

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

C. B. S.

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FISIOLOGIA Y EL METABOLISMO DE LA

BACTERIA RUMINAL *Megasphaera elsdenii*.

Uso de modelos no estructurados y análisis de flujos metabólicos

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

Presenta:

**NICOLAS OSCAR SOTO CRUZ**  
Ingeniero Bioquímico Industrial  
Maestro en Ingeniería Química

2002

---

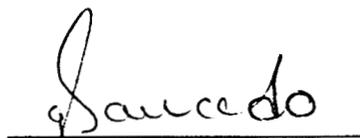
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

Nicolás Oscar Soto Cruz

El día 14 de mayo del año 2002

**Comité tutorial:**

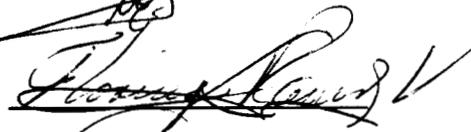
Director: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

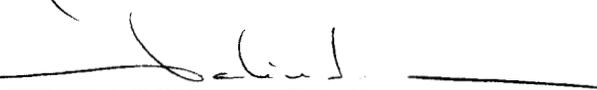


Asesor: Dra. Florina Ramírez Vives  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



**Comité de evaluación**

Presidente: Dr. Juvencio Galíndez Mayer  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN



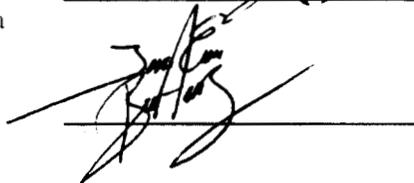
Secretario: Dr. Ernesto Favela Torres  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal: Dra. Florina Ramírez Vives  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal: Dr. Enrique Botello Alvarez  
Instituto Tecnológico de Celaya



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-0.1 Doctorado en Biotecnología**

*A Dios*

*A mi amada Gloria*

*A mis adorados hijos: Oscar, Alejandro y Cecilia*

*A la grata memoria de mi madre*

*A mi padre*

*A mis hermanos y a toda la gran familia*

*Si los sueños no se hicieran realidad,  
la naturaleza no nos permitiría tenerlos*

JOHN UPDIKE

## AGRADECIMIENTOS

Mi más profunda gratitud, admiración y respeto al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda y al Dr. Ernesto Favela Torres. No encontré palabras para expresar lo que para mí ha significado que sean mis amigos, consejeros y directores científicos. Gracias por su ejemplo, por tratar de transmitirme esa actitud crítica que los caracteriza y por haber soportado a este, su obstinado discípulo, que profesa un gran afecto por ustedes.

A la Dra. Florina Ramírez Vives, al Dr. Juvencio Galíndez Mayer y al Dr. Enrique Botello Alvarez, por sus acertados comentarios y correcciones a mi trabajo.

Al Dr. Sevastianos Roussos, por recibirme en su laboratorio, por lo mucho que me enseñó en tan poco tiempo y por hacer llevaderos, con su simpatía y jovialidad, esos meses que pasé lejos de mi familia. Gracias también a Isabel, Susy, Jean Jaques, Eva, José Luis, Mercedes y a todos los entrañables amigos que encontré en Marsella. Aprecio mucho el apoyo de Mme. Marie Laure Fardeau, Mr. Jean Louis Garcia, Mr. Didier Alazard y Mr. Frédéric Verhe.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca que hizo posible mi formación doctoral. A la Unión Europea por el financiamiento parcial de la tesis (proyecto: I.C.18\*CT970185) y a la red  $\alpha$ fa que me otorgó la beca que hizo posible una fructífera estancia en el laboratorio de microbiología del IRD-Marsella (proyecto ALR/B7-3011/94.04-6.0063).

A todos los compañeros de la Planta Piloto, por mantener ese agradable ambiente de trabajo, especialmente a Doña María Elena, Romano, Tania, Arely, Sergio, Luciano, Cristobal, Juan León, Gerardito y Paty Ruiz.

## RESUMEN

*Megasphaera elsdenii* es la principal especie consumidora de lactato en el rumen, por lo que se ha considerado uno de los microorganismos más importantes en la preservación del equilibrio ecológico ruminal. Esta bacteria es capaz de fermentar hasta el 97% del lactato presente en el rumen. La remoción de lactato es importante, ya que su acumulación causa problemas como la reducción de la salivación, redistribución de agua en el cuerpo y daño al rumen y otros tejidos, entre otros desordenes.

Se conocen varias características fisiológicas importantes de *M. elsdenii*. Es conocido que: *i*) el CO<sub>2</sub> y los ácidos grasos volátiles (AGV) acetato, propionato, butirato y valerato son los principales productos del metabolismo del lactato, *ii*) *M. elsdenii* utiliza lactato en preferencia a la glucosa en medios que contienen ambas fuentes de carbono, *iii*) *M. elsdenii* es, entre los microorganismos conocidos como consumidores de lactato en el rumen, el único que no está sujeto a represión catabólica por azúcares solubles, *iv*) el transporte de lactato a través de la membrana parece ocurrir por transporte activo que no depende de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>. A pesar de que se ha señalado que la producción de AGV por *M. elsdenii* depende de la cepa empleada y de la composición del medio de cultivo, la relación cinética entre el crecimiento y la formación de productos no se ha establecido.

Por otra parte, acerca del metabolismo de *M. elsdenii*, es conocido que: *i*) una vez que el lactato es introducido a la célula de *M. elsdenii* la lactato racemasa intercambia entre los isómeros (L y D) de acuerdo a las necesidades de la célula, *ii*) en la vía del acrilato, ATP, CO<sub>2</sub>,

acetato y propionato se producen a partir de lactato, *iii*) el valerato es producido a partir de un acetilCoA y un propionilCoA, mientras que dos moléculas de acetilCoA son condensadas para producir butirato, *iv*) algunos estudios han sugerido que *M. elsdenii* utiliza la vía de Embden-Meyehorff-Parnas y existe evidencia de la utilización de la vía de las pentosas fosfato cuando *M. elsdenii* crece sobre glucosa. La información acerca de otras vías del metabolismo de *M. elsdenii* es escasa y no existe una revisión sobre el tema. Aunque algunos estudios enzimáticos y de consumo de sustratos han contribuido a ampliar el conocimiento del metabolismo de *M. elsdenii*, no existe una red metabólica completa.

El presente documento revisa el conocimiento actual sobre la fisiología y el metabolismo de *M. elsdenii* y contribuye a extender el conocimiento acerca de esta bacteria, durante el crecimiento en lactato, usando modelos matemáticos. La realización de este estudio para la utilización de lactato se consideró de particular interés, debido a la importancia de la remoción de lactato en el rumen.

En este trabajo se aplicó un modelo no estructurado para las cinéticas de crecimiento, consumo de lactato y producción de AGV. El modelo permitió establecer el grado de asociación entre el crecimiento, el consumo de lactato y la producción de AGV, bajo diferentes condiciones nutricionales.

Se propuso la utilización de un criterio estadístico, ya establecido en la literatura, para determinar la significancia de los parámetros involucrados en las ecuaciones de Pirt y

Luedeking-Piret. Los parámetros ajustados para la ecuación de Pirt indicaron que, en el medio complejo, el lactato fue utilizado completamente para el crecimiento y la formación de productos, mientras que en medio mínimo una fracción de la energía obtenida del lactato fue usada para mantenimiento. El modelamiento de la producción de AGV por medio de la ecuación de Luedeking-Piret indicó que, independientemente del tipo de medio utilizado, acetato y propionato son productos asociados al crecimiento, mientras que butirato y valerato son productos parcialmente asociados al crecimiento. Los productos asociados al crecimiento están relacionados al metabolismo energético y los productos parcialmente asociados están relacionados al consumo de equivalentes de reducción.

Este trabajo propone un modelo estequiométrico, constituido por las vías del acrilato, gluconeogénesis y de las pentosas fosfato, para *M. elsdenii* creciendo en presencia de lactato. La red bioquímica de reacción (RBR), fue propuesta usando la información de la literatura y soportada por la determinación de seis actividades enzimáticas, las cuales no habían sido medidas previamente en cultivos de *M. elsdenii*. Las metodologías de análisis de consistencia y análisis de flujos metabólicos fueron aplicadas para validar el modelo estequiométrico, el cual consiste de 20 reacciones metabólicas.

Se llevaron a cabo cultivos continuos en un medio definido a dos tasas de dilución (0.05 y 0.1 h<sup>-1</sup>). El análisis de consistencia, aplicado al modelo de caja negra (balances de C, H, O y N), permitió la validación de la calidad de los datos experimentales. Por otra parte, el análisis de consistencia, aplicado a la RBR, permitió validar la suposición de estado pseudoestacionario

para los compuestos intracelulares. El modelo estequiométrico fue completamente validado comparando las mediciones experimentales (L-lactato, acetato, propionato, butirato, valerato y biomasa) contra los valores predichos por la distribución de flujos metabólicos. En su conjunto, los resultados presentados contribuyen a extender el conocimiento de la bioquímica de *M. elsdenii* creciendo sobre lactato, soportando la utilización de la gluconeogénesis, la vía de las pentosas fosfato y un puente metabólico constituido por las reacciones de la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxicinasa.

## ABSTRACT

*Megasphaera elsdenii* is the main lactate-utilizing species in the rumen and has been considered one of the most important ruminal microorganisms. It is able to ferment up to 97% of the rumen lactate. Lactate removal is important in rumen ecology, because its accumulation causes dysfunction such as reduced salivation, redistribution of water in the body and damage to the rumen and other tissues, among other disorders.

Many important physiological characteristics of *M. elsdenii* grown on lactate have been established previously. It is known that: *i*) CO<sub>2</sub> and the volatile fatty acids (VFA) acetate, propionate butyrate and valerate are the main products of lactate metabolism, *ii*) *M. elsdenii* utilizes lactate in preference to glucose in media with both carbon sources, *iii*) *M. elsdenii* is the only microorganism that is not subject to catabolite repression by soluble sugars, among the lactate-utilizing microorganisms known in the rumen, *iv*) lactate transport across the membrane appears to occur by active transport that is not dependent on Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>, among other characteristics. Although it has been reported that the production of VFA by *M. elsdenii* strongly depends on the strain employed and culture medium composition, the kinetic relationship between growth and product formation has not been reported.

On the other hand, about the metabolism of *M. elsdenii*, it is known that: *i*) once lactate is introduced into *M. elsdenii*, lactate racemase exchanges the isomers (L and D) according to the cell requirements, *ii*) in the acrylate pathway, ATP, CO<sub>2</sub>, acetate and propionate are produced from lactate, *iii*) valerate is formed starting from an acetyl-CoA and a propionyl-CoA, while

two molecules of acetyl-CoA are condensed to produce butyrate, *iv*) some studies have suggested that *M. elsdenii* utilizes the Embden-Meyehorff-Parnas pathway and there is evidence of the utilization of the pentose phosphate pathway by *M. elsdenii* when it is grown in glucose. The information about other pathways of *M. elsdenii* biochemistry is scattered and there is no a review that gathers all this information together.

Then, although some enzyme and substrate consumption studies have contributed to enhancing the knowledge of the biochemistry of *M. elsdenii*, there is no an integrated metabolic network.

This document reviews the current knowledge about the physiology and metabolism of *M. elsdenii* and, using mathematical models, contributes to extend our knowledge about this bacterium during growth in lactate. Since lactate removal is important in the rumen as pointed out above, it was considered of particular interest to carry the study during lactate utilization.

In this work, an unstructured model for the kinetics of growth, lactate consumption and VFA production by this ruminal bacterium was applied. The model permitted to establish the degree of association between growth, lactate consumption and VFA production under different nutritional conditions. Use of the Pirt and Luedeking-Piret equations permit the determination of the effect of medium composition on the metabolic patterns of *M. elsdenii* grown in minimal and complex media with lactate as the major carbon source. In order to establish the significance of the parameters involved in the Pirt and Luedeking-Piret equations, a quantitative statistical criterion was proposed.

The fitted parameters of the model suggested that, in the complex medium, lactate was completely used for growth and product formation, while in the minimal medium a fraction of the energy obtained from lactate was used for maintenance purposes. Modeling of VFA production by the Luedeking-Piret equation showed that, independent of the type of medium, acetate and propionate are growth-associated products, while butyrate and valerate are only partially growth-associated. The growth-associated products are related to energy yielding metabolism and the non growth-associated products are related to the consumption of reducing equivalents.

A stoichiometric model, constituted by the acrylate, gluconeogenesis and pentose phosphate pathways, was proposed for the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii* grown in the presence of lactate. The biochemical reaction network (BRN), was proposed using information from the literature and supported by six enzyme activities, which have not been measured previously in *M. elsdenii* cultures. The methodologies of data consistency and metabolic flux analysis were applied to validate the stoichiometric model, which consisted of 20 metabolic reactions.

Continuous cultures of *M. elsdenii* were carried out in a defined medium at two dilution rates (0.05 and 0.1 h<sup>-1</sup>). Data consistency analysis applied to the black box model (C, H, O and N), allowed the validation of the quality of the experimental data. On the other hand, data consistency analysis, applied to the complete BRN, allowed the validation of the pseudo-steady

state assumption for the intracellular compounds. The stoichiometric model was validated comparing the experimental measurements (L-lactate, acetate, propionate, butyrate, valerate and biomass) with the values predicted by the metabolic flux distribution calculations. Collectively, the results presented here contributed to extending our knowledge of the biochemistry of *M. elsdenii* grown in lactate, supporting the utilization of *i*) gluconeogenesis, *ii*) the pentose phosphate pathway and *iii*) a metabolic bridge constituted by the reactions of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase.

## INDICE DEL CONTENIDO

Portada	<i>i</i>
Dedicatoria	<i>iv</i>
Agradecimientos	<i>v</i>
Resumen	<i>vi</i>
Abstract	<i>x</i>
Indice del contenido	<i>xiv</i>
Presentación	<i>xvii</i>
1. Revisión de la literatura	1
1.1. Fisiología y metabolismo de <i>Megasphaera elsdenii</i>	3
1.1.1. Fisiología de <i>Megasphaera elsdenii</i>	3
1.1.2. Metabolismo de <i>Megasphaera elsdenii</i>	7
1.2. Modelado matemático	11
1.2.1. Generalidades sobre modelos matemáticos	11
1.2.2. Modelos no estructurados	14
1.3. Análisis de flujos metabólicos	22
1.3.1. Modelos de caja negra y análisis de sistemas sobredeterminados	23
1.3.2. Modelos estequiométricos	30

2. Justificación	36
3. Objetivos	40
3.1. Objetivo general	41
3.2. Objetivos particulares	41
4. Materiales y métodos	42
4.1. Microorganismo	43
4.2. Medios de cultivo	43
4.3. Cultivo anaerobio	46
4.3.1. Preparación de medio de cultivo en tubos y frascos	46
4.3.2. Preparación de medio de cultivo en reactor	49
4.4. Preparación de inóculo e inoculación de cultivos	49
4.5. Tratamiento de muestras	52
4.6. Técnicas analíticas	53
4.6.1. Concentración de biomasa	53
4.6.2. Concentración de L-lactato	54
4.6.3. Concentración de ácidos grasos volátiles	54
4.7. Preparación de extractos libres de células para los ensayos de actividad enzimática	55
4.8. Ensayos de actividades enzimáticas	57
5. Asociación entre el crecimiento, el consumo de lactato y la producción de AGV	60
5.1. El modelo no estructurado	61
5.2. Cultivo por lote de <i>Megasphaera elsdenii</i>	68
5.2.1. Efecto de la composición del medio	68
5.2.2. Implicaciones biológicas de los parámetros del modelo	75
5.3. Alcances del modelo no estructurado	78
5.4. Conclusiones	81

6. Modelo estequiométrico del metabolismo de <i>Megasphaera elsdenii</i>	82
6.1. El modelo estequiométrico	84
6.1.1. Conocimiento previo del metabolismo de <i>Megasphaera elsdenii</i>	84
6.1.2. Un modelo estequiométrico completo: actividades enzimáticas	85
6.2. Cultivo continuo de <i>Megasphaera elsdenii</i>	92
6.2.1. Presentación de resultados y comparación con el cultivo por lote	92
6.2.2. Análisis de consistencia	100
A. Validación de los datos experimentales en el modelo de caja negra	100
B. Validación de la suposición de estado pseudoestacionario	104
6.2.3. Análisis de flujos metabólicos	107
A. Distribución de flujos metabólicos	107
B. Validación del modelo	111
C. Análisis de sensibilidad	113
6.3. Alcances del modelo estequiométrico	114
6.4. Conclusiones	117
8. Conclusiones y perspectivas	119
Referencias bibliográficas	125
Apéndices	143
Apéndice 1. Nomenclatura	144
Apéndice 2. Cálculos para transformar datos a términos de unidades C-mol	147
Apéndice 3. Metodología del análisis de flujos metabólicos	148
Apéndice 4. Productos de la formación doctoral	160

## PRESENTACION

*Megasphaera elsdenii* ha sido considerado como uno de los microorganismos más importantes del rumen, ya que es la especie predominante que consume lactato. La acumulación de lactato en el rumen es resultado del consumo abundante de azúcares fácilmente fermentables y conduce a un cuadro de disminución del pH (menor a 5.2) conocido como acidosis láctica, lo que afecta principalmente a las bacterias celulolíticas y a los protozoarios, y rompe el equilibrio ecológico de la microflora. Por lo tanto, la eliminación de lactato es de gran importancia en la ecología del rumen, pues contribuye a mantener una fermentación ruminal estable y a evitar otros problemas ocasionados por la acumulación de lactato como la reducción de la salivación, redistribución de agua en el cuerpo y daño al rumen y otros tejidos.

