

BIOINFORMÁTICA APLICADA A LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Carlos Ocampo^{*†}, Margarita Ramírez^{*}, Álvaro Ospina^{}, Marcela Maya^{***}.**

^{*} *Universidad Pontificia Bolivariana, Grupo CIBIOT. Cq. 1 #70-01, of. 11-7, Medellín, Colombia,*

^{**} *Universidad Pontificia Bolivariana, Grupo de Microelectrónica. Cq. 1 #70-01, of. 11-6, Medellín, Colombia,*

^{***} *Universidad Pontificia Bolivariana, Grupo T y D. Cq. 1 #70-01, of. 11-6, Medellín, Colombia,*

Recibido 10 Noviembre 2008; aceptado 10 Diciembre 2008
Disponible en línea: 17 Diciembre 2008

Resumen: Para el análisis de flujo metabólico aplicado a la producción de etanol se elaboró una interfaz de usuario basada en el programa METATOOL, empleando lenguaje C y combinándola con MSEXCEL. Se construyó una red metabólica compuesta por 42 reacciones incluyendo las etapas de la glicólisis, la vía de las pentosas, el ciclo de ácido cítrico y la ruta de asimilación de amonio. Se encontraron 23 soluciones para el vector de flujos metabólicos, de las cuales 11 son válidas a nivel experimental. Se encontró un rendimiento máximo para la producción de etanol ($Y_{EtOH/S}$) de 0.51 g/g que concuerda con varios estudios preliminares. Con los resultados obtenidos se identificó la distribución de flujo de carbono hacia el etanol y el glicerol, lo que abre la posibilidad para incrementar el rendimiento de etanol mediante la manipulación de cepas en *Saccharomyces cerevisiae*. Copyright © 2007 UPB.

Abstract: In order to establish a metabolic flux analysis applied to ethanol production an user interface based on the program METATOOL using C language combined with MSEXCEL was developed. It has built a metabolic network composed of 42 metabolic reactions including glycolysis, pentose, citric acid and ammonium assimilation pathways. It was found 23 solutions for the metabolic flux vector, in which 11 are valid experimentally. There was a maximum yield for ethanol production ($Y_{EtOH / S}$) of 0.51 g / g. It was found consistent with previous studies. With the results it was identified the carbon flux distribution to produce ethanol and glycerol, which opens the possibility for increasing the yield of ethanol by manipulating strains of *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: Bioinformatics, Ethanol, METATOOL, Metabolic flux analysis

[†] Autor al que se le dirige la correspondencia:
Tel. (+574) 4159015 ext 6791, fax 4118779.
E-mail: carlos.ocampo@upb.edu.co (Carlos Ocampo).

1. INTRODUCCIÓN

En 1996 la producción mundial de etanol alcanzó los 31.3 billones de litros. De éstos el 80% fue producido por fermentación anaerobia de *Saccharomyces cerevisiae* empleando diferentes azúcares como fuente de carbono. Dos terceras partes de la producción mundial de etanol fueron realizadas por Brasil y Estados Unidos con el objetivo de emplearlo como combustible renovable. El precio del azúcar es uno de los parámetros más relevantes para determinar la economía del proceso, es por ello que resulta importante optimizar el rendimiento del etanol maximizando el aprovechamiento de la fuente de carbono (Nissen et al, 2000), (Bro et al, 2006).

Durante la producción del etanol a partir de azúcares se forman varios subproductos indeseables, el más representativo de ellos es el glicerol, el cual consume más del 4% de la fuente de carbono para mantener el balance redox. Según estudios de Xu y colaboradores (Xu et al, 2008), se prevé que la producción de etanol puede incrementar hasta un 10% al redireccionar el flujo de carbono desde glicerol hacia etanol. Lo que representa 1.25 billones de litros al año al mismo costo de producción. (Nissen et al, 2000), (Bro et al 2006), (Roca, 2003).

