

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME

DE

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS DE CEPA COSTARRICENSE DE  
*CHLORELLA VULGARIS*: MODELO BASE PARA INGENIERÍA METABÓLICA  
DE ORGANISMOS AUTÓTROFOS

**HELLEN MELISSA RAMÍREZ ALVARADO**

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

CARTAGO, 2018

ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS DE CEPA COSTARRICENSE DE  
*CHLORELLA VULGARIS*: MODELO BASE PARA INGENIERÍA METABÓLICA  
DE ORGANISMOS AUTÓTROFOS

Hellen Melissa Ramírez Alvarado<sup>1</sup>

**RESUMEN**

*Chlorella vulgaris* es una microalga ampliamente utilizada tanto para investigación como en la industria, especialmente para la producción de suplementos alimenticios y biocombustibles. Para la aplicación de ingeniería genética sobre el metabolismo de un organismo con un objetivo en mente es necesario primero conocer los flujos y los pasos limitantes presentes en el metabolismo. Este proyecto tiene como objetivo desarrollar y evaluar un modelo base para la generación de mapas de flujos metabólicos de organismos autotróficos a partir de *C. vulgaris* mediante el análisis por INST-MFA de muestras de biomasa marcadas con <sup>13</sup>C. Este modelo permitiría conocer la utilidad práctica de la microalga y así determinar los objetivos de mejora mediante ingeniería metabólica que aumenten la producción del metabolito de interés. Se diseñó un modelo matemático que permitió realizar un primer cálculo de flujos, generándose un mapa simplificado de los flujos metabólicos de *C. vulgaris* que evidencia la preferencia del sistema hacia el mantenimiento del ciclo de Calvin Benson, además se encontró que la fosfofrutoquinasa se encuentra inactiva, cortando la glucólisis, pero el ciclo de Krebs se mantiene activo. El mapa no evidenció la producción activa de ácidos grasos o glutamato.

**Palabras clave**

*C. vulgaris*, INST-MFA, <sup>13</sup>C, GS-MS, metabolismo central.

ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS DE CEPA COSTARRICENSE DE  
*CHLORELLA VULGARIS*: MODELO BASE PARA INGENIERÍA METABÓLICA  
DE ORGANISMOS AUTÓTROFOS

**ABSTRACT**

*Chlorella vulgaris* is a widely used microalga, especially to produce food supplements and biofuels. For the application of genetic engineering on the metabolism of an organism with an objective in mind it is necessary to first know the flows and the present limiting steps. This project aims to develop and evaluate a base model for the generation of metabolic fluxes maps of autotrophic organisms from *C. vulgaris* through the analysis by INST-MFA of biomass samples labeled with  $^{13}\text{C}$ . This model would allow to know the practical utility of the microalga and thus determine the objectives of improvement through metabolic engineering that increase the production of the metabolite of interest. A mathematical model was designed that allowed us to perform a first calculation of flows, generating a simplified map of the metabolic flows of *C. vulgaris* that shows the preference of the system towards the maintenance of the Calvin Benson cycle, in addition it was found that the phosphofructokinase is inactive, cutting the glycolysis, but Krebs cycle remains active. The map did not show the active production of fatty acids or glutamate.

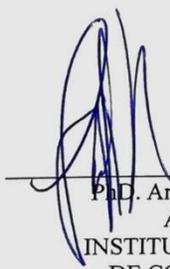
**Key words:**

*C. vulgaris*, INST-MFA,  $^{13}\text{C}$ , GS-MS, central metabolism.

ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS DE CEPA COSTARRICENSE DE  
*CHLORELLA VULGARIS*: MODELO BASE PARA INGENIERÍA METABÓLICA  
DE ORGANISMOS AUTÓTROFOS

Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal



---

Ph.D. Andrés Sánchez Kopper  
Asesor externo  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE COSTA RICA



---

M. Sc. Maritza Guerrero Barrantes  
Asesor interno  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE COSTA RICA



---

Ph.D. Fabián Villalta  
Lector  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

## **DEDICATORIA**

A Dios por no dejarme vencer ante los problemas.

A mi familia por apoyarme cada vez que quería renunciar ante la adversidad.

A mis amigos y compañeros de la universidad que a pesar del tiempo y la distancia siguen apoyándome.

A Eduardo por apoyarme y convencerme de salir de mi zona de comodidad y hacer este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento:

A mis padres y familia que me apoyaron incondicionalmente tanto en los buenos como en los malos momentos durante mi tiempo en la universidad.

A los asistentes del profesor Andrés: Ariadna, Carolina, Katherine, Sammy y Steven por todo su aporte técnico en el laboratorio y sus palabras de apoyo durante la realización del proyecto.

Al equipo de microalgas del Centro de Investigación en Biotecnología, en especial a la investigadora Francinie Murillo por toda su ayuda a lo largo del proyecto y al investigador Fabian por su colaboración durante la toma de muestras y como lector.

A la profesora Maritza quien no dudó ni un segundo el brindarme su apoyo en este proyecto como tutora.

Un especial agradecimiento al profe Andrés por su paciencia y todas sus explicaciones que me ayudaron a adquirir el conocimiento necesario para llevar a cabo este proyecto y por su tranquilidad en los momentos difíciles durante la realización el proyecto.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>DEDICATORIA</b> .....	4
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	5
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	6
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	9
<b>ABREVIATURAS</b> .....	12
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	15
A. Metabolómica.....	15
i. Ingeniería metabólica.....	15
ii. Herramientas de la ingeniería metabólica.....	18
iii. Estudio de los metabolismos centrales.....	19
iv. Análisis de flujos metabólicos.....	22
B. Metabolómica en microalgas.....	24
i. Microalgas.....	24
ii. Análisis metabólicos en microalgas.....	27
<b>I. OBJETIVOS</b> .....	30
A. Objetivo general.....	30
B. Objetivos específicos.....	30
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
a. Experimento de pulso con marcaje de carbono 13.....	30
b. Cuantificación y análisis de metabolitos.....	31
c. Generación de un modelo de flujos metabólicos no estacionarios.....	33
<b>III. RESULTADOS</b> .....	34
a. Experimento de pulso con marcaje de carbono 13.....	34
b. Cuantificación y análisis de metabolitos.....	36
c. Generación de un modelo de flujos metabólicos no estacionarios.....	40
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	45
a. Experimento de pulso con marcaje de carbono 13.....	45
b. Cuantificación y análisis de metabolitos.....	47

c. Generación de un modelo de flujos metabólicos no estacionarios. ....	48
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	51
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	52
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	52
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	58

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Monitoreo de la temperatura durante el proceso de tomado de muestra y lisiado de células de <i>C. vulgaris</i> .....	35
<b>Cuadro 2.</b> Tiempos de retención determinados para buscar los diferentes metabolitos en los cromatogramas de las muestras de biomasa .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica del proceso total para la producción de biocombustibles a partir de microalgas usando biología sintética. Fuente: Jagadevan et al., 2018. ....	16
<b>Figura 2.</b> Reacción general de siliación ocurrida durante la derivatización empleando compuestos como el BSTFA.....	19
<b>Figura 3.</b> Formación alternativa de la ruta de las pentosas. (a) Biosíntesis de nucleótidos. (b) Síntesis de NADPH. (c) Generación de energía. Fuente: Mathews et al., 2013.....	22
<b>Figura 4.</b> Cálculos realizados para determinar la abundancia corregida de los fragmentos detectados, empleando la abundancia natural reportada por Wu et al. (2015). ....	33
<b>Figura 5.</b> Cinética de crecimiento de células de <i>C. vulgaris</i> en biorreactor de tanque agitado marca Bioengieniering .....	35
<b>Figura 6.</b> Cromatograma que muestra los tiempos de retención resultantes del análisis de una mezcla de metabolitos .....	36
<b>Figura 7.</b> Abundancia de $^{13}\text{C}$ en los fragmentos (a) F6P C5-C6 357 y (b) F6P C4-C6 217 en las 10 muestras de biomasa de <i>C. vulgaris</i> . ....	37
<b>Figura 8.</b> Abundancia de $^{13}\text{C}$ en el fragmento G6P C5-C6 357 en las 10 muestras de biomasa de <i>C. vulgaris</i> . ....	38
<b>Figura 9.</b> Abundancia de $^{13}\text{C}$ en el fragmento PEP C1-C3 369 en las 10 muestras de biomasa de <i>C. vulgaris</i> . ....	39
<b>Figura 10.</b> Abundancia de $^{13}\text{C}$ en los fragmentos (a) AKG C1-C5 288, (b) MAL C1-C4 245, (c) FUM C1-C4 245 y (d) SUC C1-C4 247 en las 10 muestras de biomasa de <i>C. vulgaris</i> . ....	40
<b>Figura 11.</b> Simulación del flujo metabólico para PEP 369, los puntos corresponden a los valores experimentales mientras las líneas indican la predicción calculada por la simulación del modelo. ....	41
<b>Figura 12.</b> Simulación del flujo metabólico para (a) G6P y (b) F6P en donde se observa que el modelo no corresponde con los datos experimentales. ....	42
<b>Figura 13.</b> Simulación para F6P en donde se observa que el modelo no tomó en consideración la presencia de M+3 correspondiente a los puntos experimentales en color rojo. ....	42
<b>Figura 14.</b> Simulación y abundancia de carbono trece para (a.1 y a.2) PYR 158 y (b.1 y b.2) PYR 174 en donde se observa que el modelo no determinó aumento en la abundancia de M+1 y M+2 comparado con la gráfica para los datos experimentales de abundancia. ....	43
<b>Figura 15.</b> Simulación para AKG 288 en donde se observa la disonancia entre los valores experimentales que implican absorción de $^{13}\text{C}$ y la abundancia determinada por el modelo.....	43
<b>Figura 16.</b> Simulación para (a) SUC 247, (b) FUM 245, (c) MAL 245 y (d) MAL 335 en donde se observa la disonancia entre los valores experimentales, la predicción del modelo y la omisión de M+3. ....	44
<b>Figura 17.</b> Simulación para GLU 363 y SER 204 con sus respectivos gráficos de abundancia de $^{13}\text{C}$ . ....	44

**Figura 18.** Mapa simplificado de flujos metabólicos para *C. vulgaris* bajo condiciones autótrofas..... 45

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Procedimiento para la preparación del medio de cultivo F2 .....	58
<b>Anexo 2.</b> Condiciones de la corrida para GS-MS .....	61
<b>Anexo 3.</b> Fragmentos de metabolitos detectados por medio de CG-MS con su respectiva masa iónica, masa y la abundancia natural de sus isotopómeros.....	61
<b>Anexo 4.</b> Conteo celular de <i>C. vulgares</i> en biorreactor de tanque agitado .....	63
<b>Anexo 5.</b> Tiempos de retención detectados en los estándares para los metabolitos G6P, F6P, PEP, PYR, AKG, SUC, FUM y MAL .....	63
<b>Anexo 6.</b> Espectros para las muestras T1 y T10 de los metabolitos analizados .....	66
<b>Anexo 7.</b> Datos de abundancia empleados en el software INCA para el diseño del modelo de flujos metabólicos.....	71
<b>Anexo 8.</b> Absorción de $^{13}\text{C}$ a través del tiempo para los fragmentos de los metabolitos analizados .....	75
<b>Anexo 9.</b> Reacciones empleadas en el modelo de flujos metabólicos.....	78

## ABREVIATURAS

<sup>13</sup>C: Isótopo estable de carbono

MS: espectrometría de masas

GC: cromatografía de gases

GC-MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas/  
espectrometría de masas

BSTFA: N,O-Bis (Trimetilsilil) Trifluoroacetamida

INST-MFA: siglas en inglés para Isotopically Nonstationary Metabolic Flux Analysis,  
Análisis De Flujos Metabólicos de Isótopos No Estacionarios.

INCA: siglas en inglés para Isotopomer Network Compartmental Analysis, Análisis  
Compartmental De La Red de Isotopómeros

6PG: Ácido 6-fosfogluconico

G6P: Glucosa-6-fosfato

F6P: Fructosa-6-fosfato

PEP: Ácido fosfoenolpiruvato

PYR: Ácido pirúvico o Piruvato

AKG: Ácido  $\alpha$ -cetoglutárico

SUC: Ácido succínico o Succinato

FUM: Ácido fumárico o Fumarato

MAL: Ácido Málico o Malato

LAC: Ácido láctico o Lactato

SER: Serina

ASP: Asparagina

GLU: Glutamato

G3P: gliceraldehído-3-fosfato

## I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son de gran interés en la comunidad científica debido a sus características. Estas son pequeños microorganismos que presentan cierta variedad morfológica entre especies, pero que cuentan con características compartidas: habitan en aguas marinas y dulces, son pertenecientes al género protista, eucariotas, unicelulares y fotosintéticos (Venkatesan, Manivasagan y Kim, 2015).

Las microalgas presentan características que les confiere una ventaja productiva sobre otros organismos popularmente utilizados como lo son *E. Coli*, levaduras, y células de mamíferos, son capaces de crecer bajo condiciones autótrofas, heterótrofas y mixotróficas (Liang *et al.*, 2015). Estos organismos presentan ciertas ventajas prácticas, entre ellas se encuentran su capacidad para crecer en aguas residuales ya que no necesitan medios de cultivo complejos por lo que salen a bajo costo y, además, su capacidad de mantener altas densidades de crecimiento incluso en condiciones de toxicidad (Wang *et al.*, 2018).

Liang *et al.* (2015) comenta que a inicios de 1950 se utilizaban los primeros cultivos mixtos de algas para tratar aguas residuales, además, en este mismo tiempo salen a la luz los primeros interesados en investigar el uso de microalgas como fuente de proteína, para 1960 en Japón comercializaba cultivos a gran escala de *Chlorella*. Para el 2005 Liang *et al.* identifica un aumento en el interés investigativo de las microalgas debido a la necesidad de nuevas soluciones para disminuir los efectos del cambio climático y cumplir con las necesidades de energía.

En la actualidad se sabe que las microalgas son capaces de producir una amplia variedad de sustancias como “proteínas, carbohidratos, lípidos y nutrientes incluyendo vitaminas, antioxidantes...” (Yaakob *et al.*, 2014). Zainan *et al.* (2018) indica tres grandes usos que se les puede dar a estos microorganismos, el primero hace referencia a la posibilidad de emplear los metabolitos producidos como suplementos alimenticios, segundo, la disminución de gases de efecto invernadero debido a su capacidad de

capturar CO<sub>2</sub> del medio ambiente y, por último, la producción de metabolitos como lípidos que pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles.

Sacristán-de Alva (2014) también menciona que las microalgas pueden intervenir en la solución de problemas como la eutrofización y la ecotoxicidad. Además las microalgas pueden ser cultivadas en medios de cultivo con aguas residuales, Wang *et al.* (2018) indica que *Chlorella vulgaris* es especialmente útil dada su alta tolerancia a compuestos tóxicos y sus habilidades para remover contaminantes del agua.

Las ventajas metabólicas que ofrecen las microalgas han despertado el interés de los científicos en áreas como la ingeniería metabólica y la ingeniería genética. Con estas dos ingenierías se vuelven casi infinitas las posibilidades de modificar objetivamente el metabolismo de un organismo. En términos generales todas las especies de microalgas presentan los mismos ciclos metabólicos, pero a un nivel intrínseco cada especie presenta características propias con respecto de los flujos metabólicos e incluso reaccionan diferente a estímulos externos.

Un estudio avanzado de la metabolómica daría como resultado: la detección de los pasos limitantes y las variables que afectan estos puntos dentro del sistema, la reacción bioquímica, el tiempo de reacción, necesidades energéticas de la reacción, las enzimas involucradas y los genes que codifican esas enzimas. Con esta información es posible aplicar ingeniería genética para modificar el código genético de tal manera que se redirija la producción hacia un objetivo específico (García, Hamedi y Zhao, 2016).

Para los metabolismos centrales ya se tiene bastante información de las reacciones bioquímicas y existen programas computacionales que realizan los balances estequiométricos a partir de concentraciones conocidas (Cheah y Young, 2018), para avanzar un paso dentro de este esquema de conocimientos necesarios se deben emplear herramientas de la ingeniería genética para medir las concentraciones en una parte definida de la red metabólica y determinar las características intrínsecas de cada especie para así poder compararlas y determinar utilidades productivas y posibles mejoras con ingeniería genética.

El presente trabajo tiene como objetivo contribuir a implementar una metodología base para evaluar el potencial productivo de otras microalgas y posibles objetivos de mejora en la productividad mediante ingeniería metabólica a partir de la medición de flujos metabólicos no estacionarios para una cepa costarricense de *Chlorella vulgaris* por medio del marcaje de metabolitos con  $^{13}\text{C}$  mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## II. MARCO TEÓRICO

### A. Metabolómica

#### i. Ingeniería metabólica

Van Dien (2016) indica que desde 1996 la ingeniería metabólica ha emergido como un campo que se enfoca en estudiar a fondo las rutas metabólicas principalmente debido al interés por manipular las redes metabólicas. Según Van Dien una definición superficial para ingeniería metabólica vendría siendo la manipulación de organismos para lograr obtener un metabolito específico, mientras que para Fernández, Dustet, y Chico (2012) sería:

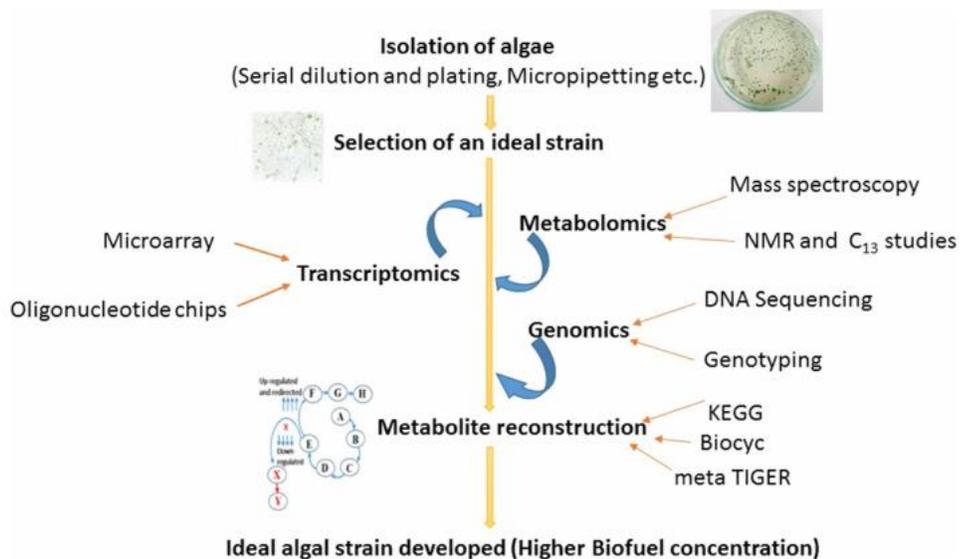
[...] la rama de las ciencias biológicas que se encarga del estudio y la evaluación de los cambios que se producen de forma dirigida en el metabolismo. Entre los objetivos que persigue esta metodología integradora está lograr el incremento del rendimiento del producto de interés hasta valores cercanos al máximo teórico.

Es decir, la ingeniería metabólica se encarga de emplear herramientas ingenieriles para obtener beneficios deseados a través de los conocimientos generados en el campo de la metabolómica con respecto de las entidades químicas que denominamos metabolitos. La capacidad para modificar los flujos metabólicos se debe especialmente a la implementación de la manipulación genética que permite realizar una alteración dirigida por medio de procesos como la mutagénesis para modificar las enzimas que

participan en los procesos de catálisis necesarios para la producción del metabolito (Van Dien, 2012).