En el capítulo 1 se presenta una revisión de la literatura, en la que se describen los diversos estudios sobre este microorganismo. Las condiciones de cultivo, en cuanto a requerimientos nutricionales y efecto de los factores ambientales, se encuentran bien definidas. Se conocen varias características fisiológicas y los parámetros cinéticos relacionados con la ecuación de Monod han sido determinados bajo diversas condiciones de cultivo. Por otra parte, la bioquímica de *M. elsdenii* ha sido estudiada de manera relativamente extensa, pero no existe un trabajo que integre el conocimiento que se tiene en este campo y existen algunos vacíos importantes en el conocimiento de su metabolismo. La ruta de producción de acetato y propionato, a partir de lactato, es bien conocida y existe buena evidencia sobre las secuencias de reacción que llevan a la formación de butirato y valerato. Además hay evidencias de que *M. elsdenii* posee los sistemas enzimáticos para utilizar las vías EMP y PP, cuando crece

utilizando glucosa como sustrato. En la segunda parte del capítulo 1 se revisan los antecedentes sobre modelado matemático, en particular sobre modelos no estructurados y estructurados, con especial énfasis en el análisis de flujos metabólicos.

En seguida, basada en la revisión bibliográfica, se presenta la justificación del presente trabajo en el capítulo 2. En este capítulo se resaltan sobre todo los siguientes puntos. Primero, no se ha llevado a cabo un estudio cinético de la formación de ácidos grasos volátiles (AGV), que permita establecer el nivel de asociación entre el crecimiento bacteriano y la formación de productos. Así mismo, no existe un estudio detallado acerca de la forma en que *M. elsdenii* satisface sus requerimientos de energía de mantenimiento, bajo diferentes condiciones de cultivo. Por lo que la realización de un estudio sistemático en este campo, permitiría hacer una contribución importante a la fisiología de este microorganismo. Por otra parte, se insiste en el hecho de que no existe un trabajo que integre el conocimiento que se tiene en este campo y existen algunos vacíos importantes en el conocimiento de su metabolismo, en particular no hay información sobre cómo se conectan las vías EMP y PP con la vía del acrilato, cuando *M. elsdenii* crece sobre lactato. Es decir, cómo se evitan las reacciones irreversibles de la vía EMP: la conversión de PEP a piruvato y la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato, al utilizar la gluconeogénesis. Finalmente, se resalta el hecho de que el análisis de flujos metabólicos no ha recibido atención, para aplicarlo a microorganismos del rumen.

Después de presentar los objetivos, y material y métodos, en los capítulos 3 y 4, en el capítulo 5 se presenta la aplicación de un modelo no estructurado al cultivo por lote de *M. elsdenii*, bajo

diferentes condiciones nutricionales. El capítulo comienza por proponer las ecuaciones del modelo no estructurado que permite establecer el nivel de asociación entre el crecimiento, el consumo de lactato y la producción de ácidos grasos volátiles por *M. elsdenii*. Las ecuaciones se ajustan a los datos experimentales de crecimiento, consumo de lactato y producción de ácidos grasos volátiles en cultivo por lote. Así mismo, se discuten las implicaciones biológicas de los parámetros del modelo y los alcances del mismo. En el capítulo 6 se recapitula el conocimiento previo de la bioquímica de *M. elsdenii*, presentado en el capítulo 1, y se propone una red metabólica, soportada en las actividades enzimáticas determinadas en este trabajo. Posteriormente se presentan los resultados del cultivo continuo de *M. elsdenii* en medio mínimo. El análisis de los datos de cultivo continuo inicia con los balances generales de carbono y grado de reducción. Enseguida se presenta el análisis de los datos en un modelo de caja negra que, al tratarse de un sistema sobredeterminado, permite calcular el índice de consistencia y validar la calidad de los datos experimentales. Llegado a este punto, se retoma la red metabólica propuesta y se calcula el índice de consistencia para el modelo estequiométrico completo, lo que permite validar la suposición de estado pseudoestacionario para los metabolitos intracelulares. Finalmente, se calculan y discuten los flujos metabólicos, que sirven para validar el modelo estequiométrico.

Las conclusiones, que se presentan en el capítulo 7, resaltan los tres aspectos originales del trabajo. La realización de un estudio sistemático de las cinéticas de consumo de lactato y producción de AGV por *M. elsdenii*, la integración de la información sobre la bioquímica de *M. elsdenii* en un modelo estequiométrico y la aplicación del análisis de flujos metabólicos.

---

**1. REVISION  
DE LA LITERATURA**

---

## 1. Revisión de la literatura

La población bacteriana del rumen es muy variada e incluye bacterias celulolíticas, lactolíticas, metanógenas, entre otras (Fonty *et al.*, 1987). Algunas de las bacterias representativas que se encuentran comúnmente en el rumen son: *Oscilospira guillermondi*, *Bacillus merismopedioides*, *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, *Bacteroides succinogenes* (Hungate, 1966; Nagaraja *et al.*, 1992).

De la gran población bacteriana que se encuentra presente en el rumen se destacan algunas especies, entre ellas *M. elsdenii*, que ha sido considerado como uno de los microorganismos más importantes del rumen (Counotte *et al.*, 1981; Marounek *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1994), por ser la especie predominante que consume lactato, llegando a consumir hasta el 97% (Counotte *et al.*, 1981). La acumulación de lactato en el rumen (acidosis láctica) es resultado del consumo abundante de azúcares fácilmente fermentables y conduce a un cuadro de disminución del pH (menor a 5.2), lo que afecta principalmente a las bacterias celulolíticas y a los protozoarios, y rompe el equilibrio ecológico de la microflora (Slyter, 1976; Kung y Hession, 1995). La eliminación de lactato es, por lo tanto, de gran importancia en la ecología del rumen, ya que contribuye a mantener una fermentación ruminal estable (Counotte *et al.*, 1981), además de que se evitan otros problemas ocasionados por la acumulación de lactato como la reducción de la salivación, redistribución de agua en el cuerpo y daño al rumen y otros tejidos (Slyter, 1976).

## 1.1. Fisiología y metabolismo de *Megasphaera elsdenii*

### 1.1.1. Fisiología de *Megasphaera elsdenii*

*Megasphaera elsdenii*, originalmente conocido como *Peptostreptococcus elsdenii* (Rogosa, 1971), es un coco Gram-negativo, de aproximadamente 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Hobson *et al.*, 1958). Es una bacteria encontrada en gran número de animales con dietas basadas en granos (Hobson *et al.*, 1958), que carece de estructuras para desplazarse (Elsden *et al.*, 1956). Es un anaerobio estricto (Marounek *et al.*, 1989) aunque no requiere de condiciones de óxido-reducción tan estrictas como otros microorganismos del rumen (Elsden *et al.*, 1956; Hobson *et al.*, 1958; Loesche, 1969). El rango de temperatura en el que crece mejor es de 37 a 39°C (Marounek *et al.*, 1989; Hodrová *et al.*, 1995).

En cuanto al efecto del pH, el rango de mejor crecimiento es de 6-7, si bien se considera a *M. elsdenii* como un microorganismo ácido-tolerante, ya que crece hasta pH de 4.2 (Russell *et al.*, 1979; Russell y Dombrowsky, 1980). Esta característica de ácido-tolerante se ha atribuido a su capacidad de disminuir su pH intracelular, como respuesta a descensos del pH externo (Russell, 1991). Miwa *et al.* (1997) demostraron que la capacidad de *M. elsdenii* para disminuir su pH interno está asociada a la presencia de  $\text{H}^+$ -ATPasa, en cantidades mayores a otras bacterias del rumen que no son ácido-tolerantes, y a su capacidad de sintetizar más  $\text{H}^+$ -ATPasa, en respuesta al descenso del pH externo.

Por otra parte, aunque se había señalado que *M. elsdenii* requiere aminoácidos, como nutrientes esenciales para su crecimiento (Bryant y Robinson, 1962; Hungate, 1966), Forsberg (1978) quién llevó a cabo el estudio más completo y detallado sobre las características nutricionales de *M. elsdenii*, demostró la capacidad de *M. elsdenii* para crecer en un medio químicamente definido, conteniendo sales minerales,  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrógeno, sulfato como fuente de azufre, glucosa como fuente de energía, acetato como fuente de carbono y las vitaminas biotina, piridoxina y pantotenato de calcio. Cuando el lactato es usado como fuente de carbono, con cisteína presente como agente reductor, el acetato no se requiere. Posteriormente, Hino *et al.* (1991) demostraron que el acetato sirve como aceptor de electrones más que como fuente de carbono, cuando la glucosa es utilizada como sustrato.

Marounek y colaboradores (1989), y posteriormente Hino y colaboradores (1994), demostraron que *M. elsdenii* utiliza lactato en preferencia a la glucosa cuando los dos sustratos están presentes. Esta bacteria también utiliza fructosa, maltosa y manitol (Russell y Baldwin, 1978; Russell *et al.*, 1981; Marounek *et al.*, 1989; Hodrová *et al.*, 1995). Así mismo, tiene la capacidad de desaminar aminoácidos, lo cual se ha relacionado a sus necesidades de energía de mantenimiento, más que al crecimiento (Russell y Baldwin, 1979b; Wallace, 1986). Por otra parte, *M. elsdenii* es incapaz de utilizar polioles como sorbitol, xilitol, dulcitol, así como pentosas como ribosa y arabinosa (Marounek *et al.*, 1989), como fuentes de carbono y/o energía. Un aspecto que se ha resaltado en la bibliografía es el hecho de que *M. elsdenii* es, dentro del grupo de bacterias del rumen conocidas como consumidoras de lactato, la única que

no está sujeta a represión catabólica por otros sustratos, principalmente glucosa (Russell y Baldwin, 1978; Marounek *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1994).

El transporte de nutrientes hacia el interior de la célula de *M. elsdenii* ha sido estudiado por diversos autores. Las hexosas se asimilan por medio del sistema de la fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (Dills *et al.*, 1981; Martin y Russell, 1986; Martin, 1994; Martin y Wani, 2000). Waldrip y Martin (1993), utilizando ensayos de asimilación de L-[<sup>14</sup>C]lactato, observaron que ni el sodio ni el potasio, están involucrados en el transporte activo de lactato. Lo anterior es consistente con el hecho de que *M. elsdenii* no es afectado por los antibióticos ionóforos (Marounek *et al.*, 1989), los cuales inhiben el transporte de sustratos rompiendo los gradientes de cationes como sodio y potasio (Bergen y Bates, 1984). Waldrip y Martin (1993) además observaron que el pH del medio no afecta el transporte en un rango de 6 a 8, que al disminuir el pH de 6 a 4 la tasa de asimilación de lactato se incrementa y varios inhibidores de H<sup>+</sup>-ATPasas disminuyen la tasa de asimilación de lactato. Estos investigadores concluyen que el transporte de lactato debe llevarse a cabo por medio de translocación de protones.

En cuanto a los perfiles metabólicos, los principales productos formados por *Megasphaera elsdenii* a partir de lactato son CO<sub>2</sub> y los ácidos grasos volátiles (AGV) acetato, propionato, butirato y, dependiendo de la cepa, cantidades variables de valerato (Marounek *et al.*, 1989). A partir de glucosa, *M. elsdenii* produce CO<sub>2</sub>, acetato y butirato, pero no propionato (Marounek *et al.*, 1989; Hino *et al.*, 1994).

Por otra parte, Counotte y colaboradores (1981) concluyen del análisis de sus resultados que, en animales alimentados con dietas normales, *M. elsdenii* fermenta de 60 a 80% del lactato presente. Por otra parte, considerando que *M. elsdenii* es el único microorganismo consumidor de lactato que no está sujeto a represión catabólica por azúcares solubles (Marounek *et al.*, 1989), Counotte y colaboradores (1981) concluyen que la presencia de azúcares solubles incrementa la participación de *M. elsdenii* en la fermentación de lactato. La importancia de que el consumo de lactato por *M. elsdenii* no esté sujeto a represión catabólica por otros sustratos, radica en que la acumulación de lactato en el rumen es resultado de la presencia abundante de sustratos fácilmente fermentables, entre ellos glucosa, de manera que los otros consumidores de lactato (*Selenomonas ruminantium* y *Veionella alcalences*, principalmente) no consumen lactato por la represión catabólica de que son objeto (Hishinuma *et al.*, 1968; Russell y Baldwin, 1978). Es decir, en rumiantes bajo condiciones de producción de leche y/o carne, *M. elsdenii* es el único microorganismo capaz de mantener bajos los niveles de lactato, con la consiguiente estabilización del ecosistema ruminal (Counotte *et al.*, 1982; Marounek y Bartos, 1987; Russell *et al.*, 1981; Kung y Hession, 1995).

Otro aspecto en el que *M. elsdenii* se ha considerado importante, dentro del ecosistema ruminal, es la capacidad de producir AGV de cadena ramificada, como isobutirato e isovalerato, a partir de aminoácidos (Allison, 1978; Wallace, 1986). El principal factor que influye en la producción de AGV de cadena ramificada por *M. elsdenii* es la composición de aminoácidos presentes (Wallace, 1986), lo cual depende del contenido de proteína en la dieta

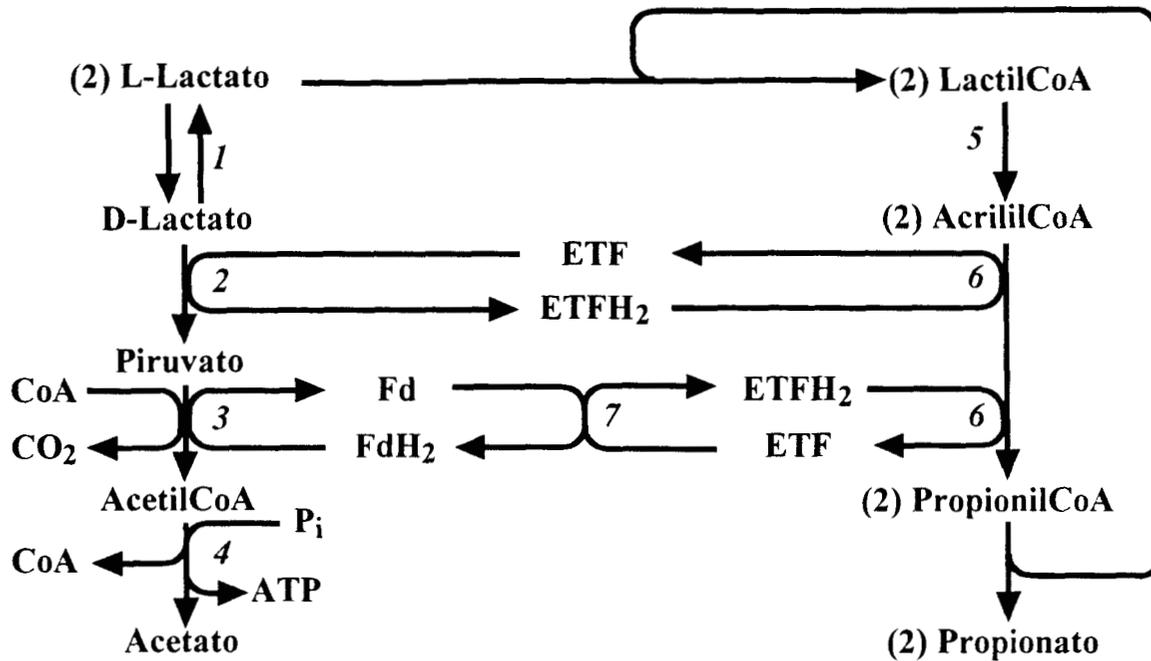
del rumiante (Hungate, 1966). Los AGV de cadena ramificada, y el amonio liberado, son factores esenciales para el crecimiento de las bacterias celulolíticas, resultando en un incremento en la digestión de fibra en el rumen (Hungate, 1966; Gylswyk, 1970).