El análisis de flujos metabólicos es de herramienta matemática particularmente útil en estudios de producción de metabolitos, donde el objetivo es dirigir el flujo de carbono de un sustrato hacia un producto metabólico, además de permitir el cálculo de flujos extracelulares no medidos y rendimientos teóricos máximos, identificar vías metabólicas alternativas y puntos ramificados de control metabólico (Melzer, Guido et al, 2007) (Wang, 2006). Debido a la complejidad operativa para encontrar las soluciones de los modelos de flujo metabólico, se emplean herramientas computacionales, restringiendo sistemáticamente la estequiometría y la termodinámica de las reacciones. A esta forma de análisis que une la informática con el análisis de sistemas metabólicos se le conoce como bioinformática (Xu et al, 2008).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Formulación de la ruta metabólica para la producción de etanol

Se construyó un modelo estequiométrico para la producción de etanol en cultivos anaerobios de *S. cerevisiae*, empleando glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. La ruta metabólica fue compuesta por 42 reacciones bioquímicas, incluyendo la vía glicolítica, la vía de las pentosas, el ciclo de Krebs, y una etapa para la asimilación de amonio. Para el desarrollo de las rutas metabólicas se consideraron tres regiones clave: el exterior de la célula, el citoplasma, y la mitocondria. Es por ello que los metabolitos se nombraron según la región en la cual ocurre la reacción metabólica. Una descripción detallada del metabolismo se muestra en la Fig 1.

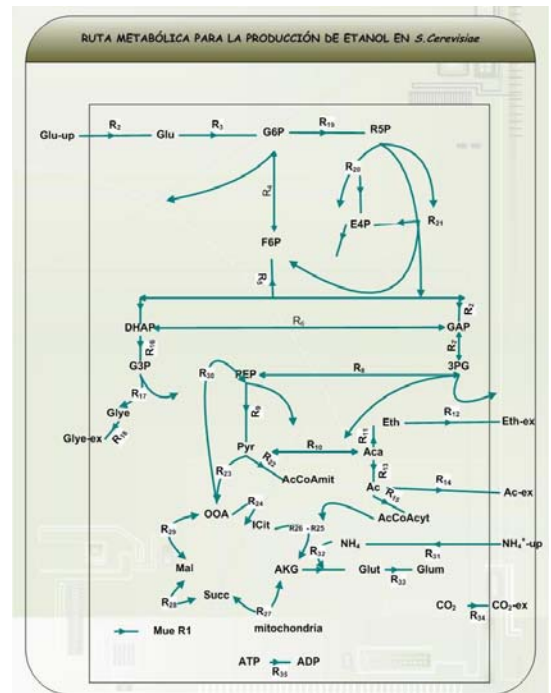


Fig 1. Ruta metabólica para la producción de etanol en *S. cerevisiae*.

Para la reacción de síntesis de biomasa se empleó un modelo de síntesis a partir de los 12 precursores de metabolito, este modelo fue propuesto por Wang y Hatzimanikatis (Wang, 2006).

2.2. Distribución de flujos metabólicos para *S. cerevisiae*

- Análisis de flujos metabólicos

Un modelo estequiométrico en términos de metabolitos externos fue empleado para la estimación de los flujos metabólicos intracelulares. Como metabolitos externos se consideraron la glucosa, el etanol, el CO₂, el glicerol, el amonio, el ácido acético y la biomasa. El conjunto de transformaciones se representó matemáticamente como un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, tal como se muestra en la Ecuación 1.

$$\frac{dX}{dt} = N * v(X) \quad (1)$$

Donde:

N: Matriz estequiométrica para las reacciones metabólicas. Dimensión n x m. Con n: número de metabolitos a analizar, m: número de reacciones metabólicas.

v(*X*): Vector de velocidades de reacción ó flujos metabólicos

X: Vector de concentraciones de metabolitos internos

Para la solución del sistema formado por la Ecuación 1 se consideró el estado pseudo estacionario. El cual se muestra en la Ecuación 2.

$$N * v(X) = 0 \quad (2)$$

Adicionalmente se empleó una restricción termodinámica para las velocidades de reacción de las etapas irreversibles, la cual se muestra en la Ecuación 3.

