

**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.**

ESTIMACIÓN DE LOS FLUJOS METABÓLICOS DE
Isaria fumosorosea DURANTE LA SÍNTESIS DE
METABOLITOS INSECTICIDAS

POR

Francisco Javier Bacame Valenzuela

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

OCTUBRE DE 2010

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir esta meta en la vida.

A CONACYT por la beca proporcionada para realizar esta maestría.

A CIAD por haberme aceptado en su programa de posgrado.

Al Dr. Ali Asaff por creer en mí y por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación. Gracias por su paciencia y por todo el conocimiento transmitido.

A la Dra. Elisa Valenzuela por su apoyo brindado durante toda mi maestría.

Al Dr. Orfil González por todo el tiempo dedicado para poder realizar este trabajo.

A la Dra. Yolanda Reyes Vidal por todo su apoyo académico y por hacerme ver cuando las cosas se hacen bien y cuando se hacen mal. Yolanda no tengo palabras para agradecerte el apoyo que me brindaste estos años, solo me queda por decirte mil gracias.

A mis compañeros de laboratorio Dra. Alicia Martínez, M.C. Socorro Vallejo, Paco, Nalleli, Estrella, Fresia, Nora por todas las actividades de integración (viajes, carne asada, boliche, etc....).

A mis compañeros de la Universidad de Guadalajara Cesar, Carmen, Luz, Neyra, Marcela, Angeles por su amistad brindada durante mi estancia en CUCEI.

A mis compañeros de maestría Elsa, Rosina, José Luis, Rita, Magda, Bertha, Lucina y Judith por todos los momentos compartidos durante esta etapa de mi vida. Les desea éxito a todos y que se cumplan todas las metas propuestas al termino de esta bonita etapa de nuestras vidas.

DEDICATORIA

A mi padre Francisco Vacame Oquita donde quiera que se encuentre estoy seguro que está orgulloso de mí.

A mi abuela Socorro Valenzuela por que al igual que mi padre se que ella me bendice donde quiera que se encuentre.

A mi madre Margarita Valenzuela por creer en mí y apoyarme a realizar a todas las metas propuestas, además de ser un ejemplo de fortaleza para mí.

A mis hermanos Ramón, Mabel, Lorenia, Margarita por estar conmigo siempre.

A mis sobrinos Eduardo, Mayra, Jhosselyn, Hugo, Valeria, Derek, Adán y Ariel por ser la alegría de mi vida, a todo sin excepción los quiero mucho.

A mis amigos (mi familia) Martha, Diego, Norberto, Maya, Edith, Sarahari, Ana, Danet y Marco por los momentos compartidos y por los que faltan por vivir. Espero seguir siendo parte de sus vidas como ustedes son parte de la mía.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	viii
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	5
2.1. Factores que afectan la producción de metabolitos.....	6
2.2. Rutas biogénicas de DPA y OXA.....	7
2.3. Ingeniería metabólica.....	10
2.3.1. Modelado de sistemas biológicos.....	13
2.3.2. Síntesis de rutas metabólicas.....	16
2.3.3. Análisis de flujos metabólicos.....	17
3. Justificación.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivo general.....	21
5.1 Objetivos particulares.....	21
6. Materiales y métodos.....	22
6.1 Modelo propuesto para la producción de OXA y DPA en <i>Isaria fumosorosea</i>	22
6.2 Síntesis de rutas extremas.....	22
6.3. La matriz estequiométrica.....	25
6.4. Estudio de las rutas extremas obtenidas para <i>Isaria fumosorosea</i>	25

6.5 Análisis de flujos metabólicos.....	26
7. Resultados y discusión.....	29
7.1. Síntesis de rutas metabólicas.....	29
7.2. Rendimientos máximos teóricos.....	41
7.3 Análisis del flujo de carbono.....	46
8. Conclusiones.....	51
9. Recomendaciones.....	52
10. Bibliografía.....	53
11. Anexos.....	60

INDICE DE FIGURAS DE FIGURAS

Figura		Página
1	Bloques simplificados de reacciones propuestos para describir el metabolismo central de <i>I. fumosorosea</i> y la producción de DPA y OXA. Los bloques de reacciones propuestos están formados por la glucólisis, ruta de las pentosas, ciclo de Krebs, ciclo del glioxilato y producción de OXA y DPA.	9
2	Ruta extrema con la glucólisis incompleta y las vías de las pentosas y del glioxilato activas. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo1.	32
3	Ruta extrema con las vías de la glucólisis, las pentosas y del glioxilato activas, con producción de OXA. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo1.	33
4	Ruta extrema con las vías de la glucólisis, las pentosas y del glioxilato activas, con producción de DPA. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo 1.	34
5	Ruta extrema con las vías de la glucólisis, de las pentosas, carboxilación del piruvato en citosol y mitocondria y los ciclos de Krebs y del glioxilato activos, con producción de biomasa, OXA y DPA. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo 2.	38
6	Ruta extrema con las vías de la glucólisis, las pentosas y del glioxilato activas, con producción de biomasa OXA y DPA. Obtenida del bloque de reacciones del anexo 2.	39
7	Ruta extrema con las vías de la glucólisis, las pentosas y el ciclo de Krebs activos, con producción de biomasa y DPA pero sin producción de OXA. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo 2.	40
8	Rendimiento máximo teórico para la producción de OXA en <i>Isaria fumosorosea</i> .	42
9	Rendimiento máximo teórico para la producción DPA en <i>Isaria fumosorosea</i> .	43
10	Rendimiento máximo teórico para la producción de biomasa de <i>Isaria fumosorosea</i> .	45
11	Distribución de flujos de carbono en el modelo metabólico de <i>Isaria fumosorosea</i> con tasas elevadas de crecimiento y de producción de OXA y DPA.	48

- 12 Distribución de flujos de carbono en el modelo metabólico de *Isaria fumosorosea* con una tasa baja de crecimiento y tasas elevadas de producción de OXA y DPA. 49

RESUMEN

Isaria fumosorosea es un hongo entomopatógeno utilizado en el control biológico. Este hongo produce metabolitos con propiedades insecticidas como el ácido oxálico (OXA) y el ácido dipicolínico (DPA). Reportes de la literatura, así como resultados experimentales previos han sentado las bases para realizar el modelado matemático del metabolismo del hongo durante la producción de estos metabolitos, lo que permite realizar un análisis *in silico* simulando diversos escenarios. De igual manera facilita la estimación de rendimientos máximos teóricos así como la estimación de los flujos de carbono. Para realizar esta tarea se emplearon herramientas de la ingeniería metabólica, concretamente la síntesis de rutas metabólicas y el análisis de flujos metabólicos con la ayuda del programa MATLAB.

Se lograron integrar todas las reacciones para la construcción de un modelo que representó el metabolismo de *Isaria fumosorosea* durante la producción de OXA y DPA. De las 157 rutas extremas obtenidas, solamente dos rutas cumplieron con todas las restricciones impuestas para su selección. Se diseñaron las rutas extremas que permitieron obtener los máximos rendimientos teóricos aunque no todas ellas cumplen con las restricciones experimentales y bioquímicas. La distribución de flujos de carbono aplicada al modelo obtenido coincide con los resultados presentados en trabajos previos. Para tasas de crecimiento bajas pero altas tasas de producción de metabolitos insecticidas el 78% del flujo de carbono se gasta por el ciclo del glioxilato. Sin embargo a tasas de crecimiento y producción de metabolitos altas el 49% del flujo de carbono sigue principalmente el ciclo de Krebs. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura lo que indica que el modelo desarrollado representa adecuadamente el metabolismo del hongo. Sin embargo, hace falta validarlo con datos experimentales de calidad generados en cultivo continuo, estado para el cual se han desarrollado los algoritmos matemáticos empleados.

1. INTRODUCCION

Isaria fumosorosea es un hongo capaz de causar enfermedad y muerte a insectos plaga, cualidad por la cual es utilizado en el control biológico, particularmente de mosquita blanca, *Bemisia* spp., (Asaff, 2005). Este hongo produce, como parte de su mecanismo patogénico, diversos metabolitos insecticidas, tal es el caso del ácido oxálico (OXA) y el ácido dipicolínico (DPA) (Asaff y col., 2006). Estos metabolitos pueden aplicarse solos o en forma combinada con los propios hongos para potenciar su acción patogénica. Por ejemplo, el sobrenadante del cultivo de *Beauveria bassiana*, conteniendo ácido oxálico (OXA) fue usado sobre diferentes chinches y ácaros, mostrando un elevado porcentaje de control (Kirkland y col., 2005).

Hasta la fecha, el papel de los metabolitos insecticidas en el mecanismo patogénico no ha sido claramente descrito, y en muy pocos casos, como el de las destruxinas, se han realizado estudios toxicológicos profundos (Claydon y Grove, 1982). Para elucidar el papel del OXA, Bidochka y Khachatourians (1991) generaron cepas hiperproductoras de *Beauveria bassiana* por mutagénesis al azar. Sin embargo, una mutagénesis de este tipo no permitió obtener resultados concluyentes puesto que el proceso patogénico es multifactorial, sugiriendo la participación del OXA en la solubilización de la cutícula. En el caso del DPA, Asaff (2005) únicamente describió sus propiedades insecticidas, proponiendo que estas serían atribuidas a la capacidad quelante del compuesto y que causaría la inactivación de algunas metaloenzimas.

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación permiten sentar las bases que podrían conducir en el futuro a la modificación genética dirigida de *I. fumosorosea* a través de la ingeniería metabólica, una de las áreas de investigación de frontera más activas en biotecnología. Para realizar una manipulación racional y dirigida de las vías metabólicas es fundamental tener un conocimiento profundo de la bioquímica del organismo que se quiere modificar. Los flujos metabólicos y en particular los cambios de los flujos en respuesta a varios tipos de perturbaciones genéticas y medioambientales son críticos para la elucidación de los puntos de control de una red metabólica. El control de un flujo metabólico provee las bases para una modificación racional de las vías metabólicas, al permitir predicciones sobre los efectos de dichas modificaciones en función de datos experimentales previos.

Estas predicciones se pueden realizar a través de un modelo estequiométrico elaborado en base a todas las reacciones que componen la red metabólica y herramientas de ingeniería metabólica, como la síntesis de rutas metabólicas y el análisis de flujos metabólicos. Hasta el momento se tiene información bibliográfica suficiente a cerca de los bloques de reacciones que componen el metabolismo central de *I. fumosorosea* y las vías que conducen a la producción de OXA y DPA. Asimismo se dispone de evidencia experimental sobre la existencia de vías anapleróticas, como la vía del glioxilato, que es utilizada para la producción de precursores comunes de ambos ácidos y que resulta determinante en el metabolismo del hongo. Estos bloques de reacciones

describen la formación de biomasa, la generación de energía de mantenimiento y la síntesis de los metabolitos de interés. En el presente trabajo, la información existente fue empleada para la reconstrucción del metabolismo central de *I. fumosorosea* en un modelo estequiométrico que fue parcialmente validado en base a datos experimentales previos.

A futuro se requiere la validación completa del modelo con datos experimentales que se generen en un cultivo continuo del hongo, ya que el estado estacionario o pseudoestacionario simplifica el modelado matemático del sistema. El análisis predictivo podrá utilizarse para realizar mutagénesis dirigida del hongo a fin de conseguir cepas hiperproductoras o carentes de capacidad de producción de DPA y OXA, con el fin de elucidar el papel de estos metabolitos dentro del proceso patogénico.

2. ANTECEDENTES

Isaria fumosorosea es un hongo entomopatógeno capaz de infectar a una gran variedad de insectos (Asaff y col., 2002). Se conoce que su acción más efectiva es contra mosquita blanca (*Bemisia* spp.), insecto que se extiende en todo el mundo y que anualmente causa pérdidas millonarias en la agricultura (Osborne, 1990). Una de las grandes ventajas que tiene *I. fumosorosea* en contra de este insecto, es su capacidad para infectarlo en todas sus etapas de desarrollo, incluyendo su periodo gestacional en sus huevecillos. Adicionalmente provoca altos niveles de mortandad a una velocidad mayor que otros hongos entomopatógenos (Osborne y Landa, 1992). Las unidades infectivas y de diseminación son sus conidios aéreos producidos por cultivo sobre sustrato sólido. Sin embargo, también cierto tipo de propágulos producidos en cultivo sumergido, conocidos como blastosporas y conidios sumergidos tienen capacidad infectiva (Asaff y col., 2002).

Al igual que otros hongos, *I. fumosorosea* produce metabolitos secundarios de bajo peso molecular, muchos de los cuales han demostrado que poseen actividad insecticida (Asaff, 2005). Además del OXA y DPA se reporta que *I. fumosorosea* produce beauvericina y otras toxinas peptídicas cíclicas o depsipéptidos, que pueden tener una fuerte acción inmunomoduladora del insecto, pero carecen de un efecto insecticida directo (Jegorov y col., 1994).