La diferencia de la ingeniería metabólica con respecto de otras áreas se basa en que dicha ingeniería se dirige hacia la colaboración para el diseño de diversas herramientas computacionales basados en la teoría biológica y modelos matemáticos que facilitan el estudio de los flujos metabólicos. Una vez identificada la ruta metabólica con un metabolito específico como objetivo es posible analizar los controles que se dan a lo largo de la ruta para poder optimizar el proceso con ayuda de otros conocimientos como la genómica, la proteómica y la ingeniería genética para poder sobre expresar el metabolito deseado (Van Dien, 2016 y García, Hamedí y Zhao, 2016).

La ingeniería metabólica recientemente ha sido implementada para la producción de compuestos no naturales antes solo obtenidos por medio de procesos petroquímicos (Van Dien, 2016), en los últimos años debido al agotamiento de los combustibles fósiles ha habido un auge en el desarrollo de biocombustibles. Como se observa en la figura 1 se requiere de una serie de pasos que permiten la obtención de conocimientos necesarios para llegar a desarrollar un producto completo. Para que la ingeniería



**Figura 1.** Representación gráfica del proceso total para la producción de biocombustibles a partir de microalgas usando biología sintética. Fuente: Jagadevan *et al.*, 2018.

metabólica sea capaz de tener los conocimientos necesarios para realizar los cambios que mejoren a gusto las rutas metabólicas es necesario que primero se estudien las ciencias “-ómicas”.

Las “-ómicas” son las ciencias encargadas de estudiar cierto grupo de moléculas específicas involucradas en el funcionamiento de los organismos. Existen varias y entre ellas se encuentran: la genómica que estudia los genes, la transcriptómica que estudia los transcritos (ARN mensajeros), la proteómica que estudia las proteínas, la metabolómica que estudia los metabolitos (Frigolet y Gutiérrez, 2017) y recientemente se ha estudiado la fluxómica que mide la velocidad de producción de los metabolitos (Foguett y Cascante, 2015).

El profesor Yanes (2015) resalta la multidisciplinariedad presente en el estudio de la metabolómica ya que los metabolitos no responden a instrucciones codificadas en el ADN como lo son los genes y las proteínas, sino que son entidades químicas, “moléculas que participan como sustratos, intermediarios o productos en las reacciones químicas del metabolismo” (Frigolet y Gutiérrez, 2017) y que a su vez cada una de estas presenta sus propias características en cuanto polaridad, peso molecular, estabilidad y reactividad química por mencionar algunas; la diferencia entre cada metabolito hace necesario que para su estudio se conforme un grupo de trabajo multidisciplinario conformado principalmente por biólogos, químicos, bioinformáticos, bioestadísticos, entre otros (Frigolet y Gutiérrez, 2017).

Frigolet y Gutiérrez (2017) mencionan que para poder estudiar uno solo de estos metabolitos es necesario unir diferentes áreas de conocimiento, pero las áreas van incluso más allá de las ciencias naturales ya que requieren de la ayuda de electrónicos y programadores debido a que para el análisis de estas moléculas es necesario el desarrollo de equipos tecnológicos capaces de cumplir con estos objetos, actualmente Yanes (2015) menciona que la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS) son muy populares, “esta última casi siempre acoplada a técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida (LC-MS), la cromatografía

de gases (GC-MS), o en menor medida la electroforesis capilar (CE-MS)” (Yanes, 2015).

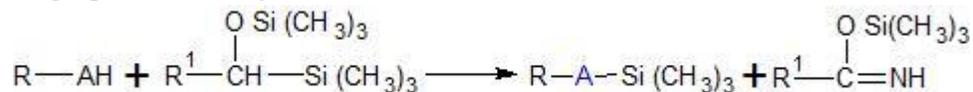
## ii. Herramientas de la ingeniería metabólica

GC-MS es de las más empleadas debido a su alta reproducibilidad, pero según Yanes (2015) presenta la desventaja de que solo aplica para compuestos volátiles y térmicamente estables, los metabolitos presentes en muestras orgánicas tienden a ser de características polares no volátiles por lo que es necesario hacer uso de reacciones químicas para adaptar las moléculas para que sean detectables en un GC-MS. La derivatización es un proceso químico que emplea moléculas como N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) o N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) para modificar compuestos y que resulten en nuevos productos que se adaptan a las propiedades necesarias para su uso en cromatografías (Acket *et al.*, 2017).

La derivatización es aplicada cuando se tiene un compuesto cuyas características no son compatibles con los requerimientos para utilizar la técnica de cromatografía de gases, por lo que es necesario provocar una reacción química que va a generar un compuesto no polar volatilizable. Para lograr este efecto existen diferentes reacciones químicas que se pueden dar para obtener los resultados deseados, entre ellos se encuentran la siliación, afiliación, alquilación y esterificación (Schummer, Delhomme, Appenzeller, Wennig, y Millet, 2009 y Saldívar, 2005 ).

Al emplear agentes como el BSTFA se va a producir una siliación, es decir, una reacción de sustitución nucleofílica, en donde el compuesto reacciona con el BSTFA y se produce un derivado del silano ya que tiene un potente donante de trimetilsililo que reemplaza los grupos  $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $=NH$ ,  $-NH_2$  o  $-SH$  (Saldívar, 2005 y Fonseca, 2017). En la figura 2 se observa el proceso de derivatización al usar BSTFA, Saldívar (2018) comenta que entre las características de la reacción de siliación es “la habilidad

de estabilizar una carga negativa en un estado transitorio, y un poco o ningún enlace  $\pi$  entre el grupo funcional y el átomo de silicio”.



**Figura 2.** Reacción general de siliación ocurrida durante la derivatización empleando compuestos como el BSTFA

Una vez analizados los metabolitos derivatizados por medio de GC-MS es posible determinar cierta información acerca del metabolismo de un organismo, obtener datos acerca de los flujos metabólicos significa identificar una pequeña parte de una serie de reacciones químicas catalizadas por una enzima específica. Con los conocimientos actuales, se han estudiado pequeños segmentos de los flujos metabólicos debido a que el metabolismo no es un flujo lineal, más bien, es una compleja red con nodos que pueden interrelacionarse unos con otros de diferentes maneras, por lo que actualmente se estudian segmentos para en un futuro relacionarlos unos con otros y aumentar el conocimiento sobre la red total.

### iii. Estudio de los metabolismos centrales

Cuando se inicia una investigación de flujos metabólicos se busca estudiar los metabolitos centrales los cuales han sido denominados de esta manera porque ocupan posiciones que conectan una zona de la red metabólica con otra; Guimerà y Sales (2015) utilizan la glucosa para identificar un metabolito central, estudios han demostrado que esta azúcar funciona como un cuello de botella que puede alterar los flujos metabólicos, es decir, la glucosa se ha convertido en un identificable punto de control sistémico del metabolismo.

La glucosa es identificable como parte principal del glicólisis, pero a su vez existen otros metabolismos centrales, que igualmente poseen metabolitos centrales que actúan como cuello de botella, que pueden identificarse fácilmente como lo son el ciclo de Calvin-Benson, el ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato.

En organismos autótrofos el ciclo de Calvin-Benson es uno de los más estudiados debido a la fijación de CO<sub>2</sub> que se da gracias a la presencia de los cloroplastos ya que en el estroma se llevan a cabo 13 reacciones catalizadas por 11 enzimas diferentes y se dividen en tres fases (Niizawa, 2014):

1. Fase de carboxilación: la enzima RuBisCo adiciona una molécula de CO<sub>2</sub> a una molécula ribulosa bis-fosfato o RuBP y seguidamente se divide en dos moléculas de 3-fosfoglicerato.
2. Fase de reducción: el 3-fosfoglicerato emplea una molécula de ATP para fosforilarse en 1,3-bis-fosfoglicerato, seguidamente es reducido a glicerato-3-fosfato por medio de un NADPH. En este punto se necesitan tres moléculas de CO<sub>2</sub> para que se formen seis moléculas de gliceraldehído-3-fosfato y una pueda seguir a la ruta de formación de glucosa y las otras cinco regeneren la molécula de RuBP.
3. Fase de regeneración: el gliceraldehído-3-fosfato sufre una serie de transformaciones para convertirse nuevamente en RuBP e iniciar un nuevo ciclo.

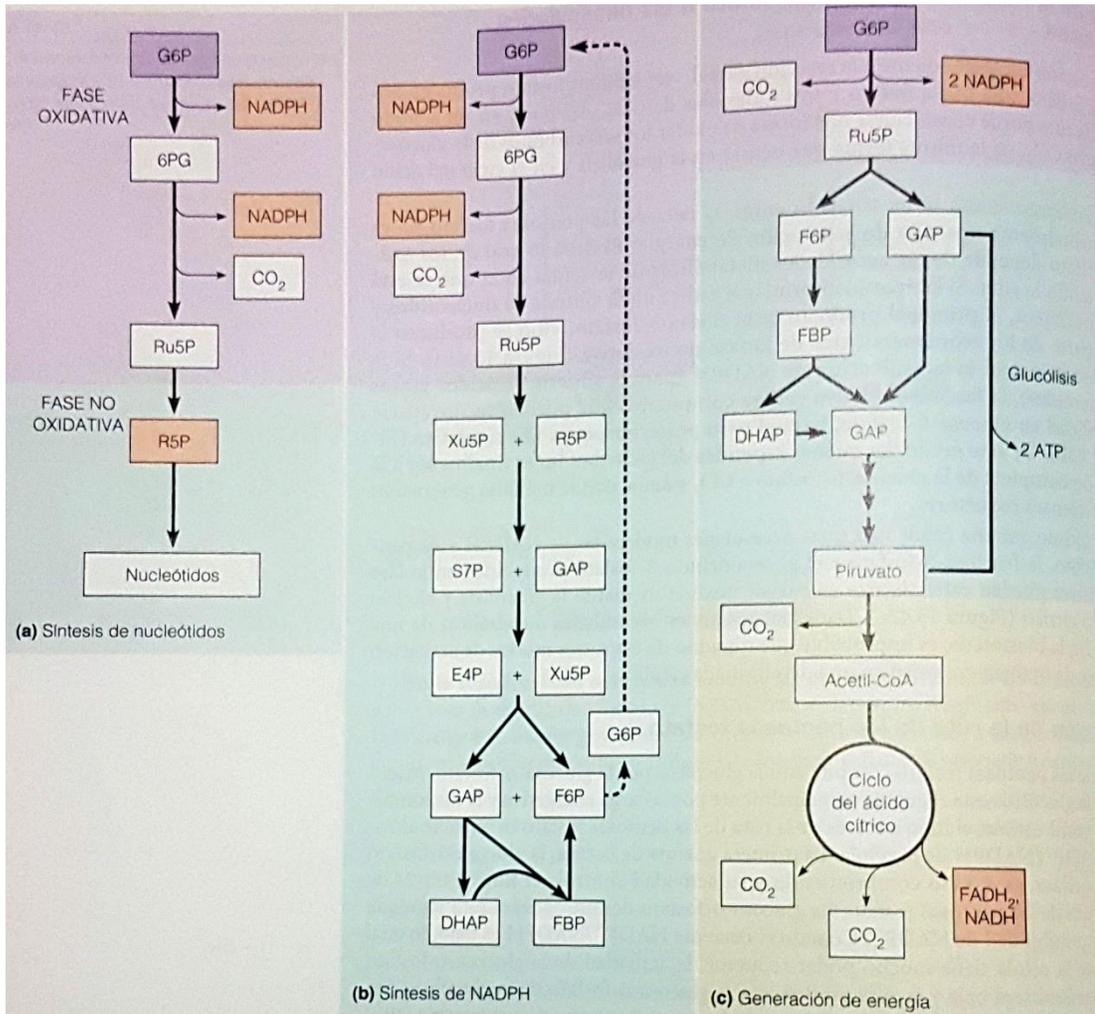
Una vez formada la glucosa esta participa en la glucólisis, la ruta más conocida es la vía de Embden-Meyerhoff quienes originalmente describieron una ruta conformada por una serie de 10 reacciones químicas que transforman glucosa en dos moléculas de piruvato, suele darse a nivel de citosol, pero algunas de sus reacciones forman parte del ciclo de Calvin que se da a nivel de cloroplastos (Feduchi, Blasco, Romero y Yáñez, 2010).

La glucólisis se divide en dos fases: la fase preparativa y la fase de rendimiento energético; la fase preparativa se da cuando la glucosa pasa a gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato por medio del gasto energético de dos moléculas de ATP; la fase de rendimiento energético ocurre cuando el gliceraldehído-3-fosfato se transforma en piruvato generando dos moléculas de ATP y dos de NADH + H<sup>+</sup> (Feduchi, Blasco, Romero y Yáñez, 2010).

Una vez formado el piruvato este debe sufrir una transformación para convertirse en Acetil-CoA y dar inicio al ciclo de Krebs. La primera etapa, la transformación del piruvato, se da por la catalización del complejo piruvato deshidrogenasa que lleva a cabo una descarboxilación oxidativa para formar acetil-coenzima A. El ciclo de Krebs está conformado por ocho pasos (Mathews *et al.*, 2013):

1. El proceso inicia con la unión entre el acetil-CoA y el oxalacetato para formar el citrato por medio de una citrato sintasa.
2. Formado el citrato una aconitasa va a transformarlo en isocitrato con un intermediario de *cis*-aconitato.
3. Una isocitrato deshidrogenasa va a transformar el isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato.
4. El complejo de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa va a transformar el  $\alpha$ -cetoglutarato en succinil-CoA
5. La succinil-CoA deshidrogenasa va a remover el CoA para formar succinato.
6. Una succinato deshidrogenasa va a transformar el succinato en fumarato.
7. La fumarasa va a transformar fumarato en malato
8. Por último, la malato deshidrogenasa va a transformar el malato en oxalacetato y vuelve a iniciar el ciclo.

La vía de las pentosas fosfato, a diferencia de las anteriores, tiene funciones anabólicas y se da explícitamente en el citosol. Tiene dos funciones principales, proporcionar NADPH para la biosíntesis reductora y proporcionar ribosa-5-fosfato para la biosíntesis de nucleótidos; la tendencia a la cual se dirige va a depender de las diferentes necesidades metabólicas del organismo. Esta vía puede dividirse en dos fases, la fase oxidativa y la fase no oxidativa. Durante la fase oxidativa la glucosa-6-fosfato se oxida irreversiblemente en ribulosa-5-fosfato produciendo NADPH, mientras que en la fase no oxidativa puede generar diferentes metabolitos (Mathews *et al.*, 2013). Como se observa en la figura 3 durante la fase no oxidativa la vía de las pentosas puede tomar diferentes caminos.



**Figura 3.** Formación alternativa de la ruta de las pentosas. (a) Biosíntesis de nucleótidos. (b) Síntesis de NADPH. (c) Generación de energía. Fuente: *Mathews et al.*, 2013

#### iv. Análisis de flujos metabólicos

Para poder recabar información acerca de estos flujos metabólicos es necesario emplear alguna herramienta que permita darle seguimiento a los metabolitos durante el movimiento dentro de la red, una técnica bastante popularizada es la modelización de flujos metabólicos por medio de experimentos de marcaje con  $^{13}\text{C}$ , estos experimentos van a depender si se emplearán modelos isotópicos estacionarios o no estacionario.

El modelo de flujos metabólicos se basa en la teoría de que existe un estado estacionario tanto en el metabolismo (es decir, las concentraciones de los metabolitos no cambian con el tiempo) como en los isótopos presentes (las distribuciones de isotopómeros no cambian con el tiempo) (Cheah y Young, 2018). En los modelos de flujos metabólicos estacionarios se alimenta a las células con sustratos marcados con el isótopo estable  $^{13}\text{C}$  y a un tiempo determinado se realizan las lecturas del movimiento del carbono dentro de la red metabólica que después son analizadas por medio del cálculo de ecuaciones de equilibrio de isotopómeros (Dai y Locasale, 2017).

En contraposición, el modelo de flujos metabólicos no estacionarios (Isotopically Nonstationary Metabolic Flux Analysis o INST-MFA) emplea la misma técnica con  $^{13}\text{C}$ , pero hace lecturas de muestras a tiempos diferentes que permiten ver el avance de la incorporación de  $^{13}\text{C}$  a través del metabolismo; esta técnica tiene la ventaja de que puede ser empleados en sistemas autótrofos, además, es ideal para sistemas lentos debido a la presencia de muchos intermediarios o cuellos de botella, y, tiene una mayor sensibilidad de medición para estimar los flujos reversibles y la presencia de intermediarios en el sistema que permite potencialmente unir metabólica con fluxómica.

Los modelos INST-MFA tiene la desventaja de necesitar softwares con modelos matemáticos capaces de analizar los datos obtenidos de los experimentos (Cheah y Young, 2018), esto se debe a que se basan en ecuaciones diferenciales ordinarias las cuales van a describir cómo cambian las distribuciones de isotopómeros con el tiempo para simular el perfil isotópico dinámico (Dai y Locasale, 2017), la teoría detrás de este proceso se basa en los modelos estequiométricos, basándose en la premisa de que el sistema mantiene en un estado estacionario es posible calcular el balance del sistema si se conoce concentraciones de metabolitos clave en el flujo (Foguet y Cascante, 2015).

Debido a la complejidad computacional se han creado dos populares softwares dentro del ambiente computacional de Matlab llamados OpenMebius e INST-MFA:INCA.

Estos programas son capaces de analizar datos obtenidos a partir de GC-MS o LC-MS/MS y, presentan la característica de generar automáticamente balances de metabolitos e isotopómeros a partir de reacciones y transiciones de átomos definidas (Cheah y Young, 2018).

## B. Metabolómica en microalgas

### i. Microalgas

Las algas son un grupo heterogéneo de organismos donde se encuentran microorganismos en todos los colores, formas y tamaños debido a que son un grupo polifilético, es decir, no comparten un ancestro en común y cuentan con diferentes e independientes líneas evolutivas, pero comparten ciertas características en común. La principal característica que define a las algas es su capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica (Barsanti y Gualtieri, 2014) aunque existen algunas excepciones (Graham, Graham y Wilcox, 2009).

Barsanti y Gualtieri (2014) indican que las microalgas se pueden clasificar en: Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta, Charophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Cercozoa (Chlorarachniophyceae), Myzozoa (Dinophyceae) y Eyglenozoa (Euglenophyceae). Todavía existe un poco de controversia con respecto de los organismos que forman parte de las algas, especialmente en relación con las cianobacterias.

Las cianobacterias tienen en común su capacidad fotosintética, pero su mayor diferencia es que las microalgas son eucariotas mientras que las cianobacterias son procariotas, por lo tanto, no cuentan con cloroplastos, su capacidad fotosintética es gracias a que en el sistema de antenas recolectoras de luz, las cianobacterias “ensamblan ficobilisomas, grandes complejos de proteínas hidrofílicas asociadas a la membrana” (Wilde y Hihara, 2016, p. 297) en lugar de emplear cloroplastos con clorofila.

Otra característica que las identifica es el hábitat donde viven, Graham, Graham y Wilcox (2009) indican que generalmente se encuentran en medios acuáticos tanto de agua dulce como salada, pero algunos de estos organismos han desarrollado características que les permite existir en hábitats terrestres, pero permanecen en estado de dormancia hasta que se encuentren en un lugar con suficiente humedad; las algas también pueden unirse en simbiosis con otros organismos, un ejemplo de simbiosis es la unión entre un alga y una bacteria que se le define como un liquen (Barsanti y Gualtieri, 2014).