### 1.1.2. Metabolismo de *Megasphaera elsdenii*

La parte mejor conocida del metabolismo de *M. elsdenii* es la vía del acrilato (Figura 1.1), en la cual el lactato es catabolizado a CO<sub>2</sub>, acetato y propionato, obteniéndose una mol de ATP por cada mol de acetato producida (Gottschalk, 1986).

Esta vía fue propuesta por primera vez en *M. elsdenii* por Baldwin y Milligan (1964) y Baldwin y colaboradores (1965), como una interpretación a sus estudios de transporte de electrones y actividades enzimáticas relacionadas con la utilización de lactato. La vía del acrilato es un sistema bioquímico poco común en otros microorganismos, de hecho solo está demostrada en *M. elsdenii* y *Clostridium propionicum* (Gottschalk, 1986).

De acuerdo a la Figura 1.1, *M. elsdenii* obtiene energía (en forma de ATP) a partir de lactato, mediante una serie de reacciones en las que el D-lactato es transformado en acetato. En las reacciones 2 y 3 de la Figura 1.1 se liberan electrones, los cuales deben ser transportados hasta un aceptor. El aceptor de electrones es el acrililCoA que es generado a partir del L-lactato.

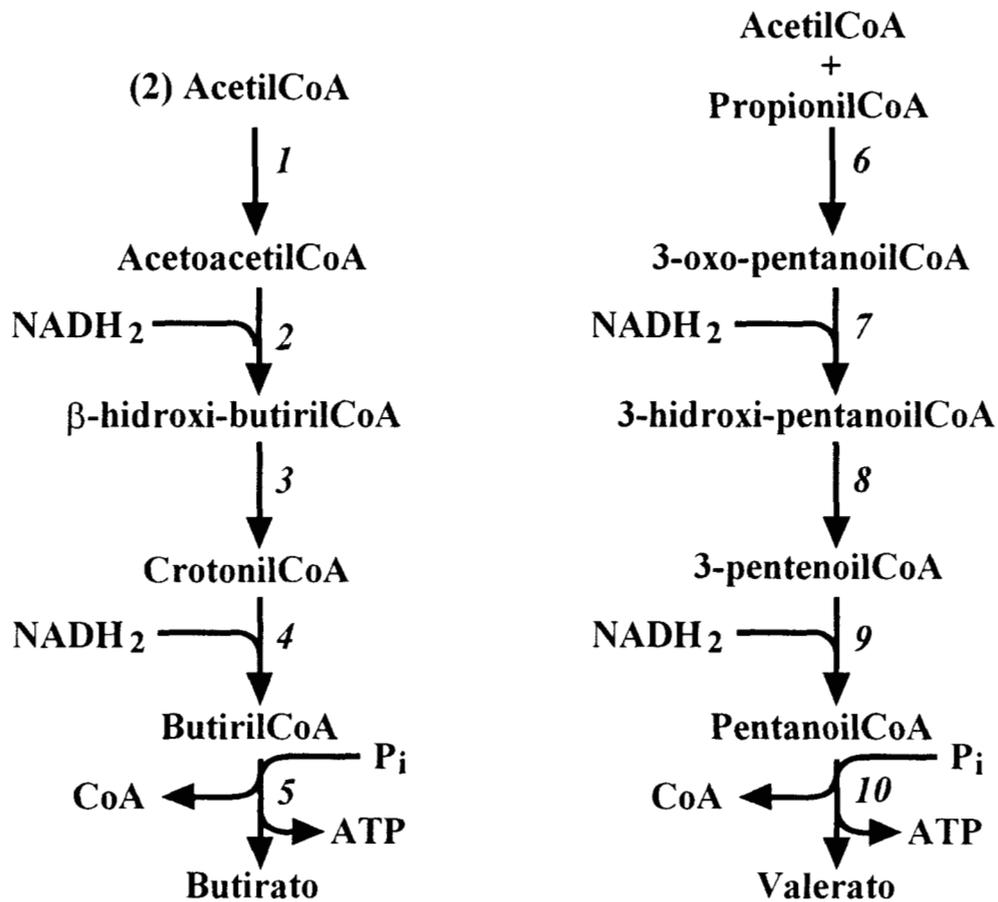


**Figura 1.1.** Vía del acrilato, utilizada por *Megasphaera elsdenii* para el catabolismo del lactato (Tomada de Gottschalk, 1986). 1, lactato racemasa; 2, D-lactato deshidrogenasa; 3, piruvato-ferredoxin oxidoreductasa; 4, fosfotransacetilasa + acetato cinasa; 5, enzimas no identificadas; 6, deshidrogenasa que usa flavoproteína transportadora de electrones; 7, transhidrogenasa.

Una vez que recibe los electrones, transportados por una flavoproteína (Brockman y Wood, 1975), el acrililCoA es reducido a propionilCoA y éste es transformado a propionato en una reacción observada por primera vez en extractos de *M. elsdenii* por Ladd y Walker (1959). En la secuencia de reacciones que lleva a la formación de propionato no se obtiene ATP, ya que es una secuencia de reacciones de reducción (Gottschalk, 1986). Hino y Kuroda (1993) demostraron que la lactato racemasa es una enzima inducida por sus sustratos, que intercambia entre ambos isómeros del lactato de acuerdo a las necesidades de la célula. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, *M. elsdenii* no produce propionato cuando utiliza glucosa (Marounek *et al.*, 1989) y aunque el piruvato se puede obtener a partir de ella, el hecho de que

la lactato racemasa sea inducible por lactato, impide que se lleven a cabo las reacciones del lado derecho de la Figura 1.1. Para Hino y Kuroda (1993) esto explica la incapacidad de *M. elsdenii* para producir propionato a partir de glucosa.

La producción de butirato y valerato se da por medio de las reacciones de la  $\beta$ -oxidación en sentido inverso (Baldwin *et al.*, 1965; Russell y Wallace, 1988). Las secuencias de reacciones se presentan en la Figura 1.2. A partir de dos moléculas de acetilCoA producidas en la vía del acrilato, se sintetiza una molécula de butirato mientras que el valerato es producido iniciando con la condensación de una molécula de acetilCoA y una de propionilCoA. En cada caso, durante la secuencia de reacciones se consumen dos moléculas de NADH+H<sup>+</sup> y se produce una de ATP (Baldwin *et al.*, 1965; Gottschalk, 1986; Russell y Wallace, 1988; Hino y Kuroda, 1993). Debe mencionarse que al menos una enzima, la butirilCoA deshidrogenasa (EC 1.3.99.2), ha sido aislada y caracterizada a partir de extractos de *M. elsdenii* (Williamson y Engel, 1984; Djordjevic *et al.*, 1995). La butirilCoA deshidrogenasa de *M. elsdenii* cataliza la conversión reversible de ésteres saturados de CoA y los correspondientes ésteres 2,3 insaturados, presentando los valores más altos de velocidad de reacción cuando los sustratos son butirilCoA y valerilCoA (pentanoilCoA) y prácticamente la misma afinidad por ambos sustratos (Williamson y Engel, 1984). La butirilCoA deshidrogenasa probablemente está involucrada en ambas secuencias de reacciones *in vivo*, es decir, que las enzimas 4 y 9 de la figura 1.2 probablemente son isoenzimas (Williamson y Engel, 1984).



**Figura 1.2.** Secuencia de reacciones de la reducción de acetoacetylCoA, para la producción de butirato, y de 3-oxo-pentanoilCoA, para la producción de valerato (Gottschalk, 1986; Russell y Wallace, 1988). 1, acetilCoA-acetiltransferasa; 2, β-hidroxibutirilCoA deshidrogenasa; 3, 3-hidroxiacilCoA hidrolasa; 4, butirilCoA deshidrogenasa; 5, fosfotransbutirilasa + butirato cinasa; 6, acetilCoA-propioniltransferasa; 7, 3-hidroxipentanoilCoA deshidrogenasa; 8, 3-hidroxipentanoilCoA hidrolasa; 9, pentanoilCoA deshidrogenasa; 10, fosfotranspentanoilasa + valerato cinasa.

Por otra parte, cuando el crecimiento bacteriano se da sobre sustratos diferentes a la glucosa, el fosfoenolpiruvato (PEP) sirve como compuesto de partida para la gluconeogénesis, durante la cual se sintetizan todos los carbohidratos requeridos para la síntesis de polímeros (Ingraham, *et al.*, 1983; Gottschalk, 1986). La gluconeogénesis utiliza las reacciones de la vía Embden-Meyehorff-Parnas (EMP) en sentido inverso, pero en la vía EMP existen dos

reacciones irreversibles: la conversión de PEP a piruvato y, la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato (Gottschalk, 1986). Algunos estudios (Joyner y Baldwin, 1966; Hino *et al.*, 1991; Hino y Kuroda, 1993) han sugerido que *M. elsdenii* utiliza la vía EMP, además de que se ha presentado evidencia (Joyner y Baldwin, 1966) de la utilización de la vía de las pentosas fosfato (PP), en cultivo con glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, no existe información sobre las reacciones que permiten a *M. elsdenii* evitar las reacciones irreversibles de la vía EMP y llevar a cabo la gluconeogénesis, cuando crece sobre lactato. Para finalizar con la parte conocida de la bioquímica de *M. elsdenii*, debe señalarse que Somerville (1968) demostró que *M. elsdenii* posee los sistemas enzimáticos para sintetizar varios aminoácidos (alanina, serina, aspartato y glutamato) a partir de lactato y que el ciclo de los ácidos tricarbónicos no puede completarse, ya que *M. elsdenii* no posee la enzima málica (Joyner y Baldwin, 1966).

## **1.2. Modelado matemático**

### **1.2.1. Generalidades sobre modelos matemáticos**

Un modelo se puede definir como una aproximación física o abstracta, que pretende representar un fenómeno que ocurre en la naturaleza, generalmente constituido por un sistema de ecuaciones, que representan al sistema bajo estudio. Los modelos simples pueden ser algebraicos, pero son más frecuentes las ecuaciones diferenciales, sobre todo cuando son esenciales las descripciones dinámicas (Perlmutter, 1972).

En física se usan dos tipos de aproximaciones para describir fenómenos: la descripción corpuscular y la descripción continua. En la corpuscular, se ve al sistema como compuesto de un gran número de unidades elementales, debiéndose conocer las propiedades básicas de ellas y sus interacciones; el sistema se analiza con los métodos de la mecánica estadística, para calcular las propiedades del sistema. Esta descripción es extremadamente versátil, pero además de los requerimientos antes mencionados, se debe utilizar una herramienta matemática muy elaborada. La aproximación del continuo es más usual en estudios de ingeniería y es la base del llamado método macroscópico. Se basa en la definición de variables macroscópicas (temperatura, presión, concentración, entre otras), que se suponen continuas con respecto al tiempo y a las coordenadas espaciales, ignorándose la estructura corpuscular subyacente al sistema (Roels, 1980; Roels, 1982). La formulación de un modelo matemático debe cubrir de manera sistemática las siguientes etapas (Luyben, 1973):

- 1) **Descripción de las bases del modelo.** Definición tanto del sistema como de las variables físicas, químicas y biológicas que participan y desarrollo de balances globales totales y parciales (si es necesario) para cada especie.
- 2) **Proposición de hipótesis de trabajo.** Son consideraciones que pretenden simplificar la complejidad del modelo, en base a observaciones experimentales. Una de las hipótesis más frecuentes a que se recurre, al modelar sistemas biológicos, es la de considerar a la biomasa como compuesta por células idénticas, todas con el mismo estado fisiológico (Crundwell, 1994).

- 3) **Análisis de consistencia del modelo.** Se debe asegurar que se dispone de al menos el mismo número de ecuaciones que de incógnitas y que el sistema es consistente desde un punto de vista dimensional.
- 4) **Solución de las ecuaciones del modelo.** Si es posible resolver de manera analítica, se obtiene soluciones exactas, pero si la solución es numérica se obtienen valores aproximados.
- 5) **Verificación ó validación.** Se deben confrontar las predicciones del modelo, con resultados experimentales propios.

Por otra parte, los procesos de fermentación, son caracterizados por el crecimiento de una población de microorganismos, que degradan un sustrato, formando algún(os) producto(s). El modelo es un arreglo de ecuaciones algebraicas y/o diferenciales, cada una definida para una variable de estado, derivadas a partir de balances de masa (Maher *et al.*, 1995). Los modelos matemáticos en biotecnología pueden ser desarrollados en diferentes niveles, a saber (Tsuchiya *et al.*, 1966; Fredrickson *et al.*, 1970; Bayley, 1998):

- 1) Nivel molecular o enzimático (modelos de síntesis enzimática).
- 2) Nivel de componentes intracelulares (modelos celulares estructurados).
- 3) Nivel celular - ambiente (modelos no estructurados para reactores).
- 4) Nivel dinámico - celular - ambiente (modelos estructurados para reactores).

Las ecuaciones siempre contienen constantes o parámetros, los cuales pueden ser de carácter físico, químico y biológico, que dependen de las condiciones bajo las que se desarrolla la experimentación (Munack, 1985). La evaluación de tales parámetros se basa en la obtención de datos experimentales de suficiente cantidad y calidad, lo que implica que en la medida en que se cuente con datos experimentales de calidad, se podrán estimar los parámetros del modelo con suficiente confianza (Schügerl, 1985).

En las dos siguientes subsecciones se presentará la información relacionada a los modelos no estructurados y al análisis de flujos metabólicos (que es un modelo estructurado), ya que son los dos tipos de modelos que se aplican en el desarrollo de la presente tesis.

### **1.2.2. Modelos no estructurados**

En los procesos biológicos, durante el crecimiento, nueva masa celular es formada autocatalíticamente a partir del sustrato a una cierta tasa específica de crecimiento,  $\mu$  (Bellgardt, 1991). Pueden escribirse diferentes expresiones matemáticas para  $\mu$ , denominadas modelos de crecimiento celular, las cuales pueden dividirse en estructuradas y no estructuradas (Bellgardt, 1991; Blanch y Clark, 1994). Los modelos no estructurados son los más simples y en ellos se considera a la biomasa como un material sin dinámica interna, cuyas tasas de reacción sólo dependen de las condiciones en la fase líquida del reactor; es decir, sólo se toman promedios sobre la población (Bellgardt, 1991). Así, en un modelo no estructurado (el caso más idealizado) la biomasa se considera un material uniforme en solución, tomando en cuenta

que las células son extremadamente pequeñas en comparación con el reactor y que el elevado número de células permite establecer valores promedio, estadísticamente bien definidos, para los parámetros de la población (Bellgardt, 1991; Bailey y Ollis, 1986). De esta manera, los modelos no estructurados sólo contienen cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto (Bellgardt, 1991). Un modelo no estructurado para el crecimiento de la biomasa es una buena aproximación, si los tiempos de respuesta de la célula a los cambios del medio ambiente son despreciables, comparados con la duración del proceso de fermentación (Bellgardt, 1991). Por otra parte, si en el modelo celular se incluyen efectos como regulación metabólica, concentraciones internas de metabolitos, enzimas o ARN; es decir, si se incluye el estado interno de las células y sus cambios, se tiene un modelo estructurado (Bellgardt, 1991; Blanch y Clark, 1994).