2.1. Factores que afectan la producción de metabolitos

La producción de metabolitos de *I. fumosorosea* se ve fuertemente afectada por el sistema y el medio de cultivo. Por ejemplo, se reportó que cuando la cepa Pfrd del hongo es cultivada por fermentación líquida en medios que contienen elevadas cantidades de zinc ($> 20 \mu\text{M}$) se produce abundante biomasa y una cantidad pequeña de metabolitos insecticidas (DPA y OXA). Sin embargo, en condiciones limitantes de zinc ($< 0.20 \mu\text{M}$), el crecimiento del hongo es pobre pero la producción de DPA y OXA es elevada y se da fundamentalmente de forma no asociada al crecimiento (Asaff y col., 2006). En cultivo sólido, el metabolismo del hongo es menos sensible a la concentración de zinc en el medio, posiblemente debido a la velocidad de transporte de nutrientes y a la disponibilidad de factores de óxido-reducción provenientes de la cadena respiratoria (Asaff y col., 2006). En todos los casos se observó que los principales productos de fermentación fueron la biomasa, DPA y OXA, con porcentajes de recuperación de carbono superiores al 85%.

También se ha encontrado que el hierro tiene un efecto sobre la producción de metabolitos de *I. fumosorosea*. La producción de biomasa fue limitada cuando el hierro se encontró en una baja concentración, mientras que la producción de OXA y DPA fue abundante (Bacame, 2008).

2.2. Rutas biogénicas de DPA y OXA

Aunque no existe un estudio bioquímico en particular acerca de las vías metabólicas de formación de DPA y OXA en *I. fumosorosea*, se conoce que en otros hongos, la biosíntesis de DPA se da a partir del dihidrodipicolinato. Este compuesto se forma por condensación entre el piruvato y el aspartato semialdehído proveniente de la reducción del aspartato (Hodson y Foster, 1966) que a su vez se sintetiza por la reacción entre el glutamato y el oxaloacetato (OXAA). Por otro lado, el OXA se puede sintetizar por hidrólisis del OXAA catalizado por la enzima oxaloacetato hidrolasa (Kubicec y col., 1988) u oxaloacetasa (Munir y col., 2001). Así también puede ser formado por oxidación del glioxilato, mediante catálisis de la glioxilato oxidasa o glioxilato deshidrogenasa (Yoon y col. 2002).

Varios de los precursores del DPA y OXA son intermediarios o productos del ciclo de Krebs, el cual está fuertemente regulado por los requerimientos energéticos de la célula. Estudios previos demostraron que en *I. fumosorosea* también se encuentra activa la vía del glioxilato como una ruta anaplerótica para la producción de intermediarios del metabolismo central y posibles precursores de DPA y OXA, tal el caso del OXAA o del glioxilato (Bacame, 2008). Se observó que la ruta del glioxilato, en alternancia con el ciclo de Krebs, permite el direccionamiento del flujo de carbono hacia la síntesis de metabolitos insecticidas o hacia la formación de biomasa (Bacame, 2008). La isocitrato liasa (ICL) es la enzima responsable de desviar el flujo hacia el ciclo del glioxilato, mientras que la

isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (IDH- NAD^+) y la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ (IDH- NADP^+) son las enzimas claves del ciclo de Krebs (Mathews y col. 2003) y que forman el nodo de bifurcación con la ruta del glioxilato. Se demostró que las actividades de la ICL e IDH- NADP^+ se ven favorecidas positivamente por Fe^{2+} y Zn^{2+} , por lo que el manejo adecuado de la concentración de estos cationes constituye una forma sencilla de direccionar el metabolismo del hongo hacia los productos de interés (Bacame 2008).

Con la información disponible sobre las reacciones metabólicas altamente conservadas del metabolismo central y las rutas biosintéticas de DPA y OXA de otros hongos, así como de rutas específicamente estudiadas de *I. fumosorosea*, se construyeron inicialmente bloques simplificados de reacciones (Figura 1).

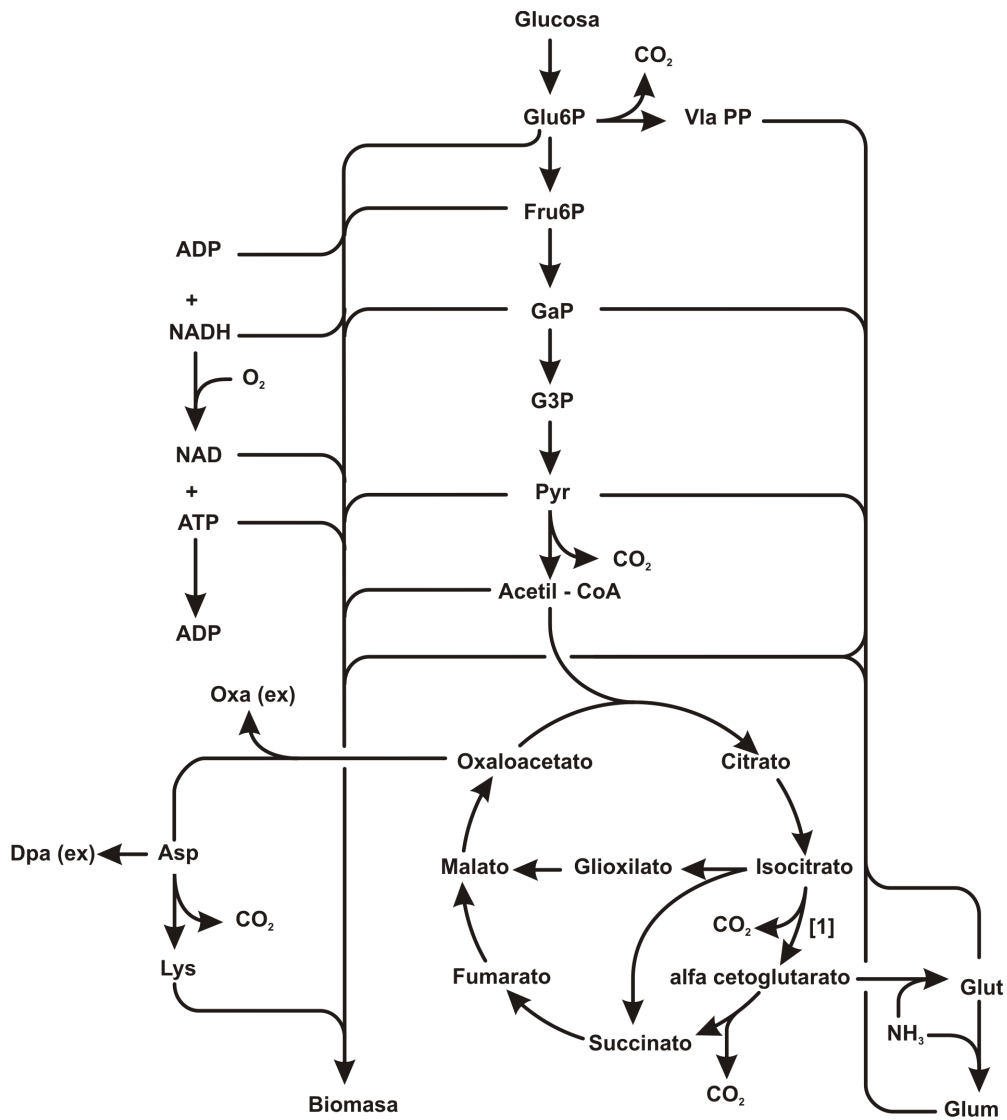


Figura 1. Bloques simplificados de reacciones propuestos para describir el metabolismo central de *I. fumosorosea* y la producción de DPA y OXA. Los bloques de reacciones propuestos están formados por la glucólisis, ruta de las pentosas, ciclo de Krebs, ciclo del glioxilato y producción de OXA y DPA.

Mediante esta información se pueden sentar las bases para construir un modelo metabólico del sistema biológico de *I. fumosorosea* que describa la

formación de los principales productos de fermentación del hongo como son la biomasa, DPA y OXA. Además, utilizando herramientas de la ingeniería metabólica se pueden obtener las rutas extremas para la biosíntesis de estos productos y con ello el conjunto de enzimas mínimas indispensables para este propósito.

2.3. Ingeniería metabólica

La ingeniería metabólica es una nueva área de la biotecnología relacionada con el estudio y la modificación del metabolismo. La ingeniería metabólica surge como resultado del cúmulo de conocimientos generados por varias disciplinas biológicas que incluyen principalmente a la bioquímica, la genética, la biología molecular y las ciencias genómicas (Martínez y Gosset, 2007).

La aplicación más frecuente de la ingeniería metabólica es en el estudio y modificación del metabolismo con el fin de generar organismos capaces de producir una cantidad elevada de un metabolito particular. Existen estrategias generales de la ingeniería metabólica que se pueden aplicar con este fin, independientemente del metabolito que se desee producir. Estas estrategias se enlistan a continuación (Martínez y Gosset, 2007):

- 1) Con base en el conocimiento bioquímico de la vía metabólica que sintetiza al compuesto de interés, identificar a las enzimas que son sujetas a

control por inhibición alostérica, es decir, enzimas cuya actividad es inhibida por sus productos u otros metabolitos celulares. Estas son las enzimas clave que regulan el flujo de carbono hacia una vía específica.

2) Para incrementar el flujo de carbono hacia la vía biosintética de interés, identificar y eliminar los controles alostéricos y transcripcionales en las enzimas clave de esa vía y en los genes que las codifican.

3) Lograr un alto nivel de expresión de los genes que codifican para las enzimas clave a las que ya se les eliminó el control alostérico. Esto se logra insertando los genes de interés en moléculas de ADN llamadas plásmidos, los cuales se replican en forma independiente del cromosoma y se encuentran en varias copias dentro de la célula.

4) Identificar y eliminar posibles pasos limitantes dentro de la vía de interés en un estudio dado.

5) Incrementar la disponibilidad metabólica de los intermediarios del metabolismo central que sean los precursores del metabolito que se desea producir.

Para aplicar la ingeniería metabólica y lograr una modificación racional en el metabolismo se debe partir de un modelo del sistema biológico. Este debe estar constituido por las reacciones involucradas en el metabolismo del organismo que

se quiera analizar o modificar. La simulación de los sistemas biológicos se realiza a través de herramientas de la ingeniería metabólica como el de la síntesis de rutas metabólicas, análisis de flujos metabólicos (AFM) y análisis de control del metabolismo (ACM). Estas herramientas permiten la medición de los flujos metabólicos y elucidación de su control como factores determinantes de la función del metabolismo y la fisiología celular (Koffas y col., 1999).

Gracias a estas herramientas de la ingeniería metabólica Gheshlaghi y col. (2007) lograron realizar un análisis del flujo de carbono mediante un modelo metabólico de una cepa recombinante y una nativa de *Aspergillus niger*. Esto se logró mediante el modelado del metabolismo de dicho microorganismo utilizando todas las reacciones metabólicas disponibles en la literatura sobre su metabolismo.

2.3.1. Modelado de sistemas biológicos

Generalmente, la unidad fundamental de un sistema biológico es la célula, la cual está constituida por órganos y compartimentos que contienen metabolitos que pueden ser transformados por reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas (Trinh y Ruohonen, 2008). El mecanismo metabólico de los microorganismos ha sido utilizado como reactores biológicos por el hombre desde hace miles de años (Vital, 2004). Los hongos filamentosos son utilizados para producir compuestos de importancia económica como son los antibióticos, ácidos orgánicos, vitaminas y enzimas comerciales (Gheshlaghi y col., 2007). Sin

embargo, a pesar de los amplios beneficios que se obtienen de los microorganismos, en ocasiones es difícil diseñar un bioproceso por la gran diversidad de mecanismos que contiene el microorganismo para sobrevivir convirtiéndolos en sistemas muy complejos. No obstante, con el uso de modelos metabólicos y herramientas matemáticas es posible diseñar bioprocesos para lograr estos objetivos (Vital, 2004).

En los años setenta se publicó el primer trabajo que utilizó matemáticas en el estudio de fenómenos bioquímicos (Bailey y Pedersen, 1999). Hoy en día existen varios enfoques para tratar de modelar el comportamiento de los microorganismos. Los modelos se pueden clasificar en estructurados y segregados (Bailey y Pedersen, 1999). Los modelos estructurados consideran que las células están formadas por componentes bioquímicos mientras que los modelos no estructurados consideran a la célula como un todo. Los modelos segregados consideran la heterogeneidad de la población celular y los modelos no segregados toman las características promedio de la población (Vital, 2004). Los modelos matemáticos también se pueden clasificar como cibernéticos y modelos basados en restricciones o acotaciones, siendo los modelos cibernéticos los que consideran que la célula optimiza los recursos limitantes mientras que los modelos basados en restricciones definen un espacio en el que se centran las soluciones permitidas (Price y col., 2003). Las restricciones son estequiométricas, refiriéndose a los balances de masa y termodinámica, de las cuales toman en cuenta la reversibilidad de las reacciones enzimáticas, referidas a la máxima velocidad de la enzima (Vital, 2004).

