0.133362 R18 0.400024 R12
0.133362 R1 0.133362 R71 0.266663
R29 R30 1.13336 R31 0.400024 R11
0.400024 R13 0.133362 R24
0.133362 R* -0.0666504 R50
0.0666504 R47 0.133362 R19
0.133362 R20 0.133362 R9 0.133362
R25 -0.133362 R2 0.133362 R33
0.133362 R6 -0.133362 R8 -0.133362
R7 0.0666504 R51 R81 0.866638
R83 irreversible
270: 0.117676 R22 0.117676 R40
0.117676 R38 0.117676 R34
0.117676 R18 0.235291 R12
0.117676 R1 0.117676 R29 R30
1.11768 R31 0.235291 R11 0.235291
R13 0.117676 R24 0.117676 R* -
0.0588379 R50 0.0588379 R47

0.117676 R19 0.117676 R20
 0.117676 R9 0.117676 R25 -
 0.117676 R2 0.117676 R33 0.117676
 R6 0.117676 R21 -0.117676 R8 -
 0.117676 R7 0.0588379 R51 -
 0.117676 R23 0.882324 R81
 0.764709 R83 irreversible
271: R40 R38 R34 R12 0.5 R3 0.5 R1
 R30 R31 R11 R13 0.5 R* -0.5 R50
 0.5 R47 -0.5 R4 -R2 R33 0.5 R51 -0.5
 R5 1.5 R81 1.5 R83 irreversible
282: 0.333313 R40 0.333313 R38
 0.333313 R34 0.666687 R12
 0.333313 R1 0.333313 R29 R30
 1.33331 R31 0.666687 R11 0.666687
 R13 0.333313 R* -0.333313 R50
 0.333313 R47 0.333313 R9 -
 0.333313 R2 0.333313 R33 0.333313
 R6 -0.333313 R26 -0.333313 R8 -
 0.333313 R7 0.333313 R51 R81 R83
 irreversible
343: 2 R40 2 R38 2 R34 R59 R3 R1
 R* -R55 -2 R14 R57 -R4 -2 R2 2 R33
 R51 -R5 -R60 R81 R83 irreversible
 347: (20) 2 R40 R67 2 R38 2 R34
 R59 R3 R1 R* -2 R14 -R50 R57 -R56
 -R4 -2 R2 2 R33 R51 -R5 -R60 R81
 R83 irreversible
348: 3 R40 3 R38 3 R34 R12 1.5 R3
 1.5 R1 R11 R13 1.5 R* -2 R14 -0.5
 R50 0.5 R47 -1.5 R4 -3 R2 3 R33 0.5
 R51 -1.5 R5 1.5 R81 1.5 R83
 irreversible
452: 0.142883 R40 0.142883 R38
 0.142883 R34 0.285706 R12
 0.142883 R1 R30 R31 0.285706 R11
 0.285706 R13 0.142883 R10
 0.142883 R* -0.142883 R50 0.142883
 R47 0.142883 R9 -0.142883 R2
 0.142883 R33 0.142883 R6 -

0.142883 R8 -0.142883 R7 0.142883
 R51 0.428589 R80 irreversible
453: 0.200012 R40 0.200012 R38
 0.200012 R34 0.200012 R12
 0.200012 R1 R30 1.20001 R31
 0.200012 R11 0.200012 R13
 0.200012 R* 0.200012 R92 -
 0.0999756 R50 0.0999756 R47
 0.200012 R9 -0.200012 R2 0.200012
 R33 0.200012 R6 -0.200012 R8 -
 0.200012 R7 0.0999756 R51 0.5 R80
 irreversible
454: 0.0666504 R40 0.0666504 R38
 0.0666504 R34 0.0666504 R28
 0.0666504 R18 0.200012 R12
 0.0666504 R1 0.0666504 R71
 0.133362 R29 R30 1.06665 R31
 0.200012 R11 0.200012 R13
 0.0666504 R24 0.0666504 R* -
 0.0333252 R50 0.0333252 R47
 0.0666504 R19 0.0666504 R20
 0.0666504 R9 0.0666504 R25 -
 0.0666504 R2 0.0666504 R33
 0.0666504 R6 -0.0666504 R8 -
 0.0666504 R7 0.0333252 R51 0.5
 R80 -0.0666504 R83 irreversible
455: 0.142883 R40 0.142883 R38
 0.142883 R34 0.285706 R12
 0.142883 R1 0.285706 R11 0.285706
 R13 0.142883 R10 0.142883 R* -
 0.142883 R50 0.142883 R47
 0.142883 R9 -0.142883 R2 0.142883
 R33 0.142883 R6 -0.142883 R8 -
 0.142883 R7 0.142883 R51 -
 0.571411 R80 R81 R83 irreversible
456: 200012 R40 0.200012 R38
 0.200012 R34 0.200012 R12
 0.200012 R1 0.200012 R31 0.200012
 R11 0.200012 R13 0.200012 R*
 0.200012 R92 -0.0999756 R50
 0.0999756 R47 0.200012 R9 -

0.200012 R2 0.200012 R33 0.200012
R6 -0.200012 R8 -0.200012 R7
0.0999756 R51 -0.5 R80 R81 R83
irreversible

457: 0.0666504 R40 0.0666504 R38
0.0666504 R34 0.0666504 R28
0.0666504 R18 0.200012 R12
0.0666504 R1 0.0666504 R71
0.133362 R29 0.0666504 R31
0.200012 R11 0.200012 R13
0.0666504 R24 0.0666504 R* -
0.0333252 R50 0.0333252 R47
0.0666504 R19 0.0666504 R20
0.0666504 R9 0.0666504 R25 -
0.0666504 R2 0.0666504 R33
0.0666504 R6 -0.0666504 R8 -
0.0666504 R7 0.0333252 R51 -0.5
R80 R81 0.93335 R83 irreversible