A pesar de que mayoritariamente las algas por su capacidad fotosintética son capaces de generar sus propios carbohidratos y adenosín trifosfato, hay algas que emplean otras estrategias para adquirir los nutrientes que necesitan y se pueden clasificar en (Barsanti y Gualtieri, 2014):

- I. Algas obligatoriamente heterótrofas: Obtienen carbohidratos de fuentes externas ya sea mediante ósmosis o fagocitando otros microorganismos como bacterias, en caso de escasez de nutrientes pueden sustentarse a sí mismas mediante la fotosíntesis.
- II. Algas obligatoriamente fotótrofas: Su nutrición depende principalmente de la fotosíntesis, pero si hay limitada luz puede sobrevivir fagocitando o adquiriendo nutrientes mediante osmosis.
- III. Algas mixotróficas facultativas: Pueden vivir bien tanto heterótrofa como autótrofamente.
- IV. Algas mixotróficas obligadas: Se nutren de la fotosíntesis, pero necesita nutrientes que solo adquiere por medio de osmosis o fagocitando otros microorganismos.

Existen diferentes métodos de reproducción entre las algas según la especie. Pueden reproducirse de diversas formas dentro de las categorías de reproducción vegetativa, asexual y sexual (Barsanti y Gualtieri, 2014).

Entre las algas se pueden encontrar diversas características morfológicas y citológicas. En primera instancia se pueden encontrar como células individuales, móviles o no, pero también pueden unirse imprecisa u organizadamente para formar una colonia, dentro de la colonia pueden sobrevivir individualmente porque no hay división de labores, así como puede ser lo contrario y pueden tener capacidades móviles o no. También se pueden encontrar como filamentos en donde las células se dividen y forman largos filamentos mientras permanecen unidas, sifonal cuando una célula cenocítica tiene secciones de ramificación y, por último, parenquimatoso sucede cuando hay un punto meristemático y la división celular se da en tres dimensiones. Existen otras morfologías que se dividen de las mencionadas anteriormente (Barsanti y Gualtieri, 2014).

*Chlorella vulgaris* es una microalga perteneciente al reino protista, división Chlorophyta, clase Trebouxiophyceae, género *Chlorella*, especie *C. vulgaris*. Barsanti y Gualtieri (2014) comentan que la división Chlorophyta está caracterizada por presentar organismos que habitan todo tipo de ambientes, hay un amplio rango de diferencias morfológicas que van desde microalgas con o sin flagelos y diferentes tipos de organización (unicelular, colonial, filamentosos, sifonal y parenquimatoso), además presentan clorofila  $\alpha$  y  $\beta$ , sin ficobilisomas, carotenoides  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -caroteno, las principales xantofilas son luteína y prasinoxantina, su principal producto de almacenamiento es el almidón ( $\alpha$ -1,4-glucano) y los cloroplastos están rodeados por una envoltura de dos membranas y los tilacoides se agrupan formando granas. Se divide en varias clases y entre ellas se destacan: Ulvophyceae, Trebouxiophyceae y Chlorophyceae.

*C. vulgaris* es un alga verde unicelular de forma cocoide no móvil (Barsanti y Gualtieri, 2014), “contiene un plasto parietal voluminoso provisto de un pirenoide” (Abbeyes y Bitschin, 1989) y se reproduce por medio de autoesporas (Barsanti y Gualtieri, 2014), estas se producen cuando la célula alcanza la madurez y el núcleo se divide en 4, 8 o 16 para formar las nuevas células hijas que se liberan de la ruptura por dehiscencia de la pared celular de la célula original (Abbeyes y Bitschin, 1989).

## ii. Análisis metabolómicos en microalgas

Pérez *et al.* (2011) realizaron una revisión de los cultivos heterotróficos empleados para cultivar microalgas, esta técnica se aprovecha de las microalgas capaces de cambiar su funcionamiento autótrofo por uno capaz de utilizar los nutrientes en su medio de cultivo, al momento de realizar dicha revisión los cultivos heterótrofos eran mucho más baratas, más simples de construir, y más fáciles para mantener a gran escala en comparación con los cultivos autótrofos, pero resaltan la necesidad de crear mejoras por medio de la genómica, la bioinformática, la genética y la ingeniería metabólica para encontrar un balance en los costos de producción a larga escala para obtener un producto a partir de microalgas.

Lü, Sheahan, y Fu en el 2011 realizaron un resumen de las técnicas hasta ese momento empleadas para aplicar procesos ingenieriles en la obtención de biocombustibles de cuarta generación en microalgas, sus investigaciones revelan que las microalgas *C. reinhardtii* y *C. vulgaris* han sido ampliamente investigadas, incluso para *C. reinhardtii* se cuenta con el mapeo del ADN del cloroplasto por lo que se han realizado estudios de transformación genética en su genoma. Utilizando *C. vulgaris* fue posible desarrollar el método PEG para expresar una proteína heteróloga recombinante, una hormona del crecimiento humano (hGH). En otro laboratorio se descubrió que cuando *C. reinhardtii* absorbe gran cantidad de luz puede provocar una fotoinhibición, por lo que hicieron pequeñas modificaciones para obtener células con complejos de antenas recolectoras de luz truncados, pero capaces de una mayor transmitancia de la luz y una mejor utilización de la luz solar.

Boyle y Morgan (2009) reconstruyeron la red metabolómica de *C. reinhardtii* que tomando en cuenta tres compartimentos metabólicamente activos, consistía en 484 reacciones metabólicas y 4458 metabolitos intracelulares, con la obtención de este mapa fueron capaces de estimar las distribuciones de flujo metabólico intracelular bajo condiciones de crecimiento autotróficas, heterótrofas y mixotróficas, además anotaron

una nueva enzima en la base de datos, pero encontraron que algunas otras estaban faltando.

Boyle, Sengupta y Morgan en el 2017 continuaron las investigaciones en *C. reinhardtii*, mediante un análisis empleando  $^{13}\text{C}$  y determinaron la ruta metabólica de los metabolitos primarios bajo crecimiento heterotrófico, en esta investigación lograron conseguir resultados un poco más específicos al descubrir que el acetato se liga a la coenzima A tanto en el citosol como en la mitocondria y el plástido, hay dos citrato sintasas que posiblemente estén involucradas con el acetyl-CoA, el acetyl-CoA sintetizado en el plastidio se dirige directamente a la síntesis de ácidos grasos y por último la mayoría del flujo de malato se desvía a al citosol y al plástido y se convierte en oxalacetato a pesar de tener un ciclo de Krebs en la mitocondria.

En el 2010 Xiong *et al.* hicieron los primeros estudios empleando  $^{13}\text{C}$  para el estudio de los flujos metabólicos isotópicos estacionarios en *C. protothecoides* en condiciones heterotróficas, microalga particularmente investigada por su acumulación de triacilglicerol neutros. En sus investigaciones emplearon el método de cromatografía de gas acoplado a espectrometría de masas para seguir el movimiento del carbono dentro del flujo metabólico, para este momento no se había aplicado el método GC-MS para investigar el metabolismo de las microalgas.

Sus datos dieron como resultado la presencia de rutas metabólicas para la glicolisis, la pentosa fosfato y el ciclo del triacilglicerol, además de evidencia de la presencia de fosfoenolpiruvato, carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y actividad de la enzima málica (Xiong *et al.*, 2010).

En el 2015 Wu *et al.* continuaron las investigaciones y realizaron un proceso similar al de Boyle y Morgan al reconstruir la red metabólica compartimentalizada para *C. protothecoides* con un total de 272 reacciones metabólicas, 270 enzimas y 461 genes, con esta información simulaban el crecimiento en diferentes condiciones. Primero basándose en la función de los genes conocidos para la microalga montaron un modelo de flujo metabólico tanto autotrófico como heterotrófico, seguidamente lo compararon

con resultados experimentales del marcaje con  $^{13}\text{C}$  en un modelo isotópico no estacionario y resultados obtenidos de un análisis de balance de flujos metabólicos. Sus resultados demostraron que hay ciertas diferencias en la concentración de algunos metabolitos entre células sugiriendo que hay diferentes propiedades para los crecimientos autótrofos y heterótrofos.

Chen *et al.* (2017) comentan que muchas de las rutas metabólicas de las microalgas se ven influenciadas por los cambios en el medio ambiente, especialmente indica que se ha notado en la práctica que las microalgas ante una deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo tienden a aumentar la biosíntesis de lípidos, es decir, hay una correlación entre el nitrógeno, el carbono y la producción de lípidos; con tecnología que permita realizar de forma más rápida y eficiente el análisis de las muestras es posible llevar a cabo investigaciones que permitan determinar las rutas metabólicas para saber así las características propias aprovechables de una especie definida.

Hasta el momento no se han realizado un estudio de las rutas metabólicas de *C. vulgaris* como si se ha realizado con *C. protothecoides* y *C. reinhardtii*, ni se ha descubierto como manipular el proceso de la regulación de los sistemas bioquímicos para que inducir la producción de un compuesto específico. La mayoría de las investigaciones en microalgas continúan en la fase de metabolómica y algunas investigaciones han decidido probar con cambios a nivel de genómica, pero todavía no se cuenta con un completo conocimiento de las microalgas, en comparación con otros organismos como *E. coli* que es ampliamente utilizado en el campo de la biotecnología, es decir, como lo plantean Chen *et al.* (2017), todavía faltan investigaciones por realizar para entender los procesos bioquímicos que ocurren en las microalgas para poder explotar sus capacidades.

## **I. OBJETIVOS**

### **A. Objetivo general**

Desarrollar y evaluar un modelo base para la generación de mapas de flujos metabólicos de organismos autotróficos a partir de *Chlorella vulgaris* como herramienta para la obtención de objetivos de mejora mediante ingeniería metabólica.

### **B. Objetivos específicos**

1. Obtener muestras de biomasa de un experimento de pulso con marcaje de carbono <sup>13</sup>C para un cultivo de la microalga *Chlorella*.
2. Realizar la cuantificación y el análisis de los metabolitos intracelulares mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
3. Generar un modelo de flujos metabólicos no estacionarios y evaluarlo con los resultados experimentales del ensayo de marcaje con <sup>13</sup>C.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **a. Experimento de pulso con marcaje de carbono <sup>13</sup>C.**

En el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica se realizaron cultivos de la cepa costarricense de *Chlorella vulgaris* en un biorreactor marca Bioengineering (Switzerland) de tanque agitado con propela marina, de volumen máximo trabajo de 2,7 L, aireación a 12 L/h con una concentración de 5% de CO<sub>2</sub>, 300 rpm, temperatura ajustada a 25°C, luz constante y con control de pH ajustado a un valor de 8. El medio de cultivo utilizado fue un medio F2 preparado bajo protocolos del laboratorio de microalgas del CIB (Anexo 1).

Se montó un primer biorreactor de la cepa costarricense de *C. vulgaris* bajo las condiciones previamente mencionadas y se realizó una primera prueba para determinar los datos del crecimiento, se tomaron muestras de biomasa diariamente que fueron

analizadas al microscopio con cámara de Neubauer para determinar la concentración celular para establecer la curva de crecimiento y conocer el tiempo y a la concentración a la que el cultivo se encontraba en fase exponencial. Con un inóculo a una concentración conocida y con los datos del tiempo y concentración a la cual el cultivo de *C. vulgaris* se encuentra en fase exponencial se procedió a montar un segundo biorreactor. El segundo biorreactor empleó las mismas condiciones que el primero y el inocular mantuvo una concentración similar al primero.

Para el segundo biorreactor se calculó diariamente la concentración de células por mililitro hasta que el cultivo llegó a la concentración previamente determinada en el primer biorreactor para la fase exponencial. Llegado el cultivo a la concentración establecida se procedió a cerrar el suministro de CO<sub>2</sub>. Cuatro horas después de haber cerrado el flujo de CO<sub>2</sub> se procedió a bajar la cantidad de medio de cultivo a un litro y se inyectó una disolución de un gramo de NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub>. Inmediatamente realizada la adición del NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> se inició el muestreo, para cada muestra se tomaron 30 ml de muestra de biomasa en tiempos de 0 (T0), 10 s (T1), 30 s (T2), 50 s (T3), 110 s (T4), 3 min (T5), 5 min (T6), 8 min (T7), 10 min (T8), 20 min (T9) y 40 min (T10).

A cada muestra de biomasa extraída se le añadió 20 ml de metanol a - 50°C, centrifugadas a -4°C a 5000 rpm por 5 minutos, decantadas y el botón de biomasa se introdujo en nitrógeno líquido siguiendo el protocolo establecido por Jazmin y Young (2013) y Young, Shastri, Stephanopoulos y Morgan (2011). Una vez extraída la muestra de biomasa del biorreactor se procedió a monitorear la temperatura al salir la muestra del biorreactor, antes de ser centrifugada y al salir de la centrifuga.

#### b. Cuantificación y análisis de metabolitos.

Cada botón de microalgas fue resuspendidos en 500 µL de una mezcla de 1:1 agua:metanol, en eppendorfs se agregó el peso de 500 µL (0,69-0,73 g) de balines de vidrio con diámetros 0,25-0,5 µm y los 500 µL de los botones resuspendidos. Las células provenientes de la muestra de biomasa fueron lisadas mediante el uso de un molino Retsch utilizando balines de 0,25-0,5 µm, una vez preparados los eppendorfs con

los balines y los botones de microalgas resuspendidos se procedió a colocarlas en la cámara del molino, sumergirlas en nitrógeno líquido y seguidamente se colocó la cámara en el molino por 5 minutos a 30 Hz, al finalizar se tomó la temperatura con un termómetro infrarrojo, el tiempo de agitación en el molino se repitió un total de 5 veces hasta que las células estuvieron completamente lisadas, se corroboró tomando una muestra y observándola al microscopio.

Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto de las células lisadas y se evaporó utilizando un SpeedVacuum, el tiempo de evaporación varió según la muestra. Una vez evaporadas las muestras se procedió a derivatizar el residuo. Para la preparación del proceso de derivatización se disolvió 1 g de clorhidrato de metoxiamina en 5 mL de piridina seca preparada de una disolución con concentración de 20mg/mL y se añadió 40  $\mu\text{L}$  de este a las muestras, se incubó 30 min a 30°C, una vez pasado el tiempo se agregó 60  $\mu\text{L}$  de BSTFA y se incubó 60 min a 50°C, se centrifugó por 5 minutos y se transfirieron 90  $\mu\text{L}$  a un vial con un inserto para ser analizados y cuantificados mediante cromatografía gaseosa acoplada con un detector de masas utilizando condiciones cromatográficas previamente determinadas por el equipo de investigación encargado de este proyecto (anexo 2).

El proceso de derivatización se realizó para las 10 muestras de biomasa de *C. vulgaris* obtenidas del biorreactor, 9 muestras de los metabolitos puros 6-fosfoglicerato (6PG), fructosa-6-fosfato (F6P), glucosa-6-fosfato (G6P), fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato (PYR),  $\alpha$ -cetoglutarato (AKG), succinato (SUC) y malato (MAL) y una mezcla de los metabolitos F6P, G6P, PEP, PYR, AKG, SUC, MAL y fumarato (FUM). El metabolito FUM y los aminoácidos serina (SER) y glutamato (GLU) no fueron analizados en forma pura, pero se analizaron según datos obtenidos previo a la realización de este proyecto.

La CG-MS provoca que los metabolitos se fragmenten por lo que para cada metabolito se analizaron los fragmentos reportados por Wu *et al.* (2015) (anexo 3); para corroborar dicha información los espectros de todos los metabolitos se analizaron en el software NIST MS Search versión 2.2.

Los tiempos de retención empleados para buscar los metabolitos en los cromatogramas de las muestras de biomasa se obtuvieron de la siguiente manera: en primer lugar se determinó el tiempo de retención de los metabolitos puros que daba como resultado un rango de tiempo, se procedió a medir una mezcla de los metabolitos y empleando los rangos de tiempo previos se logró reducir el rango de tiempo y determinar un tiempo lo más exacto que fue posible para buscar a ese tiempos los metabolito en las muestras de biomasa.

A partir del análisis mediante GC-MS de las muestras de biomasa se obtuvieron los datos de abundancia de  $^{13}\text{C}$  para los fragmentos en estudio. La información obtenida a partir de la CG-MS se tabuló en un Excel, debido a que los fragmentos de los metabolitos incluían las moléculas añadidas durante el proceso de derivatización se debió ajustar matemáticamente la abundancia de  $^{13}\text{C}$ . El ajuste se debe a que las moléculas añadidas a los fragmentos pueden naturalmente presentar  $^{13}\text{C}$  por lo que se debe restar el porcentaje de la abundancia natural correspondiente a los átomos de carbono que conforman las moléculas añadidas (figura 4).

Time (s)	time	Mesured		Relative		Natural abundance		Correction		Corrected		Relative	
		M+0	M+1	M+0	M+1	M+0	M+1	M+0	M+1	M+0	M+1	M+0	M+1
10	T1						1						
30	T2	Datos obtenidos		Cálculo de la fórmula:		1	Datos	Cálculo de la fórmula:		Cálculo de la fórmula:		Cálculo de la fórmula:	
50	T3	del espectro,				1	reportados	Natural abundance*		Measured - Correction			
110	T4	desde M+0 hasta		M+0 (Suma de M+		1	por	Measured				M+0 Corrected	
180	T5	M+6 según		0 hasta M+6)		1	Wu <i>et al.</i>					Suma de M+0	
300	T6	corresponda.				1	Desde M-1					hasta M+6 de	
480	T7					1	hasta M+6					los datos	
600	T8					1						Corrected	
1200	T9					1							
2400	T10					1							

**Figura 4.** Cálculos realizados para determinar la abundancia corregida de los fragmentos detectados, empleando la abundancia natural reportada por Wu *et al.* (2015).

- c. Generación de un modelo de flujos metabólicos no estacionarios.

Haciendo uso de los datos de abundancia de  $^{13}\text{C}$  obtenidos de experimento de marcaje con  $^{13}\text{C}$  se utilizó la metodología de análisis de flujos metabólicos INST-MFA (Isotopically non stationary metabolic flux analysis). Utilizando el programa INCA 1.7 se generó un modelo de reacciones en el cual se incluyeron los datos del experimento

de marcaje, desarrollando una ecuación de balance de masas para un metabolismo autotrófico (Jazmin y Young, 2013) (anexo 9).

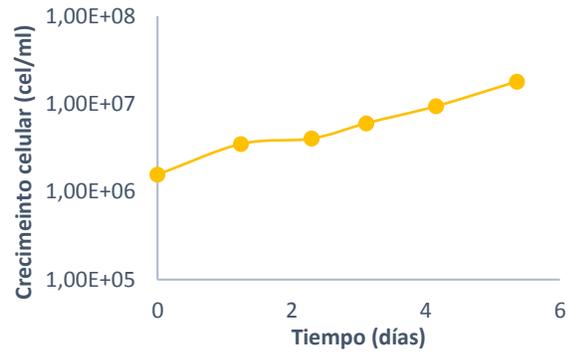
El programa INCA además generó gráficos para la abundancia de  $^{13}\text{C}$  en donde en el eje X se muestran las cantidades de átomos de carbono con  $^{13}\text{C}$  presentes en el esqueleto de carbonos del fragmento y se divide según la cantidad de átomos de  $^{13}\text{C}$ , M0 indica ningún átomo de  $^{13}\text{C}$ , M+1 indica un átomo de  $^{13}\text{C}$ , M+2 indica dos  $^{13}\text{C}$  y así sucesivamente y a su vez, cada cantidad de átomos de  $^{13}\text{C}$  incluye 10 barras verticales que indican un muestreo a un tiempo diferente empezando por T1 y terminando con T10 y en el eje Y se encuentra la escala de abundancia del total de fragmentos presentes.

El programa INCA además genera una simulación basándose en diferentes datos como por ejemplo la estequiometría de las reacciones añadidas en el modelo y a su vez lo compara con los datos experimentales obtenidos. Empleando la información conseguida a través de la simulación del modelo de reacciones en el programa INCA se generó un mapa simplificado de flujos metabólicos.