Los modelos estequiométricos son una herramienta importante en el análisis del metabolismo celular. Su poder radica en que la información requerida es abundante a diferencia de otros modelos (Vital, 2004). La característica principal de los modelos estequiométricos es que solo requieren del conocimiento de las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el sistema biológico y de la estequiometría de las mismas.

Los modelos estequiométricos pueden ser establecidos con todas las reacciones del metabolismo de un microorganismo o con solo una parte de ellas (Vital, 2004). La ley de conservación de la materia impone restricciones al metabolismo de los microorganismos, mismas que se expresan como balances de masa para cada metabolito del sistema. El balance de masa indica la velocidad con que se acumula un metabolito, siendo esta la diferencia entre la velocidad con que se sintetiza y la velocidad con que se consume. El flujo de un metabolito a través de la frontera de un sistema se puede considerar como una reacción en la que se forma o se consume. Si el metabolito entra al sistema, el flujo tendrá signo positivo, por el contrario si el flujo sale del sistema, el flujo tendrá signo negativo (Vital, 2004).

Matemáticamente el balance de masa se escribe como:

$$\frac{dx}{dt} = V_{s,i} - V_{c,i} \quad (1)$$

Donde:

X es la concentración del metabolito i en mmol/g de biomasa

$V_{s,i}$, $V_{c,i}$ son las velocidades netas de síntesis y consumo del metabolito i en unidades de masa por unidad de tiempo.

Los términos del lado derecho de la ecuación (1) pueden estar formados por una o más velocidades de reacciones enzimáticas, flujos para la formación de biomasa, de mantenimiento o de transporte.

2.3.2. Síntesis de rutas metabólicas

Una ruta metabólica se define como el conjunto de reacciones bioquímicas con las cuales un microorganismo convierte un metabolito en otro (Vital, 2004).

Una ruta metabólica se puede representar como un vector K^n donde n es el número de reacciones en el sistema, los coeficientes indican el flujo relativo de las reacciones en la ruta (Vital, 2004).

Dos de los conceptos más importantes en la síntesis de rutas metabólicas son los modos elementales y el análisis de vías extremas (Klamt y col., 2003). El diseño de modos elementales fue introducido por Schuster y col. (1999). En este diseño una reacción reversible no se descompone en dos reacciones irreversibles (Trinh y Ruohonen, 2008). La síntesis de vías extremas puede ser considerado

como un híbrido entre el análisis de redes estequiométricas y el análisis de modos elementales. El diseño de los modos elementales, se hace bajo los principios del análisis estequiométrico donde un balance de masa diferencial representa cada uno de los metabolitos que participan en un mapa metabólico (Varma y Palson, 1994).

Para realizar este procedimiento existen herramientas computacionales desarrolladas desde hace dos décadas que ayudan a determinar las rutas metabólicas, definiendo las reacciones de catálisis enzimática que participan en una red metabólica y que proporcionan información importante para obtener rendimientos máximos de un producto deseado (Trinh y Ruohonen, 2008). Algunos de los programas diseñados para el desarrollo de los modos elementales o rutas extremas son METATOOL, GEPASI, COPASI y MATLAB (Trinh y Ruohonen, 2008).

2.3.3. Análisis de flujos metabólicos

Mediante el análisis de flujos metabólicos se puede determinar la distribución del carbono en una ruta metabólica, así como determinar los rendimientos máximos teóricos y también establecer los nodos rígidos de la red. De este modo se puede hacer un ajuste entre las vías metabólicas tomando en cuenta la producción de metabolitos intermediarios y el consumo de sustratos (Varma y Palson, 1994).

En el análisis de flujos metabólicos, los flujos intracelulares son calculados usando un modelo estequiométrico donde se describe la bioquímica del microorganismo (Nissen y col., 1997). Es importante considerar que el análisis cuantitativo del metabolismo requiere de datos experimentales, siendo de suma importancia comprobar la consistencia de los mismos (Stephanopoulos y col., 1998). Para el caso de estudio, se ha planteado el modelo estequiométrico que se presenta en la Figura 1 el cual está compuesto por glucólisis, ruta de las pentosas, ciclo de Krebs, ciclo del glioxilato y la producción de OXA y DPA. Estas reacciones se describen en el Anexo 1.

3. JUSTIFICACION

Gracias al avance en la ciencia de la computación y el desarrollo de software, actualmente es posible efectuar una serie de análisis *in silico* de diferentes sistemas, procesos o productos a través de modelos estequiométricos. El objetivo de un modelo matemático es entender ampliamente un fenómeno y predecir su comportamiento sin necesidad de recurrir a un trabajo experimental. El modelado de un sistema biológico o una red metabólica permite por ejemplo, estimar los rendimientos teóricos máximos de un producto en particular o establecer la presencia de nuevas rutas metabólicas no descritas. Asimismo, un modelo metabólico admite el análisis del efecto de las condiciones y medios de cultivo o modificaciones genéticas sobre la fisiología de un organismo. En este trabajo, a través de las herramientas de la ingeniería metabólica, se pretende establecer un modelo metabólico que provea las bases para una modificación racional y dirigida de las vías metabólicas de *I. fumosorosea*. Este hongo entomopatógeno es utilizado como agente de control biológico y es reconocido por su capacidad para producir metabolitos insecticidas, como DPA y OXA. Sin embargo, el papel de estos compuestos en el proceso patogénico no ha sido claramente establecido por lo que la modificación dirigida de sus rutas biosintéticas coadyuvará a comprender el rol de estos metabolitos.

4. HIPÓTESIS

Mediante la reconstrucción del metabolismo central de *Isaria fumosorosea* en un modelo estequiométrico, es posible predecir *in silico* la producción y rendimientos máximos de biomasa y de los metabolitos insecticidas OXA y DPA.

5. OBJETIVO GENERAL

Establecer un modelo estequiométrico del metabolismo central de *Isaria fumosorosea* que explique y prediga la producción de OXA y DPA y el flujo de carbono bajo diferentes condiciones experimentales.

5.1. Objetivos Particulares

Construir un modelo metabólico de *Isaria fumosorosea* mediante la integración de las vías metabólicas disponibles en la literatura y evidencia experimental previa.

Sintetizar y analizar posibles rutas metabólicas de *Isaria fumosorosea* para la producción de biomasa, OXA y DPA.

Analizar los flujos metabólicos de las rutas sintetizadas de *Isaria fumosorosea* durante la producción de OXA y DPA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Modelo propuesto para la producción de OXA y DPA en *Isaria fumosorosea*

Para la construcción del modelo estequiométrico de *I. fumosorosea* se consideró la información disponible en la literatura de otros hongos, así como también datos experimentales de *I. fumosorosea*. Para la producción de OXA y DPA se tomaron en cuenta las reacciones metabólicas de glucólisis, ruta de las pentosas, ciclo de Krebs, ciclo del glioxilato, producción de OXA y DPA, fosforilación oxidativa, energía de mantenimiento y producción de biomasa, todas descritas en el Anexo 1.

6.2. Síntesis de rutas extremas

La síntesis de rutas extremas se realizó utilizando un programa diseñado en MATLAB por Vital (2004) en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica de la

Universidad de Guadalajara, empleando el algoritmo propuesto por Schuster y col. (2000) a partir de un balance de masa como se muestra en la ecuación 2.

$$\frac{dx}{dt} = \underline{S} \cdot \underline{v} \quad (2)$$

Donde \underline{x} es un vector que considera la concentración de cada metabolito, \underline{S} es la matriz que contiene cada uno de los coeficientes estequiométricos de las reacciones o flujos presentes y \underline{v} un vector que agrupa tanto los flujos internos como los flujos de intercambio (consumo y/o producción). Considerando condiciones de estado estacionario o pseudoestacionario en la ecuación (2), el balance de masa dinámico queda expresado como:

$$\underline{S} \cdot \underline{v} = 0 \quad (3)$$

Donde la matriz $S_{m \times n}$ está conformada por los metabolitos (m) y flujos (n) de intercambio. Si se impone la restricción termodinámica sobre el sistema para las velocidades irreversibles:

$$v_i \geq 0 \quad (4)$$

Donde v_i representa la velocidad neta de cada reacción irreversible, i^{th} .

La solución a la ecuación (3) considerando (4) se define como:

$$P = \{ \underline{v} \in \mathfrak{R}^n : \underline{S} \cdot \underline{v} = 0 \quad \text{y} \quad v_i \geq 0, i \in \text{irrev} \} \quad (5)$$

Donde P representa un conjunto de vectores de flujo o distribuciones de flujo (\underline{v}), que pertenecen a un espacio de magnitud n, y que cumplen con el conjunto de igualdades para la ecuación 3 y el conjunto de desigualdades para la ecuación 4.

En P podemos encontrar un subconjunto de vectores de flujo \underline{e} que cumplen con las siguientes características:

- (I) Condición de estado estacionario, ecuación 3
- (II) Factibilidad termodinámica: $e_i \geq 0, \forall i \in \text{irrev}$ (6)
- (III) Elementaridad, es decir un vector de flujo \underline{e} no puede ser descompuesto en dos o más vectores que cumplan con las condiciones 3 y 6 e involucren un subconjunto propio de sus reacciones participantes.

Esto expresado de manera matemática es:

$$\text{Para todo } \underline{e}' \in P: R(\underline{e}') \subseteq R(\underline{e}) \Rightarrow \underline{e}' = 0 \text{ o } \underline{e}' \cong \underline{e} \text{ o } \underline{e}' \cong -\underline{e} \quad (7)$$

Así cada vector de flujo $\underline{e} \in P$ que cumple con las características antes mencionadas es conocido como una ruta extrema.

6.3. La matriz estequiométrica

La matriz estequiométrica (**S**) se forma al aplicar el balance de masa (1), para cada metabolito que participa en el modelo estequiométrico. El coeficiente para cada metabolito será positivo si participa como sustrato o será negativo cuando participa como producto en una reacción dada. Los coeficientes en los flujos de intercambio son positivos cuando es un flujo de entrada y es negativo cuando es un flujo de salida. Cada fila de (**S**) representa el balance de masa para un metabolito y cada columna representa un flujo interno o un flujo de intercambio. Así, el elemento $S_{i,j}$ de la matriz estequiométrica corresponde al coeficiente del metabolito i en el flujo j . Si un metabolito no participa en un flujo el elemento de la matriz (**S**) correspondiente a dicho metabolito y dicho flujo es igual a cero.

6.4. Estudio de las rutas extremas obtenidas para *Isaria fumosorosea*

Las rutas extremas sintetizadas se seleccionaron en base a los siguientes criterios:

1. Deben cumplir con las restricciones experimentales ya establecidas.
2. El sustrato inicial debe ser glucosa y como productos OXA y DPA.
3. En una sola ruta metabólica se deben producir los dos metabolitos insecticidas.

4. Debe estar activa mínimamente la reacción de energía de mantenimiento.

6.5. Análisis de flujos metabólicos

El análisis de flujos metabólicos es una herramienta de Ingeniería Metabólica que puede ser utilizada para analizar las capacidades de una red metabólica reconstruida en base a la estequiometría sistémica y a restricciones termodinámicas y de capacidad de transporte del sistema biológico (Edwards y col. 2002). En base a estas restricciones se puede predecir las distribuciones de flujos óptimos, los cuales son calculados usando técnicas de programación lineal. Así calculando y examinando distribuciones de flujos óptimas bajo diferentes condiciones, es posible generar hipótesis cuantitativas *in silico* que pueden ser probadas experimentalmente (Edwards y col. 2001).

A partir de la información bioquímica se formula la representación matemática del sistema metabólico, partiendo de un balance de masa alrededor de cada metabolito en el sistema, que en forma matricial se expresa como:

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot v \quad (8)$$

Donde X denota el vector concentración de todos los metabolitos considerados, S representa la matriz estequiométrica y v es el vector de flujos

internos y de intercambio del sistema biológico. Bajo condiciones de estado estacionario la derivada del vector concentración de los metabolitos con respecto al tiempo es cero:

$$S \cdot v = 0 \quad (9)$$

Resultando así un sistema de ecuaciones homogéneas lineales. El sistema de ecuaciones obtenido es sub-determinado, puesto que el número de reacciones normalmente excede el número de metabolitos. Dicho sistema de ecuaciones es resuelto aplicando técnicas de programación lineal, maximizando una función objetivo (Edwards y col. 2001) .que para nuestro caso fue la formación de biomasa, OXA y DPA. Esta función objetivo fue probada experimentalmente de manera previa.