En los modelos no estructurados, las reacciones biológicas dependen directa, y solamente, de variables macroscópicas que describen las condiciones en el fermentador, siendo la concentración de la masa celular, el único estado biológico variable (Bellgardt, 1991). Esto es particularmente útil en casos complejos, donde un modelo no estructurado es mucho más simple y fácil de aplicar (Amrane y Prigent, 1994). Este tipo de modelos hacen una descripción integral del proceso, sin una descripción detallada de los mecanismos subyacentes (degradación de sustratos, síntesis de componentes celulares, duplicación de ADN) debido a la omisión extensiva del metabolismo celular (Amrane y Prigent, 1994; Bellgardt, 1991).

Como ya se mencionó, el modelado matemático, incluye no sólo la selección de la estructura correcta del modelo, sino también la determinación cuantitativa de los parámetros del mismo (Bellgardt, 1991). La determinación de los valores numéricos de los parámetros del modelo puede seguir dos rutas. La más conveniente es estimar los parámetros del modelo, a partir de varios experimentos independientes (Bellgardt, 1991; Crundwel, 1994). Si lo anterior no es posible, entonces deben ser determinados por ajuste del modelo a los datos experimentales, de hecho esta es la manera más usual, se adopta una estructura analítica particular y se ajustan los parámetros, mediante el uso de técnicas numéricas (Bellgardt, 1991; Maher *et al.*, 1995). Los algoritmos más utilizados, en el ajuste de parámetros, son los métodos de Newton y de Marquardt (Howell, 1983). En ambos casos, se selecciona una función objetivo de manera que pequeños valores de ella, representen una buena aproximación de las predicciones del modelo, a los datos experimentales. Los parámetros del modelo, son entonces ajustados, alcanzando un mínimo en la función objetivo, obteniéndose *los parámetros del mejor ajuste*. Los datos experimentales están sujetos a errores de medición, de manera que el modelo casi nunca ajusta exactamente, aunque éste sea correcto (Press *et al.*, 1990).

Los parámetros relacionados con la biomasa, poseen particular importancia en el contexto del modelado de sistemas biológicos, ya que aportan información valiosa para la comprensión del fenómeno bajo estudio. Los parámetros que se encuentren presentes dependen del tipo de modelo y del tipo de expresión para el modelo celular que se esté utilizando, sin embargo, los más frecuentes son:

a) **La tasa específica máxima de crecimiento de la ecuación de Monod ( $\mu_m$ ).**

Este parámetro, depende de las condiciones bajo las cuales se cultive a los microorganismos, sustrato limitante, tipo de nutrientes, pH, temperatura, tasa de mezclado, presión, salinidad, etc. (Bader, 1982).

b) **La constante de afinidad ( $K_s$ ).** Es una medida de la afinidad del microorganismo por el sustrato limitante (a menor valor numérico de  $K_s$ , mayor afinidad del microorganismo por el sustrato). Es la concentración de sustrato limitante, a la cual se obtiene una tasa específica de crecimiento igual a un medio de la máxima (Monod, 1949).

c) **El coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto al sustrato limitante ( $Y_{sx}$ ).** Es una medida de la fracción de sustrato limitante transformado a biomasa. Su inverso representa la masa de sustrato limitante utilizado en la formación de una unidad de biomasa (Monod, 1949).

d) **El coeficiente de mantenimiento ( $m$ ).** Fracción del sustrato consumido para obtener la energía necesaria para la actividad normal de la célula, que no tiene que ver con el crecimiento, por ejemplo, transporte, síntesis/degradación de macromoléculas como el ARNm, mantenimiento de gradientes eléctricos y de concentración, entre otros usos (Pirt, 1975)

e) **Coeficiente de formación de producto asociado al crecimiento ( $\alpha$ ).** Fracción del producto formado para obtener la energía necesaria en la generación de nuevo protoplasma celular (Luedeking y Piret, 1959).

**f) Coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento ( $\beta$ ).**

Fracción del producto formado para obtener la energía necesaria para actividades que no tienen que ver con el crecimiento (Luedeking y Piret, 1959).

Para el caso de *Megasphaera elsdenii*, se presenta la Tabla 1.1 que muestra algunos valores que se han obtenido para los parámetros más frecuentes, obtenidos en diversos medios y modos de cultivo. Para facilitar la posterior comparación con los parámetros obtenidos en este trabajo, los valores encontrados en la literatura se han convertido a unidades en base C-mol (ver página 26 y Apéndice 2). Para facilitar la lectura de la Tabla 1.1, puede tomarse como referencia que el  $Y_{SX}$  para *E. coli* es de  $0.46 \text{ g biomasa (g glucosa)}^{-1}$ , en cultivo aerobio (Shiloach y Bauer, 1975), lo cual equivale a  $0.55 \text{ C-mol biomasa (C-mol glucosa)}^{-1}$ .

Las diferencias, en ocasiones importantes, que se observan en la Tabla 1.1 pueden atribuirse principalmente a la composición del medio de cultivo, que en todos los casos contenía uno ó más componentes complejos como peptona de caseína y extracto de levadura en concentraciones de  $0.5 \text{ a } 5 \text{ g L}^{-1}$ . La Tabla 1.1. muestra que *M. elsdenii* presenta un crecimiento mejor con glucosa que con lactato, ya que los valores de  $\mu_m$  con glucosa son aproximadamente dos veces mayores que el correspondiente con lactato, mientras que los valores de  $Y_{SX}$  con glucosa son de dos a tres veces mayores en comparación con los casos en que se usó lactato.

Tabla 1.1. Diversos parámetros determinados para *Megasphaera elsdenii*.

Parámetro	Valor	Referencia
$\mu_m$		
Lote	0.21 h <sup>-1</sup> (en lactato)	Russell y Baldwin, 1978
Continuo	1 h <sup>-1</sup> (en lactato)	Russell y Baldwin, 1979a
Lote	0.45 h <sup>-1</sup> (en glucosa)	Russell y Baldwin, 1978
Lote	0.35 h <sup>-1</sup> (en glucosa)	Russell <i>et al.</i> , 1979c
Lote	0.2 h <sup>-1</sup> (en glucosa)	Gylswyk <i>et al.</i> , 1992
$Y_{SX}^*$		
Lote	0.16 C-mol biomasa (C-mol lactato) <sup>-1</sup>	Henderson, 1980
Lote	0.07 C-mol biomasa (C-mol lactato) <sup>-1</sup>	Marounek y Bartos, 1987
Lote	0.14 C-mol biomasa (C-mol lactato) <sup>-1</sup>	Rossi <i>et al.</i> , 1995
Continuo	0.55 C-mol biomasa (C-mol glucosa) <sup>-1</sup>	Russell y Baldwin, 1979b
Continuo	0.62 C-mol biomasa (C-mol glucosa) <sup>-1</sup>	Russell y Dombrowski, 1980
Lote	0.31 C-mol biomasa (C-mol glucosa) <sup>-1</sup>	Henderson, 1980
Continuo	0.31 C-mol biomasa (C-mol glucosa) <sup>-1</sup>	Wallace, 1986
Lote	0.17 C-mol biomasa (C-mol glucosa) <sup>-1</sup>	Marounek y Bartos, 1987
$K_s$		
Continuo	1.11 C-mmol lactato L <sup>-1</sup>	Russell y Baldwin, 1979a
Lote	1.11 C-mmol lactato L <sup>-1</sup>	Russell y Baldwin, 1979c
Lote	52.5 C-mmol lactato L <sup>-1</sup>	Counotte <i>et al.</i> , 1981
Continuo	0.67 C-mmol glucosa L <sup>-1</sup>	Russell y Baldwin, 1979a
$m$		
Continuo	0.16 C-mol glucosa (C-mol biomasa) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Russell y Baldwin, 1979b
Continuo	0.09 C-mol glucosa (C-mol biomasa) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Wallace, 1986
$Y_{XP}$		
Lote	1.75 C-mol acetato (C-mol biomasa) <sup>-1</sup>	Henderson, 1980
Lote	1.83 C-mol acetato (C-mol biomasa) <sup>-1</sup>	Rossi <i>et al.</i> , 1995
Lote	2.06 C-mol propionato (C-mol biomasa) <sup>-1</sup>	Henderson, 1980
Lote	3.83 C-mol propionato (C-mol biomasa) <sup>-1</sup>	Rossi <i>et al.</i> , 1995
Lote	1 C-mol butirato (C-mol biomasa) <sup>-1</sup>	Henderson, 1980
Lote	1.20 C-mol butirato (C-mol biomasa) <sup>-1</sup>	Rossi <i>et al.</i> , 1995
Lote	1.35 C-mol valerato (C-mol biomasa) <sup>-1</sup>	Henderson, 1980
Lote	1.38 C-mol valerato (C-mol biomasa) <sup>-1</sup>	Rossi <i>et al.</i> , 1995

Debe aclararse que el valor de  $\mu_m$  de 1 h<sup>-1</sup>, para cultivo continuo con lactato como fuente de carbono, fue considerado como desproporcionado e irreal por los mismos autores (Russell y

Baldwin, 1979a) que anteriormente habían determinado un valor de  $0.21 \text{ h}^{-1}$  en cultivo por lote (Russell y Baldwin, 1978). Además de lo anterior, en la Tabla 1.1 puede verse que la afinidad de *M. elsdenii*, medida como  $K_s$ , es mayor por la glucosa que por el ácido láctico. Tomando en cuenta las observaciones hechas hasta este momento sobre los parámetros de la Tabla 1.1, resulta extraño, como lo habían señalado Hino y colaboradores (1994), que *M. elsdenii* tenga preferencia por consumir lactato en lugar de glucosa. Estos investigadores proponen que probablemente se debe a que el sistema de transporte y la vía metabólica, involucrados en la utilización lactato, resultan más ventajosos en conjunto que los correspondientes a la utilización de glucosa. Sin embargo, la explicación es aún desconocida.

En cuanto al hecho de que los valores de  $Y_{SX}$  para la glucosa presentados en la Tabla 1.1, parecen ser muy altos, debe tomarse en cuenta las siguientes consideraciones. En general, cuando las bacterias del rumen son comparadas con otras bacterias, los rendimientos celulares parecen ser anómalamente altos (Bauchop y Elsdén, 1960; Stouthamer, 1969). Por ejemplo, *E. coli* presenta rendimientos celulares de  $0.17 \text{ C-mol biomasa (C-mol glucosa)}^{-1}$  y  $0.55 \text{ C-mol biomasa (C-mol glucosa)}^{-1}$ , en anaerobiosis y aerobiosis, respectivamente (Stouthamer, 1969; Shiloach y Bauer, 1975), mientras que el promedio para las bacterias del rumen es de  $0.38 \text{ C-mol biomasa (C-mol glucosa)}^{-1}$ , lo cual se ha atribuido a que éstas probablemente son capaces de llevar a cabo la síntesis de ATP por medio de mecanismos ligados al transporte de electrones por acarreadores de membrana, además de la fosforilación por transporte de electrones entre sustratos de diferente nivel de óxido-reducción que se utilizan en los procesos anaerobios (Russell y Wallace, 1988).

Por otra parte, la determinación del coeficiente de mantenimiento se ha llevado a cabo únicamente con glucosa, mientras que no se dispone de este tipo de datos para cultivos desarrollados en lactato. Wallace (1996) determinó que la desaminación de aminoácidos por *M. elsdenii* para producir ácidos grasos de cadena ramificada, contribuye a aportar energía que se utiliza para cubrir, aproximadamente en un 37%, las necesidades de energía de mantenimiento. En cuanto a los rendimientos de producto con respecto a biomasa ( $Y_{XP}$ ) de la Tabla 1.1, puede observarse que estos son muy similares entre sí, excepto para el propionato.

Es importante destacar que en muchos casos, sobre todo cuando se tienen varios parámetros a ajustar y/o grandes diferencias entre los valores numéricos de las variables medidas, es conveniente adimensionalizar los datos y el modelo (Howell, 1983; Bird *et al.*, 1987). Esto contribuye a reducir el número de parámetros a ajustar, ya que los parámetros originales se combinan en grupos adimensionales que constituyen los nuevos parámetros, y a evitar problemas numéricos, debidos a diferencias de escala entre las variables medidas, durante la solución de las ecuaciones, es decir, el sistema se hace más robusto (Howell, 1983). Un sistema robusto es aquel para el cual pequeñas perturbaciones en las variables medidas conducen a variaciones también pequeñas en las soluciones obtenidas (Luyben, 1973).

### 1.3. Análisis de flujos metabólicos

El cálculo de flujos metabólicos es una herramienta de la ingeniería metabólica (Nielsen, 2001) y una determinación fundamental en estudios cuantitativos de fisiología celular, ya que permite organizar el conocimiento metabólico de un microorganismo en una red de reacciones bioquímicas y provee una medida del grado de ajuste entre varias vías metabólicas (Varma y Palsson, 1994; Stephanopoulos *et al.*, 1998). El grado de ajuste entre varias vías metabólicas tiene que ver con el acoplamiento entre ellas en cuanto a la producción de intermediarios en unas y el consumo de los mismos en otras, por ejemplo, cuando las condiciones ambientales cambian los flujos metabólicos son redistribuidos de manera que se mantenga el balance de óxido-reducción en la célula (Varma y Palsson, 1994).

Una poderosa herramienta para la determinación de los flujos en la red de reacciones bioquímicas es el análisis de flujos metabólicos, en el cual los flujos intracelulares son calculados usando un modelo estequiométrico que describe la bioquímica del microorganismo (Jørgensen *et al.*, 1995; Nissen *et al.*, 1997; Stephanopoulos *et al.*, 1998). Sin embargo, ya que el análisis cuantitativo del metabolismo requiere datos experimentales, es importante que la consistencia de los datos sea confirmada, antes de utilizarlos en la determinación de flujos metabólicos (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Una descripción detallada sobre la metodología usada para validar la consistencia de datos experimentales, y calcular los flujos metabólicos, se presenta en el Apéndice 3 del presente

documento. En la páginas siguientes de este capítulo, primero se revisarán los antecedentes sobre la consistencia de datos experimentales, para posteriormente hacer otro tanto sobre la determinación de flujos metabólicos.

### 1.3.1. Modelo de caja negra y análisis de sistemas sobredeterminados

La información presentada en los siguientes párrafos está basada en lo descrito por Nielsen y Villadsen, (1994) y Stephanopoulos y colaboradores (1998), a menos que se indique otra cosa. El análisis de consistencia de datos experimentales puede realizarse aplicando la *redundancia de datos*. Esta se introduce cuando se emplean sensores múltiples para medir la misma variable, o cuando las mediciones obtenidas deben cumplir ciertas restricciones, tales como cumplir con balances elementales. La redundancia de datos también puede ser usada para la identificación sistemática de fuentes de errores gruesos en las mediciones. Para que el análisis de consistencia pueda funcionar, los datos experimentales que se empleen deben tener las siguientes características:

- a) **Completos.** Esto no significa que se deben medir todos los posibles sustratos y productos, pero sí todos aquellos presentes en cantidades significativas, lo cual permitirá cumplir con los balances elementales. Esta característica requiere el uso de medios químicamente definidos y, esencialmente, elimina el uso de medios complejos en los estudios metabólicos sistemáticos. Cuando se utilizan medios complejos, los balances elementales no se cumplen si se considera el

metabolismo en su conjunto (catabolismo y anabolismo), por lo cual el estudio se aplica generalmente al catabolismo desacoplado del anabolismo, es decir, no se considera el crecimiento de la biomasa.

- b) **Libres de ruido (tanto como sea posible)**. Ya que las tasas de reacción son derivadas de las mediciones de concentración, el ruido en tales mediciones introduce incertidumbre en las variables derivadas.

En el modelo de caja negra todas las reacciones celulares son agrupadas en una sola reacción y el método básicamente consiste en la validación de balances elementales, considerando a la biomasa como una caja negra que intercambia materiales con el medio.