### III. RESULTADOS

#### a. Experimento de pulso con marcaje de carbono 13.

Se montó un primer biorreactor para confirmar la cinética de crecimiento de la microalga. La cinética de crecimiento resultante para *C. vulgaris* indica que no hay una marcada fase de latencia, pero se puede diferenciar claramente el inicio de la fase exponencial y como la concentración aumenta en gran medida durante el paso del tiempo desde el día 2 al día 6 (figura 4) (anexo 4). Se estableció que el momento requerido durante la curva de crecimiento de *C. vulgaris* era al quinto día con una concentración aproximada de 9 millones cel/ml con un inóculo de 1,6 millones cel/ml. El segundo biorreactor montado específicamente para el marcaje con  $^{13}\text{C}$  se inoculó con 2 millones cel/ml y al llegar a una concentración de 8,5 millones cel/ml se realizó la inyección de  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ .



**Figura 5.** Cinética de crecimiento de células de *C. vulgaris* en biorreactor de tanque agitado marca Bioingeniering

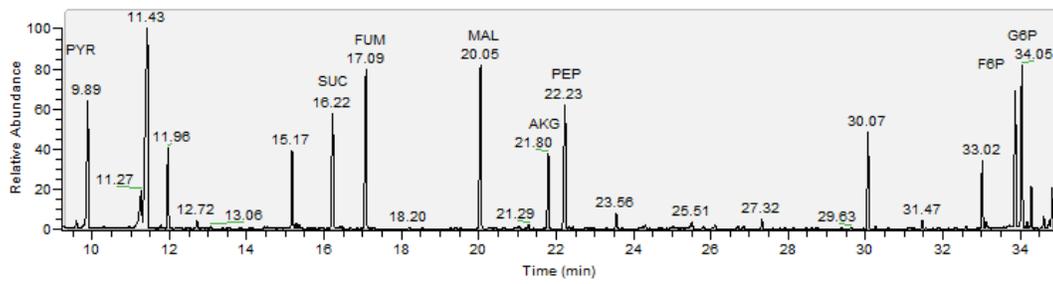
Los puntos de control de la temperatura dieron como resultado que mayoritariamente las células se mantuvieron igual o por debajo de 0°C con excepción de T6 y T7 que antes de centrifugar se encontraban por debajo de 2°C y las muestras T2, T8, T9 y T10 que después de ser lisadas en el molino Retsch su temperatura aumento, pero manteniéndose debajo de 12°C (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Monitoreo de la temperatura durante el proceso de tomado de muestra y lisiado de células de *C. vulgaris*

Muestra	T1	T2	T4	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Tiempo (s)	10	30	50	110	180	300	480	600	1200	2400
Temperatura inicial (°C)	-19	-18	-19	-21	-22	-10	-13	-17	-17	-11
Temperatura antes de centrifugar (°C)	-10	-7	-11	-10	0.5	1.9	1.8	-7.2	-3.8	-8.2
Temperatura después del nitrógeno <sub>0</sub> (°C)	-7.2	-9	-7.2	-10	-7	-4.2	-6.4	-4.7	-6.4	0.6
Temperatura antes de la lisis (°C)	-35	-20	-20	-31	-34	-30	-20	-20	-32	-35
Temperatura después de la lisis (°C)	-0.8	12	-2.1	-1.7	-1.4	0.3	0.1	10.3	9.1	9.5

b. Cuantificación y análisis de metabolitos.

En primera instancia se analizaron mediante CG-MS los metabolitos puros de 6PG, G6P, F6P, PEP, PYR, AKG, SUC y MAL para determinar los tiempos de retención aproximados, en el anexo 5 se observa el resultado de los tiempos de retención, pero debido a que estos tiempos de retención podían variar debido a un cambio en el comportamiento de estos dentro de una mezcla, solo se usaron como referencia para buscar los metabolitos en el cromatograma de la mezcla de metabolitos (figura 6). El cromatograma de la mezcla de metabolitos dio como resultado los tiempos de retención a utilizar para buscar los metabolitos en los cromatogramas de las muestras de biomasa (cuadro 3).



**Figura 6.** Cromatograma que muestra los tiempos de retención resultantes del análisis de una mezcla de metabolitos

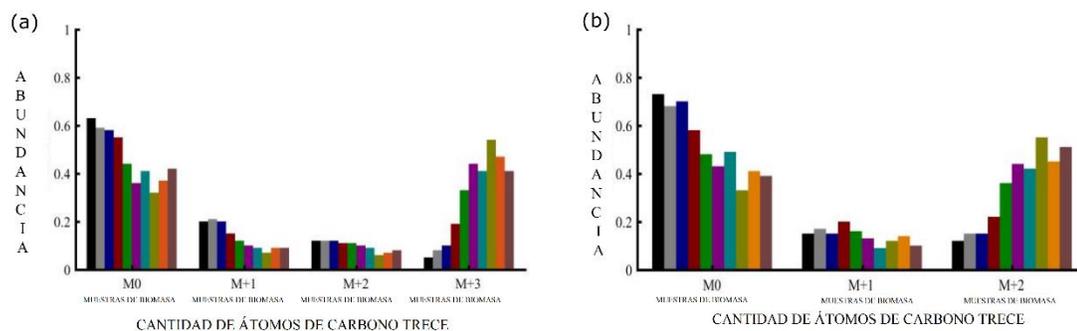
**Cuadro 2.** Tiempos de retención determinados para buscar los diferentes metabolitos en los cromatogramas de las muestras de biomasa

<i>Metabolito</i>	<i>Tiempo (min)</i>
<i>PYR</i>	9.89
<i>SUC</i>	16.22
<i>FUM</i>	17.09
<i>SER</i>	17.25
<i>MAL</i>	20.05
<i>AKG</i>	21.80
<i>PEP</i>	22.23
<i>GLU</i>	22.66
<i>F6P</i>	33.87
<i>G6P</i>	34.05

Los tiempos de retención para GLU y SER fueron a los tiempos 22.6 min y 17.2 min respectivamente; una vez obtenidos los tiempos de retención pertenecientes a los metabolitos en estudio (cuadro 3) y los cromatogramas para las 10 muestras de biomasa de *C. vulgaris* (anexo 6) se procedió a buscar los diferentes fragmentos de los metabolitos y tabular los datos de abundancia de  $^{13}\text{C}$  (anexo 7).

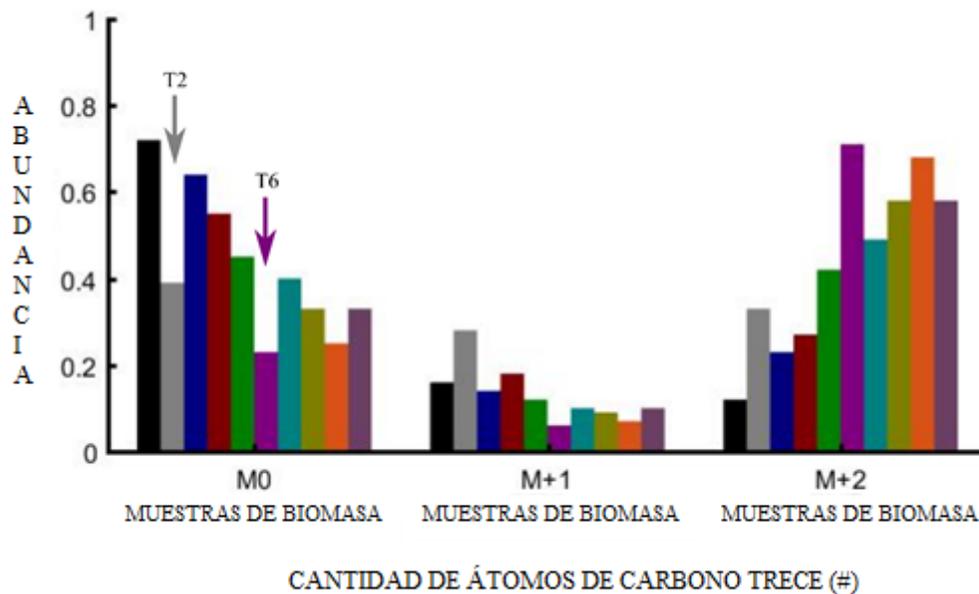
En el caso de 6PG no fue posible detectarlo en ninguna de las muestras de biomasa en el tiempo de retención determinado, tampoco se pudieron encontrar algunos de los fragmentos reportados para varios metabolitos.

En F6P se observa que la primera barra perteneciente a la primera muestra de biomasa T1 alcanza el máximo valor de abundancia en M0, mientras que en M+1 y M+2 se observa una muy baja abundancia, en contraposición en el último tiempo de muestreo T10, indicado con la última barra de color púrpura oscuro, se observa una disminución en la abundancia en M0 mientras que para M+2 aumentó considerablemente, se observa un comportamiento similar para el fragmento 217 en el cual aumenta la abundancia de 3 átomos de  $^{13}\text{C}$  (M+3) con el paso del tiempo (figura 7).



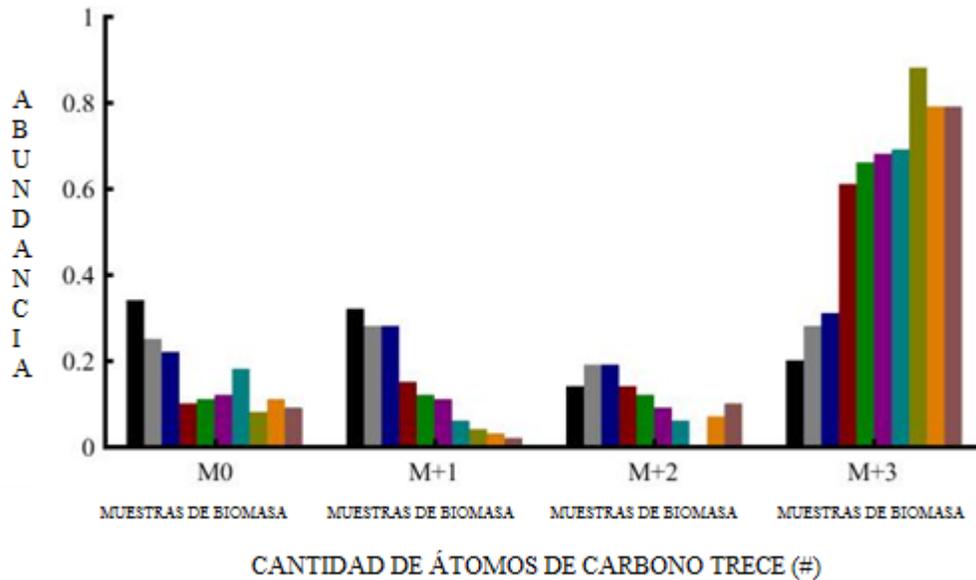
**Figura 7.** Abundancia de  $^{13}\text{C}$  en los fragmentos (a) F6P C5-C6 357 y (b) F6P C4-C6 217 en las 10 muestras de biomasa de *C. vulgaris*.

El comportamiento regular de la absorción de  $^{13}\text{C}$  va a mostrar un alto contenido de  $^{12}\text{C}$  (M0) que disminuye lentamente con el tiempo, en el caso del fragmento 357 de G6P presenta ciertas alteraciones en los datos para las muestras T2 y T6 en donde se pierde el comportamiento constante, pero se mantienen las demás características, con el tiempo aumento M+2, y M+1 mantiene una relativa abundancia constante (figura 8).



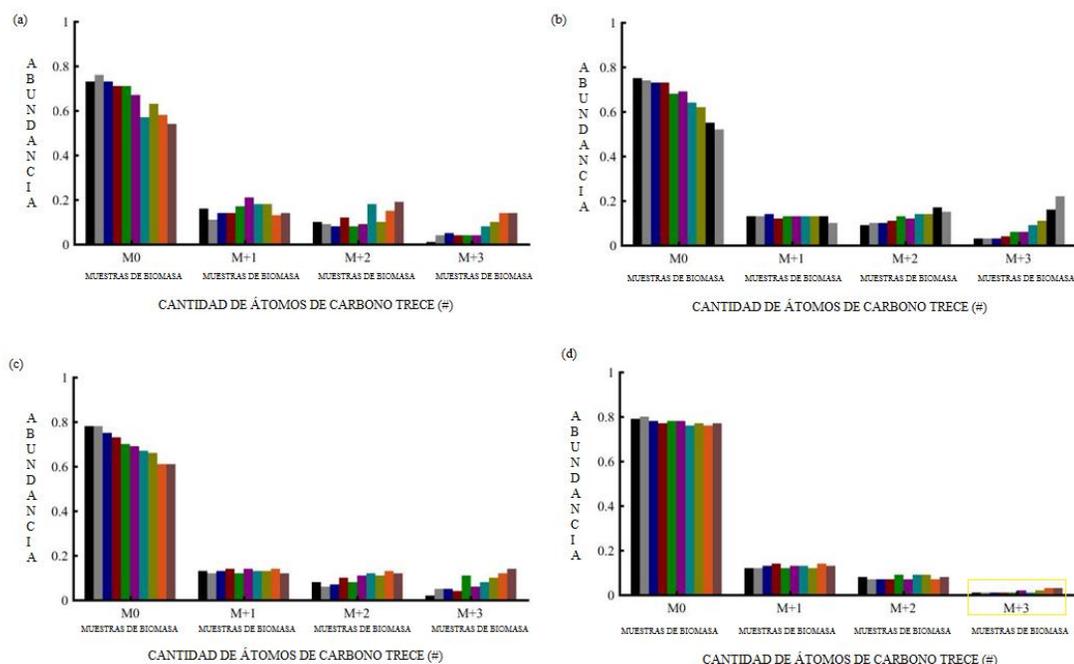
**Figura 8.** Abundancia de  $^{13}\text{C}$  en el fragmento G6P C5-C6 357 en las 10 muestras de biomasa de *C. vulgaris*.

PEP es el único metabolito en donde M+3 presenta la mayor abundancia en comparación con M0, M+1 y M+2, además se observa que para los tiempos T1, T2 y T3 la abundancia es levemente mayor en M0, M+1 y M+2 en comparación con los demás tiempos de muestreo (figura 9).



**Figura 9.** Abundancia de <sup>13</sup>C en el fragmento PEP C1-C3 369 en las 10 muestras de biomasa de *C. vulgaris*.

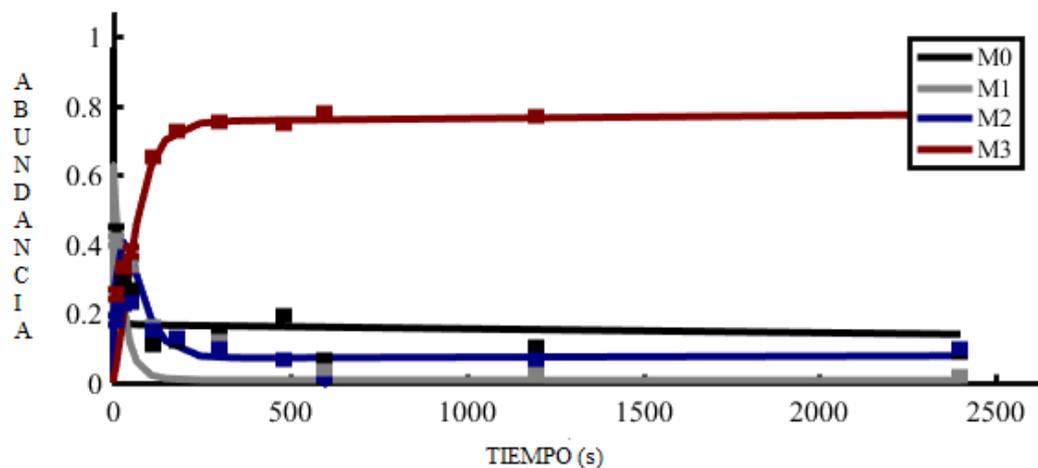
Los fragmentos AKG 288, SUC 247, FUM 245 y MAL 245 presentaron el mismo comportamiento que F6P, pero se observa que SUC 247 tuvo un mínimo aumento en M+3 en comparación con los datos obtenidos para AKG, FUM y MAL (figura 10). En los fragmentos PYR 174, PYR 153, GLU, SER y el fragmento MAL 335 se observó el mismo comportamiento en donde M0 presenta máxima abundancia que se reduce con el paso del tiempo mientras aumenta muy levemente la presencia de <sup>13</sup>C en todos los átomos de carbono disponibles y las cantidades intermediarias de átomos de <sup>13</sup>C (M+1, M+2 y M+3) se mantienen relativamente constantes a través del tiempo (anexo 8). Para el caso de SER se eliminó el tiempo de muestreo T3 y T10 debido a que no se encontró en la muestra.



**Figura 10.** Abundancia de  $^{13}\text{C}$  en los fragmentos (a) AKG C1-C5 288, (b) MAL C1-C4 245, (c) FUM C1-C4 245 y (d) SUC C1-C4 247 en las 10 muestras de biomasa de *C. vulgaris*.

c. Generación de un modelo de flujos metabólicos no estacionarios.

En el programa INCA se diseñó un modelo de 31 reacciones, los datos corregidos de abundancia de  $^{13}\text{C}$  para cada metabolito se añadieron al programa y se corrió la simulación del flujo metabólico. Para el caso de PEP la simulación del modelo logró seguir el comportamiento de los valores experimentales, se puede observar como la absorción de  $^{13}\text{C}$  en M+3 desplazó la abundancia de  $^{12}\text{C}$  en M0 (figura 11). En contraposición se puede observar como el modelo no logró ajustar los datos de la simulación a los datos experimentales para G6P 357 y F6P 357, la simulación si marca el aumento de la abundancia para M+2 como corroboran los datos experimentales, pero se puede observar una exagerada curva para los valores simulados de M+2 que no corresponde al comportamiento de los valores experimentales (figura 12).

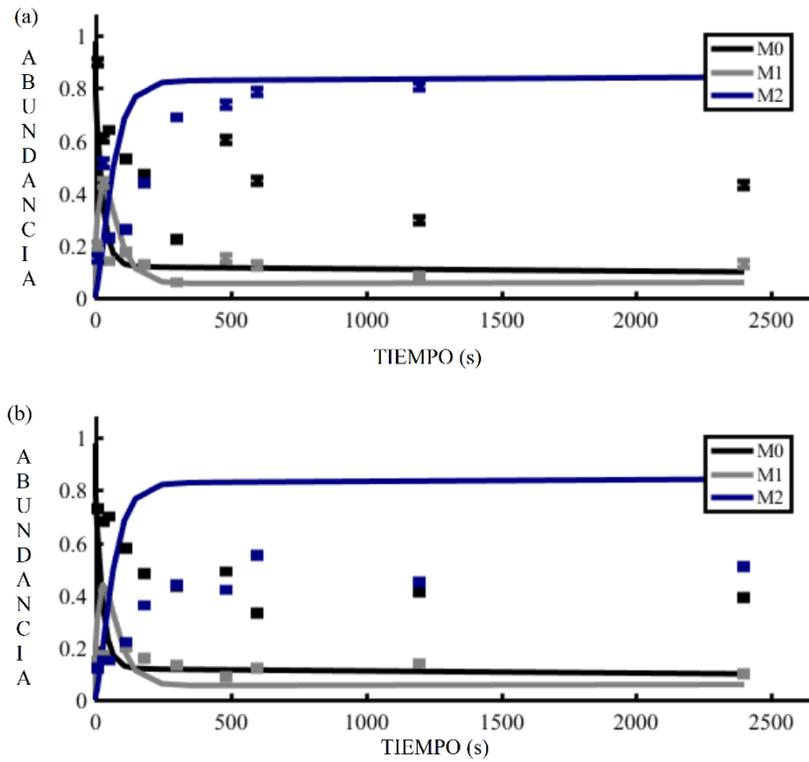


**Figura 11.** Simulación del flujo metabólico para PEP 369, los puntos corresponden a los valores experimentales mientras las líneas indican la predicción calculada por la simulación del modelo.