La función objetivo Z se define con la composición de la biomasa del microorganismo, producción de OXA y DPA y se expresa en forma matemática mediante la siguiente ecuación:

$$Z = \sum_{m=1}^M dm \cdot X_m \rightarrow \text{Biomasa, OXA y DPA} \quad (10)$$

Donde dm es la proporción de cada metabolito X_m , en la composición de la biomasa. Aplicando restricciones termodinámicas y de capacidades de transporte y usando técnicas de programación lineal se determina la distribución de flujos óptima que maximiza la función objetivo de biomasa OXA y DPA para:

$$\geq 0 \cdot i \cdot v$$

$$\alpha_j \leq b_j \leq \beta_j$$

Donde para la ecuación anterior α_j y β_j son escalares que determinan la capacidad de transporte y de intercambio del sistema biológico.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Síntesis de rutas extremas

La síntesis de rutas extremas se inició empleando el primer bloque de reacciones descrito en el Anexo 1. Este bloque de reacciones está compuesto a su vez por cuatro subbloques, donde el primero de ellos contiene las reacciones que corresponden a la glucólisis, el segundo describe las reacciones de la vía de las pentosas y el tercero muestra las reacciones de los ciclos de Krebs y del glioxilato. También se incluye un bloque con las reacciones que componen la fosforilación oxidativa y energía de mantenimiento. En este primer bloque de reacciones no se consideraron otras vías anapleróticas.

Se conoce que la glucólisis es una vía altamente conservada en diferentes organismos aerobios y anaerobios (Mathews y col. 2003). De la misma forma, se reporta que el ciclo de Krebs es altamente conservado en la mayoría de los organismos (Mathews y col. 2003).

En el caso del ciclo del glioxilato, se reporta que es una vía anaplerótica inducible en ausencia de glucosa y que conduce a la gluconeogénesis (Munir y col. 2001). Sin embargo, la evidencia experimental previa sugiere que el ciclo del glioxilato es una vía constitutiva (Bacame, 2008).

Además del bloque de reacciones del metabolismo central se consideró la producción de OXA y DPA, los metabolitos mayoritarios de *I. fumosorosea*. Para el caso del OXA las reacciones fueron tomadas del modelo metabólico de *Aspergillus niger* (Gheshlaghi y col. 2007). Para la producción de DPA las reacciones metabólicas fueron tomadas de las descritas para *Penicillium citreoviride* (Kanie y col. 1966).

Las rutas extremas deben de cumplir con ciertas restricciones, ya sean biológicas o establecidas en base a la evidencia experimental. Por ejemplo, es necesario que en una ruta extrema esté activa al menos la reacción correspondiente a la energía de mantenimiento, imprescindible para la sobrevivencia de un microorganismo en estado vegetativo (Anexo 1). Asimismo, toda ruta extrema para ser considerada factible, debe incluir a la glucosa como sustrato de partida al ser la única fuente de carbono empleada en la fase experimental previa, además de simplificar el análisis. Por otro lado, también se requiere que exista la producción simultánea de OXA y DPA, debido a que experimentalmente ambos metabolitos siempre son detectados, cualquiera sea el medio, condiciones o sistema de cultivo empleados, aunque su concentración sea variable (Asaff y col. 2006). Igualmente se reporta que la proporción de OXA en relación al DPA es siempre mayor, indistintamente del medio o condiciones de cultivo (Bacame 2008) y que la producción de biomasa es superior a cualquiera de los otros dos ácidos.

De acuerdo al bloque de reacciones considerado (Anexo 1), se obtuvieron 1500 rutas extremas, de las cuales ninguna alcanzó la totalidad de las restricciones impuestas. En la Figura 2 se muestra una ruta extrema donde se da la producción de OXA, con las vías de las pentosas y del glioxilato activas, no así la de la glucólisis ya que la reacción de isomerización de la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato está ausente. Este aspecto hace que la primera ruta extrema presentada se considere no factible puesto que la literatura refiere a que la glucólisis se encuentra integra en la mayoría de los organismos. Por ejemplo, en la construcción del modelo metabólico de *Aspergillus niger* se consideran las reacciones metabólicas de la glucólisis en su totalidad (Gheshlaghi y col. 2007; Guebel y Torres, 2001; Pedersen y col. 1999). Desde el punto de vista bioquímico, la reacción de isomerización es un paso importante, puesto que se define la geometría molecular que afectará los dos pasos críticos en la glucólisis: el próximo paso, que agregará un grupo fosfato al producto de esta reacción, y el paso 4, donde se producen dos moléculas de gliceraldehido que finalmente serán las precursoras del piruvato (Nelson y Cox, 2004). Puesto que la energía libre de esta reacción es igual a +1,7 kJ/mol la reacción es no espontánea y se debe acoplar (Nelson y Cox, 2004).

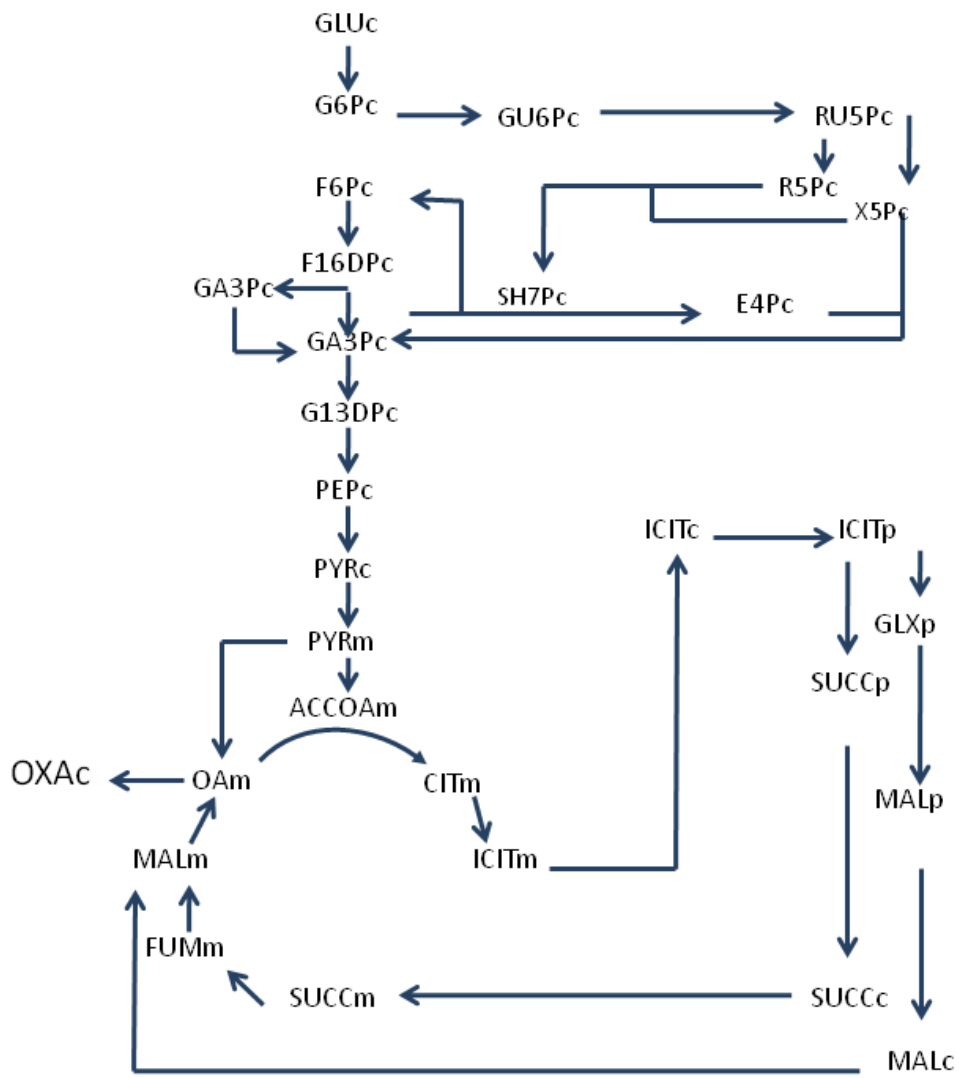


Figura 2. Ruta extrema con la glucólisis incompleta y las vías de las pentosas y del glioxilato activas. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo1.

En la Figura 3 se presenta otra ruta extrema, donde se observan las vías de la glucólisis, de las pentosas y del glioxilato activas, aunque únicamente permiten la producción de OXA.

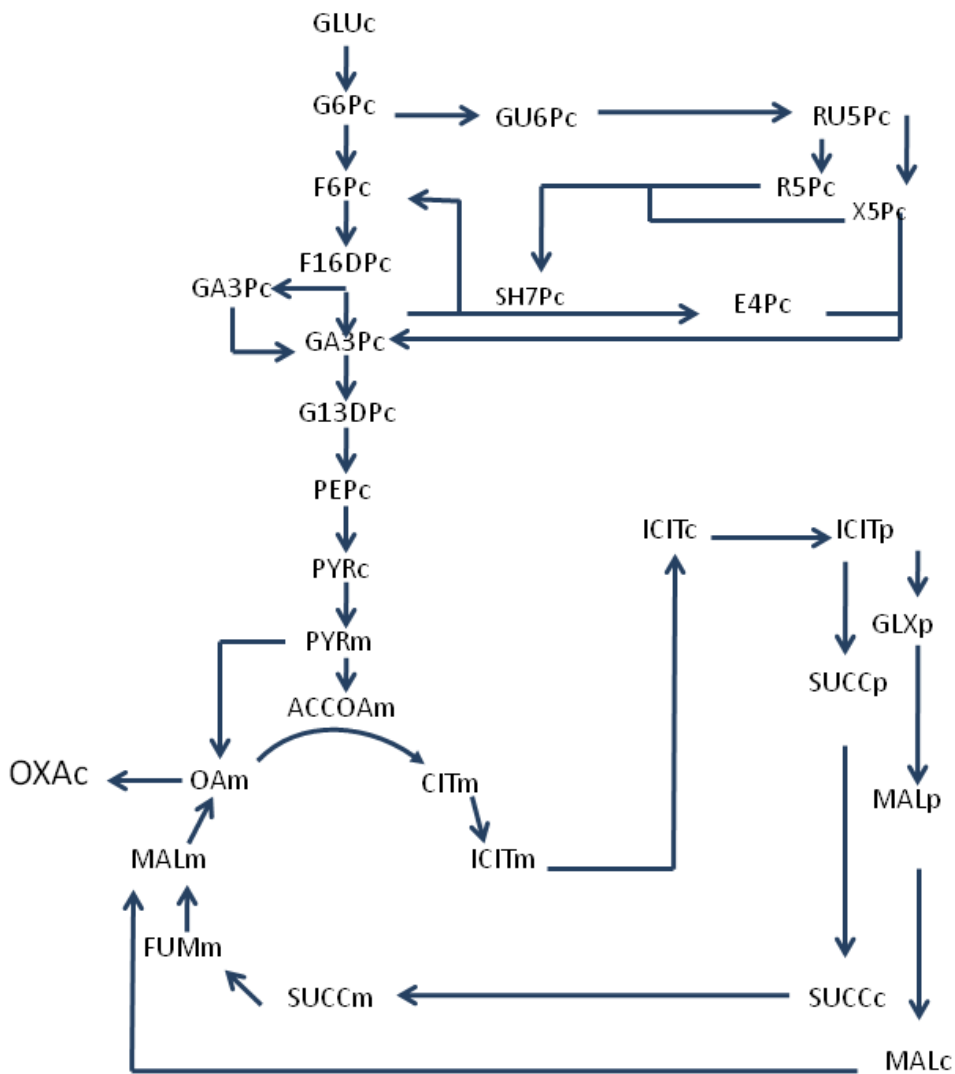


Figura 3. Ruta extrema con las vías de la glucólisis, las pentosas y del glioxilato activas, con producción de OXA. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo1.

En la Figura 4, al igual que en la ruta extrema de la Figura 3, las vías de la glucólisis, de las pentosas y del glioxilato se observan activas pero esta vez no se produce OXA sino DPA.