$$v_{irreversible} \geq 0 \quad (3)$$

Donde:

v_{irreversible}: Vector de velocidades de reacción irreversibles

- Desarrollo de la herramienta informática

Para realizar el análisis de flujo metabólico para la producción de etanol se desarrolló una interfaz de usuario basada en METATOOL, un programa existente para el análisis de flujo metabólico, el cual está desarrollado en lenguaje C y se combinó con MSEXCEL. De esta forma los datos arrojados por el METATOOL fueron organizados sistemáticamente en MSEXCEL para realizar cálculos de estequiométricos.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Modelos estequiométricos encontrados

Las reacciones metabólicas que se emplearon para modelar el proceso de producción de etanol en cultivos anaeróbicos de *S. cerevisiae* se muestra en el Apéndice 1.

Para establecer el modelo se consideraron tres regiones donde ocurren procesos de cambio en los metabolitos: el exterior de la célula, en la cual ocurren procesos de transporte, la región citoplasmal, donde ocurren los procesos de biotransformación hacia los productos y la región mitocondrial, donde se realizan los procesos de respiración para mantener el equilibrio redox.

Luego de ingresar en la herramienta informática que se desarrolló toda la información respecto a las rutas metabólicas, se encontraron 23 soluciones que cumplen con todas las restricciones del modelo. De ellas se seleccionaron 11 soluciones como posibles candidatos para el modelo estequiométrico del proceso y se descartaron las soluciones matemáticas que no presentaban coherencia con la realidad experimental. Las soluciones encontradas se muestran en la Tabla 2.

En el modelo 1 se encuentra la estequiometría teórica para la producción de etanol, la cual supone que no se generan productos secundarios como el glicerol o el acetato y además no considera los procesos de formación de biomasa. En los demás modelos se encuentra que la producción de glicerol es hasta tres veces mayor que la de etanol en base molar y que la producción de ácido acético es normalmente 1.5 veces mayor que la producción de etanol. Esto se explica desde el metabolismo,

Tabla 2. Modelos estequiométricos coherentes encontrados para el análisis de flujo metabólico.

Modelo	Ecuación Estequiométrica
1	$GLUUP + 2 ADP = 2 CO2EX + 2 ETHEX + 2 ATP$
2	$6 GLUUP + ADP = 8 CO2EX + 5 ETHEX + 6 GLYCEX + ATP$
3	$5.95 GLUUP + 2.35 ATP = MUE + 6.78 CO2EX + 3.92 ETHEX + 5.63 GLYCEX + 2.35 ADP$
4	$4.44 GLUUP + 9.89 ATP = 3.15 MUE + 2.61 CO2EX + ETHEX + 2.93 GLYCEX + 9.89 ADP$
5	$2.62 GLUUP + 4.11 ATP = 1.35 MUE + 2.06 CO2EX + ETHEX + 2.00 GLYCEX + 4.11 ADP$
6	$2.47 GLUUP + 2.95 ATP = MUE + 2.22 CO2EX + 1.16 ETHEX + 2.03 GLYCEX + 2.95 ADP$
7	$2.38 GLUUP + 3.48 ATP = 1.15 MUE + 1.96 CO2EX + ETHEX + 1.83 GLYCEX + 3.48 ADP$
8	$13.68 GLUUP + 20.56 ATP = 6.25 MUE + 5.87 ACEX + 7.12 CO2EX + ETHEX + 11.68 GLYCEX + 20.56 ADP$
9	$4.38 GLUUP + 5.3 ATP = 1.66 MUE + 1.38 ACEX + 3 CO2EX + ETHEX + 3.85 GLYCEX + 5.3 ADP$
10	$4.26 GLUUP + 4.26 ATP = 1.38 MUE + ACEX + 3.41 CO2EX + 1.44 ETHEX + 3.81 GLYCEX + 4.26 ADP$
11	$4.01 GLUUP + 4.47 ATP = 1.40 MUE + 1.32 ACEX + 2.84 CO2EX + ETHEX + 3.56 GLYCEX + 4.47 ADP$

ya que el glicerol proviene desde la vía glicolítica, como se mostró en la Figura 1, mientras que el etanol y el acetato provienen de un metabolito común: el acetaldehído, el cual se genera a partir del piruvato. Un comportamiento similar fue encontrado por Nissen ([Nissen et al., 2000](#)), el cual encontró que en cultivos de *S. cerevisiae* donde se inhibe la producción de glicerol, se incrementa el rendimiento de la producción de etanol hasta en un 10%.