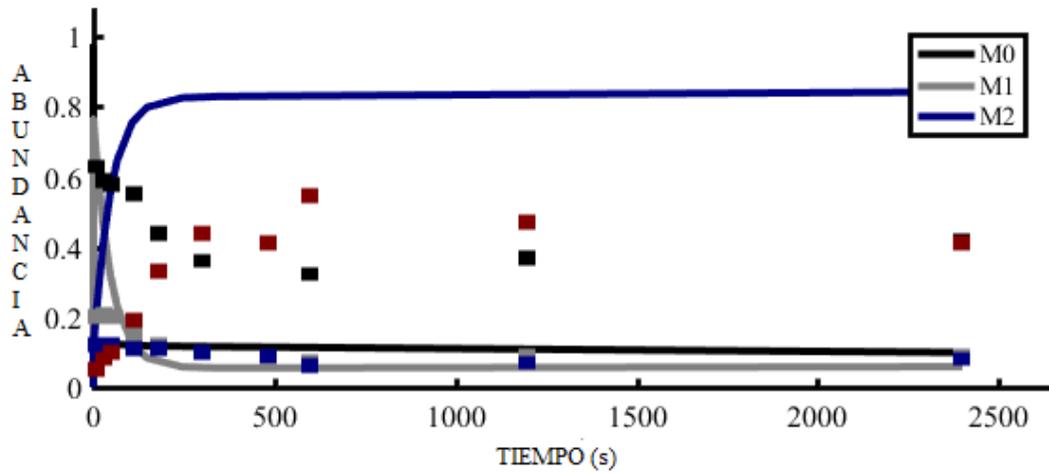
Se observa que para el caso de F6P 217 la simulación del modelo de flujos metabólicos no tomó en consideración la presencia de M+3 y siguió con el comportamiento previamente mostrado para F6P 357 en donde M+2 logra el punto máximo en abundancia, situación que no se dio con los datos experimentales pues fue mayor la abundancia de M+3 hasta llegar a una abundancia parecida con M0 (figura 13 y 7).

En PYR la absorción de  $^{13}\text{C}$  no se dio en abundancia; en el gráfico se puede observar que PYR 158 muestra un leve aumento en la abundancia de M+2 el cual no es reflejado en la simulación, pero en el caso de PYR 174 no se dio absorción pues los valores se mantienen constantemente bajos concordando con la simulación (figura 14).

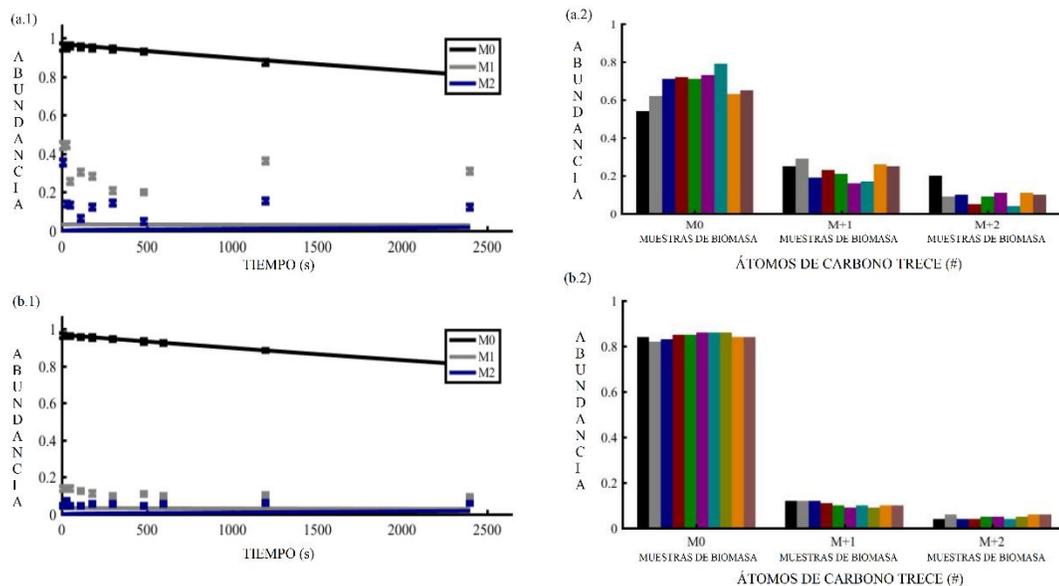
En la simulación del modelo de AKG se puede observar como los datos experimentales y la simulación para M0 es congruente, pero para los datos que implican presencia de  $^{13}\text{C}$  (M+1 y M+2 y M+3) hay una disonancia entre la abundancia experimental y la abundancia establecido por el modelo (figura 15).



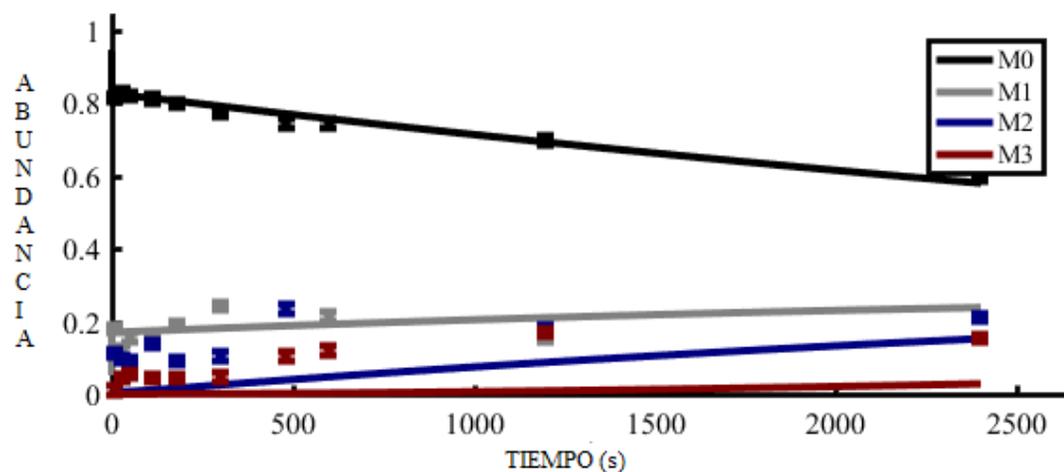
**Figura 12.** Simulación del flujo metabólico para (a) G6P y (b) F6P en donde se observa que el modelo no corresponde con los datos experimentales.



**Figura 13.** Simulación para F6P en donde se observa que el modelo no tomó en consideración la presencia de M+3 correspondiente a los puntos experimentales en color rojo.

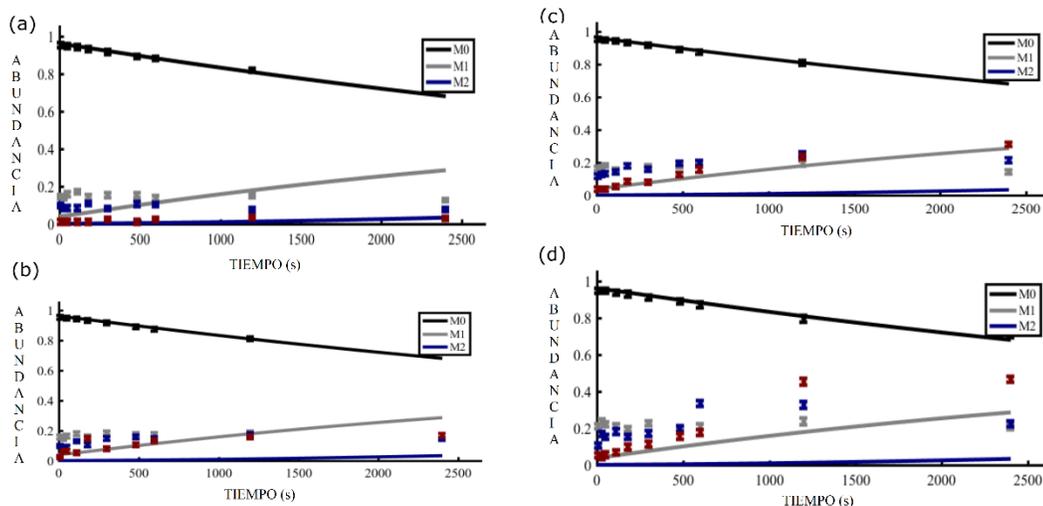


**Figura 14.** Simulación y abundancia de carbono trece para (a.1 y a.2) PYR 158 y (b.1 y b.2) PYR 174 en donde se observa que el modelo no determinó aumento en la abundancia de M+1 y M+2 comparado con la gráfica para los datos experimentales de abundancia.

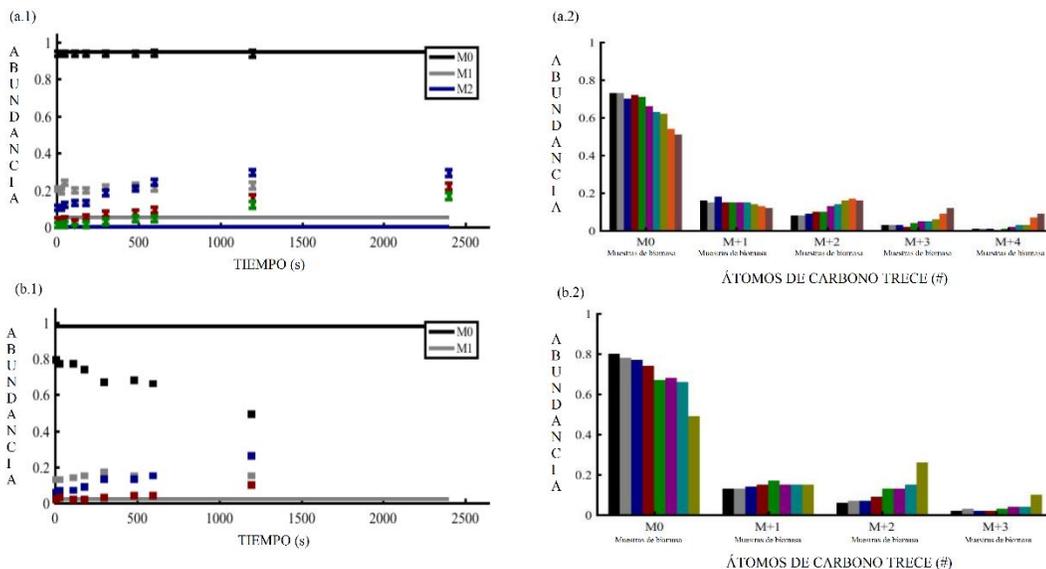


**Figura 15.** Simulación para AKG 288 en donde se observa la disonancia entre los valores experimentales que implican absorción de  $^{13}\text{C}$  y la abundancia determinada por el modelo.

En los casos de SUC 247, FUM 247, MAL 245 y MAL 335 se encontró que nuevamente hay congruencia para M0, pero se mantiene la disonancia entre la simulación del modelo y los datos experimentales y para los 4 fragmentos el modelo omitió la abundancia de M+3 (figura 16).



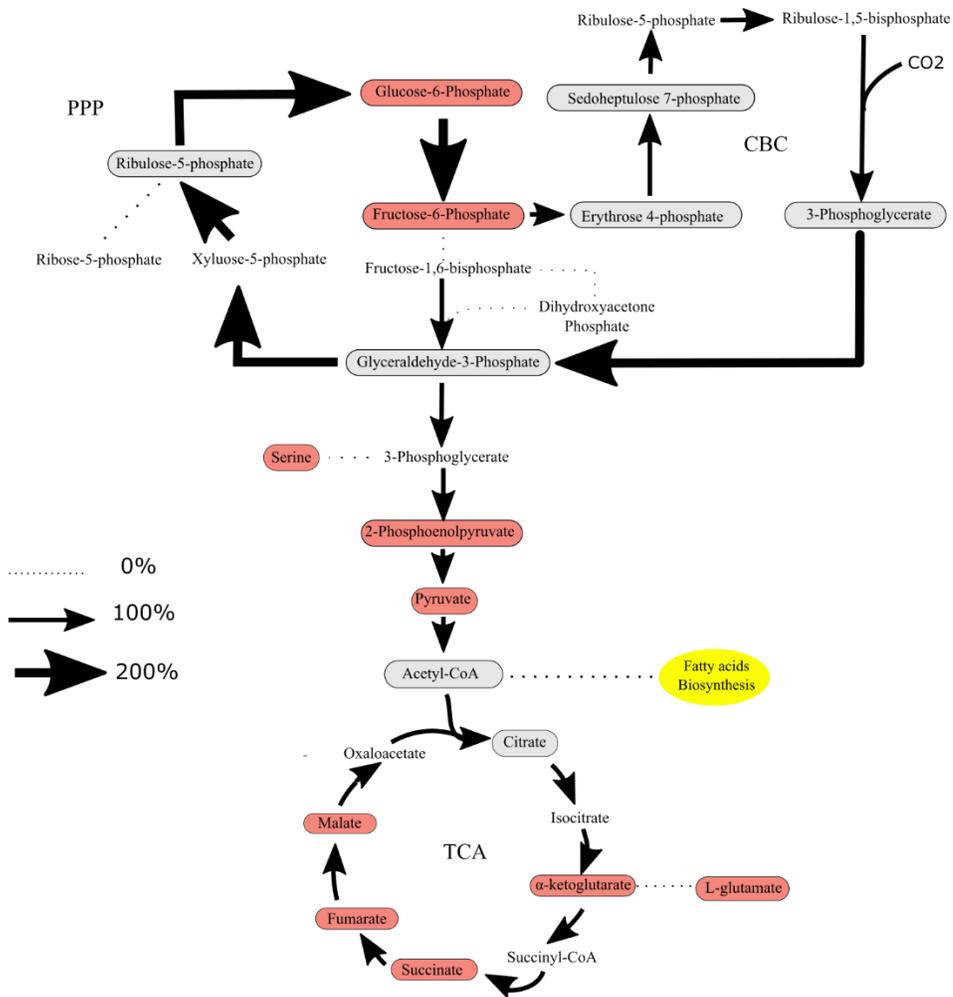
**Figura 16.** Simulación para (a) SUC 247, (b) FUM 245, (c) MAL 245 y (d) MAL 335 en donde se observa la disonancia entre los valores experimentales, la predicción del modelo y la omisión de M+3.



**Figura 17.** Simulación para GLU 363 y SER 204 con sus respectivos gráficos de abundancia de  $^{13}\text{C}$ .

La simulación del modelo para GLU omitió la abundancia tanto de M+3 como de M+4 y de igual manera en el caso de SER 204 omitió M+2 y M+3 (figura 17). Para ambos casos M+1 mantiene una abundancia constante, pero se puede observar que con el tiempo aumenta en M+2, M+3 y en GLU M+4 también, pero la predicción del modelo no concuerda con estos valores.

Con los flujos designados por la simulación del modelo generado se generó un mapa de flujos metabólicos no estacionarios, la orientación de las flechas indica la dirección preferencial de las relaciones que están en equilibrio y el grosor indica la magnitud de la velocidad relativa a la incorporación del CO<sub>2</sub> al metabolismo considerada como 100% (figura 18).



**Figura 18.** Mapa simplificado de flujos metabólicos para *C. vulgaris* bajo condiciones autótrofas.

#### IV. DISCUSIÓN

##### a. Experimento de pulso con marcaje de carbono 13.

Barsanti y Gualtieri (2014) explican que la curva de crecimiento para las algas consta de seis fases, la primera fase hace referencia a la fase lag en donde las células no crecen

debido a la necesidad de primero adaptarse a los cambios en las condiciones de su ambiente, la curva de crecimiento determinada para *C. vulgaris* denota que no hay una marcada fase lag al inicio y en su lugar inicia con un crecimiento que al avanzar el tiempo se va haciendo más lento (figura 5).

La siguiente es la fase de aceleración y es el punto donde el crecimiento empieza a aumentar, se observa que del día 2 al 3 hay un aumento en el crecimiento hasta llegar a la fase exponencial que se puede ver claramente en los días 4 y 5, en esta fase es cuando el crecimiento es constante y se empiezan a dar cambios en el medio de cultivo donde se encuentran debido al consumo de nutrientes y producción de metabolitos (figura 5).

Debido al consumo de los nutrientes, llegan a la fase de retraso en donde el crecimiento empieza a decrecer hasta llegar a la fase estacionario en donde no crecen debido a la escasez de uno o varios nutrientes en el medio de cultivo hasta llegar a la fase de decline donde las células empiezan a morir.

Para obtener una mejor absorción del  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  por parte de las células estas deben encontrarse en la fase exponencial o de crecimiento logarítmico, esta fase es caracterizada por la duplicación exponencial de las células que fomenta una alta actividad metabólica (Negroni, 2009) además de que se considera que durante esta fase las propiedades de las células se mantienen constante (Barsanti y Gualtieri). La inyección de  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  se realizó cuando el biorreactor alcanzó una concentración de 8,5 millones cel/ml, tanto el biorreactor de prueba como el de marcaje iniciaron con un inóculo de cercano a los 2 millones cel/ml, al día 4 contaban con una concentración cercana a los 9 millones cel/ml y con la curva de crecimiento se comprobó que a este momento las células se encontraban dentro de la fase exponencial, por lo tanto, para el biorreactor del marcaje se esperó a que las células estuvieran a una concentración cercana a los 9 millones cel/ml para realizar el experimento en la fase exponencial.

Parecido a lo obtenido por Rodríguez, Amarelo, Guerrero y Delgado dos Reis (2016) quienes analizaron el crecimiento de *Chlorella protothecoides* en condiciones autotróficas y heterotróficas, bajo condiciones heterotróficas, *C. protothecoides* tiene una fase exponencial larga que va desde el segundo al quinto día, además, no presenta

fuertes cambios marcados en su crecimiento a diferencia del desarrollo del crecimiento bajo condiciones heterotróficas.

Barsanti y Gualtieri (2014) indican que la temperatura ideal para mantener a un alga vivo es la misma al lugar de su procedencia, pero mayoritariamente temperaturas menores a 16 °C reducen la velocidad de crecimiento y mayores a 35°C pueden causar letales daños. Debido a la necesidad de detener el metabolismo de la célula se optó por el uso de una centrifugadora a -4°C y el empleo de nitrógeno líquido para congelar las muestras permitió que la temperatura se mantuviera muy por debajo de la temperatura reportada a la cual el metabolismo reduce su velocidad, 16 °C. Por lo tanto, con lo observado en el registro de temperaturas se registra que las temperaturas alcanzadas permitieron que las células mantuvieron su metabolismo suspendido. Se registró un aumento de la temperatura al terminar el proceso de lisado, pero continuó por debajo de los 16 °C, de igual manera, se comprobó al microscopio que las células ya estaban lisadas.

b. Cuantificación y análisis de metabolitos.

Como se puede observar en los datos de abundancia de F6P 357, F6P 217, G6P 357 PEP 369, AKG 288, MAL 245, FUM 245, SUC 247, PYR 158, PYR 174, GLU 363 y SER 204 muestran con los datos experimentales la absorción de <sup>13</sup>C por parte del sistema, sin llegar hasta el equilibrio, por lo tanto, es necesario aumentar el tiempo de muestreo para poder observar el equilibrio ( figuras 7, 8, 9, 10, 14 y 17). Wu *et al.* (2015) con su experimento en *C. protothecoides* indica que en el caso de los metabolitos del ciclo de Krebs a los 60 min no se encontraban marcados por encima del 50% con respecto del isotópomo M0, recalcando la importancia de aumentar el tiempo de muestreo.

De igual manera Wu *et al.* (2015) recalca que hay ciertos metabolitos, ejemplifica con ácido 3-foglicérico, que a los 8 min ya se encontraba en equilibrio, por lo tanto, es importante alargar el tiempo de muestreo sin dejar de realizar rápidos muestreos al inicio puesto que para este proyecto se puede evidenciar el caso de PEP, metabolito en

el cual se puede observar la completa absorción de  $^{13}\text{C}$ , pero no fue posible observar la abundancia total de  $^{12}\text{C}$ .