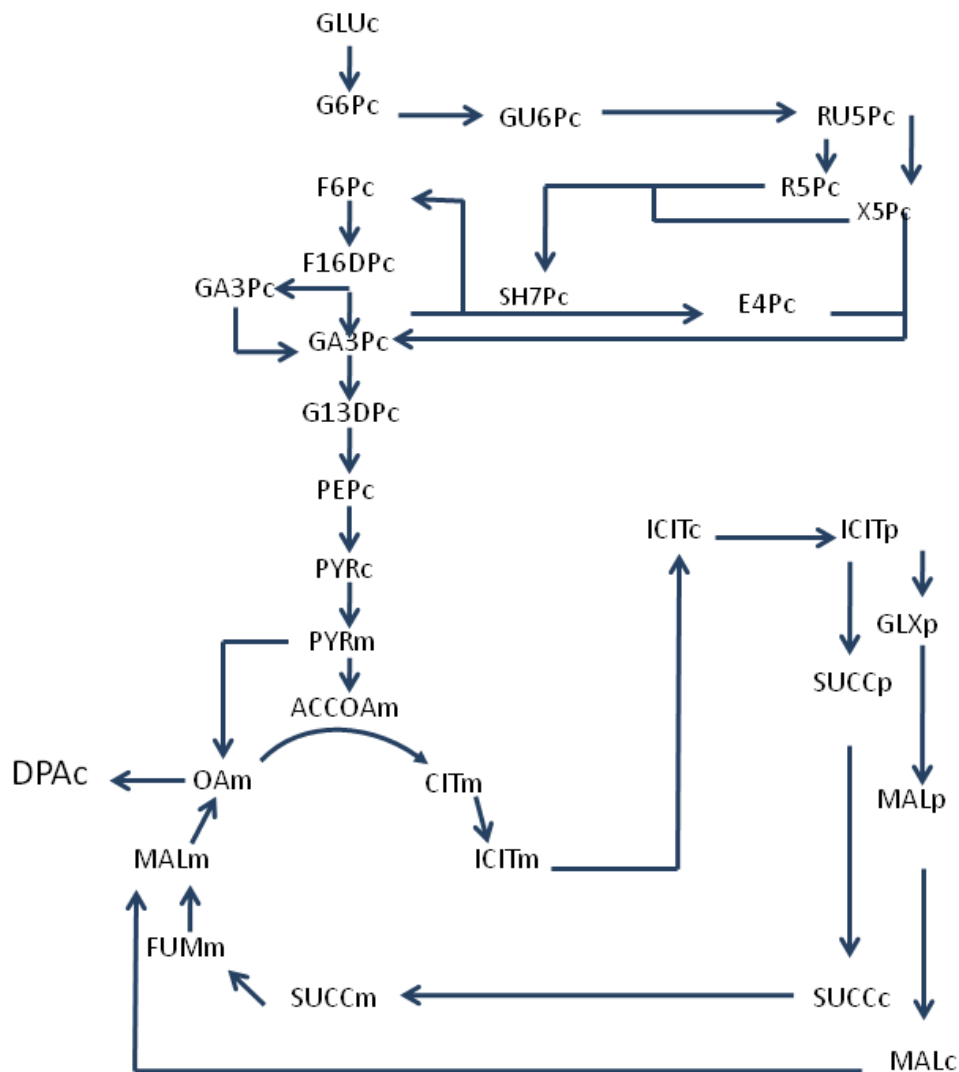


Figura 4. Ruta extrema con las vías de la glucólisis, las pentosas y del glioxilato activas, con producción de DPA. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo 1.

En las rutas extremas obtenidas, el ciclo del glioxilato se encuentra siempre presente, ya sea para la producción de OXA o para la producción de DPA. Experimentalmente se observó que en *I. fumosorosea* el ciclo del glioxilato se encuentra activo, independientemente si el ciclo de Krebs está activo o no (Bacame, 2008). Tanto el balance estequiométrico de la síntesis de rutas

extremas, como la evidencia experimental, muestran el papel preponderante que juega el ciclo del glioxilato en el metabolismo central del hongo.

Una característica que presentaron las 1500 rutas extremas obtenidas es que el ciclo de Krebs no estuvo activo. El ciclo de Krebs es la ruta oxidativa central de la respiración mediante el cual se catabolizan todos los combustibles metabólicos (carbohidratos, lípidos y proteínas) en los organismos y tejidos aerobios (Mathews y col. 2003). En el trabajo de Bacame (2008) se estableció que la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP, una de las enzimas claves del ciclo de Krebs, se encuentra generalmente activa, aunque requiere de cationes metálicos para maximizar su actividad. Estos antecedentes señalan que el ciclo del Krebs debía estar presente en alguna de las rutas extremas de *I. fumosorosea*, hecho no observado, lo que lleva a concluir que el bloque de reacciones del Anexo 1 resultó insuficiente para describir la bioquímica de su metabolismo central.

Como la síntesis de rutas extremas se basa en un balance de todas las posibles reacciones necesarias para llegar a un producto, el hecho de que ninguna ruta extrema permita la síntesis de OXA y DPA al mismo tiempo indica que la cantidad de carbono o de reacciones es insuficiente. Por tanto, deben de existir otras vías anapleróticas para la producción de los precursores de DPA y OXA, probablemente las del oxaloacetato (OXAA). Un microorganismo ampliamente conocido por su capacidad para producir ácidos orgánicos es *Aspergillus niger* en especial aquellos como el ácido cítrico y ácido oxálico (OXA) (Ruijter y col. 1999). Existen modelos metabólicos descritos para *A. niger* donde se muestra que

existen diferentes rutas anapleróticas para la producción de oxaloacetato como son la carboxilación del piruvato y la carboxilación del fosfoenolpiruvato (Gheshlaghi y col. 2007). Por tanto, estas rutas fueron incorporadas en un nuevo bloque de reacciones (Anexo 2).

Otro aspecto a considerar es la producción de biomasa ya que en el bloque de reacciones propuesto inicialmente solo se consideró que la biomasa está compuesta por ADN, ARN y proteína. En el nuevo bloque, las reacciones para la producción de biomasa fueron desglosadas en síntesis de DNA, síntesis de RNA, producción de aminoácidos y síntesis de proteína de acuerdo al bloque de reacciones propuesto por Pedersen y col. (1999) para *A. niger*.

Por otra parte, fue importante considerar la compartimentalización del modelo metabólico con el fin de tener una mayor aproximación a los procesos que suceden en la célula. La compartimentalización se hizo agrupando las reacciones que se llevan a cabo en citosol como la glucólisis, ruta de las pentosas, carboxilación del piruvato, carboxilación del fosfoenolpiruvato, producción de OXA y DPA. En mitocondria se consideraron las reacciones del ciclo de Krebs y en peroxisoma las reacciones del ciclo del Glioxilato (Gheshlaghi y col. 2007). La integración de las modificaciones propuestas dio lugar a una red constituida por 76 reacciones, 94 metabolitos intracelulares, glucosa como sustrato inicial (Anexo 2) y distribuidas en glucólisis, ruta de las pentosas, ciclo de Krebs, ciclo del Glioxilato, carboxilación del piruvato, carboxilación del fosfoenolpiruvato,

fosforilación oxidativa, producción de aminoácidos, síntesis de proteínas, ARN, ADN, lípidos y carbohidratos.

De acuerdo al nuevo bloque de reacciones considerado se obtuvieron nuevas rutas extremas, dos de las cuales cumplen con las restricciones impuestas al sistema. En la Figura 5, se presenta una de las rutas extremas seleccionadas en la que se encuentran activos, tanto el ciclo de Krebs, como el ciclo del glioxilato y se da la producción conjunta de OXA, DPA y biomasa, cumpliendo con las diferentes restricciones establecidas previamente.

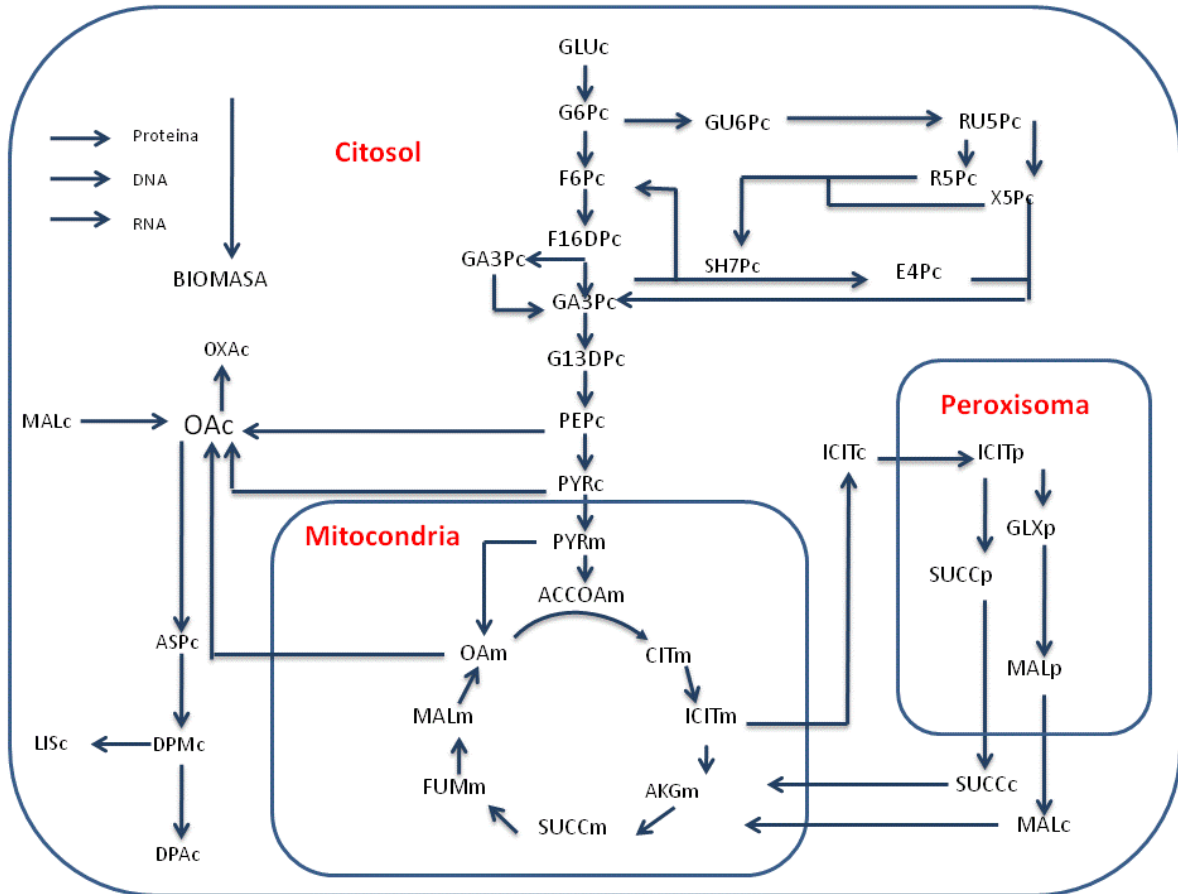


Figura 5. Ruta extrema con las vías de la glucólisis, de las pentosas, carboxilación del piruvato en citosol y mitocondria y los ciclos de Krebs y del glioxilato activos, con producción de biomasa, OXA y DPA. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo 2.

También se seleccionó otra ruta extrema (Figura 6), en el que se encontró activo el ciclo del glioxilato, la vía anaplerótica de carboxilación del piruvato para la producción de oxaloacetato pero no así el ciclo de Krebs. Sin embargo, se observó que estas condiciones fueron suficientes para mantener la producción de DPA, OXA y biomasa.

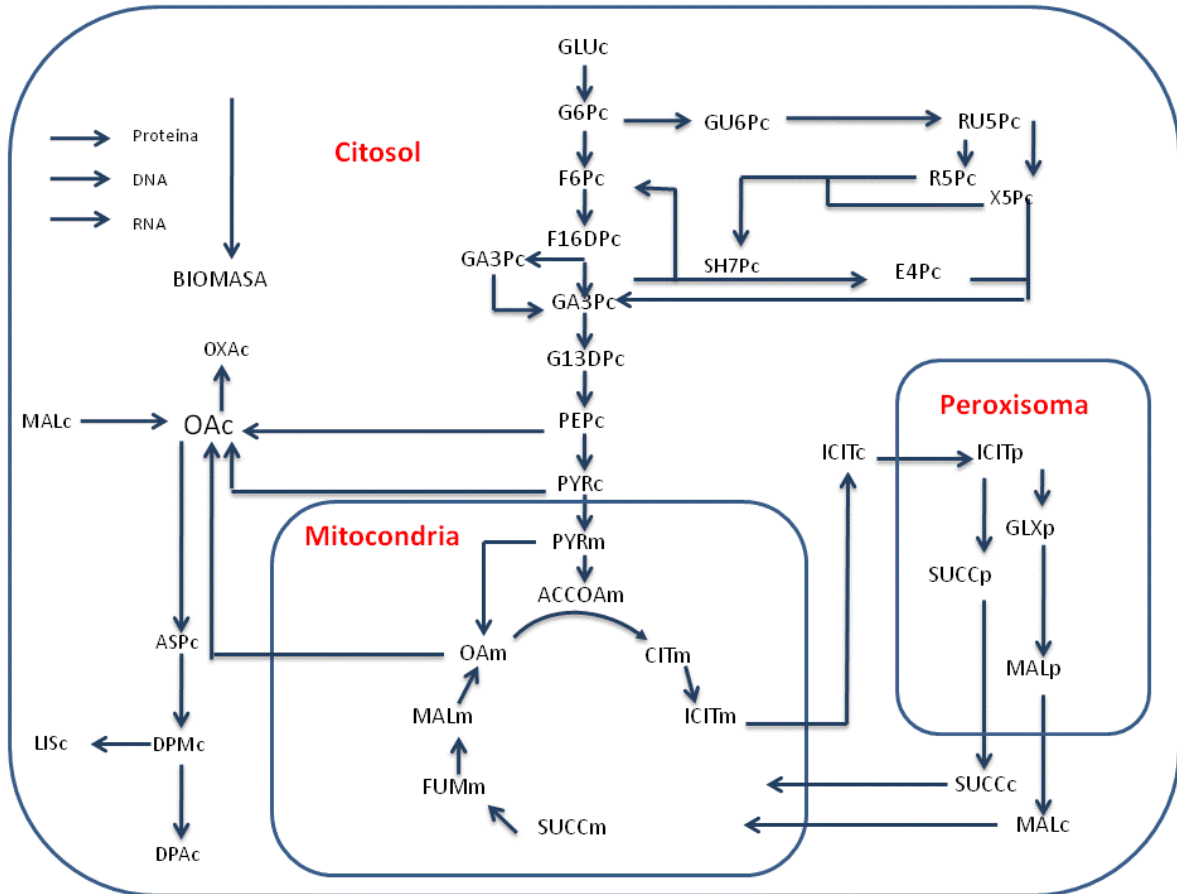


Figura 6. Ruta extrema con las vías de la glucólisis, las pentosas y del glioxilato activas, con producción de biomasa OXA y DPA. Obtenida del bloque de reacciones del anexo 2.