En la Tabla 3 se muestran los rendimientos de producción de etanol a partir de glucosa, empleando cada uno de los modelos encontrados.

Se encuentra que teóricamente los procesos en los cuales la relación molar glicerol/etanol es baja, el rendimiento de etanol es máximo. Esto se refleja en los modelos 2 y 3, los cuales presentan altos rendimientos de la producción de etanol y en los que la relación molar glicerol/etanol es de 1.2 y 1.4 respectivamente. Para el modelo 8, el cual presenta el rendimiento de producción de etanol mas bajo, de 0.02 g/g, la relación molar es de 11.7.

Tabla 3. Rendimiento para la producción de etanol a partir de glucosa $Y_{P/S}$ (g/g).

Modelo	Rendimiento para la producción de etanol a partir de glucosa $Y_{P/S}$ (g/g)
1	0.51*
2	0.21
3	0.17
4	0.06
5	0.10
6	0.12
7	0.11
8	0.02
9	0.06
10	0.09
11	0.06

*Máximo teórico

3.2 Modos elementales de flujo metabólico

Para evaluar la distribución relativa de flujos metabólicos durante la producción de etanol se empleó la expresión de la Ecuación 2, en donde el vector de flujo metabólico $v(X)$ se encuentra a partir de la matriz estequiométrica N , la cual presentó dimensiones de 38 x 42.

En la Tabla 4 para el modelo 2, el cual presento un rendimiento de producción de etanol de 0.21, y para el modelo 8, el cual presentó un rendimiento de 0.02, se muestra la distribución de flujos metabólicos para cada reacción metabólica.

Tabla 4. Flujos metabólicos relativos para los modelos estequiométricos 2 y 8. Los valores negativos indican que la reacción es reversa.

Reacción (Ri)	v(X) modelo 2	v(X) modelo 8
2	2.4	27.4
3	2.4	27.4
5	2.4	23.5
7	2.4	23.5
8	2.4	22.8
9	2.4	22.0
10	2.0	13.8
11	2.0	2.0
12	2.0	2.0
16	2.4	23.5
17	2.4	23.4
18	2.4	23.4
22	0.4	3.38
27	0.4	-1.38
28	0.4	-1.38
29	0.4	1.38
34	3.2	14.25
42	-0.4	1.38

La reacción 18 (R18) es la etapa de síntesis de glicerol a partir de glicerol-3-fosfato, se encontró que para el modelo 2 el flujo metabólico de esta etapa fue de 2.4 unidades mientras que para el modelo 8 el flujo metabólico fue de 23.4, casi diez veces mayor. Es decir que bajo el modelo 8 el flujo metabólico del carbono esta diseccionado hacia la síntesis de glicerol, disminuyendo la producción de etanol a menos de 0.02 g/g empleando de glucosa como sustrato.

Según Xu y colaboradores (Xu, 2008), la enzima que regula la producción de glicerol es la glicerol fosfatasa (GPP), es por ello que se esperaba limitar la expresión del gen que produce esta enzima para incrementar la productividad de etanol y direccional el flujo metabólico hacia el producto de interés.

CONCLUSIONES

Se encuentran 23 soluciones termodinámicamente plausibles para evaluar el modelo estequiométrico de la producción de etanol en *S. cerevisiae*. De estos solo 11 son coherentes a nivel experimental y resultan ser modelos de estudio para el bioproceso.