458: 0.0714111 R40 0.0714111 R38
0.0714111 R34 0.0714111 R28
0.0714111 R18 0.214294 R12
0.0714111 R1 0.0714111 R71
0.142883 R29 R30 1.07141 R31
0.214294 R11 0.214294 R13
0.0714111 R24 0.0714111 R* -
0.0357056 R50 0.0357056 R47
0.0714111 R19 0.0714111 R20
0.0714111 R9 0.0714111 R25 -
0.0714111 R2 0.0714111 R33
0.0714111 R6 -0.0714111 R8 -
0.0714111 R7 0.0357056 R51
0.464294 R80 0.0714111 R81
irreversible

459: 0.0625 R22 0.0625 R40 0.0625
R38 0.0625 R34 0.0625 R18 0.125
R12 0.0625 R1 0.0625 R29 R30
1.0625 R31 0.125 R11 0.125 R13
0.0625 R24 0.0625 R* -0.03125 R50
0.03125 R47 0.0625 R19 0.0625 R20
0.0625 R9 0.0625 R25 -0.0625 R2
0.0625 R33 0.0625 R6 0.0625 R21 -

0.0625 R8 -0.0625 R7 0.03125 R51 -
0.0625 R23 0.46875 R80 -0.0625
R83 irreversible

460: 0.0625 R22 0.0625 R40 0.0625
R38 0.0625 R34 0.0625 R18 0.125
R12 0.0625 R1 0.0625 R29 0.0625
R31 0.125 R11 0.125 R13 0.0625
R24 0.0625 R* -0.03125 R50 0.03125
R47 0.0625 R19 0.0625 R20 0.0625
R9 0.0625 R25 -0.0625 R2 0.0625
R33 0.0625 R6 0.0625 R21 -0.0625
R8 -0.0625 R7 0.03125 R51 -0.0625
R23 -0.53125 R80 R81 0.9375 R83
irreversible

461: 0.0666504 R22 0.0666504 R40
0.0666504 R38 0.0666504 R34
0.0666504 R18 0.133362 R12
0.0666504 R1 0.0666504 R29 R30
1.06665 R31 0.133362 R11 0.133362
R13 0.0666504 R24 0.0666504 R* -
0.0333252 R50 0.0333252 R47
0.0666504 R19 0.0666504 R20
0.0666504 R9 0.0666504 R25 -
0.0666504 R2 0.0666504 R33
0.0666504 R6 0.0666504 R21 -
0.0666504 R8 -0.0666504 R7
0.0333252 R51 -0.0666504 R23
0.43335 R80 0.0666504 R81
irreversible

462: 0.400024 R40 0.400024 R38
0.400024 R34 0.400024 R12
0.200012 R3 0.200012 R1 R30 R31
0.400024 R11 0.400024 R13
0.200012 R* -0.200012 R50 0.200012
R47 -0.200012 R4 -0.400024 R2
0.400024 R33 0.200012 R51 -
0.200012 R5 0.599976 R80
irreversible

463: 0.400024 R40 0.400024 R38
0.400024 R34 0.400024 R12
0.200012 R3 0.200012 R1 0.400024

R11 0.400024 R13 0.200012 R* -
 0.200012 R50 0.200012 R47 -
 0.200012 R4 -0.400024 R2 0.400024
 R33 0.200012 R51 -0.200012 R5 -
 0.400024 R80 R81 R83 irreversible
494: 0.166687 R40 0.166687 R38
 0.166687 R34 0.333313 R12
 0.166687 R1 0.166687 R29 R30
 1.16669 R31 0.333313 R11 0.333313
 R13 0.166687 R* -0.166687 R50
 0.166687 R47 0.166687 R9 -
 0.166687 R2 0.166687 R33 0.166687
 R6 -0.166687 R26 -0.166687 R8 -
 0.166687 R7 0.166687 R51 0.5 R80
 irreversible
495: 0.166687 R40 0.166687 R38
 0.166687 R34 0.333313 R12
 0.166687 R1 0.166687 R29 0.166687
 R31 0.333313 R11 0.333313 R13
 0.166687 R* -0.166687 R50 0.166687

R47 0.166687 R9 -0.166687 R2
 0.166687 R33 0.166687 R6 -
 0.166687 R26 -0.166687 R8 -
 0.166687 R7 0.166687 R51 -0.5 R80
 R81 R83 irreversible
634: 2 R40 2 R38 2 R34 0.5 R59 R3
 R1 R* -0.5 R55 -2 R14 0.5 R57 -R4 -2
 R2 2 R33 0.5 R51 -R5 -0.5 R60 0.5
 R80 irreversible
640: 2 R40 0.5 R67 2 R38 2 R34 0.5
 R59 R3 R1 R* -2 R14 -0.5 R50 0.5
 R57 -0.5 R56 -R4 -2 R2 2 R33 0.5
 R51 -R5 -0.5 R60 0.5 R80 irreversible
641: 2 R40 2 R38 2 R34 0.333313
 R12 R3 R1 0.333313 R11 0.333313
 R13 R* -1.66669 R14 -0.166687 R50
 0.166687 R47 -R4 -2 R2 2 R33
 0.166687 R51 -R5 0.5 R80
 irreversible