En la Figura 7 se presenta una ruta extrema en la que solo se encuentra activo el ciclo de Krebs. Esta ruta extrema muestra que únicamente con este ciclo activo se puede producir DPA pero no OXA, lo cual discrepa de la evidencia experimental discutida previamente.

Por tanto, esta ruta extrema no responde a las restricciones establecidas y destaca una vez más la importancia del ciclo del glioxilato en el metabolismo de *I. fumosorosea* y la producción de metabolitos insecticidas.

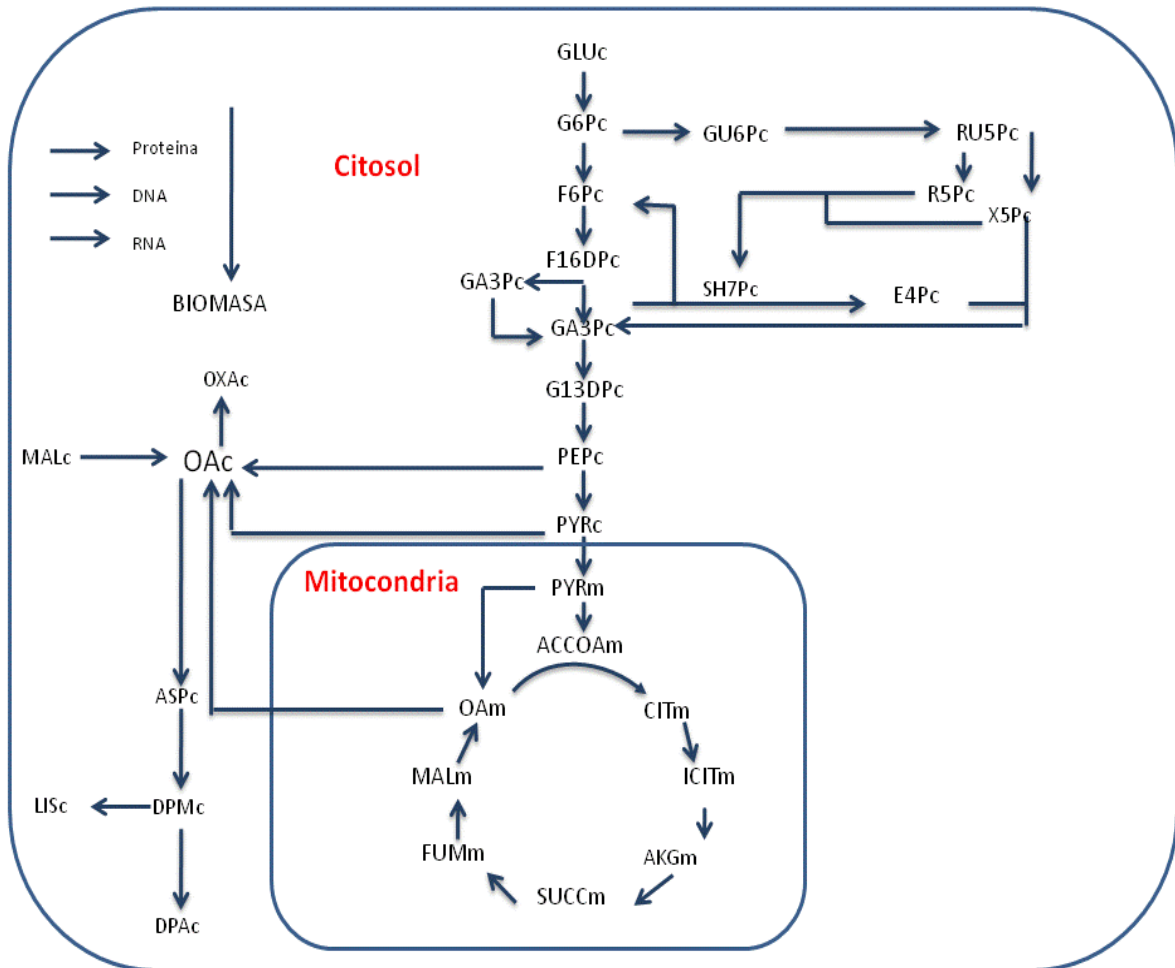


Figura 7. Ruta extrema con las vías de la glucólisis, las pentosas y el ciclo de Krebs activos, con producción de biomasa y DPA pero sin producción de OXA. Obtenida del bloque de reacciones del Anexo 2.

El ciclo del glioxilato es una ruta anaplerótica que utilizan algunos microorganismos y plantas para sobrevivir cuando hay algún problema con el ciclo de Krebs (Munir y col. 2001). La enzima clave de este ciclo es la isocitrato liasa (ICL), la cual se encarga de redireccionar el flujo de carbono del ciclo de Krebs hacia el ciclo del glioxilato. La vía del glioxilato se activa también durante la gluconeogénesis cuando se agotan los carbohidratos como fuente de carbono

(glucosa) (Munir y col. 2001). Sin embargo, en un trabajo previo se estableció que en *I. fumosorosea*, la ICL presenta actividad elevada, inclusive a concentraciones altas de glucosa, sugiriendo que se trata de una enzima constitutiva (Bacame, 2008). Al parecer, en *I. fumosorosea*, al igual que en ciertos hongos de la pudrición de la madera, como *Fomitopsis palustris*, la actividad del ciclo del glioxilato está relacionada con la producción de energía (Yoon y col. 2002).

7.2. Rendimientos Máximos Teóricos

Una de las características del programa de cómputo utilizado es que puede identificar las rutas extremas que permiten alcanzar los rendimientos máximos teóricos de metabolitos de interés o la biomasa. En la Figura 8 se presenta el número de rutas extremas y los rendimientos alcanzados en cada una de ellas para la producción de OXA.

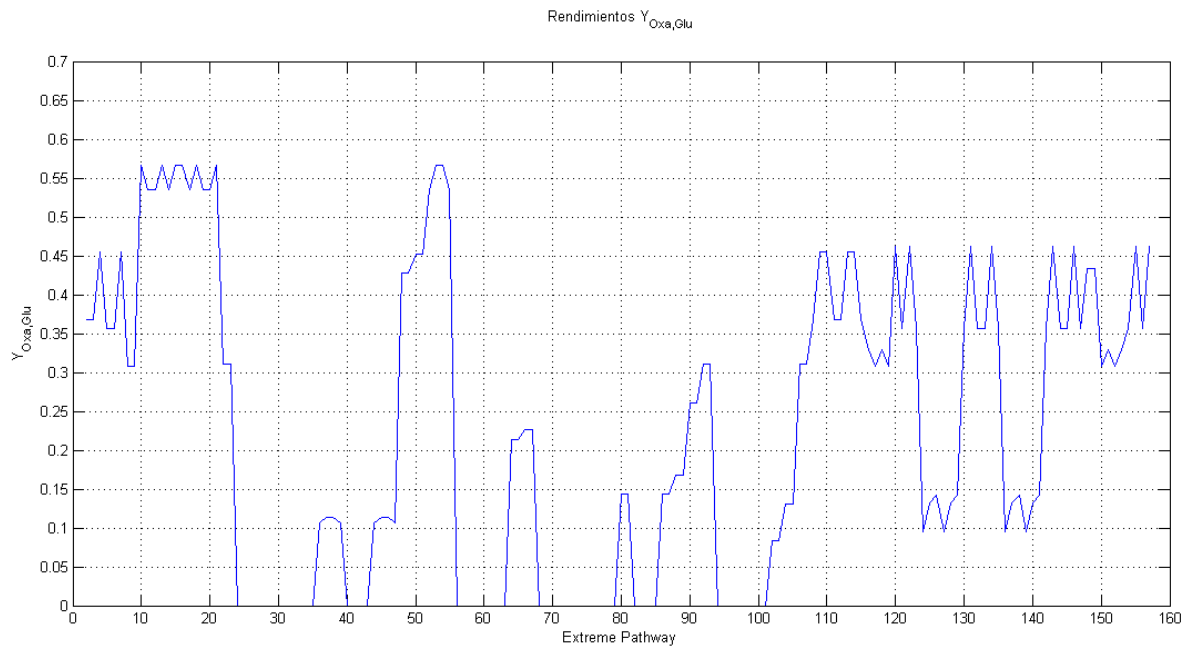


Figura 8. Rendimiento máximo teórico para la producción de OXA en *Isaria fumosorosea*.

El rendimiento máximo teórico para la producción de OXA fue de 0.566, valor alcanzado en 8 rutas metabólicas de las 157 sintetizadas. Una característica de estas 8 rutas es que en todas se encuentra activo el ciclo de glioxilato e inactivo el ciclo de Krebs. Además, las 8 rutas incluyen la producción de DPA, con un rendimiento de 0.084 y biomasa con un rendimiento de 0.053. De acuerdo a estos resultados, la proporción entre DPA y OXA es de 1:51.45. Dichos resultados coinciden con lo ya reportado por Asaff y col. (2006) donde se muestra que el rendimiento de OXA es mayor que el rendimiento de DPA en condiciones experimentales.

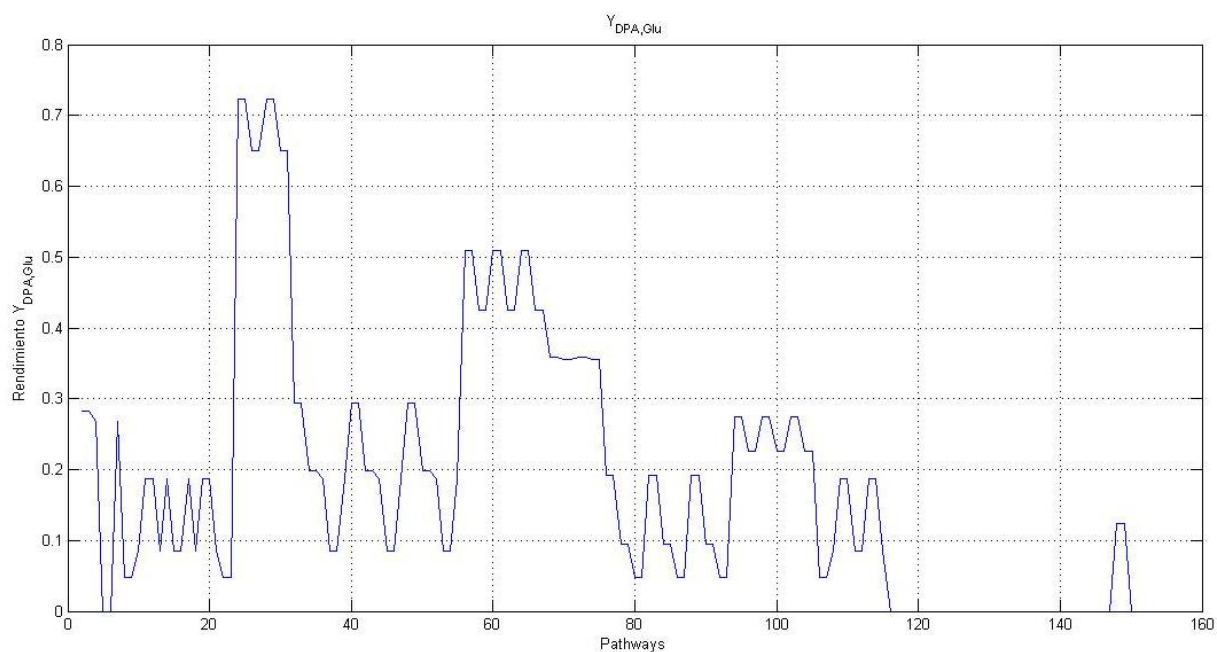


Figura 9. Rendimiento máximo teórico para la producción DPA en *Isaria fumosorosea*.