Se encuentra que la relación glicerol/etanol debe ser mínima durante biotransformación para garantizar altos rendimientos de la producción de etanol. Se alcanzan rendimientos de hasta 0.21 g/g de etanol a partir de glucosa cuando la relación glicerol/etanol es de 1.2.

Se encontró que en el modelo estequiométrico 2, donde se obtiene rendimiento de etanol de 0.21 g/g, frente al modelo estequiométrico 8, donde se obtiene un rendimiento de etanol de 0.02 g/g el flujo metabólico del glicerol es 10 veces menor.

La bioinformática resulta ser una herramienta poderosa para el análisis de bioprocesos, ya que abre la posibilidad de predecir rendimientos máximos del producto deseado, establecer las etapas limitantes y direccionar las investigaciones en modificación genética para expresar genes que maximicen el flujo metabólico en una ruta de interés.

APÉNDICE 1

Reacciones metabólicas empleadas para establecer el modelo estequiométrico.

Abreviaturas de los metabolitos

AC:	Acetato
ACA:	Acetaldehído
ACCOACYT:	Acetil-CoA (Citoplasma)
ACCOAMIT:	Acetil-CoA (Mitocondria)
AKG:	2 – Oxoglutarato
CO2:	Dioxido de carbono (Interno)
COASHCYT:	CoEnzimaA Reducida (Citoplasma)
COASHMIT:	CoEnzimaA Reducida (Citoplasma)
DHAP:	Dihidroxiacetonafofato
ETH:	Etanol
E4P:	Eritrosa-4- fosfato
F6P:	Fructosa-6- fosfato
FAD:	Flavina adenina dinucleótido (Oxidada)
FADH2:	Flavina adenina dinucleótido (Reducida)
NH4:	Amonio (Interno)
GLU:	Glucosa
G6P:	Glucosa-6-fosfato
GAP:	Gliceraldehido-3- fosfato
GLYC:	Glicerol
GLUM:	Glutamina

GLUT:	Glutamato	NADCYT + 6 NADMIT + 90 NADPHCYT + 22
G3P:	Glicerol-3-fosfato	NADPHMIT = 100 MUE + 24 COASHCYT + 3
ICIT:	Isocitrato	COASHMIT + 254 ADP + 16 NADHCYT + 6
MAL:	Malato	NADHMIT + 90 NADPCYT + 22 NADPMIT
OAA:	Oxalacetato	
O3PG:	3- fosfoglicerato	R2: GLUUP = GLU
PEP:	Fosfofenolpiruvato	R3: GLU + ATP = ADP + G6P
PYR:	Piruvato	R4: G6P = F6P
SUCC:	Succinato	R5: ATP + F6P = ADP + DHAP + GAP
R5P:	Ribosa-5-fosfato	R6: DHAP = GAP
NADCYT:	Nicotinamida adenina dinucleótido - oxidada (Citoplasma)	R7: ADP + GAP + NADCYT = ATP + O3PG + NADHCYT
NADMIT:	Nicotinamida adenina dinucleótido - oxidada (Mitocondrial)	R8: O3PG = PEP
NADPCYT:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - oxidada (Citoplasma)	R9: ADP + PEP = ATP + PYR
NADPMIT:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - oxidada (Mitocondrial)	R10: PYR = ACA + CO2
NADHCYT:	Nicotinamida adenina dinucleótido - reducida (Citoplasma)	R11: ACA + NADHCYT = ETH + NADCYT
NADHMIT:	Nicotinamida adenina dinucleótido - reducida (Mitocondrial)	R12: ETH = ETHEX
NADPHCYT:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - reducida (Citoplasma)	R13 : ACA + NADPCYT = AC + NADPHCYT
NADPHMIT:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato - reducida (Mitocondrial)	R14 : AC = ACEX
MUE:	Biomasa	R15 : AC + 2 ATP = ACCOACYT + 2 ADP
ACEX:	Acetato (Excretado)	R16 : DHAP + NADHCYT = G3P + NADCYT
CO2EX:	Dioxido de carbono (Excretado)	R17 : G3P = GLYC
ETHEX:	Etanol (Excretado)	R18 : GLYC = GLYCEX
GLUUP:	Glucosa (Externo)	R19 : G6P + 2 NADPCYT = CO2 + R5P + 2 NADPHCYT
GLYCEX:	Glicerol (Excretado)	R20: 2 R5P = E4P + F6P
NH4UP:	Amonio (Externo)	R21: E4P + R5P = F6P + GAP
ATP:	Adenosin trifosfato	R22: PYR + NADMIT + COASHMIT = ACCOAMIT + CO2 + NADHMIT
ADP:	Adenosin difosfato	
FAD:	Favin adenin dinucleotido (Oxidada)	R23: ATP + CO2 + PYR = ADP + OAA
FADH2:	Favin adenin dinucleotido (Reducida)	R24: ACCOAMIT + OAA = ICIT + COASHMIT