Además, es importante emplear un sensor de dióxido de carbono en el biorreactor que indique el momento en que luego de haber cerrado el suministro de  $\text{CO}_2$  las concentraciones están cercanas a por lo menos 5% para realizar el pulso con  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  y, por lo tanto, asegurar la máxima absorción posible de  $^{13}\text{C}$ .

Cuando se analizaron las muestras no fue posible observar varios de los fragmentos existentes para los diferentes metabolitos, especialmente para los fragmentos mayores a 700 m/z, estaban presentes en algunos de los tiempos de muestreo, pero se encontraban contaminados por otras señales que interferían con el análisis, por lo tanto, es importante ajustar las condiciones cromatográficas para realizar un análisis específico para las masas mayores a 700 m/z.

También es necesario aumentar la concentración de la muestra, se emplearon 200  $\mu\text{L}$  de extracto para realizar los análisis en GC-MS, pero no fue posible encontrar 6PG en las muestras de biomasa. Este metabolito es empleado en la vía de las pentosas fosfato para la generación de ribulosa-5-fosfato, además puede ser utilizado en la glucólisis para formar gliceraldehído-3-fosfato a partir de G6P pasando por 2-keto-3-fosfogluconato (Smolke, 2010), es posible que las velocidades de reacción que convierten este metabolito en otro sean muy rápidas, por ende, no fuera posible tomar una muestra con una concentración suficiente para que el equipo de GC-MS fuera capaz de detectar, aumentar la cantidad de extracto podría ayudar a mejorar la concentración del metabolito para que pueda ser analizable.

Para las irregularidades presentes en G6P y SUC sería recomendable realizar repeticiones del análisis de la muestra a mayor concentración para diferenciar si es un error de lectura o un comportamiento que requiera mayor investigación.

#### c. Generación de un modelo de flujos metabólicos no estacionarios.

El modelo de flujos metabólicos da como resultado la referencia de la dirección a la cual tienden las reacciones bidireccionales, en primer lugar inicia con la formación de 3-fosfoglicerato mediante la adición de  $\text{CO}_2$  y se dirige directamente hacia

gliceraldehído-3-fosfato (G3P), en este punto el flujo se bifurca, el sistema indica que tiene preferencia hacia continuar a la ruta de las pentosas fosfato pasando por xylulosa-5-fosfato, seguido de ribulosa-5-fosfato hasta llegar a glucosa-6-fosfato, a partir de G6P el sistema en lugar de seguir hacia la glucólisis se dirige hacia el ciclo de Calvin Benson, indicando que a partir de F6P en lugar de formar fructuosa-1,6-bifosfato se forma eritrosa-4-fosfato, pero a partir de fructuosa-1,6-bifosfato el modelo indica que si se está formando G3P. Volviendo a la bifurcación en G3P, un menor flujo procede a dirigirse al ciclo de Krebs, completando el ciclo, pero no indica la salida de metabolitos, pues tanto el flujo para ácidos grasos, SER y GLU es de cero, mismo resultado para la formación de biomasa.

El modelo de reacciones y la cantidad de datos utilizados se debe revisar debido a la incongruencia evidenciada entre los gráficos de abundancia de  $^{13}\text{C}$  y los flujos generados por el modelo, posiblemente se deba a los casos previamente mencionados en donde la simulación del modelo no tomó en consideración los valores M+1, M+2, M+3 y M+4. Además, es posible que el modelo presente ciertas incongruencias debido al reordenamiento de átomos generado por la succinato deshidrogenasa, Zamboni, Fendt, Rühl y Sauer (2009) recomiendan incorporarlo en el modelo, esto no fue incorporado dentro del modelo de reacciones.

El modelo de flujos metabólicos con los datos generados de la abundancia de  $^{13}\text{C}$  revela que el sistema busca mantener el ciclo de Calvin Benson altamente activo, una vez formado el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) el sistema indica que hace el proceso inverso de la vía de las pentosas, en términos bioquímicos, realizar la vía de manera inversa no es factible; la vía de las pentosas fosfato está conformada por dos fases, la fase oxidativa y la fase no oxidativa, la fase oxidativa incluye el proceso en el cual a partir de G6P se forma ribulosa-5-fosfato, un proceso no reversible que se da en el citoplasma de la célula (Mathews *et al.*, 2013), por lo tanto, no es posible hacerlo inversamente.

Como el modelo está diseñado para determinar un flujo hacia la vía de las pentosas, el modelo unió el ciclo de Calvin Benson con la vía de las pentosas como si fuera uno solo, pero Wu *et al.* (2015), reporta que para la microalga *C. protothecoides* el mapa

de flujos tiende, de igual manera que el mapa generado para *C. vulgaris*, a buscar el mantenimiento del ciclo de Calvin Benson activo. Como las reacciones que involucran a xilulosa-5-fosfato y la ribulosa-5-fosfato además de en la vía de las pentosas fosfato se encuentran de igual manera en el cloroplasto junto con el ciclo de Calvin Benson, es factible que, en lugar de dirigirse hacia el citoplasma a la ruta de las pentosas, sea que el sistema indica que son reacciones dentro del cloroplasto como parte del ciclo de Calvin Benson las que tienen mayor peso dentro del flujo.

Chang *et al.* (2011) y Manichaikul *et al.* (2009) mencionados por Wu *et al.* (2015) indican que bajo condiciones autotróficas es posible que la enzima fosfofructoquinasa que transforma F6P en fructosa-1,6-bifosfato se encuentre inactiva, desactivando una parte de la glucólisis, dato observable en el mapa de flujos para *C. vulgaris*.

La ribulosa-5-fosfato es el metabolito más importante para la absorción de CO<sub>2</sub>, cuando Calvin y Benson experimentaron con algas y descubrieron el ciclo realizaron un pulso con CO<sub>2</sub> marcado con carbono catorce y se dieron cuenta que rápidamente obtenían una serie de diferentes metabolitos marcados, pero 3-fosfoglicerato fue el primero en marcarse en su grupo carboxilo, indicando que era ahí donde se unía el <sup>14</sup>C, con investigaciones posteriores descubrieron que era la ribulosa-5-fosfato quien añadía el carbono a su esqueleto y se partía en dos, de ahí la importancia que indica el mapa de mantener activo el flujo en el ciclo, especialmente por tratarse de un organismo autótrofo.

El mapa de flujos metabólicos no muestra hacia donde prosigue la transferencia de <sup>13</sup>C, una vez cerrado el ciclo de Krebs no se indica una ruta de salida para la producción de ácidos grasos o glutamato, tampoco indica formación de biomasa. Esto se debe principalmente a que la simulación del modelo no está tomando en consideración la incorporación del carbono marcado como se puede observar en la figura 17, en donde a pesar de que la incorporación hacia GLU y SER es muy poca, pero existente, por lo tanto, es necesario reajustarlo con los datos del equilibrio de <sup>13</sup>C para estos aminoácidos, es decir, con un aumento en el tiempo de muestreo.

De igual manera, la reacción de biomasa debe ser calculada experimentalmente ya que para el modelo se utilizó la reacción reportada por Wu *et al.* (2015). Thiele y Palsson,

2010 indican que “la reacción de la biomasa explica todos los constituyentes de la biomasa conocidos y sus contribuciones fraccionarias a la biomasa celular en general.”, por ende, es importante determinarla para el organismo en estudio.

## V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos del primer experimento de marcaje con  $^{13}\text{C}$  en un organismo autótrofo realizando en el país, con el fin de tener un primer modelo matemático que permita evaluar los flujos metabólicos de diferentes especies de microalgas y así caracterizar su potencial productivo.

Para obtener los datos del metabolismo en este experimento de marcaje es necesario determinar el momento en que las células se encontraban en fase exponencial, ya que esto facilita la obtención de muestras de biomasa de un experimento de pulso con marcaje de carbono 13 en un biorreactor de tanque agitado, además mediante el mantenimiento de las muestras a temperaturas menores a  $16^{\circ}\text{C}$  se asegura el detenimiento del metabolismo de las células.

Al realizar la cuantificación y análisis por medio de GC-MS de los isotopómeros de los metabolitos G6P-357, F6P-217, F6P-357, PEP-369, PYR-174, PYR 158, SUC 247, FUM-245, MAL-245, MAL-335, GLU-204 y SER-363, se logró corroborar la abundancia de  $^{13}\text{C}$  para dichos fragmentos, determinándose que sí hubo incorporación total del carbono marcado para el caso de PEP-369, en contraposición de los otros fragmentos, que mostraron incorporación sin llegar a estado estacionario.

Mediante el INST-MFA se calcularon flujos metabólicos para un modelo de reacciones que contempla 31 reacciones para un organismo autótrofo que contempló los nodos G6P, F6P, PEP, PYR, AKG, SUC, FUM, MAL, SER y GLU, involucrando el ciclo de Calvin-Benson, glucólisis, ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato.

Como resultado principal se logró obtener un mapa simplificado de flujos metabólicos. En esta primera versión de resultados se evidencia la preferencia del sistema para mantener activo el ciclo de Calvin-Benson, esto concuerda con lo obtenido por Wu *et al.* (2015) para *C. protothecoides*, en donde estos utilizan un modelo más complejo para realizar sus cálculos, dando sustento a los resultados obtenidos con el modelo

simplificado. Además, se evidenció la inactividad de la enzima fosfofrutoquinasa al igual que en los resultados obtenido por Wu *et al* (2015).

Con el desarrollo del mapa simplificado de flujos metabólicos para *C. vulgaris* presentado en este trabajo, se evidencia el potencial de INST- MFA para esclarecer el metabolismo de las microalgas, un metabolismo poco explorado hasta el momento, aun siendo las microalgas organismo de sumo interés para su utilización como biofábricas. De los resultados presentados es claro que existe la necesidad de optimizar el modelo, y que una vez optimizado, la aplicación de este procedimiento a diferentes especies de microalgas implicará que sea posible comparar y determinar su potencial productivo y posibles objetivos de mejora que en un futuro podrán ser utilizados para la producción de metabolitos de interés industrial.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda utilizar un sensor de CO<sub>2</sub> al momento de hacer la inyección del NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> para corroborar que la presencia de <sup>12</sup>C no afecte el experimento.

Se recomienda experimentar con los tiempos de muestreo hasta conocer el tiempo suficiente que permita observar el equilibrio de los isotopómeros completamente marcados con carbono 13.

Se recomienda aumentar la concentración del extracto analizado en GC-MS para lograr realizar el análisis de 6PG.

Se recomienda añadir en el modelo de reacciones el reordenamiento de átomos generado por la succinato deshidrogenasa.

Para el establecimiento de la ecuación de biomasa se recomienda la determinación experimental de los valores que la conforman.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

Abbayes, H. des., y Bueno Bitschin, J. (1989). *Botánica : vegetales inferiores*.

Reverté.

Acket, S., Degournay, A., Merlier, F., y Thomasset, B. (2017). Data documenting the comparison between the theoretically expected values of free sugars mass

- isotopomer composition with standards using GC–MS and LC-HRMS for *Metabolic Flux Analysis. Data in Brief*, 12, 108–112.
- Barsanti, L., y Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology* (2nd ed.). Florida: CRC Press. Retrieved from [https://books.google.co.cr/books/about/Algae.html?id=AZClAgAAQBAJyredir\\_esc=y](https://books.google.co.cr/books/about/Algae.html?id=AZClAgAAQBAJyredir_esc=y)
- Boyle, N. R., y Morgan, J. A. (2009). Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Systems Biology*, 3(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-3-4>
- Cheah, Y. E., y Young, J. D. (2018). Isotopically nonstationary metabolic flux analysis (INST-MFA): putting theory into practice. *Current Opinion in Biotechnology*, 54, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.02.013>
- Chen, H., Zheng, Y., Zhan, J., He, C., y Wang, Q. (2017). Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism. *Biotechnology for Biofuels*, 10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0839-4>
- Dai, Z., y Locasale, J. W. (2017). Understanding metabolism with flux analysis: From theory to application. *Metabolic Engineering*, 43(June), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.09.005>
- Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C., y Yáñez, E. (2010). *Bioquímica: Conceptos esenciales*. Madrid: Editorial Medica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.co.cr/books?id=DhDxOpmcIfICyPg=PA218ydq=%22glucólisis%22yhl=esysa=Xyved=0ahUKEwiBk83q1NDeAhVBIVkKHau6AQAQ6AEIJzAA#v=onepageyq=%22glucólisis%22yf=true>
- Fernández, O., Dustet, J., y Chico, E. (2012). Dos aplicaciones de la técnica de análisis de flujos metabólicos. *Revista Cubana de Química*, XXIV, 70–82.
- Foguett, C., y Cascante, M. (2015). Modelización de flujos metabólicos: la era de la fluxómica. *SEBBM*, pp. 17–20.

- Fonseca, R. (2017). *Flavonoides y actividad antioxidante en la especie Ilex guayusa (Loes.)*. Tesis para optar por el grado de bachillerato. Universidad Politécnica Salesiana.
- Frigolet, M. y Gutierrez, R. (2017). Ciencias “ómicas”, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud?. *Revista Digital Universitaria*, 18(7). Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.18/num7/art54/index.html#nota1>.
- García, E., Hamedirad, M. y Zhao, H. (2016). Pathway design, engineering, and optimization. En Zhao, H., y Zeng, A.-P. (Eds.). (2018). *Synthetic Biology – Metabolic Engineering (162)*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-55318-4>
- Graham, J. E., Graham, L. E., y Wilcox, L. W. (2009). *Algae* (2nd Edition). San Francisco: Pearson. Retrieved from <https://www.pearson.com/us/higher-education/program/Graham-Algae-2nd-Edition/PGM217658.html>
- Guimerà, R y Sales, M. (2015). La promesa de las redes metabólicas. *SEBBM*, pp. 14–17.
- Jagadevan, S., Banerjee, A., Banerjee, C., Guria, C., Tiwari, R., Baweja, M., y Shukla, P. (2018). Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1181-1>
- Jazmin, L. y Young, J. (2013), In Systems Metabolic Engineering. Vol. 985, pp 269–295.
- Jazmin, L. y Young, J. (2013). Isotopically Nonstationary <sup>13</sup>C Metabolic Flux Analysis. In: . Syst. Metab. Eng. 985, pp. 269–295; Young JD. 2014. INCA: A computational platform for isotopically non-stationary metabolic flux analysis.
- Liang, Y., Kashdan, T., Sterner, C., Dombrowski, L., Petrick, I., Kröger, M., y Höfer, R. (2015). Chapter 2. Algal Biorefineries. En Pandey, A., Hofer, R., Larroche, C., Taherzadeh, M y Madhavan, K. (Eds), *Industrial Biorefineries y White Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00002-1>

- Liang, Y., Kashdan, T., Sterner, C., Dombrowski, L., Petrick, I., Kröger, M., y Höfer, R. (2015). Chapter 2. Algal Biorefineries. En Pandey, A., Hofer, R., Larroche, C., Taherzadeh, M y Madhavan, K. (Eds), *Industrial Biorefineries y White Biotechnology*. (pp. 36-84). Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00002-1>
- Lü, J., Sheahan, C., y Fu, P. (2011). Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy and Environmental Science*, 4(7), 2451–2466. <https://doi.org/10.1039/c0ee00593b>
- Mathews, C., Van Holde, K., Appling, D. Anthony, S. (2013). *Bioquímica*. 4ed. Pearson; Madrid.
- Niizawa, I. (2014). *Diseño, modelado y optimización de foto-bio- reactores destinados al cultivo de microalgas para diferentes aplicaciones tecnológicas*. Universidad Nacional del Litoral.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., y Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Rodríguez-Castillo, G., Amarelo-Santos, C., Guerrero-Barrantes, M., & Delgado dos Reis, A. (2016). Estudio de las características morfológicas y fisiológicas de *Chlorella protothecoides* orientado hacia la producción de lípidos para biocombustible. *Revista Tecnología En Marcha*, 29(6), 3. <https://doi.org/10.18845/tm.v29i6.2897>
- Sacristán-de Alva, M., Luna-Pabello, V. M., Cadena-Martínez, E., y Alva-Martinez, A. F. (2014). Producción de biodiésel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua. *Agrociencia*, 48(3), 271–284.
- Saldívar, M. (2005). *Estudio de la cinética de la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales con cromatografía de gases*. Tesis para optar por el grado de maestría. Tecnológico de Monterrey.
- Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B. M. R., Wennig, R., y Millet, M. (2009). Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of

- polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, 77(4), 1473–1482.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.043>
- Smolke, C. D. (2010). *The metabolic pathway engineering handbook: fundamentals*. CRC Press/Taylor & Francis. Retrieved from  
<https://books.google.co.cr/books?id=wzAPgK1ulBQC&pg=SA2-PA16&dq=6-Phosphogluconate&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj5kayunvbeAhXtp1kKHc46CKQQ6AEILjAB#v=onepage&q=6-Phosphogluconate&f=false>
- Thiele, I., & Palsson, B. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc*, 5 (1), 93–121.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203.A>
- Van Dien, S. (2016). Introducción. En Van Dien, S. (Ed). *Metabolic engineering for bioprocess commercialization*. Suiza: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41966-4>
- Venkatesan, J., Manivasagan, P. y Kim, S. (2015). Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. En S.Kim (Eds.). *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 1-9). Londres, Inglaterra: Elsevier Inc.
- Wang, L., Wang, H., Chen, X., Xu, Y., Zhou, T., Wang, X. y Ruan, R. (2018). Using *Chlorella vulgaris* to treat toxic excess sludge extract, and identification of its response mechanism by proteomics approach. *Bioresource Technology*, 253(November 2017), 188–196.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.039>
- Wilde, A., y Yukako, H. (2016). Transcriptional and post-transcriptional control of the plant circadian gene regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1857(1), 84–94. Retrieved from  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.002>
- Wu, C., Xiong, W., Dai, J., y Wu, Q. (2015). Genome-Based Metabolic Mapping and <sup>13</sup>C Flux Analysis Reveal Systematic Properties of an Oleaginous Microalga

- Chlorella protothecoides*. *Plant Physiology*, 167(2), 586–599.  
<https://doi.org/10.1104/pp.114.250688>
- Xiong, W., Liu, L., Wu, C., Yang, C., y Wu, Q. (2010). <sup>13</sup>C-Tracer and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analyses Reveal Metabolic Flux Distribution in the Oleaginous Microalga *Chlorella protothecoides*. *Plant Physiology*, 154(2), 1001–1011. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158956>
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., y Takriff, M. S. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research*, 21. Retrieved from [www.prweb.com/pdfdownload/8849957.pdf](http://www.prweb.com/pdfdownload/8849957.pdf)
- Yanes, O. (2015). Metabolómica: la ciencia ómica más multidisciplinaria. SEBBM, pp. 7–10.
- Young JD, Shastri AA, Stephanopoulos G, Morgan JA. (2011). Mapping photoautotrophic metabolism with isotopically nonstationary <sup>13</sup>C flux analysis. *Metab. Eng.* 13:656–665.
- Zainan, N. H., Srivatsa, S. C., Li, F., y Bhattacharya, S. (2018). Quality of bio-oil from catalytic pyrolysis of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Fuel*, 223(March), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.166>
- Zamboni, N., Fendt, S.-M., Rühl, M., & Sauer, U. (2009). <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis. *Nature Protocols*, 4(6), 878–892.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.58>

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Procedimiento para la preparación del medio de cultivo F2

Primeramente, se deben preparar las siguientes disoluciones Stock de Elementos trazas, Solución de Vitaminas por separado. Para preparar estas soluciones se debe:

1. Tomar un balón aforado de 100mL.
2. Poner una agitar magnético dentro del balón y colocarlo sobre la plantilla eléctrica.
3. Agregar aproximadamente un cuarto del volumen total del balón de agua destilada y dejar agitando moderadamente.
4. Pesar cada uno de los reactivos en una balanza analítica, y agregarlo inmediatamente al balón en agitación, luego ir agregando los demás. Para la preparación del Stock de soluciones madre se utiliza la tabla 1 y para las vitaminas la tabla 2.