Los flujos de entrada y salida de la caja negra son, por una parte, las tasas específicas de consumo de sustrato (elementos del vector  $r_s$ ) y, por otra parte, las tasas específicas de formación de producto (elementos del vector  $r_p$ ). Además existe acumulación de biomasa dentro de la caja, la cual es representada como un flujo de salida con tasa específica  $\mu$ . Ya que todas las reacciones celulares están agrupadas en una sola reacción, los coeficientes estequiométricos de esta reacción global están dados por los coeficientes de rendimiento con respecto a la biomasa. La reacción global es:



dónde: X = Biomasa

$$Y_{XP_i} = \frac{r_{P_i}}{r_X} = \text{coeficiente de rendimiento del producto } i \text{ con respecto a la biomasa}$$

P<sub>i</sub> = Producto *i*

$$Y_{XS_j} = \frac{r_{S_j}}{r_X} = \text{coeficiente de rendimiento del producto } j \text{ con respecto a la biomasa}$$

S<sub>j</sub> = Sustrato *j*

Como el coeficiente estequiométrico de la biomasa es uno, la tasa de reacción está dada por la tasa específica de crecimiento de la biomasa, la cual, junto con los coeficientes de rendimiento especifican completamente el sistema. En la aplicación del modelo de caja negra para el análisis de consistencia, se puede utilizar cualquiera de los siguientes conjuntos de datos:

- a) Un conjunto de coeficientes de rendimiento como los que aparecen en la reacción global, junto con la tasa específica de crecimiento.
- b) Un conjunto de coeficientes de rendimiento con respecto a otra referencia (por ejemplo un sustrato), junto con la tasa específica de consumo/formación de ese compuesto de referencia.
- c) Un conjunto de tasas específicas de todos los sustratos y productos, incluida la biomasa.
- d) Un conjunto de tasas volumétricas de todos los sustratos y productos, incluida la biomasa.

Cualquiera de los arreglos anteriores proporciona los mismos resultados. Lo más usual es utilizar coeficientes de rendimiento expresados con respecto a uno de los sustratos, usualmente la fuente de carbono. En todo caso, las tasas de reacción utilizadas deben satisfacer varias restricciones. Los elementos que entran al sistema deben estar balanceados con los elementos que salen del sistema, por ejemplo, el carbono que entra al sistema vía sustratos tiene que ser recuperado en forma de productos metabólicos y biomasa. Cada elemento que entra al sistema impone una restricción.

Antes de presentar los balances elementales, es conveniente introducir la expresión de las fórmulas elementales de los compuestos involucrados, normalizados con respecto a su contenido de carbono. Por ejemplo, la fórmula elemental de la glucosa, que es  $C_6H_{12}O_6$ , se puede expresar como  $CH_2O$  en base a un átomo de carbono. Así, el balance de carbono, en base C-mol y considerando un solo sustrato, es expresado como:

$$1 = \sum_{i=1}^M Y_{SP_i} + Y_{SX} + Y_{SC} \quad (1.2)$$

dónde:  $Y_{SP_i} = \frac{r_P}{r_S}$  = coeficiente de rendimiento del producto  $i$  con respecto al sustrato

$Y_{SX} = \frac{r_X}{r_S}$  = coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto al sustrato

$Y_{SC} = \frac{r_{CO_2}}{r_S}$  = coeficiente de rendimiento del  $CO_2$  con respecto al sustrato

En la ecuación 1.2 los coeficientes de rendimiento tienen unidades de C-mol por cada C-mol de sustrato. El CO<sub>2</sub> se considera separado de los demás productos, ya que no contribuye al balance generalizado de grado de reducción:

$$\gamma_s = \sum_{i=1}^M Y_{SP_i} \gamma_{P_i} + Y_{SX} \gamma_X \quad (1.3)$$

dónde:  $Y_{SP_i} = \frac{r_{P_i}}{r_S}$  = coeficiente de rendimiento del producto i con respecto al sustrato

$Y_{SX} = \frac{r_X}{r_S}$  = coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto al sustrato

$\gamma_s$  = grado de reducción del sustrato

$\gamma_{P_i}$  = grado de reducción del producto i

$\gamma_X$  = grado de reducción de la biomasa

Este balance fue introducido por Roels (1983), como una generalización del trabajo de Erickson y colaboradores (1978), quienes definieron el grado de reducción de un compuesto como *el número de electrones disponible para transferirse al oxígeno en la combustión del compuesto*. En el balance generalizado de grado de reducción, el grado de reducción de un compuesto es *un factor de cálculo que se elige por conveniencia*, de manera arbitraria, de modo que los coeficientes estequiométricos para el dióxido de carbono, el agua, la fuente de nitrógeno, la fuente de azufre y la fuente de fósforo, desaparezcan del balance generalizado de grado de reducción (Nielsen y Villadsen, 1994). Es decir, no hay una definición física del

grado de reducción; éste es únicamente un factor de cálculo y el planteamiento de Erickson y colaboradores (1978) es un caso particular.

Para obtener el grado de reducción de un compuesto dado, se debe tomar en cuenta lo siguiente. En primer lugar, se elige al átomo de hidrógeno como la unidad de grado de reducción. En seguida se selecciona un compuesto con grado de reducción cero para cada elemento: H<sub>2</sub>O para oxígeno, CO<sub>2</sub> para el carbono, NH<sub>3</sub> para el nitrógeno, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para el azufre y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para el fósforo. Estas dos elecciones permiten establecer que el grado de reducción de cada uno de los átomos involucrados es: -2 para el oxígeno, 4 para el carbono, -3 para el nitrógeno, 6 para el azufre y 5 para el fósforo. Así, puede obtenerse el grado de reducción de los compuestos más comunes que intervienen en procesos biológicos. De esta manera, las ecuaciones 1.2 y 1.3 establecen que el carbono y el grado de reducción que se introduce a la caja negra, debe ser recuperado en los productos que salen de ella. Es importante mencionar que la composición elemental de la biomasa, normalizada con respecto a su contenido de carbono, que tiene la forma CH<sub>a</sub>O<sub>b</sub>N<sub>c</sub>, depende de su contenido macromolecular (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) y, por lo tanto, de las condiciones de cultivo. Sin embargo, excepto para situaciones extremas, es razonable usar la composición promedio (CH<sub>1.81</sub>O<sub>0.52</sub>N<sub>0.21</sub>, con un 6% p/p de cenizas), cuando la composición exacta de la biomasa no es conocida (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

De una manera similar al balance de carbono que se presenta en la ecuación 1.2, pueden escribirse balances para los otros elementos que participan en la reacción expresada en la

ecuación 1.1. Estos balances pueden ser convenientemente escritos colocando la composición elemental de la biomasa, sustratos y productos en las columnas de una matriz  $\mathbf{E}$ , cuyos renglones representan a cada uno de los elementos involucrados. Para el caso de un proceso en el que, además de la biomasa, se tengan  $M$  productos y  $N$  sustratos, que incluyan  $I$  elementos (normalmente C, H, O y N) en su composición, se tendrá una matriz  $\mathbf{E}$  de  $I$  renglones por  $M+N+1$  columnas. Este es un sistema con  $I$  restricciones (balances elementales que se deben cumplir) y  $M+N+1$  tasas de reacción ( $r$ ), el cual puede ser representado por:

$$\mathbf{E}r = 0 \quad (1.4)$$

Los grados de libertad ( $F$ ) del sistema son  $F = M+N+1-I$ . Si se tienen exactamente  $F$  tasas de reacción medidas, es posible calcular las demás, pero no hay redundancias para validar la consistencia de los datos. De manera que es recomendable planear la medición de más mediciones que los grados de libertad del sistema.

En el caso de un sistema en el que se tenga un número mayor de mediciones experimentales, que de grados de libertad, el sistema se denomina *sobredeterminado*. En éste caso, la redundancia de las mediciones puede ser usada para:

- a) Calcular las tasas no medidas.
- b) Incrementar la exactitud de las mediciones disponibles y,
- c) Identificar si existe una fuente de errores gruesos en las mediciones.

El análisis más eficiente está basado en el uso simultáneo de todos los balances, para lo cual la manera más adecuada de manejar el sistema es por medio de manipulaciones matriciales. Lo anterior se ilustrará en el capítulo 7, trabajando los datos experimentales obtenidos en este trabajo.

### **1.3.2. Modelos estequiométricos**

Una vez que la consistencia global de los datos experimentales se ha validado y la red de reacciones bioquímicas ha sido determinada, la información se colecta en una matriz estequiométrica (**A**) del metabolismo y las tasas de reacción, o flujos metabólicos, son calculadas con base en una suposición de estado pseudoestacionario para las concentraciones intracelulares de los metabolitos (Vallino y Stephanopoulos, 1990). Una consecuencia importante de esta suposición es que todos los metabolitos que no se encuentren en una ramificación de la red metabólica pueden ser eliminados, dando como resultado que todas las reacciones que ocurren entre dos metabolitos localizados en ramificaciones pueden representarse con una sola reacción, sin que esto signifique ninguna pérdida de información (Vallino y Stephanopoulos, 1990; Vallino y Stephanopoulos, 1993). Con esto, el modelo se hace más simple y más robusto (Vallino y Stephanopoulos, 1990; Schulze, 1995). Como entrada para los cálculos se utiliza un conjunto de flujos extracelulares medidos, típicamente tasas de consumo de sustratos y tasas de secreción de productos (Nissen *et al.*, 1997). El producto final del cálculo es un mapa de flujos metabólicos que muestra la tasa (es decir el

flujo) a la cual ocurre cada una de las reacciones (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Si la matriz estequiométrica es singular, dos o más reacciones son linealmente dependientes y no existe una solución única del sistema (Nissen *et al.*, 1997; Vanrollegem y Heijnen, 1998). Una singularidad típica aparece cuando el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el ciclo del glioxalato y la reacción anaplerótica de la piruvato carboxilasa se consideran juntas (Stephanopoulos *et al.*, 1998):

**Ciclo de los ácidos tricarboxílicos:** Piruvato  $\rightarrow 3\text{CO}_2 + 4\text{NADH} + \text{FADH} + \text{GTP}$

**Ciclo del glioxalato:**  $2\text{Piruvato} \rightarrow 2\text{CO}_2 + \text{Oxalacetato} + 4\text{NADH} + \text{FADH}$

**Piruvato carboxilasa:** Piruvato + ATP +  $\text{CO}_2 \rightarrow \text{Oxalacetato}$

Si ATP y GTP se consideran iguales (lo cual se hace frecuentemente en el análisis de reacciones celulares), es obvio que el ciclo del glioxalato es una combinación lineal de las otras dos vías. Las singularidades sólo pueden ser eliminadas cambiando la red metabólica, adicionando o removiendo reacciones. Sin embargo, esto debe hacerse respetando los principios de la bioquímica fundamental (Nissen *et al.*, 1997). Una herramienta muy usada, para determinar la presencia o ausencia de reacciones, es la realización de ensayos *in vitro* de enzimas intracelulares (Nissen *et al.*, 1997; Stephanopoulos *et al.*, 1998). Es importante señalar que cualquier modelo estequiométrico debe sujetarse a un análisis de sensibilidad, para establecer que tan robusto es el sistema, es decir, para detectar cómo son afectados los flujos calculados por errores en las mediciones experimentales (Vallino y Stephanopoulos, 1990). El primer

indicador es el número de condición ( $C$ ) de la matriz estequiométrica (Vallino y Stephanopoulos, 1990), que se calcula de la siguiente manera (Noble y Daniel, 1977):

$$C(\mathbf{A}) = \|\mathbf{A}\| \cdot \|\mathbf{A}^\#\| \quad (1.5)$$

dónde  $\|\cdot\|$  es alguna norma matricial y  $\mathbf{A}^\#$  es la pseudoinversa, dada por:

$$\mathbf{A}^\# = (\mathbf{A}^\top \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^\top \quad (1.6)$$

$C$  es un indicador del error numérico que puede acumularse al resolver el sistema. Si  $C$  es del orden de  $10^k$  y el vector de residuos es del orden de  $10^j$ , puede esperarse un vector de errores del orden de  $10^{k-j}$  cuando se resuelve el sistema (Schulze, 1995). El análisis de sensibilidad del vector de flujos calculados ( $\mathbf{x}$ ) con respecto al vector de las tasas medidas ( $\mathbf{r}$ ) se hace calculando la matriz (Vallino y Stephanopoulos, 1990):

$$\frac{\partial \mathbf{x}}{\partial \mathbf{r}} = (\mathbf{A}^\top \mathbf{A})^{-1} \mathbf{A}^\top \quad (1.7)$$

Los elementos de la matriz dada por la ecuación 1.7 permiten identificar qué flujos se verán afectados por determinadas mediciones. Por ejemplo, si el  $ij$ -ésimo elemento de la matriz es mayor que 1, quiere decir que el flujo  $i$  es particularmente sensible a errores en la medición de la tasa  $j$  (Schulze, 1995). El análisis de flujos metabólicos puede entonces considerarse como

un campo de importancia fundamental y práctica, que puede proporcionar contribuciones básicas, en la medición y entendimiento del control de flujos *in vivo*, que lleva a cabo la célula (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Esto es particularmente útil en conexión con estudios de producción de metabolitos, donde el objetivo es dirigir tanto carbono como sea posible desde un sustrato hacia un producto metabólico (Nissen *et al.*, 1997). Sin embargo, el análisis de flujos metabólicos es de gran utilidad para (Nissen *et al.*, 1997; Stephanopoulos *et al.*, 1998):

- 1) **Calcular flujos extracelulares no medidos.** En algunos casos, el modelo estequiométrico y los flujos extracelulares medidos permiten calcular, además de los flujos intracelulares, flujos extracelulares no medidos o incluso algunos que sí fueron medidos pero fueron intencionalmente omitidos en los cálculos. En éste último caso, el grado de concordancia entre los flujos medidos y las predicciones del modelo, pueden servir para validar el modelo.
- 2) **Calcular rendimientos teóricos máximos.** Con base en el modelo estequiométrico y la especificación de algunas restricciones en el metabolismo, es posible calcular el rendimiento teórico máximo para un metabolito (Gulik y Heijnen, 1995). Por ejemplo, Jørgensen *et al.* (1995) calcularon el rendimiento teórico máximo de penicilina a partir de glucosa para *Penicillium chrysogenum* en un medio complejo, bajo la suposición de ausencia de crecimiento.
- 3) **Identificar vías alternativas.** La formulación del modelo estequiométrico requiere de una información bioquímica detallada. Sin embargo, en muchos casos algunos detalles son desconocidos o puede no saberse si una vía

determinada está activa bajo las condiciones de experimentación. Además, puede haber varias isoenzimas con funciones que no son conocidas en detalle. Calculando los flujos metabólicos con diferentes arreglos de vías bioquímicas, puede ser posible identificar cuál de los arreglos es el que más probablemente esté activo. Este uso del AFM fue ilustrado por Aiba y Matsuoka (1979), en el que se considera el primer trabajo de aplicación del AFM, donde se examinaron varias vías anapleróticas en la producción de ácido cítrico por *Candida lipolytica*.

- 4). **Identificación de puntos ramificados de control metabólico (rigidez de nodos)**. Mediante la comparación de la distribución de flujos bajo diferentes condiciones de operación es posible identificar si un nodo es flexible o rígido. En un nodo flexible las proporciones de los flujos en las diferentes ramas se ajustan de acuerdo a las condiciones de cultivo, mientras que en un nodo rígido las proporciones son constantes independientemente de las condiciones de cultivo (Stephanopoulos y Vallino, 1991). Por ejemplo, en la producción de lisina por *Corynebacterium glutamicum*, se determinó que los nodos de glucosa-6-fosfato, piruvato y oxalacetato son flexibles, mientras que el nodo de fosfoenolpiruvato es rígido (Vallino y Stephanopoulos, 1993).

Debe señalarse que la determinación estequiométrica de los flujos metabólicos intracelulares puede basarse en igual número de balances de metabolitos, o en un número menor o mayor de tales balances, dependiendo del número de mediciones disponibles. En el primer caso no se

tiene redundancia y la solución es única, mientras que si se dispone de menos mediciones de las necesarias, se obtiene toda una familia de soluciones (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Si se requiere de una solución en particular, y no es posible medir más variables para hacer determinado el sistema, la programación lineal combinada con alguna función objetivo, es decir una restricción, puede usarse para obtener una solución deseada (Watson, 1986; Savinell y Palsson, 1992), por ejemplo, maximizar el rendimiento de algún componente dado (Fell y Small, 1986; Varma *et al.*, 1993a) o minimizar algún costo (Varma *et al.*, 1993b). Finalmente, con más mediciones de las necesarias, además del cálculo de los flujos metabólicos, la validez del proceso puede ser rigurosamente comprobada (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

---

## **2. JUSTIFICACION**

---

---

## 2. JUSTIFICACION

Recapitulando lo expuesto en la revisión de la literatura, puede decirse que la bacteria *Megasphaera elsdenii* tiene un importante papel en el rumen, ya que es el principal consumidor de lactato. La remoción de lactato en el rumen es importante, porque su acumulación causa problemas tales como: reducción de la salivación, redistribución de agua en el cuerpo y daños a la pared del rumen y otros tejidos, entre otros desordenes. Las condiciones de cultivo, en cuanto a requerimientos nutricionales de *M. elsdenii* y efecto de los factores ambientales, se encuentran bien definidas.