Reacciones metabólicas

R1: 24 ACCOACYT + 3 ACCOAMIT + 254
ATP + 11 AKG + 3 E4P + 25 G6P + 1 G3P + 10
OAA + 6 O3PG + 6 PEP + 18 PYR + 3 R5P + 16

R25: ICIT + NADMIT = AKG + CO2 +
NADHMIT

R26: ICIT + NADPMIT = AKG + CO2 +
NADPHMIT

R27: $ADP + AKG + NADMIT = ATP + CO_2 + SUCC + NADHMIT$

R28: $FAD + SUCC = FADH_2 + MAL$

R29: $MAL + NADMIT = OAA + NADHMIT$

R30: $ATP + OAA = ADP + CO_2 + PEP$

R31 : $ATP + NH_4UP = ADP + NH_4$

R32: $AKG + GLUM + NADHCYT = 2 GLUT + NADCYT$

R33: $ATP + NH_4 + GLUT = ADP + GLUM$

R34: $CO_2 = CO_2EX$

R35: $ATP = ADP$

R36: $ACCOACYT = ACCOAMIT$

R37: $COASHCYT = COASHMIT$

R38: $NADCYT = NADMIT$

R39: $NADPCYT = NADPMIT$

R40: $NADHCYT = NADHMIT$

R41: $NADPHCYT = NADPHMIT$

R42: $NADHMIT + FAD = NADMIT + FADH_2$

REFERENCIAS

Xu. Xiaojing, CAO. Limin, CHEN Xun. Elementary Flux Mode Analysis for Optimized Ethanol Yield in Anaerobic Fermentation of Glucose with *Saccharomyces cerevisiae*. Chinese Journal of Chemical Engineering, 16, 135-142, 2008.

Nissen. Torben et al. Optimization of Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Metabolic Engineering of the Ammonium Assimilation. Metabolic Engineering 2, 69-77, 2000.

Bro. Christoffer. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. Metabolic Engineering 8, 102-111, 2006.

Roca. C, Nielsen. J., Olsson. L. Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4732-4736, 2003.

Wang. Liqing, Hatzimanikatis. Vassily. Metabolic engineering under uncertainty—II: Analysis of yeast metabolism. Metabolic Engineering. 8, 133-150, 2006.

Melzer, Guido et al. Metabolic flux analysis using stoichiometric models for *Aspergillus niger*: Comparison under glucoamylase-producing and non-producing conditions. Journal of Biotechnology. 132, 405-417, 2007.

SOBRE LOS AUTORES

Carlos Ocampo López

Ingeniero Químico y Docente de la UPB. Candidato a Doctor en Ingeniería. Investigador del Grupo CIBIOT.

Margarita Enid Ramírez Carmona

Doctorada en Biotecnología de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil. Docente de la UPB. Coordinadora del Grupo CIBIOT.

Álvaro Enrique Ospina Sanjuan

Ingeniero Electrónico y Docente de la UPB. Candidato a Magíster en Software libre. Investigador del Grupo de Microelectrónica.

Marcela Maya Gómez

Ingeniera Electricista y Docente de la UPB. Candidata a especialista en Telecomunicaciones. Investigadora del Grupo TyD.