Tabla 1. Composición de la solución madre de los elementos traza del medio f2

Elementos Trazas	g por 100mL
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	3.15
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	4.36
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.0098
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.0063
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.022
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.01
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0.18

Tabla 2. Composición de la solución madre de vitaminas de medio f2

Solución de vitaminas	por 100 mL
Cianocobalamina (1g/L)	(0.001g) 1mL
Tiamina	200mg
Biotina (1g/L)	(0.001g) 1mL

1. Cuando se hayan agregado todos los compuestos, se debe adicionar agua destilada hasta la mitad y debe asegurarse que todos los reactivos se hayan solubilizado completamente, sino se debe agregar un poco más de agua destilada.
2. Una vez hecho esto, se debe sacar el agitador magnético con un imán, cuando la pastilla este en borde de la boquilla, antes de sacarlo completamente, se realiza un lavado con una piseta de agua destilada.
3. Aforar el balón.
4. Tapar el balón y agitar por inversión hasta homogeneizar.
5. Trasvasar el contenido a una botella debidamente rotulada y ambientada con la mezcla.
6. Almacenar en la refrigeradora.

Para preparación de 1 litro de medio se debe:

1. Tomar un balón aforado de 1L.
2. Poner un agitador magnético dentro del balón y colocarlo sobre la plantilla eléctrica.
3. Agregar aproximadamente un cuarto del volumen total del balón de agua marina estéril y dejar agitando moderadamente.

Tabla 4. Componentes del medio f2

Compuestos	Por L
NaNO <sub>3</sub>	75 mg
NaHPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	5 mg
Na <sub>2</sub> SiO*9H <sub>2</sub> O	30 mg
Solución trazas	1 mL
Solución de vitaminas	0.5 mL

Nota: Pesar cada uno de los reactivos en una balanza analítica, y agregarlo inmediatamente al balón en agitación, luego ir agregando los demás. Adicionar los compuestos líquidos con instrumentos previamente ambientados.

1. Cuando se hayan agregado todos los compuestos, se debe adicionar agua marina estéril hasta la mitad y debe asegurar que todos los reactivos se hayan solubilizado completamente.
2. Una vez hecho esto, se debe sacar el agitador magnético con un imán, cuando la pastilla este en borde de la boquilla, antes de sacarlo completamente, se realizar un lavado con una piseta de agua marina estéril.
3. Aforar el balón.
4. Tapar el balón y agitar por inversión hasta homogeneizar.
5. Trasvasar el contenido a una botella debidamente rotulada y ambientada con la mezcla.
6. Autoclavar la botella con el medio del cultivo a 121 grados Celsius a 1.2 Kg/cm<sup>3</sup> de presión por 15 min.

Si no se va a utilizar inmediatamente, almacenar después del autoclavado en refrigeración a 4 grados Celsius.

## Anexo 2. Condiciones de la corrida para GS-MS

Las mediciones de las muestras se realizaron en un equipo TSQ 8000 Evo Triple cuadrupolo GC-MS, Thermo Fisher Scientific, utilizando una columna TG-5SILMS 30 m x 0,25 mm de 0,25  $\mu$ m. La temperatura del inyector se mantuvo en 230 °C utilizando un flujo de gas acarreador de 1 mL/min. La inyección se realizó utilizando una programación de “Splitless with Surge” con una presión de 130 kPa y una duración de 1.3 min a un flujo de 5 mL/min, realizándose inyecciones de 2  $\mu$ L. Las condiciones del horno se mantuvieron inicialmente a 50 °C durante 5 min para realizar una rampa hasta 320 °C a una velocidad de 6 °C/min para mantenerse en esta temperatura durante 10 min, para un tiempo de corrida de 57 min por muestra. La adquisición de datos se realizó en modo full scan (adquisición general) a partir del minuto 8 de la corrida, registrando masas entre 50 y 900 m/z.

## Anexo 3. Fragmentos de metabolitos detectados por medio de CG-MS con su respectiva masa iónica, masa y la abundancia natural de sus isotopómeros.

		M+0	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5
6PG							
	C1-C4	333	334	335	336	337	
	NMIAR	1	0.3	0.15	0.03	0.01	
	C5-C6	357	358	359			
	NMIAR	1	0.28	0.15			
	C1-C6	765	766	767	768	769	770
	NMIAR	1	0.66	0.46	0.2	0.08	0.03
G6P							
	C1-C2	160	161	162			
	NMIAR	1	0.12	0.04			
	C5-C6	357	358	359			
	NMIAR	1	0.28	0.15			
	C3-C6	471	472	473	474		
	NMIAR	1	0.39	0.22	0.06		
	C1-C6	706	707	708	709	710	711
	NMIAR	1	0.59	0.38	0.15	0.05	0.05
F6P							
	C4-C6	217	218	219	220		
	NMIAR	1	0.21	0.09	0.01		
	C5-C6	357	358	359			

	NMIAR	1	0.28	0.15			
	C4-C6	459	460	461	462		
	NMIAR	1	0.38	0.21	0.08		
	C1-C6	706	707	708	709	710	711
	NMIAR	1	0.59	0.38	0.15	0.05	0.05
PEP							
	C1-C3	369	370	371	372		
	NMIAR	1	0.28	0.22	0.05		
PYR							
	C1-C3	174	175	176			
	NMIAR	1	0.12	0.05			
	C1-C3	189	190	191			
	NMIAR	1	0.14	0.05			
AKG							
	C4-C5	156	157	158	159		
	NMIAR	1	0.12	0.08	0.02		
	C1-C5	288	289	290	291		
	NMIAR	1	0.24	0.1	0.01		
	C1-C5	304	306	306	307		
	NMIAR	1	0.23	0.1	0.02		
	C1-C5	319	320	321			
	NMIAR	1	0.24	0.1			
SUC							
	C1-C4	172	173	174			
	NMIAR	1	0.13	0.05			
	C1-C4	247	248	249	250		
	NMIAR	1	0.21	0.09	0.01		
FUM							
	C1-C4	245	246	247	248		
	NMIAR	1	0.21	0.09	0.01		
MAL							
	C1-C4	245	246	247	248		
	NMIAR	1	0.21	0.15	0.03		
	C1-C4	335	336	337	338		
	NMIAR	1	0.29	0.15	0.03		
SER							
	C1-C2	204	205	206	207		
	NMIAR	1	0.2	0.09	0.01		
	C1-C3	218	219	220	221		
	NMIAR	1	0.19	0.09	0.01		

	C1-C3	306	307	308	309		
	NMIAR	1	0.28	0.14	0.03		
ASP							
	C1-C3	232	233	234			
	NMIAR	1	0.19	0.09			
	C1-C4	334	335	336	337	338	
	NMIAR	1	0.29	0.15	0.03	0.01	
	C1-C4	349	350	351	352	353	
	NMIAR	1	0.31	0.15	0.03	0.01	
GLU							
	C1-C4	246	247	248	249		
	NMIAR	1	0.22	0.09	0.01		
	C1-C6	348	349	350	351		
	NMIAR	1	0.32	0.15	0.03		
	C1-C6	363	364	365	366	367	
	NMIAR	1	0.33	0.16	0.03	0.01	

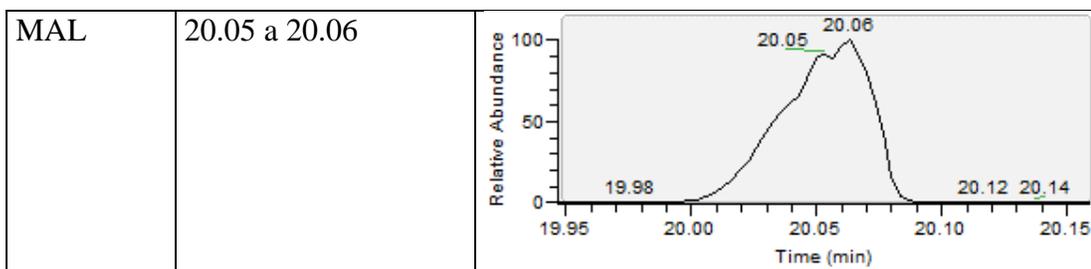
**Anexo 4.** Conteo celular de *C. vulgares* en biorreactor de tanque agitado

Conteo celular	Tiempo (días)	0	1.2	2.3	3.1	4.2	5.4
	Horas	0	29.8	55.2	74.8	99.7	128.7
	Hora	11:40:00 a.m.	02:30:00 p.m.	03:20:00 p.m.	12:30:00 p.m.	01:00:00 p.m.	03:40:00 p.m.
	1	1.70E+06	3.90E+06	4.10E+06	5.70E+06	9.60E+06	1.70E+07
	2	1.70E+06	3.20E+06	3.80E+06	6.40E+06	9.60E+06	1.80E+07
	3	1.30E+06	3.40E+06	4.20E+06	6.00E+06	9.10E+06	1.90E+07
	Promedio	1.57E+06	3.50E+06	4.03E+06	6.03E+06	9.43E+06	1.80E+07

**Anexo 5.** Tiempos de retención detectados en los estándares para los metabolitos G6P, F6P, PEP, PYR, AKG, SUC, FUM y MAL

Metabolito	Tiempo de retención	Cromatograma
6PG	35.44 a 35.52 min	

G6P	34 a 34.3 min	<p>Chromatogram for G6P showing relative abundance versus time (min). The x-axis ranges from approximately 33.7 to 34.5 minutes. The y-axis represents relative abundance from 0 to 100. The signal rises from 33.85 min, reaches a plateau between 34.03 and 34.30 min, and then drops sharply at 34.30 min. A small secondary peak is visible at 34.51 min.</p>
F6P	33.86 a 34.12 min	<p>Chromatogram for F6P showing relative abundance versus time (min). The x-axis ranges from approximately 33.7 to 34.2 minutes. The y-axis represents relative abundance from 0 to 100. The signal rises from 33.86 min, reaches a plateau between 33.99 and 34.10 min, and then drops sharply at 34.12 min.</p>
PEP	22.25 a 22.54 min	<p>Chromatogram for PEP showing relative abundance versus time (min). The x-axis ranges from approximately 21.8 to 23.0 minutes. The y-axis represents relative abundance from 0 to 100. The signal rises from 21.98 min, reaches a plateau between 22.49 and 22.54 min, and then drops sharply at 22.54 min.</p>
PYR	9.59 a 9.75 min	<p>Chromatogram for PYR showing relative abundance versus time (min). The x-axis ranges from approximately 9.3 to 10.2 minutes. The y-axis represents relative abundance from 0 to 100. The signal rises from 9.36 min, reaches a plateau between 9.66 and 9.75 min, and then drops sharply at 9.75 min.</p>
AKG	21.8 a 22.13 min	<p>Chromatogram for AKG showing relative abundance versus time (min). The x-axis ranges from approximately 21.5 to 22.5 minutes. The y-axis represents relative abundance from 0 to 100. The signal rises from 21.55 min, reaches a plateau between 22.08 and 22.13 min, and then drops sharply at 22.13 min.</p>
SUC	16.25 a 16.51 min	<p>Chromatogram for SUC showing relative abundance versus time (min). The x-axis ranges from approximately 15.7 to 17.1 minutes. The y-axis represents relative abundance from 0 to 100. The signal rises from 15.89 min, reaches a plateau between 16.42 and 16.51 min, and then drops sharply at 16.51 min.</p>

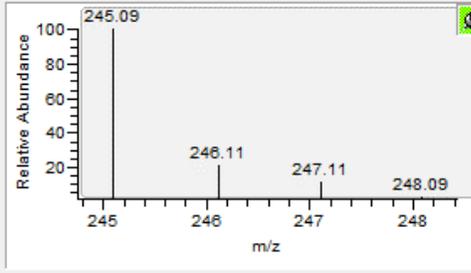
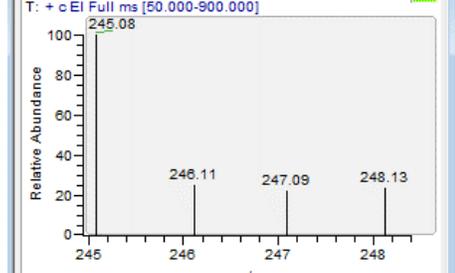
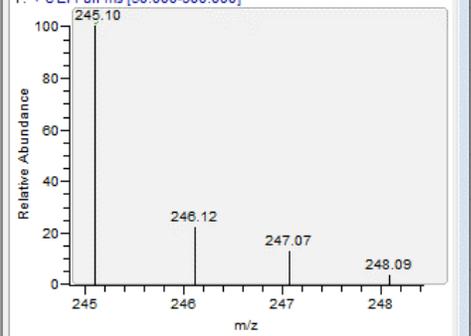
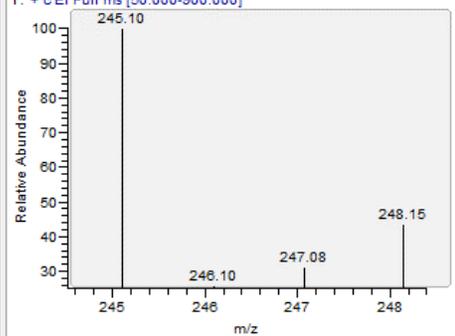
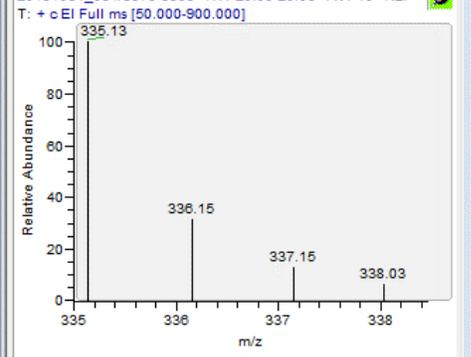
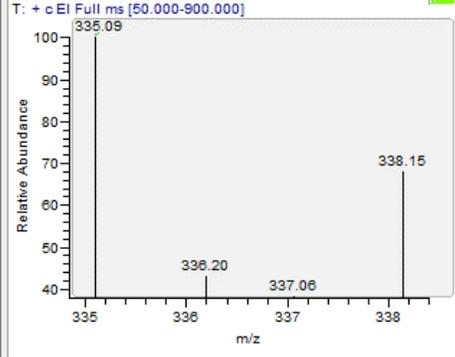


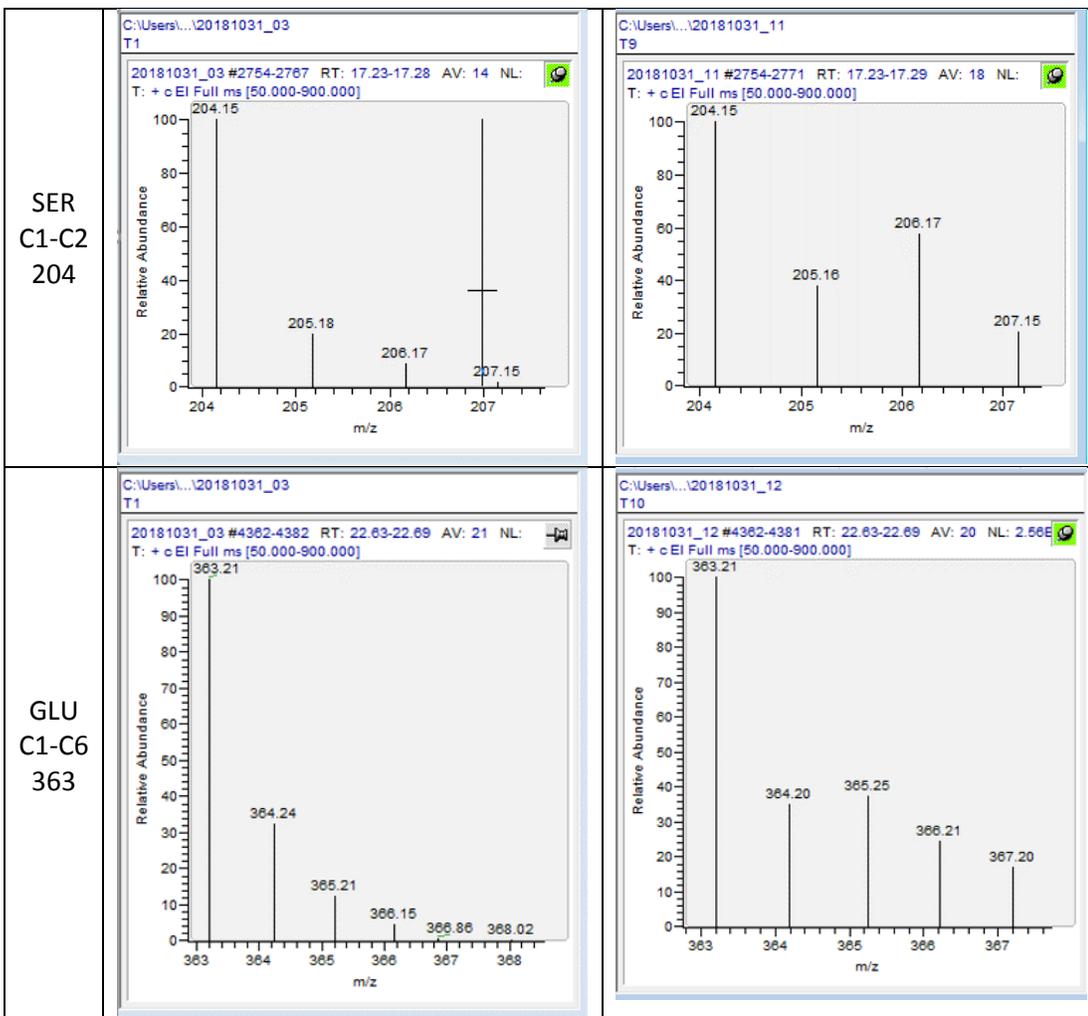
Anexo 6. Espectros para las muestras T1 y T10 de los metabolitos analizados

Meta bolito	T1	T10
G6P C1-C2 160	<p>20181031_03 #7743-7762 RT: 33.96-34.03 AV: 20 NL: T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>20181031_12 #7744-7759 RT: 33.97-34.02 AV: 16 NL: T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>
G6P C5-C6 357	<p>20181031_03 #7759-7763 RT: 34.02-34.03 AV: 5 NL: 1.36E8 T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>20181031_12 #7748-7757 RT: 33.98-34.01 AV: 10 NL: 1.13E8 T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>
F6P C4-C6 217	<p>20181031_03 #7699-7720 RT: 33.82-33.89 AV: 22 NL: T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>20181031_12 #7708-7715 RT: 33.85-33.87 AV: 8 NL: T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>

<p>F6P C5-C6 357</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1 20181031_03 #7705-7720 RT: 33.84-33.89 AV: 16 NL:  T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10 20181031_12 #7703-7719 RT: 33.83-33.88 AV: 17 NL:  T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>
<p>PEP C1-C3 369</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1 20181031_03 #4234-4240 RT: 22.20-22.22 AV: 7 NL:  T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10 20181031_12 #4234-4240 RT: 22.20-22.22 AV: 7 NL:  T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>
<p>PYR C1-C3 174</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1 20181031_03 #468-476 RT: 9.57-9.59 AV: 9 NL: 1.6  T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10 20181031_12 #468-476 RT: 9.57-9.59 AV: 9 NL: 1.6  T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>