Entre otras características fisiológicas, es bien conocido que: *i)* los ácidos grasos volátiles: acetato, propionato butirato y valerato son los principales productos del metabolismo del lactato, *ii)* *M. elsdenii* utiliza lactato en preferencia a la glucosa en medios que contienen ambos sustratos, *iii)* *M. elsdenii* es, de entre los microorganismos conocidos que consumen lactato en el rumen, el único que no está sujeto a represión catabólica por azúcares solubles, *iv)* el transporte de lactato a través de la membrana aparentemente ocurre por transporte activo, el cual no es dependiente de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ .

En cuanto a la determinación de parámetros cinéticos, los que están relacionados con la ecuación de Monod ( $K_S$  y  $\mu_{\text{max}}$ ) han sido determinados bajo diversas condiciones de cultivo. Además, se conoce la distribución del carbono consumido, en los productos formados por *M. elsdenii*, pero no se ha llevado a cabo un estudio cinético de la formación de ácidos grasos

volátiles, que permita establecer el nivel de asociación entre el crecimiento bacteriano y la formación de productos. Así mismo, no se tiene un estudio detallado de la forma en que *M. elsdenii* satisface sus requerimientos de energía de mantenimiento, bajo diferentes condiciones de cultivo. Por lo que la realización de un estudio sistemático en este campo, permitiría hacer una contribución importante a la fisiología de este microorganismo.

En este trabajo se propone llevar a cabo tal estudio cinético, utilizando modelos matemáticos no estructurados como la ecuación de Luedeking y Piret (1959) y la ecuación de Pirt (1975), bajo diferentes condiciones nutricionales.

Por otra parte, la bioquímica de *M. elsdenii* ha sido estudiada de manera extensa, pero no existe un trabajo que integre el conocimiento que se tiene en este campo y existen algunos vacíos importantes en el conocimiento de su metabolismo. La ruta de producción de acetato y propionato, a partir de lactato, es bien conocida y existe buena evidencia sobre las secuencias de reacción que llevan a la formación de butirato y valerato. Además hay evidencias de que *M. elsdenii* posee los sistemas enzimáticos para utilizar las vías EMP y PP, cuando crece utilizando glucosa como sustrato.

Cuando el crecimiento bacteriano se da sobre sustratos diferentes a la glucosa, el fosfoenolpiruvato (PEP) sirve como compuesto de partida para la gluconeogénesis (que utiliza las reacciones de la vía EMP en sentido inverso), la cual permitiría acceder también a la vía PP. Sin embargo, no hay información sobre cómo se conectan las vías EMP y PP con la vía del

acrilato, cuando *M. elsdenii* crece sobre lactato. Es decir, cómo se evitan las reacciones irreversibles de la vía EMP: la conversión de PEP a piruvato y la conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato, al utilizar la gluconeogénesis.

Ya que esta parte de la bioquímica de *M. elsdenii* no se ha estudiado, en este trabajo se propone medir actividades enzimáticas que permitan establecer las reacciones, o secuencias de reacciones, mediante las cuales el PEP es formado a partir de piruvato y la fructosa-1,6-difosfato es transformada en fructosa-6-fosfato. Esto permitiría integrar el conocimiento actual en una red metabólica completa. La red metabólica así propuesta, será probada utilizando la metodología de análisis de flujos metabólicos, el cual es un área importante de la biotecnología actual que no ha recibido atención en el caso de microorganismos del rumen.

Finalmente, cabe destacar que dada la importancia de la remoción de lactato en el rumen y las características que *M. elsdenii* presenta respecto a este sustrato, todos los estudios realizados en este trabajo estarán basados en medios que contienen lactato como fuente de carbono y energía.

---

### **3. OBJETIVOS**

---

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la fisiología y la bioquímica de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*, durante el consumo de lactato como fuente de carbono, utilizando modelos no estructurados y análisis de flujos metabólicos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Establecer el grado de asociación entre el crecimiento, el consumo de lactato y la producción de ácidos grasos volátiles, durante el cultivo por lote de *Megasphaera elsdenii*, bajo diferentes condiciones nutricionales.
- 3.2.2. Detectar las actividades enzimáticas relacionadas con: *i*) la conversión de piruvato en fosfoenolpiruvato, *ii*) la transformación de fructosa-1,6-difosfato en glucosa-6-fosfato y *iii*) la utilización de la gluconeogénesis y de la vía de las pentosas fosfato, a partir de extractos libres de células, obtenidos de cultivos de *Megasphaera elsdenii* sobre lactato.
- 3.2.3. Proponer una red completa del metabolismo del lactato por *Megasphaera elsdenii*, a partir del conocimiento actual sobre su bioquímica y la nueva evidencia de actividades enzimáticas.
- 3.2.4. Validar la red metabólica propuesta mediante un análisis de flujos metabólicos, a partir de datos de cultivo continuo sobre un medio químicamente definido.

---

## **4. MATERIAL Y METODOS**

---

## 4. MATERIAL Y METODOS

### 4.1. Microorganismo

Se utilizó la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii* CECT 390, donada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa se conservó en anaerobiosis a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en glicerol al 30% p/p.

### 4.2. Medios de cultivo

Se utilizaron tres medios de cultivo. Un medio de recuperación (recomendado por la CECT), para la activación de la cepa conservada, un medio mínimo (químicamente definido) y un medio complejo, éstos dos últimos para el desarrollo experimental. La composición del medio de recuperación fue la siguiente (pH 7.0):

L-lactato de sodio (10 g lactato L <sup>-1</sup> )	20.8 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	3 g
Extracto de levadura	3 g
Cisteína HCl	0.5 g
Solución de resarzurina (0.1%)	1 mL
Solución de sales 1	40 mL
Agua destilada c.b.p.	1000 mL

La solución de sales 1 contiene:

CaCl <sub>2</sub>		0.2 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O		0.2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1 g
NaHCO <sub>3</sub>		10 g
NaCl		2 g
Agua destilada	c.b.p.	1000 mL

La composición del medio mínimo, es la siguiente (pH 7.0):

L-lactato de sodio (5 g lactato L <sup>-1</sup> )		10.4 g
Cisteína HCl		0.5 g
Solución de vitaminas		1 mL
Solución de resarzurina (0.1%)		1 mL
Solución de sales 2		40 mL
Agua destilada	c.b.p.	1000 mL

La solución de vitaminas contiene:

Biotina		0.0005 g
Piridoxina		0.02 g
Pantotenato de calcio		0.02 g
Agua destilada	c.b.p.	100 mL

La solución de sales 2 contiene:

CaCl <sub>2</sub>		0.125 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O		0.125 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1 g
NaHCO <sub>3</sub>		5 g
NaCl		2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		2.5 g
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O		0.05 g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O		0.05 g
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O		0.05 g
CoSO <sub>4</sub> •6H <sub>2</sub> O		0.005 g
Agua destilada	c.b.p.	1000 mL

La composición de medio complejo (pH 7.0) fue la misma que la del medio mínimo, excepto que la solución de vitaminas se substituyó por 0.5 g de extracto de levadura (Bioxon®) y en lugar de la solución de sales 2 se utilizó la solución de sales 1.

Para los casos en que se incorporó un aditivo de la alimentación de rumiantes a un medio de cultivo, se procedió de la siguiente manera. Se pesaron 4 g de aditivo (*Yea Sacc*<sup>1026</sup>, AllTech™), se adicionaron 50 mL de agua desionizada y se agitó durante una hora. Después de esto, se centrifugó a 5000 X g durante 15 minutos, la solución sobrenadante se filtró primero en papel Whatman #41 y después en membrana de 0.45 µm de tamaño de poro. Paralelamente se esterilizó un tubo de 10 mL sellado, al que se le cambió el aire por una atmósfera de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

Se filtró la solución, a través de una membrana estéril utilizando una jeringa desechable de 10 mL, descargando el filtrado dentro del tubo. Del tubo se tomó el volumen necesario para que en el medio correspondiente se tuviera una concentración de 2% v/v, y se transfirió al frasco con medio de cultivo ya estéril.

### **4.3. Cultivo anaerobio**

El medio de cultivo se preparó en tres diferentes recipientes. Medio complejo en tubos de ensaye (10 mL de medio). Medio mínimo y semidefinido en frascos (50, 200 y 1500 mL de medio) y medio mínimo en un reactor (1000 mL). La metodología de cultivo anaerobio que se describe a continuación está basada en la técnica de Hungate (1969), con modificaciones propuestas por otros autores (Macy *et al.*, 1972; Bryant 1972; Miller y Wolin, 1974).

#### **4.3.1. Preparación de medio de cultivo en tubos y frascos**

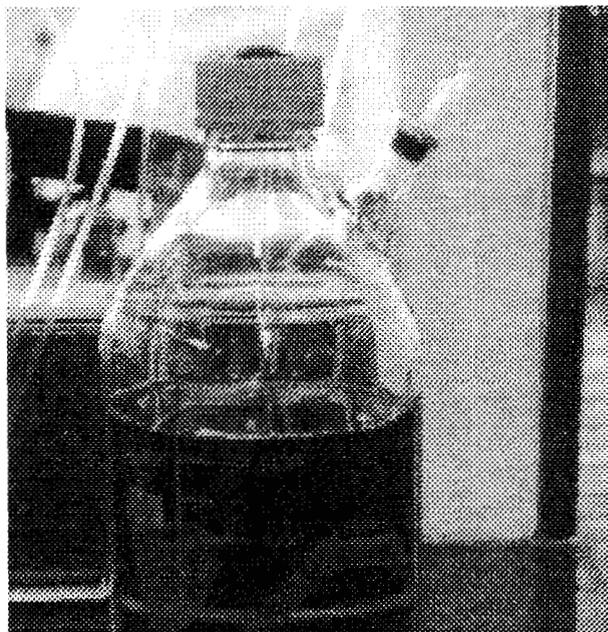
- a) Los componentes del medio se disolvieron, a temperatura ambiente, en agua desionizada.
- b) Se ajustó el pH a 7.0 con KOH 10 N, se adicionó un 10% más de agua y se colocó al matraz una tapa de papel aluminio.
- c) El medio se mantuvo en ebullición hasta consumir el exceso de agua. Cuando inició la ebullición se aplicó una corriente de N<sub>2</sub>, a través de un orificio hecho en la tapa de papel aluminio. Después de consumido el exceso de agua, el color del medio cambió de

azul-violeta a amarillo claro (medio complejo) ó incoloro (medio mínimo), lo que indicó la ausencia de oxígeno.

- d) Sin retirar la corriente de  $N_2$ , se enfrió el medio en baño de agua.
- e) Una vez frío, el medio se vació en tubos de 10 X 150 mm (10 mL a cada uno) y frascos de 250 mL (135 mL a cada uno), mediante el siguiente procedimiento. A una pipeta de 10 mL se le cambia el aire por  $N_2$ , succionando (con propipeta) del interior del matraz que contiene el medio y descargando a la atmósfera (al menos tres veces), mientras tanto, a los tubos y frascos vacíos se les hace pasar una corriente de  $N_2$ . Se pipetea el volumen correspondiente de medio, descargándose en el interior de cada tubo y frasco. Se retira la corriente de  $N_2$  de tubos y frascos e inmediatamente se colocó un tapón de neopreno y se sellan los recipientes con taponés de rosca.
- f) Una vez sellados los recipientes, se hizo pasar en su interior (Figura 4.1) una corriente de  $N_2/CO_2$  (80/20) durante 1 minuto o, si el medio presenta indicios de presencia de oxígeno (coloración rosa), hasta que el color del medio sea amarillo claro o incoloro.
- g) Los tubos y frascos con el medio se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 30 minutos. El color amarillo claro, o incoloro, del medio indicó la ausencia de oxígeno.
- h) Para el caso del medio mínimo, la solución de vitaminas se incorporó al medio ya estéril y frío, a través de una membrana estéril de 0.45  $\mu m$  de tamaño de poro.

Para asegurar que las condiciones de anaerobiosis y de pH se mantienen durante la fermentación, se adicionaron volúmenes suficientes de soluciones madre de  $Na_2S$  (2% p/v) y

$\text{NaHCO}_3$  (10% p/v) para tener una concentración final en el medio de cultivo de 0.4 y 2 g  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 4.1.** Cambio de atmósfera en un frasco con medio de cultivo.

Las soluciones madre de  $\text{Na}_2\text{S}$  y  $\text{NaHCO}_3$ , se prepararon procediendo como se indica a continuación.

- a) Se colocó al fuego un matraz con agua destilada. Se colocó una tapa de papel aluminio y cuando comenzó a ebullición se aplica una corriente de  $\text{N}_2$ . Se continuó con la ebullición durante 5 minutos. Sin retirar la corriente de  $\text{N}_2$  se enfrió el matraz en baño de agua.
- b) Solución de  $\text{Na}_2\text{S}$  2% (agente reductor). Se pesaron 0.4 g de  $\text{Na}_2\text{S}$  y se colocaron en un frasco de 50 mL, al que se le hizo pasar una corriente de  $\text{N}_2$ . Se adicionaron 20 mL de agua destilada libre de oxígeno, utilizando el procedimiento ya descrito para asegurar la anaerobiosis. La solución se esterilizó a 121 °C durante 30 minutos.

c) Solución de  $\text{NaHCO}_3$  10% (Amortiguador de pH). Se pesaron 2 g de  $\text{NaHCO}_3$  y se colocaron en un frasco de 50 mL, procediéndose de la misma manera que en el caso anterior para obtener una solución estéril y libre de oxígeno.

#### **4.3.2. Preparación de medio de cultivo en reactor**

Se pesaron y disolvieron todos los componentes a temperatura ambiente. Se adicionó la solución al reactor y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante una hora. Se dejó enfriar y se hizo pasar una corriente de  $\text{N}_2$ , previamente filtrada en filtro microbiológico estéril, hasta alcanzar condiciones de anaerobiosis. La Figura 4.2 muestra un vista general del reactor.

#### **4.4. Preparación de inóculo e inoculación de cultivos**

*Inóculo para cinética por lote.* Las células en conservación, se reactivaron mediante el proceso que se describe en seguida. El contenido total del tubo (5 mL), se transfirió a un frasco serológico de 120 mL que contiene 45 mL de medio complejo, en condiciones anaerobias y asépticas, procediendo como se describe a continuación.

a) Trabajando siempre cerca de la flama del mechero, se colocó una gota de etanol sobre la tapa de cada tubo y frasco, que al quemarse permite trabajar con los tapones en condiciones asépticas.