En la Figura 9 se muestra el número de rutas extremas donde se produce el máximo rendimiento teórico para la producción de DPA en *I. fumosorosea*. El máximo rendimiento observado fue de 0.723, alcanzado solamente en cuatro de ellas. El rendimiento máximo de biomasa para estas rutas extremas fue de 0.053 y de cero para el caso del OXA. Debido a la nula producción de OXA, es poco probable que estas rutas extremas se lleven a cabo en el microorganismo ya que experimentalmente se ha observado que siempre se producen ambos metabolitos insecticidas (Asaff y col. 2006). Otra característica de estas 4 rutas extremas es que no presentan activos ni al ciclo del glioxilato ni al ciclo de Krebs. Desde el punto de vista bioquímico esta situación no es posible, ya que en estos ciclos se

genera la energía necesaria y los precursores para las funciones anabólicas de la célula (Mathews y col. 2003).

En la Figura 9 también se puede observar que existen 6 rutas metabólicas que producen un rendimiento de 0.508 de DPA, que es el segundo máximo teórico. En 5 de estas rutas extremas se encuentra activo el ciclo de Krebs e inactivo el ciclo del glioxilato, además no existe producción de OXA. En la ruta 6 sí es producido, se obtiene un rendimiento de 0.214 de OXA y se encuentra incompleto el ciclo del glioxilato e inactivo el ciclo del Krebs por lo cual es poco probable que esta ruta extrema se lleva a cabo en la célula. La proporción entre la producción de DPA y OXA en esta ruta es de 2.41:1 y es una de las pocas en las que se obtiene una producción mayor de DPA.

En el caso de biomasa el rendimiento para estas 6 rutas metabólicas fue de 0.053. La proporción que se obtiene de estos resultados es de 1:13.62 de biomasa respecto a la producción de OXA y DPA. Esta proporción se obtiene de la ruta extrema donde se produce el OXA estando activo el ciclo del glioxilato.

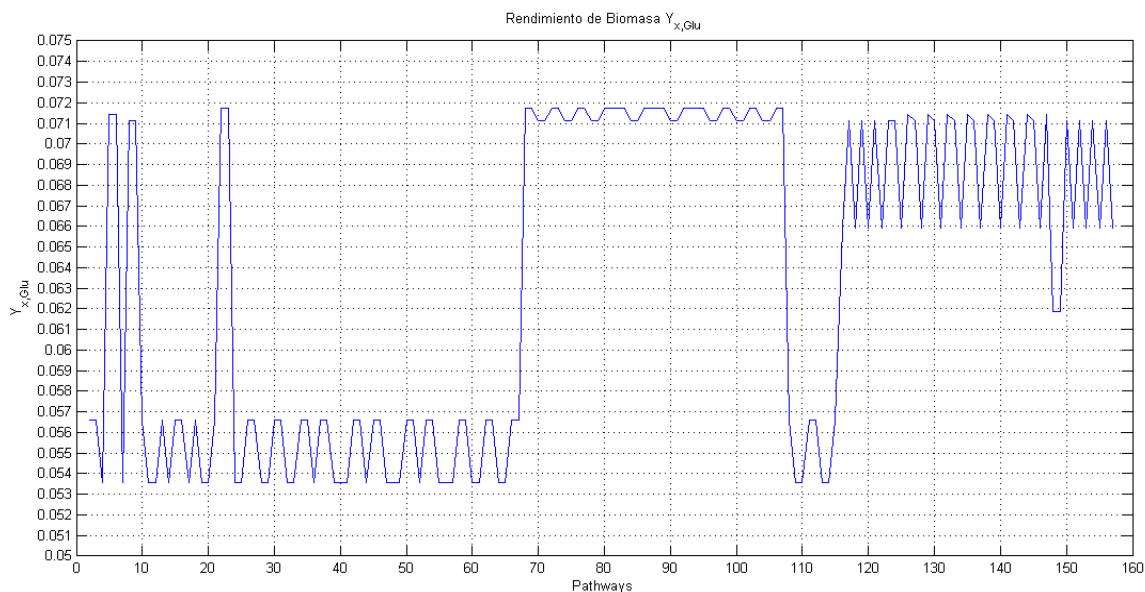


Figura 10. Rendimiento máximo teórico para la producción de biomasa de *Isaria fumosorosea*.

En la Figura 10 se muestran los rendimientos para la producción de biomasa con 26 rutas extremas con un rendimiento máximo de 0.071. En algunas de estas rutas extremas no se encontró activo el ciclo de Krebs, y precisamente en éstas no se obtuvo producción de OXA. Por otra parte, las rutas extremas donde únicamente estuvo activo el ciclo del glioxilato presentaron, tanto producción de OXA, como de DPA. En el caso donde solamente estuvo activo el ciclo del glioxilato, se obtuvo también el mayor rendimiento de OXA (0.310) con un rendimiento de 0.047 para DPA. Por otra parte, se encontraron rutas extremas donde estuvieron activos el ciclo del glioxilato y el ciclo de Krebs, produciendo un rendimiento de OXA de 0.143 y un rendimiento de DPA de 0.047. Estas condiciones originaron una proporción de 1:2.67 de biomasa respecto a la producción de OXA y DPA.

7.3. Distribución del flujo de carbono

Estudios experimentales previos señalan que durante el cultivo sumergido en lote de *I. fumosorosea*, la producción de biomasa, OXA y DPA varían de acuerdo a las condiciones, los medios y el sistema de cultivo utilizados (Asaff y col., 2006; Bacame, 2008). Por ejemplo, en un medio de cultivo conteniendo concentraciones elevadas de Zn (20 μM), los rendimientos estimados en base a sustrato de OXA y DPA fueron 0.07 y 0.002 respectivamente. A concentraciones bajas de Zn (1.0 μM), los rendimientos estimados fueron 0.22 y 0.02 (Bacame, 2008). A altas concentraciones de Zn, la velocidad máxima de crecimiento del hongo también es alta (0.1 h^{-1}) y la fase exponencial de crecimiento se mantiene hasta que los macronutrientes se van agotando. Sin embargo a bajas concentraciones de Zn, la velocidad máxima de crecimiento decae temprana y drásticamente, mucho antes de que los macronutrientes se hayan agotado (Asaff, 2005). A partir del punto de decaimiento, el crecimiento del hongo es prácticamente lineal y extremadamente lento, aunque la formación de OXA y DPA continua a una velocidad similar a la observada a altas concentraciones de Zn (Asaff, 2005). Se sugirió que la carencia de Zn provoca una severa disminución en la actividad de la isocitrato deshidrogenasa con lo que el ciclo de Krebs es interrumpido y el flujo de carbono se redirecciona hacia el ciclo del glioxilato, que por sí solo no genera la energía suficiente para mantener un crecimiento acelerado del hongo. Estudios posteriores confirmaron en parte esta hipótesis, al demostrar que la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ requiere de Zn

para una actividad óptima y que el ciclo del glioxilato está activo de manera constitutiva en *I. fumosorosea* (Bacame, 2008).

Mediante el análisis de flujos metabólicos se simularon ambas situaciones; es decir, un estado fisiológico con tasas elevadas de crecimiento y de producción de OXA y DPA y un segundo estado con una tasa muy baja de crecimiento pero manteniendo las tasas de producción de OXA y DPA del primer estado. Los resultados de esta simulación se presentan en las Figuras 11 y 12. En el primer caso se observa que inicialmente el 49% del carbono que es convertido en aconitato continúa por el ciclo de Krebs en la mitocondria, después un 38% sale a citosol y es incorporado a los bloques de reacciones para la formación de biomasa a través de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP del citosol y finalmente un 13% sigue la vía del glioxilato. En el segundo caso, no existe flujo a través del ciclo de Krebs en mitocondria, el 100% del carbono que es convertido en aconitato sale a citosol y de este porcentaje apenas el 22% es incorporado a los bloques de reacciones para la formación de biomasa, a través de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP del citosol, mientras que el 78% sigue la vía del glioxilato. Adicionalmente en el segundo caso, se activan otras vías anapleróticas que conducen al incremento de la tasa de formación de oxaloacetato (OXAA) en citosol, como la carboxilación del piruvato, también en citosol y el transporte del oxaloacetato formado en mitocondria.

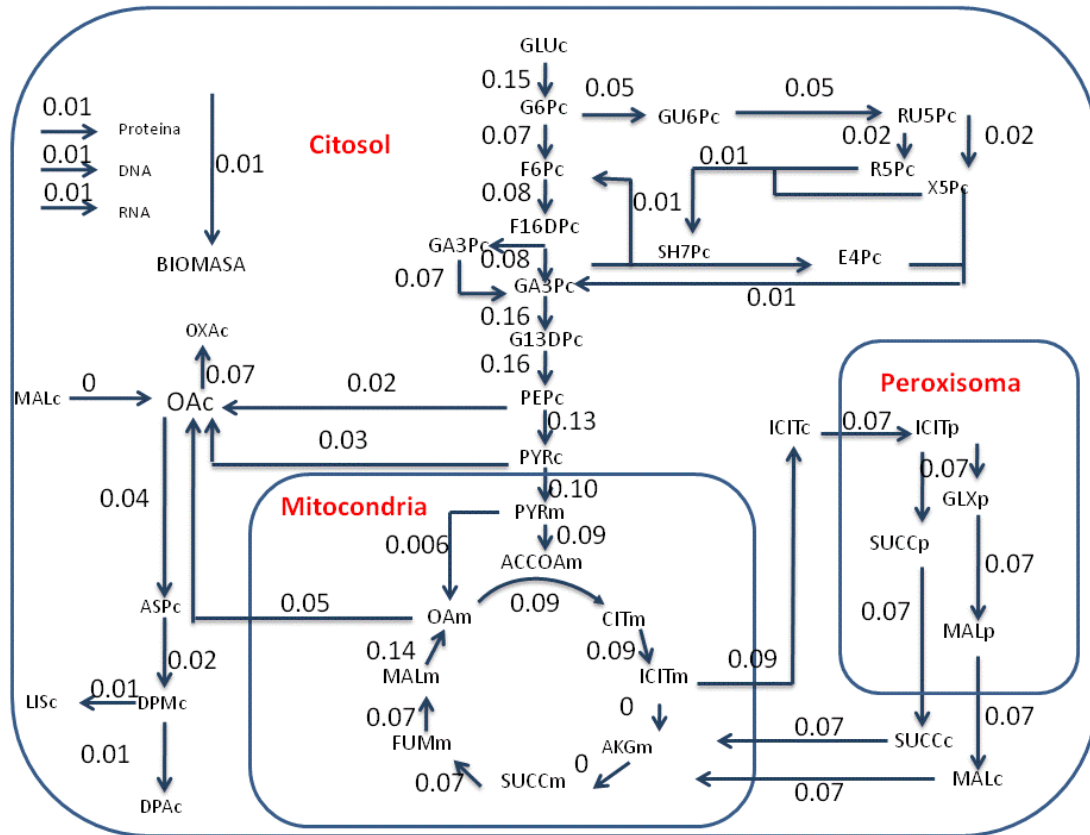


Figura 12. Distribución de flujos de carbono en el modelo metabólico de *Isaria fumosorosea* con una tasa baja de crecimiento y tasas elevadas de producción de OXA y DPA.

Por otro lado, en base a los flujos de la Figura 11 se estimaron rendimientos en base a sustrato de 0.058 y 0.008 para OXA y DPA respectivamente. En el caso de la Figura 12, los rendimientos estimados para OXA y DPA fueron 0.467 y 0.067, 8 veces superiores a los rendimientos estimados para la Figura 11.

La distribución de flujos en los casos expuestos y los rendimientos estimados en base a ellos guardan correspondencia con la evidencia experimental

y fortalecen las hipótesis planteadas en trabajos previos a cerca del papel del ciclo de Krebs y del glioxilato en la fisiología de *I. fumosorosea*.

De acuerdo con los resultados anteriormente descritos, los cuales se obtuvieron de un modelo simplificado de 76 reacciones, se considera que el modelo metabólico generado describe adecuadamente el metabolismo central de *Isaria fumosorosea*. Pero este modelo metabólico comparado con los reportados para otros sistemas biológicos se puede considerar como un modelo metabólico primario. Por ejemplo, en la construcción de un modelo metabólico para *Aspergillus niger* se utilizaron 160 reacciones que consideran en detalle los procesos de producción de biomasa y producción de polioles. Bajo estas consideraciones, es posible que los valores en el análisis de flujos sufran modificaciones, tomando en cuenta que todo cambio se deberá realizar en función de datos experimentales de calidad que sean generados en cultivo continuo y que permitan validar el modelo.