<p>PYR C1-C3 158</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1</p> <p>20181031_03 #4105-4118 RT: 21.76-21.81 AV: 14 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10</p> <p>20181031_12 #466-477 RT: 9.56-9.60 AV: 12 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>
<p>AKG C1-C5 288</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1</p> <p>20181031_03 #4105-4118 RT: 21.76-21.81 AV: 14 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10</p> <p>20181031_12 #4105-4118 RT: 21.76-21.81 AV: 14 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>
<p>SUC C1-C4 247</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1</p> <p>20181031_03 #2441-2451 RT: 16.18-16.22 AV: 11 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10</p> <p>20181031_12 #2441-2454 RT: 16.18-16.23 AV: 14 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p>

<p>FUM C1-C4 245</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1</p> 	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10</p> <p>20181031_12 #2695-2704 RT: 17.03-17.06 AV: 10 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p> 
<p>MAL C1-C4 245</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1</p> <p>20181031_03 #3578-3596 RT: 20.00-20.06 AV: 19 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p> 	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10</p> <p>20181031_12 #3579-3593 RT: 20.00-20.05 AV: 15 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p> 
<p>MAL C1-C4 335</p>	<p>C:\Users\...\20181031_03 T1</p> <p>20181031_03 #3578-3596 RT: 20.00-20.06 AV: 19 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p> 	<p>C:\Users\...\20181031_12 T10</p> <p>20181031_12 #3579-3593 RT: 20.00-20.05 AV: 15 NL: </p> <p>T: + c EI Full ms [50.000-900.000]</p> 



**Anexo 7.** Datos de abundancia empleados en el software INCA para el diseño del modelo de flujos metabólicos

Metabolito		M+0	M+1	M+2	M+3	M+4
G6P						
RT 34.03	C1-C2	160	161	162		
		0.26	0.61	0.14		
		0.25	0.59	0.15		
		0.27	0.57	0.16		
		0.20	0.62	0.18		
		0.20	0.56	0.23		
		0.17	0.60	0.24		
		0.18	0.59	0.23		
		0.15	0.60	0.25		
		0.18	0.60	0.21		
		0.23	0.55	0.22		
	C5-C6	357	358	359		
		0.72	0.16	0.12		
		0.39	0.28	0.33		
		0.64	0.14	0.23		
		0.55	0.18	0.27		
		0.45	0.12	0.42		
		0.23	0.06	0.71		
		0.40	0.10	0.49		
		0.33	0.09	0.58		
		0.25	0.07	0.68		
		0.33	0.10	0.58		
F6P						
RT 33.86	C4-C6	217	218	219	220	
		0.63	0.20	0.12	0.05	
		0.59	0.21	0.12	0.08	
		0.58	0.20	0.12	0.10	
		0.55	0.15	0.11	0.19	
		0.44	0.12	0.11	0.33	
		0.36	0.10	0.10	0.44	
		0.41	0.09	0.09	0.41	
		0.32	0.07	0.06	0.54	
		0.37	0.09	0.07	0.47	
		0.42	0.09	0.08	0.41	
	C5-C6	357	358	359		

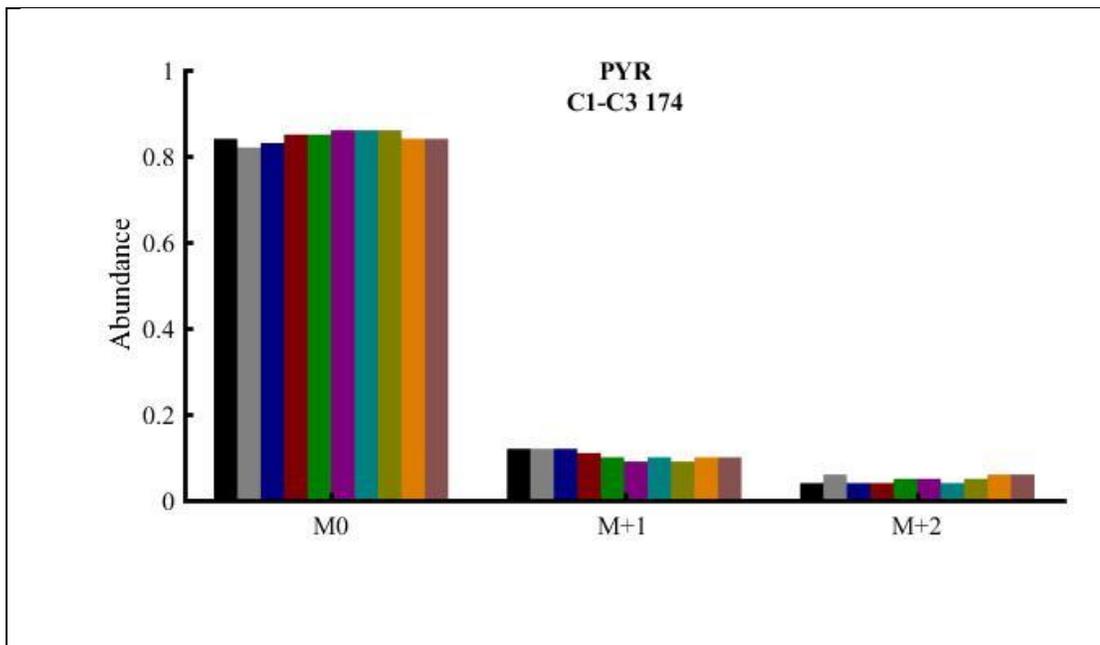
		0.73	0.15	0.12		
		0.68	0.17	0.15		
		0.70	0.15	0.15		
		0.58	0.20	0.22		
		0.48	0.16	0.36		
		0.43	0.13	0.44		
		0.49	0.09	0.42		
		0.33	0.12	0.55		
		0.41	0.14	0.45		
		0.39	0.10	0.51		
PEP						
RT 22.25	C1-C3	369	370	371	372	
		0.34	0.32	0.14	0.20	
		0.25	0.28	0.19	0.28	
		0.22	0.28	0.19	0.31	
		0.10	0.15	0.14	0.61	
		0.11	0.12	0.12	0.66	
		0.12	0.11	0.09	0.68	
		0.18	0.06	0.06	0.69	
		0.08	0.04	0.00	0.88	
		0.11	0.03	0.07	0.79	
		0.09	0.02	0.10	0.79	
PYR						
RT 9.5	C1-C3	174	175	176		
		0.84	0.12	0.04		
		0.82	0.12	0.06		
		0.83	0.12	0.04		
		0.85	0.11	0.04		
		0.85	0.10	0.05		
		0.86	0.09	0.05		
		0.86	0.10	0.04		
		0.86	0.09	0.05		
		0.84	0.10	0.06		
		0.84	0.10	0.06		
	C1-C3	158	159	160		

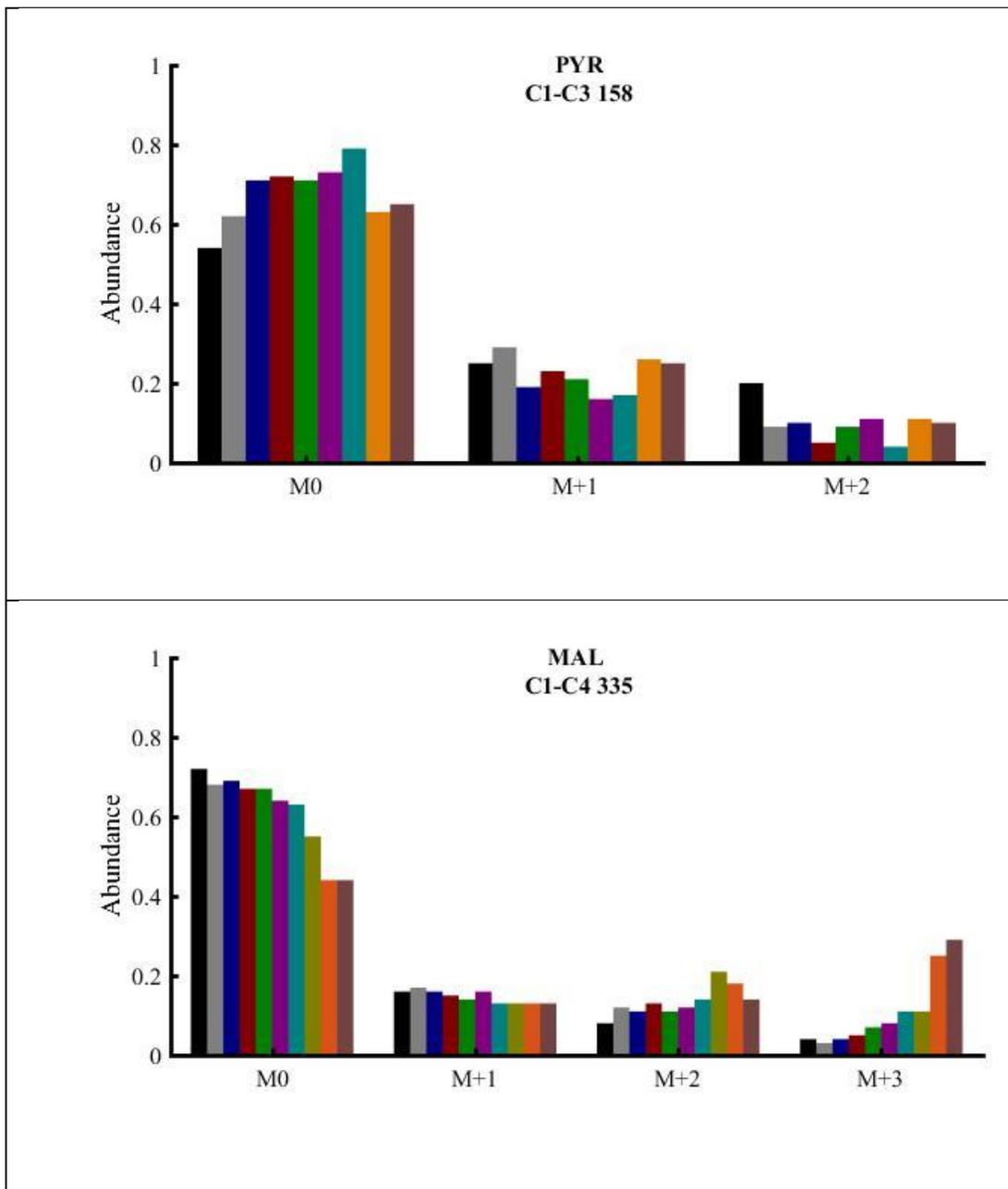
AKG						
	C1-C5	288	289	290	291	
		0.73	0.16	0.10	0.01	
		0.76	0.11	0.09	0.04	
		0.73	0.14	0.08	0.05	
		0.71	0.14	0.12	0.04	
		0.71	0.17	0.08	0.04	
		0.67	0.21	0.09	0.04	
		0.57	0.18	0.18	0.08	
		0.63	0.18	0.10	0.10	
		0.58	0.13	0.15	0.14	
		0.54	0.14	0.19	0.14	
SUC						
RT 16.25	C1-C4	247	248	249	250	
		0.79	0.12	0.08	0.01	
		0.80	0.12	0.07	0.01	
		0.78	0.13	0.07	0.01	
		0.77	0.14	0.07	0.01	
		0.78	0.12	0.09	0.01	
		0.78	0.13	0.07	0.02	
		0.76	0.13	0.09	0.01	
		0.77	0.12	0.09	0.02	
		0.76	0.14	0.07	0.03	
		0.77	0.13	0.08	0.03	
FUM						
RT 17.09	C1-C4	245	246	247	248	
		0.78	0.13	0.08	0.02	
		0.78	0.12	0.06	0.05	
		0.75	0.13	0.07	0.05	
		0.73	0.14	0.10	0.04	
		0.70	0.12	0.08	0.11	
		0.69	0.14	0.11	0.06	
		0.67	0.13	0.12	0.08	
		0.66	0.13	0.11	0.10	
		0.61	0.14	0.13	0.12	

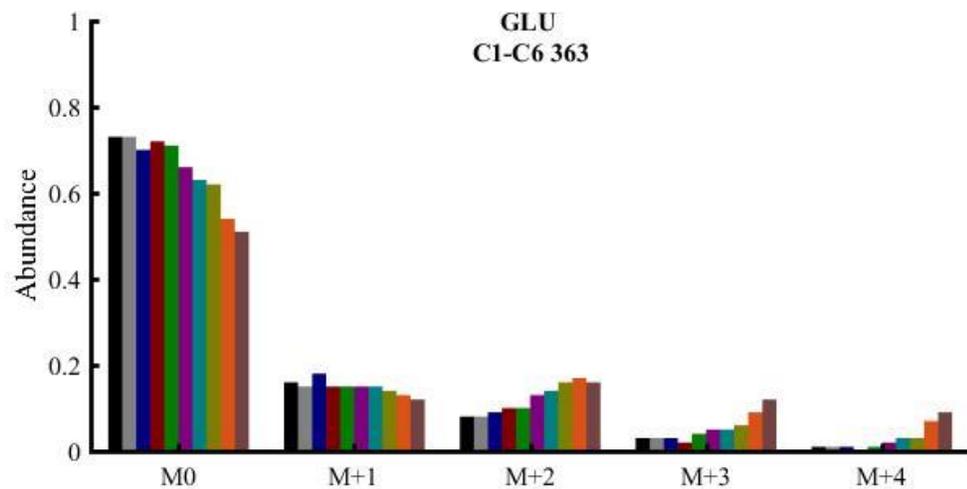
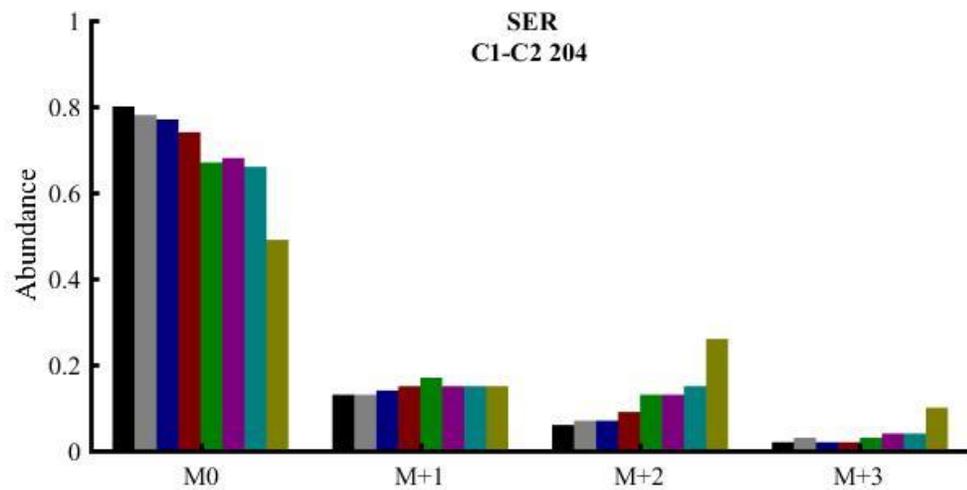
		0.61	0.12	0.12	0.14	
MAL						
RT 20.05	C1-C4	245	246	247	248	
		0.75	0.13	0.09	0.03	
		0.74	0.13	0.10	0.03	
		0.73	0.14	0.10	0.03	
		0.73	0.12	0.11	0.04	
		0.68	0.13	0.13	0.06	
		0.69	0.13	0.12	0.06	
		0.64	0.13	0.14	0.09	
		0.62	0.13	0.14	0.11	
		0.55	0.13	0.17	0.16	
		0.52	0.10	0.15	0.22	
	C1-C4	335	336	337	338	
		0.72	0.16	0.08	0.04	
		0.68	0.17	0.12	0.03	
		0.69	0.16	0.11	0.04	
		0.67	0.15	0.13	0.05	
		0.67	0.14	0.11	0.07	
		0.64	0.16	0.12	0.08	
		0.63	0.13	0.14	0.11	
		0.55	0.13	0.21	0.11	
		0.44	0.13	0.18	0.25	
		0.44	0.13	0.14	0.29	
SER						
RT 17.25	C1-C2	204	205	206	207	
		0.80	0.13	0.06	0.02	
		0.78	0.13	0.07	0.03	
		0.77	0.14	0.07	0.02	
		0.74	0.15	0.09	0.02	
		0.67	0.17	0.13	0.03	
		0.68	0.15	0.13	0.04	
		0.66	0.15	0.15	0.04	
		0.49	0.15	0.26	0.10	
GLU						
	C1-C6	363	364	365	366	367
		0.73	0.16	0.08	0.03	0.01
		0.73	0.15	0.08	0.03	0.01
		0.70	0.18	0.09	0.03	0.01

		0.72	0.15	0.10	0.02	0.00
		0.71	0.15	0.10	0.04	0.01
		0.66	0.15	0.13	0.05	0.02
		0.63	0.15	0.14	0.05	0.03
		0.62	0.14	0.16	0.06	0.03
		0.54	0.13	0.17	0.09	0.07
		0.51	0.12	0.16	0.12	0.09

**Anexo 8.** Absorción de  $^{13}\text{C}$  a través del tiempo para los fragmentos de los metabolitos analizados







## Anexo 9. Reacciones empleadas en el modelo de flujos metabólicos

CO2.ext (a) -> CO2 (a)  
RUBP.cbc (abcde) + CO2 (f) -> 3PG.cbc (cde) + 3PG.cbc (fba)  
3PG.cbc (abc) <-> G3P.glyc (abc)  
DHAP.glyc (cba) + G3P.glyc (def) <-> FBP.glyc (abcdef)  
G3P.glyc (def) + EC3 (abc) <-> F6P.glyc (abcdef)  
FBP.glyc (abcdef) <-> F6P.glyc (abcdef)  
F6P.glyc (abcdef) <-> E4P.cbc (cdef) + EC2 (ab)  
E4P.cbc (defg) + EC3 (abc) <-> S7P.cbc (abcdefg)  
S7P.cbc (abcdefg) <-> R5P.cbc (cdefg) + EC2 (ab)  
R5P.cbc (abcde) <-> RUBP.cbc (abcde)  
F6P.glyc (abcdef) <-> G6P.glyc (abcdef)  
G6P.glyc (abcdef) <-> Ru5P.ppp (bcdef) + CO2 (a)  
Ru5P.ppp (abcde) <-> R5P.ppp (abcde)  
Ru5P.ppp (abcde) <-> X5P.ppp (abcde)  
X5P.ppp (abcde) <-> G3P.glyc (cde) + EC2 (ab)  
G3P.glyc (abc) <-> 3PG.glyc (abc)  
3PG.glyc (abc) <-> 2PGA.glyc (abc)  
2PGA.glyc (abc) <-> PEP.glyc (abc)  
PEP.glyc (abc) <-> PYR.glyc (abc)  
PYR.glyc (abc) -> ACA.glyc (bc) + CO2 (a)  
ACA.glyc -> Fatty\_acids  
OAA.tca (abcd) + ACA.glyc (ef) -> CIT.tca (dcbfea)  
CIT.tca (abcdef) <-> ICI.tca (abcdef)  
ICI.tca (abcdef) <-> AKG.tca (abcde) + CO2 (f)  
AKG.tca (abcde) <-> SUC.tca (abcd) + CO2 (e)  
SUC.tca (abcd) <-> FUM.tca (abcd)  
FUM.tca (abcd) <-> MAL.tca (abcd)  
MAL.tca (abcd) <-> OAA.tca (abcd)  
3PG.glyc (abc) + Glu (defgh) -> Ser (abc) + AKG.tca (defgh)  
AKG.tca (abcde) -> Glu (abcde)  
0.715\*R5P.ppp + 3.624\*ACA.glyc + 1.191\*G6P.glyc + 0.501\*E4P.cbc +  
1.205\*3PG.glyc + 1.002\*PEP.glyc + 1.197\*PYR.glyc + 2.039\*OAA.tca (abcd) +  
1.233\*AKG.tca + 0.133\*G3P.glyc + 0.08853\*Ser + 1.5\*Fatty\_acids -> Biomass +  
0.683\*FUM.tca (abcd)