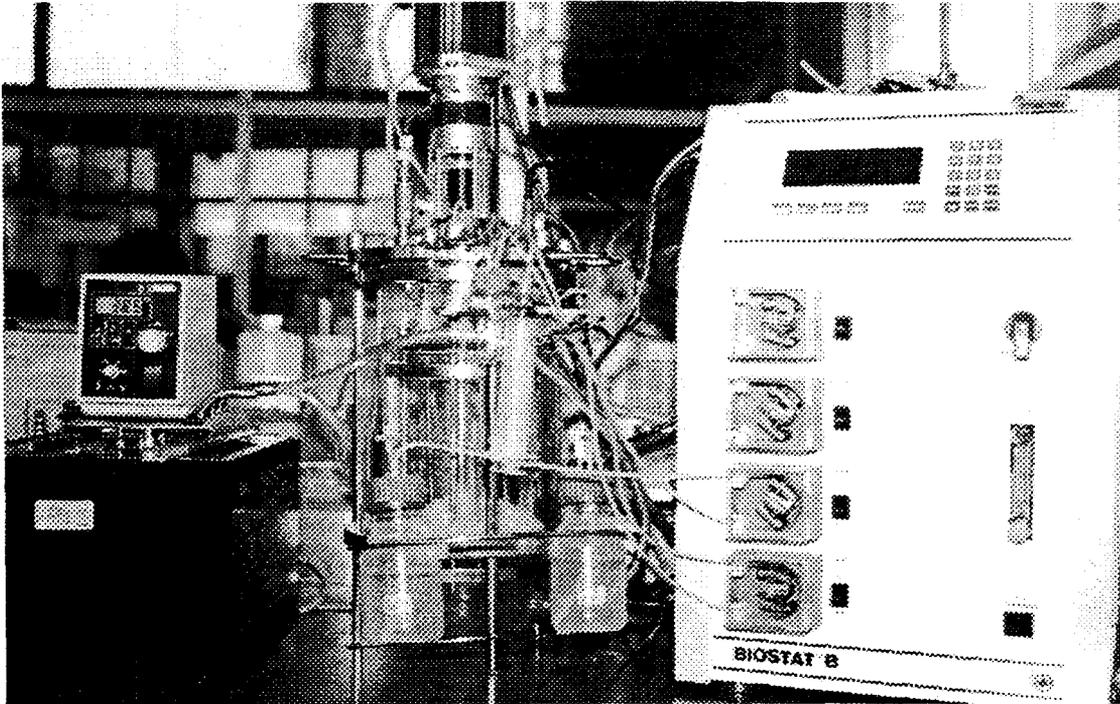
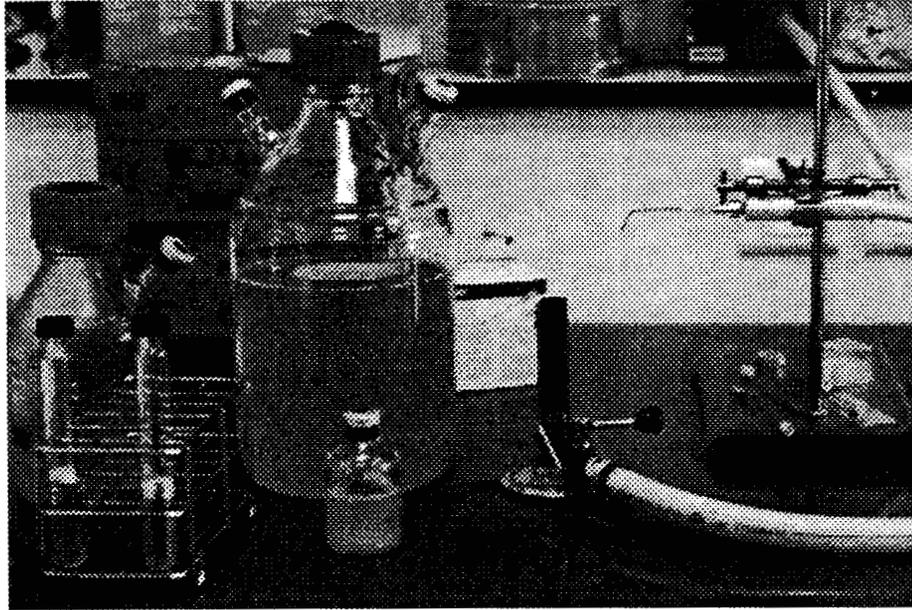


Figura 4.2. Vista del reactor que se utilizó para el cultivo continuo de *M. elsdenii*.

- b) Mientras el alcohol se quemaba, se le cambió la atmósfera a una jeringa de volumen apropiado, utilizando una corriente estéril de  $N_2$  (Figura 4.3), reteniendo en la jeringa un volumen de gas igual al del líquido que se extrajo del tubo o frasco correspondiente.
- c) Se introdujo la aguja en el tapón del tubo y se inyectó el gas, para posteriormente extraer el mismo volumen de líquido.
- d) Se introdujo la aguja en el tubo o frasco correspondiente, descargando el volumen. Sólo es necesario cambiar la atmósfera de la jeringa cuando se usa una jeringa diferente.
- e) Se incubó a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , durante 24 h. De este frasco se tomaron 5 mL y se transfirieron a un frasco que contenía 45 mL de medio semidefinido, el cual se incubaba a las mismas condiciones, durante 24 h. Se repitió el procedimiento anterior, incubándose durante 12 h.

Este último cultivo, se utilizó inmediatamente como inóculo para las cinéticas a un nivel de 10% v/v.



**Figura 4.3.** Obtención de una corriente estéril de  $N_2$ . Con el gas fluyendo, se calienta al rojo vivo la aguja metálica y después sólo es necesario mantener cerca el mechero. La jeringa está empacada con fibra de vidrio para filtrar los posibles contaminantes microbianos, presentes en la corriente de nitrógeno.

*Inóculo para cultivo continuo.* Para este caso se procedió prácticamente igual que en el caso anterior. La diferencia es que del frasco incubado 24 h se transfirieron 10 mL a un frasco serológico de 250 mL, que contenía 90 mL de medio mínimo; se incubó a 37 °C, durante 12 h, utilizándose todo el contenido como inóculo para el reactor de un litro. Para las dos tasas de dilución que se utilizaron (0.05 y 0.1 h<sup>-1</sup>), el proceso se inició con una operación por lote durante 22 h. Después de este periodo, se comenzó a alimentar medio fresco y a retirar medio fermentado, iniciándose el cultivo continuo propiamente dicho.

#### 4.5. Tratamiento de muestras

El procedimiento para tratar las muestras de fermentación se esquematiza en la Figura 4.3, a continuación.

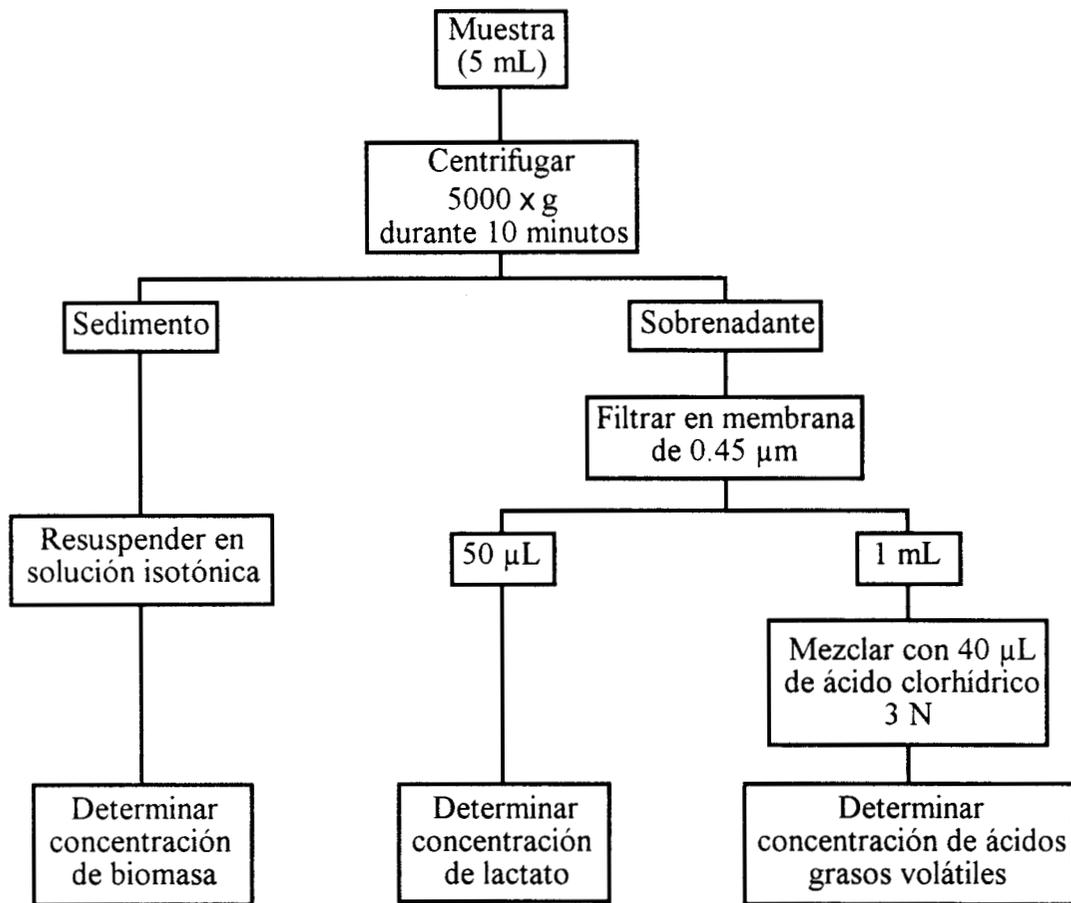


Fig. 4.3. Esquema del proceso de tratamiento de muestras.

Cada una de las muestras (5 mL), se centrifugó a 5000 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante y se resuspendió la biomasa, en un volumen equivalente de solución isotónica. La biomasa resuspendida, se utilizó para medir concentración de biomasa. El sobrenadante se filtró en membrana de 0.45 µm, del filtrado se tomaron 50 µL que se

utilizan para medir ácido láctico. Del resto del filtrado se tomó 1 mL y se mezcló con 0.04 mL de solución de HCl 3N, lo que constituye la muestra para medir ácidos grasos volátiles.

#### 4.6. Técnicas analíticas

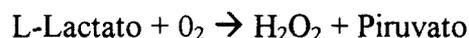
##### 4.6.1. Concentración de biomasa

Se determinó por turbidimetría (Goodhue *et al.*, 1986), leyendo densidad óptica (D.O.) de la suspensión de células, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, a 660 nm. Con la lectura de D.O. se interpoló en una curva patrón, obteniéndose la concentración de biomasa en  $\text{g L}^{-1}$ . Para preparar la curva patrón de densidad óptica contra biomasa, se partió de un cultivo de *M. elsdenii* de 12 h de incubación con un volumen aproximado de 500 mL, se tomaron (por cuadruplicado) muestras de 1, 2, 3, 4, 5, 6,7 y 8 mL; en tubos para centrífuga, que previamente se llevaron a peso constante. Las muestras fueron centrifugadas a  $5000 \times g$  durante 25 minutos. Se separó el sobrenadante y, en todos los casos, se resuspendieron las células en 5 mL de agua destilada, de manera que, del cultivo original unas muestras se concentraron y otras se diluyeron, excepto las de 5 mL que quedaron con su concentración original. Una vez resuspendidas las muestras, se midió D.O. a 660 nm. Las muestras se centrifugaron nuevamente, bajo las mismas condiciones. Se separó el sobrenadante y los tubos con las células se llevaron nuevamente a peso constante. El peso seco de células en cada muestra se determinó por diferencia de peso de los tubos al final del experimento y el peso original, con lo que se obtuvieron datos de concentración de biomasa ( $0.07$  a  $0.61 \text{ g L}^{-1}$ ) contra D.O. ( $0.24$  a

1.32 unidades de absorbancia). Con estos datos se construyó la curva de calibración en el rango de 0.07 a 0.38 g de biomasa L<sup>-1</sup> y 0.2 a 1 unidades de absorbancia, en el que la relación es lineal entre ambas y se cumple la ecuación de Lambert-Beer (Ayres, 1970). Cuando la lectura fue mayor a 1 unidad de absorbancia, se hizo una dilución adecuada para que la lectura entrara en el rango de la Figura 4.4.

#### **4.6.2. Concentración de L-lactato**

El análisis de L-lactato se llevó a cabo utilizando un analizador bioquímico YSI 2700 SELECT (Yellow Springs Instruments, USA), que realiza la medición directa del L-lactato en solución, utilizando una membrana con L-lactato oxidasa inmovilizada. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



El peróxido de hidrógeno producido por la reacción es medido electroquímicamente y presenta una relación equimolar con el L-lactato.

#### **4.6.3. Concentración de ácidos grasos volátiles**

Los ácidos acético, propiónico, butírico y valérico se determinaron por cromatografía de gases (Jouany, 1982). Se utilizó un cromatógrafo de gases Autosystem XL (Perkin Elmer, USA) con

automuestreador. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla a una columna capilar PE-FFAP. La fase móvil utilizada fue Helio a 30 cm/s. Las condiciones utilizadas fueron: 250 °C en el inyector, en la columna 100 °C inicial, 170 °C final con una rampa de 10 °C/minuto y 300 °C en el detector de ionización de flama. Se inyectaron muestras de concentración conocida (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 g/L) para obtener una curva estándar e interpolar la concentración de las muestras problema. Los tiempos típicos de retención fueron:

Compuesto	Tiempo de retención (Minutos)
Acido acético	3.5
Acido propiónico	4.1
Acido butírico	5.6
Acido valérico	6.3

#### 4.7. Preparación de extractos libres de células para los ensayos de actividad enzimática

Durante la preparación de los extractos libres de células no se utilizaron condiciones de anaerobiosis, ya que generalmente no se requieren cuando se utilizan células como fuentes de enzimas (Ljungdahl y Wiegel, 1986).

- a) El caldo proveniente de un cultivo por lote (3 L), con una concentración de biomasa de aproximadamente 0.2 g biomasa  $\text{L}^{-1}$ , se almacenó en refrigeración (4 °C), durante 3 horas.

- b) Una vez frío, el cultivo se centrifugó a 5000 X g durante 10 minutos a 4 °C.
- c) Se desechó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces, resuspendiendo en 20 mL de amortiguador Tris-HCl (100 mM, pH 7), conteniendo EDTA (1 mM) KCl (100 mM) y ditioneitol (DTT, 0.1 mM) a 4 °C.
- d) Se desechó el sobrenadante y la pasta de células, extendida uniformemente en un mortero, se congeló con nitrógeno líquido.
- e) Una vez congeladas, las células se rompieron por molienda en el mortero.
- f) Después de la molienda, se agregaron 5 mL del amortiguador ya descrito para resuspender y los restos celulares se separaron por centrifugación a 20000 X g, durante 20 minutos a 4 °C.
- g) Se recuperó el sobrenadante, que fue utilizado directamente como extracto crudo, manteniendo el tubo en baño de hielo. El contenido de proteína del extracto fue determinado por el método de Lowry (1951), usando ovoalbumina como estándar.

Ya que las reacciones enzimáticas sí se llevaron a cabo bajo condiciones de anaerobiosis, el sobrenadante fue burbujado con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) durante 10 minutos, después de lo cual el flujo de gas se mantuvo justo arriba de la superficie del extracto.

#### **4.8. Ensayos de actividades enzimáticas**

Todas las soluciones que se utilizaron para obtener las mezclas de reacción se prepararon inmediatamente antes de usarse, mezclando los componentes (excepto el extracto crudo y el sustrato) bajo condiciones de anaerobiosis. El sustrato se preparó en una solución aparte también bajo condiciones de anaerobiosis. En todos los casos, las soluciones se prepararon más concentradas, de manera que la concentración de cada componente en la mezcla final de reacción fuera la indicada en la Tabla 4.1. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 3 mL, utilizando fotoceldas de cuarzo colocadas en portaceldas con temperatura controlada, dentro de la cámara de un espectrofotómetro Shimadzu UV160A. Para preservar las condiciones de anaerobiosis, a la cámara del espectrofotómetro se le hizo pasar una corriente de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, Praxair™) libre de oxígeno.

Para llevar a cabo las reacciones se permitió que la mezcla (2.9 mL), sin sustrato y sin extracto crudo, alcanzara la temperatura de reacción (30 °C), se adicionaron 50 µL de extracto crudo e inmediatamente se inició la reacción mediante la adición de la solución de sustrato (50 µL). Todas las actividades enzimáticas se determinaron midiendo directamente (en línea) el consumo/producción de NADH+H<sup>+</sup> a 340 nm durante 1 minuto, programando el equipo para registrar lecturas cada 10 segundos. La actividad enzimática se estimó calculando la tasa inicial de reacción, como la pendiente de la curva de progreso de la concentración de NADH+H<sup>+</sup> contra el tiempo (Segel, 1993).

**Tabla 4.1.** Ensayos de actividades enzimáticas que se determinaron midiendo el consumo/producción de NADH+H<sup>+</sup>.