8. CONCLUSIONES

Se logró construir un modelo simplificado que describe el metabolismo central de *Isaria fumosorosea* y la producción de los metabolitos insecticidas OXA y DPA. A través de dicho modelo se pueden explicar las rutas extremas necesarias para la biosíntesis de dichos compuestos. Bajo el análisis de flujos según el modelo metabólico obtenido se alcanzaron resultados que coinciden en gran parte con aquellos obtenidos experimentalmente por lo que se concluye que el modelo describe adecuadamente el metabolismo central del microorganismo aunque es necesaria su validación.

9. RECOMENDACIONES

Para la continuación de este estudio es necesario ampliar las reacciones que conforman el metabolismo de *Isaria fumosorosea*, ya que solamente logramos integrar un modelo simplificado del metabolismo donde los bloques de reacciones están incompletos debido a que no se consideraron ciertas pasos metabólicos. Esto puede implicar que se esté omitiendo algún gasto de energía y por lo tanto los rendimientos en el análisis de flujos de carbono sean mayores. Principalmente, las reacciones no consideradas en detalle en el modelo metabólico descrito (Anexo 2) fueron las relacionadas con la producción de biomasa como por ejemplo la síntesis de nucleótidos, carbohidratos y lípidos.

También se recomienda la validación de este modelo metabólico mediante un sistema de cultivo continuo de *I. fumosorosea*, tomando en cuenta la producción de OXA y DPA, así como también la de biomasa, ya que la metodología que se utilizó fue para un sistema estacionario.

10. BIBLIOGRAFIA

- Asaff A. (2005). Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Asaff A., Cerda G. R., Viniegra G. G., De La Torre M. (2006). Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochemistry*. 41:1303-1310.
- Asaff A., Reyes V. Y., López L. E., De La Torre M. (2002). Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva*. 21:291-295.
- Bacame V. F. (2008). Efecto de Zn y Fe sobre la actividad enzimática de algunas enzimas del ciclo de Krebs y del Glioxilato. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Bailey M., Pedersen H. (1999). Identification of enzymes and quantification of metabolic fluxes in the wild type and in a recombinant *Aspergillus oryzae* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:11-19.

Bidochka M., Khachatourians G. (1991). The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58:106-117.

Claydon N., Grove J. (1982). Insecticidal secondary metabolitic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 40:413-418.

Edwards J., Ibarra R., Palsson B. (2001). *In silico* predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. 19:125-130.

Gheshlaghi R., Scharer M., Moo-Young M., Douglas P. (2007). Metabolic flux analysis for optimizing the specific growth rate of recombinant *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosystems Engineering*. 30:397-418.

Guebel D., Torres D. (2001). Optimization of the citric acid production by *Aspergillus niger* through a metabolic flux balance model. *Electronic Journal of Biotechnology*. 4:1:17.

Hodson P. H., Foster J. W. (1966). Dipicolinic acid synthesis in *Penicillium citreoviride*. *Journal of Bacteriology*. 91:562-569.

- Kanie M., Fujimoto S., Foster W. (1966). Chemical degradation of dipicolinic acid – C¹⁴ and its application in biosynthesis by *Penicillium citreo-viride*. *Journal of Bacteriology*. 91:570-577.
- Kirkland B. H., Eisa A., Keyhani N. O. (2005). Oxalic acid as a fungal acaracidal virulence factor source. *Journal of Medical Entomology*. 42:346-351.
- Klamt S., Stelling J., Ginkel, M., Gilles E. D. (2003). Flux Analyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps. *Bioinformatics*. 19:261-269.
- Koffas M., Roberge C., Lee K., Stephanopoulos G. (1999). Metabolic engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 1:535-557.
- Kubicec C. P., Schreferl-Kunar G., Wöhrer W., Röhr M. (1988). Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:633-637.
- Jegorov A., Sedmera P., Matha V., Simek P., Zahradnickova H., Landa Z., Eyal J. (1994). Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*. 37:1301-1303.
- Martínez J. A., Gosset L. G. (2007). Ingeniería metabólica de bacterias. *Biotecnología*. 14:373.

Mathews C. K., Van Holde K. E., Ahern K. G. Bioquímica (2003). 3nd Ed. Prentice Hall.

Munir E., Yoon J. J., Tokimatsu T., Hattori T., Shimada M. (2001). A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. Proceedings of National Academy of Sciences. 98:11126-11130.

Nielsen J. (2001). Metabolic engineering. Applied Microbiology and Biotechnology. 55:263-283.

Nelson D., Cox M. (2004). Principles of biochemistry 4^e. W.H. Freeman and Company. New York.

Nissen T. L., Schulze U., Nielsen J., Villadsen J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. 143:304-218.

Osborne L. S. (1990). Biological control of whiteflies and other pests with a fungal pathogen. United States Patent N° 4,942,030.

Osborne L., Landa Z. (1992). Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomology. 75:456-471.

- Pedersen H., Carlsen M., Nielsen J. (1999). Identification of enzymes and quantification of metabolic fluxes in the wild type and in a recombinant *Aspergillus oryzae* strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:11-19.
- Price N., Papin J., Schilling C., Palsson B. O. (2003). Genome-scale microbial *in silico* models: the constraints-based approach. *Trends in Biotechnology*. 21:162-169.
- Ruijter G., Peter J., van de Vondervoort I., Visser J. (1999). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology*. 145:2569-2576.
- Schuster S., Dandekar T., Fell, D. (1999). Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends in Biotechnology*. 17: 53-60.
- Stephanopoulos G., Nielsen J., Aristidou A. (1998). *Metabolic engineering. Principles and methodologies*. Academic Press, N. Y.
- Trinh P., Ruohonen L. (2008). Parameter estimation in metabolic flux balance models for batch fermentation—formulation and solution using differential variational inequalities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67:827-837.

Varma A., Palsson B. (1994). Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:3724-3731.

Vital L. (2004). Análisis de rutas y flujos metabólicos en la producción de ácido succínico utilizando el microorganismo *Actinobacillus succinogenes*. Tesis de maestría. Centro universitario de ciencias exactas e ingeniería, Universidad de Guadalajara.

Yoon J. J., Hattori T., Shimada M. (2002). A metabolic role of the glyoxylate and tricarboxylic cycles for development of the copper-tolerant brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*. *FEMS Microbiology Letters*. 217:9-14.

11. ANEXOS

Nomenclatura utilizada

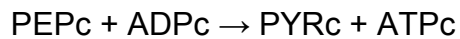
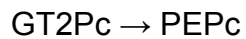
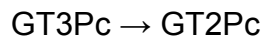
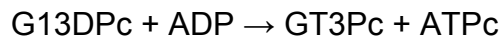
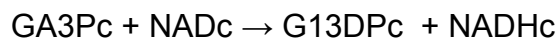
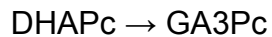
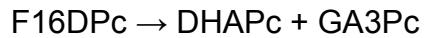
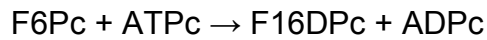
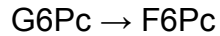
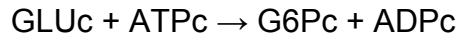
AAP	alfa aminoadipato
Ac	acetato
ADP	adenosin 5 difosfato
ATP	adenosin 5 trifosfato
AKG	alfacetoglutarato
ASP	aspartato
ACCOA	acetil coA
CIT	citrato
CHIT	quitina
CO2	dióxido de carbono
DPA	ácido dipicolínico
DHAP	dihidroxiacetona
E4P	eritrosa 4 fosfato
F6P	fructosa 6 fosfato
FUM	fumarato
F16DP	fructosa 1,6 difosfato
GU6P	gluconato 6 fosfato
GLX	glioxilato
GLU	glucosa
GLCN	glucano
GLUT	glutamato
G6P	glucosa 6 fosfato
GA3P	gliceraldehido 3 fosfato
G13DP	gliceraldehido 1,3 difosfato
GT3P	glicerato 3 fosfato
GT2P	glicerato 2 fosfato

ICIT	isocitrato
ILE	isoleucina
LYS	lisina
MAL	malato
NAD	nicotidamina adenin dinucleotido (oxidado)
NADH	nicotidamina adenin dinucleotido (reducido)
NADP	nicotidamina adenin dinucleotido fosfato (oxidado)
NADPH	nicotidamina adenin dinucleotido fosfato (reducido)
P	fósforo inorgánico
PEP	fofoenolpiruvato
PRPP	5-fosforibosilpirofosfato
PYR	piruvato
OA	oxaloacetato
OXA	ácido oxálico
RU5P	ribulosa 5 fosfato
R5P	ribosa 5 fosfato
SUCCCOA	succinilcoA
SUCC	succinato
SH7P	sedoheptulosa 7 fosfato
X5P	xilosa

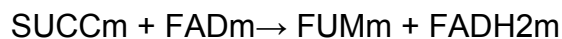
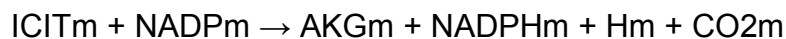
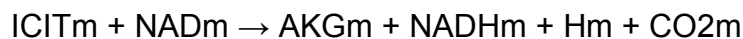
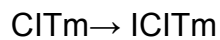
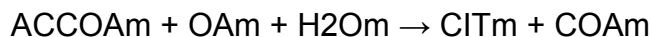
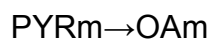
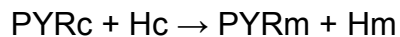
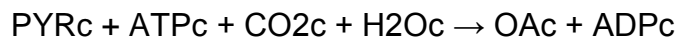
Las letras minúsculas m (mitocondria), p (peroxisoma) y c (citósol) indican el organelo de la célula en el que se encuentran.

Anexo 1

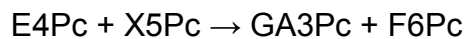
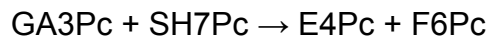
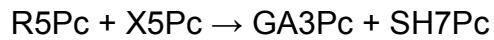
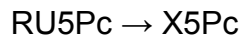
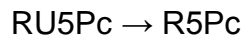
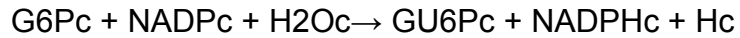
Glucólisis



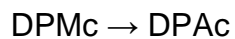
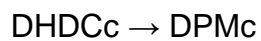
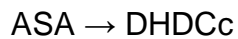
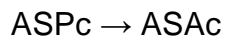
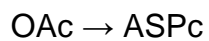
Ciclo de Krebs



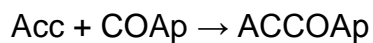
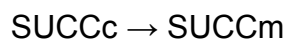
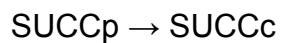
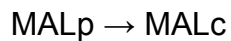
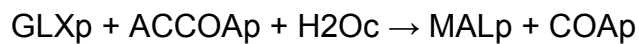
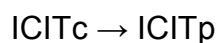
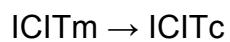
Ruta de las pentosas



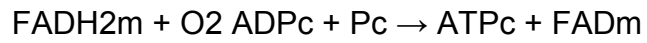
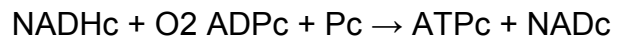
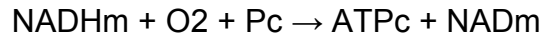
Producción de OXA y DPA



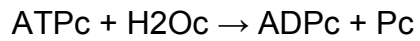
Ciclo del glioxilato



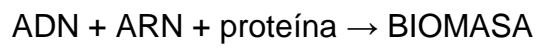
Fosforilación oxidativa



Energía de mantenimiento

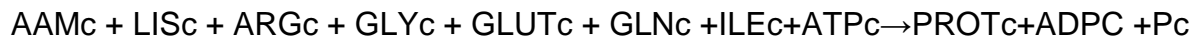
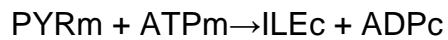
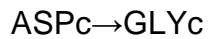
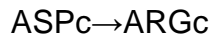
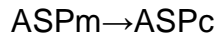
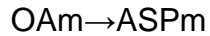
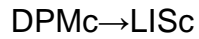


Producción de biomasa

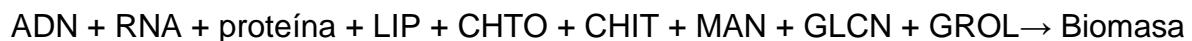
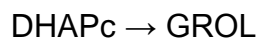
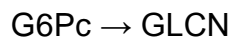
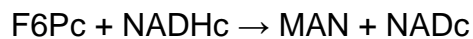
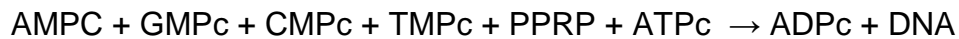
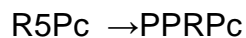
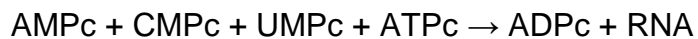
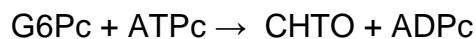


Anexo 2

Producción de proteínas



Producción de biomasa



Carboxilación del piruvato y fosfoenolpiruvato