Enzima	Mezcla de reacción	Referencia
Piruvato carboxilasa	Tris-HCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 10 mM, KHCO <sub>3</sub> 13 mM, ATP 1.3 mM, NADH+H <sup>+</sup> 0.25 mM, seroalbumina bovina 1 mg, malato deshidrogenasa 7.5 U y piruvato 1.3 mM	Tosaka <i>et al.</i> , 1979
PEP carboxicinasas*	HEPES 50 mM, IDP 1 mM, MnCl <sub>2</sub> 1mM, DTT 1 mM, NADH+H <sup>+</sup> 0.25 mM, NaHCO <sub>3</sub> 50 mM, 7 unidades de enzima málica y PEP 2 mM	Bentley y Lardy, 1976
Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa	Tris-HCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 15 mM, MnCl <sub>2</sub> 1 mM NADH+H <sup>+</sup> 0.5 mM, DTT 1 mM y 1,3 difosfoglicerato 2 mM	Ganter y Pluckthun, 1990
Fructosa-1,6 difosfatasa	Tris-HCl 100 mM, EDTA 0.5 mM, MgCl <sub>2</sub> 10 mM, NAD <sup>+</sup> 0.3 mM, glucosa fosfato isomerasa 3 U, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1 U y fructosa-1,6-difosfato 100 mM	Charles y Halliwell, 1980
Glucosa-6-P deshidrogenasa	Tris-HCl 50 mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, NAD <sup>+</sup> 0.4 mM y glucosa-6-fosfato 5 mM	Postma <i>et al.</i> , 1989
Enzima málica	Tris-HCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 10 mM, KHCO <sub>3</sub> 13 mM, NADH+H <sup>+</sup> 0.25 mM y piruvato 1.3 mM	Joyner y Baldwin, 1966

\*En el sentido de la síntesis de oxalacetato.

En todos los casos el coeficiente de correlación fue mayor a 0.98. Para todas las actividades enzimáticas se llevaron a cabo reacciones en ausencia de sustrato y la actividad así obtenida se restó a la actividad en presencia de sustrato, de modo que los resultados que se presentan son los corregidos. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria que cataliza la conversión de un nmol de sustrato por minuto a 30 °C y a pH 7.

La actividad de la PEP carboxicinasa en el sentido de la síntesis de PEP se determinó utilizando la técnica descrita por Bentle y Lardy (1976), la cual consiste en lo siguiente: la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 mL: amortiguador HEPES 50 mM (pH 7), ITP 2 mM,  $MgCl_2$  3 mM, 100  $\mu$ L de extracto crudo y oxalacetato (sustrato) 1.5 mM. La reacción se detuvo después de 5 minutos sumergiendo los tubos (5 mL) en baño de hielo. El PEP fue medido espectrofotométricamente, para lo cual se extrajo 1 mL de la mezcla de reacción anterior y se llevó a un volumen final de 3 mL de una mezcla de reacción que contenía amortiguador Tris-HCl 70 mM (pH 7),  $NADH+H^+$  0.15 mM, ADP 1.67 mM,  $MgSO_4$  4 mM y KCl 33 mM. Se adicionaron 6 unidades de lactato deshidrogenasa, se midió la D.O. a 340 nm, posteriormente se adicionaron 6 unidades de piruvato cinasa y se midió nuevamente la D.O. La reacción se realizó también en ausencia de oxalacetato para corregir las actividades. En todos los casos, las actividades medidas en ausencia del correspondiente sustrato fueron siempre menores al 10% de la actividad medida en presencia de sustrato.

---

**5. ASOCIACION ENTRE EL  
CRECIMIENTO, EL CONSUMO DE  
LACTATO Y LA PRODUCCION DE AGV**

---

## 5. ASOCIACION ENTRE EL CRECIMIENTO, EL CONSUMO DE LACTATO Y LA PRODUCCION DE AGV

En este capítulo se proponen y aplican las ecuaciones de un modelo no estructurado para estudiar el nivel de asociación entre el crecimiento, el consumo de lactato y la producción de ácidos grasos volátiles por *Megasphaera elsdenii*. Se inicia con la proposición de las ecuaciones del modelo. Posteriormente, las ecuaciones se ajustan a los datos experimentales de crecimiento, consumo de lactato y producción de ácidos grasos volátiles en cultivo por lote. Finalmente, se discuten las implicaciones biológicas de los parámetros del modelo.

### 5.1. El modelo no estructurado

La relación entre el crecimiento y el consumo/formación de sustrato/producto puede establecerse por simple inspección visual de gráficas superpuestas de cinéticas de crecimiento y consumo/formación de sustrato/producto, o bien, por medio de un análisis cinético cuantitativo (suponiendo que no hay formación de productos diferentes a la biomasa) utilizando las ecuaciones de Pirt (1975):

$$-\frac{dL}{dt} = \frac{1}{Y_{XL}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (5.1)$$

y Luedeking-Piret (1959):

$$\frac{dP_i}{dt} = \alpha_i \frac{dX}{dt} + \beta_i X \quad (5.2)$$

donde: X = concentración de biomasa

t = tiempo

L = concentración de lactato

$Y_{X/L}$  = rendimiento de biomasa con respecto a lactato

m = coeficiente de mantenimiento

$P_i$  = concentración del producto *i* (en el caso del presente trabajo, cada uno de los productos formados por *M. elsdenii*)

$\alpha_i$  = coeficiente de formación del producto *i* asociado al crecimiento

$\beta_i$  = coeficiente de formación del producto *i* no asociado al crecimiento.

Yamane y colaboradores (1996), usando el método gráfico, encontraron que la producción de poli(3-hydroxyvalerato) por *Paracoccus denitrificans* es asociada al crecimiento. Sin embargo, éste método no permite una determinación cuantitativa del nivel de asociación buscado. En contraste, las ecuaciones de Pirt y Luedeking-Piret se han usado para describir cuantitativamente la relación entre el crecimiento, el consumo de sustrato y la formación de producto (Nielsen y Villadsen, 1994). Este método fue usado recientemente para analizar la producción anaerobia de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* (Passos *et al.*, 1994) y de

leucotoxina por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Ohta *et al.*, 1996). En ambos casos, se estableció una producción parcialmente asociada al crecimiento.

Cabe aclarar que en el caso del presente trabajo, la cantidad de sustrato que se utiliza para síntesis de productos es significativa, por lo que se debería utilizar una ecuación que incluya un término de consumo de sustrato para formación de productos, como la siguiente:

$$-\frac{dL}{dt} = \frac{1}{Y_{X/L}} \frac{dX}{dt} + mX + \sum_i \frac{1}{Y_{P_i/L}} \frac{dP_i}{dt} \quad (5.1a)$$

Los resultados obtenidos cuando se utilizó la ecuación 5.1a, fueron desechados porque en unos casos se obtuvieron rendimientos negativos de biomasa con respecto a lactato y, en otros casos, coeficientes de mantenimiento negativos, lo que no tiene sentido desde el punto de vista biológico. Probablemente lo anterior se debe a la dispersión de los datos experimentales y, sobretodo, a la carencia de la cinética de formación de uno de los productos (CO<sub>2</sub>). Ooikaas y colaboradores (2000) presentan un caso similar, en el que no incluyen el término de síntesis de producto en la ecuación de Pirt porque desconocen la cinética de formación de productos. Por lo tanto, se utilizó la ecuación 5.1, ya con ella se obtuvieron resultados lógicos desde el punto de vista biológico, para los que no hay que perder de vista que la estimación del coeficiente  $Y_{X/L}$  dará resultados irreales que no pueden compararse con los rendimientos experimentales. Sin embargo, lo relevante de este análisis es determinar si el microorganismo utiliza una parte significativa de la energía del sustrato consumido, para funciones de mantenimiento.

El procedimiento más común para aplicar las ecuaciones de Pirt y Luedeking-Piret, implica calcular las tasas específicas de crecimiento ( $\mu$ ), consumo de sustrato ( $q_s$ ) y formación de producto ( $q_p$ ). Estas se calculan punto a punto, utilizando las siguientes relaciones (Wang *et al.*, 1979):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (5.3)$$

$$q_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (5.4)$$

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (5.5)$$

Como se puede apreciar en las ecuaciones anteriores, se requieren estimados de las derivadas en cada punto y, una vez estimado el valor de la derivada, éste se divide entre la concentración de biomasa correspondiente. En este trabajo, en lugar de utilizar este procedimiento, se propone uno similar al usado por Ooijkaas y colaboradores (2000), quienes, usando la ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (5.6)$$

donde:  $\mu_{\max}$  = tasa específica máxima de crecimiento

$X_{\max}$  = concentración máxima de biomasa

en conjunto con las ecuaciones de Pirt y Luedeking-Piret, desarrollaron complejas expresiones para el crecimiento, consumo de sustrato y síntesis de producto, como funciones del tiempo. Sin embargo, en el presente documento, siguiendo un procedimiento matemático de integración diferente, se desarrollaron ecuaciones más simples.

La ecuación logística se ha utilizado con frecuencia para describir adecuadamente el crecimiento bacteriano (Howell, 1983; Broughall *et al.*, 1983; Mercier *et al.*, 1992). Por otra parte, Luedeking y Piret (1959), estudiando la producción de lactato a partir de glucosa por *Lactobacillus delbrueckii*, consideraron dos componentes en la producción total de lactato: una fracción de lactato es producida para obtener la energía necesaria para formar nuevo protoplasma bacteriano, mientras la otra fracción es producida para obtener la energía necesaria para la actividad metabólica normal que no tiene que ver con el crecimiento. De esta forma, en las ecuaciones 5.1 y 5.2, el primer término del lado derecho es la tasa de consumo/síntesis que es proporcional a la tasa de crecimiento, mientras el segundo término es la tasa de consumo/síntesis relacionada a la cantidad de biomasa total presente (Luedeking y Piret, 1959; Pirt, 1975; Wang *et al.*, 1979).

De la integración de la ecuación 5.6 se obtiene:

$$X(t) = \frac{X_{\max}}{1 + \left( \frac{X_{\max}}{X_0} - 1 \right) e^{-\mu_{\max} t}} \quad (5.7)$$

donde  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa. Por otra parte, la ecuación 5.1 puede reescribirse como sigue:

$$-\frac{d(L - X/Y_{X/L})}{dt} = mX \quad (5.8)$$

dividiendo la ecuación 5.8 entre la ecuación 5.6, se obtiene:

$$-\frac{d(L - X/Y_{X/L})}{dX} = \frac{m}{\mu_{\max} \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)} \quad (5.9)$$

La integración de la ecuación 5.9 da:

$$L(X) = L_0 - \frac{1}{Y_{X/L}} (X - X_0) - \frac{mX_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right) \quad (5.10)$$

donde  $L_0$  es la concentración inicial de lactato. De manera similar, reescribiendo la ecuación 5.2, dividiendo entre la ecuación 5.6 e integrando, se obtiene la siguiente expresión:

$$P_i(X) = P_{i,0} + \alpha_i(X - X_0) + \frac{\beta_i X_{\max}}{\mu_{\max}} \operatorname{Ln} \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right) \quad (5.11)$$

donde  $P_{i,0}$  es la concentración inicial del producto  $i$ . Los datos de cultivo por lote, que se presentan en la siguiente sección, fueron utilizados para ajustar todos los parámetros, usando el paquete estadístico *StatGraphics plus 2.1* para *Windows*, el cual utiliza el algoritmo de Marquardt (1963) y calcula el intervalo de confianza (95%) para cada parámetro ajustado.

La ecuación 5.7 fue usada para estimar  $X_0$ ,  $X_{\max}$  y  $\mu_{\max}$ . La ecuación 5.10 permite ajustar los datos de crecimiento y consumo de lactato para estimar  $L_0$ ,  $Y_{x/L}$  y  $m$ , mientras que la ecuación 5.11 fue usada para estimar  $P_{i,0}$ , el término de formación asociada al crecimiento ( $\alpha_i$ ) y el término de formación no asociada al crecimiento ( $\beta_i$ ) para cada producto formado por *M. elsdenii*. Los valores de  $X_0$ ,  $X_{\max}$  y  $\mu_{\max}$  estimados de la ecuación 5.7 fueron usados en las ecuaciones 5.10 y 5.11.

El cálculo del intervalo de confianza es de particular importancia, ya que los intervalos de confianza que contienen al valor cero, corresponden a parámetros que pueden ser eliminados del modelo sin afectar significativamente el ajuste (Dowdy y Wearden, 1985).

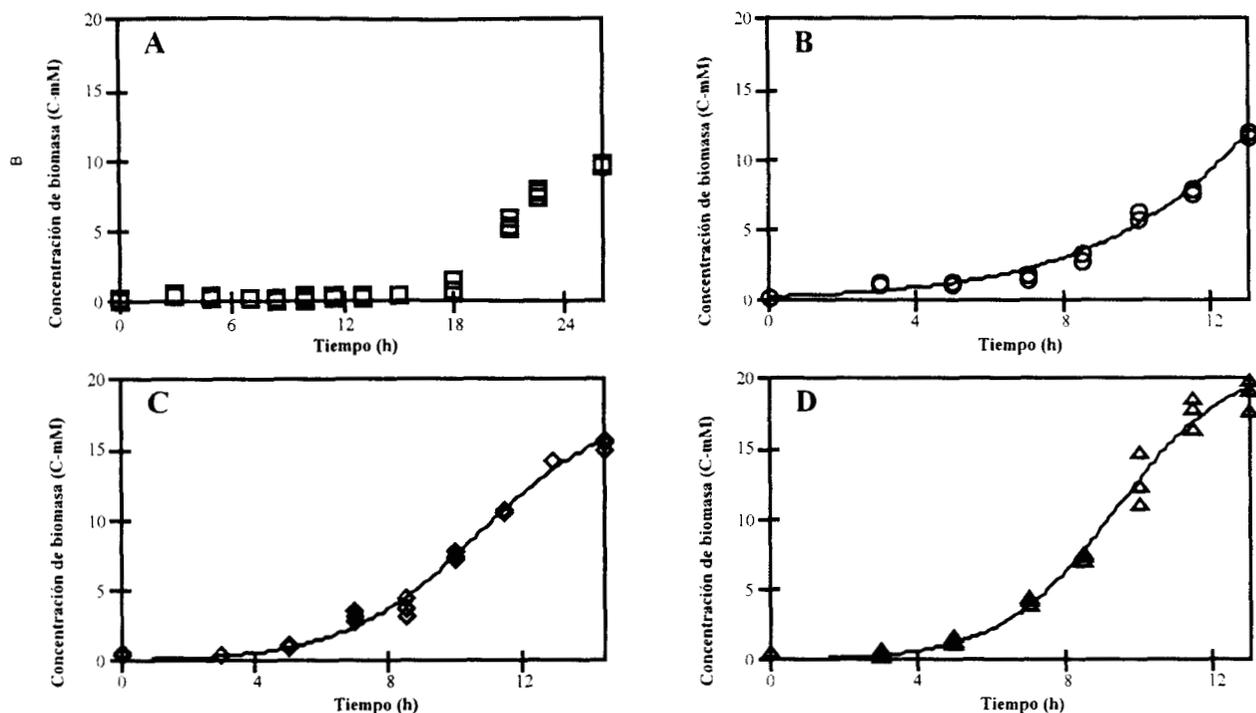
## **5.2. Cultivo por lote de *Megasphaera elsdenii***

Forsberg (1978) demostró que *M. elsdenii* es capaz de crecer en un medio químicamente definido que contenga minerales, lactato como única fuente de carbono y energía,  $\text{NH}_4^+$  como única fuente de nitrógeno, sulfato como única fuente de azufre y las vitaminas biotina, piridoxina y pantotenato de calcio. En el medio complejo utilizado en el presente trabajo, las vitaminas, algunos minerales (Mn, Fe, Zn y Co) y la fuente de nitrógeno fueron substituidos por extracto de levadura (Bioxon<sup>®</sup>), ya que este es reconocido como una excelente fuente de tales nutrientes (Benthin y Villadsen, 1996; Conway *et al.*, 2001).

Por otra parte, ya que recientemente se ha incrementado el interés en los efectos de los aditivos microbianos de la alimentación de rumiantes sobre el rumen, su microflora y el animal completo (Callaway y Martin, 1997), se decidió incluir un aditivo de la alimentación (ver sección 4.3.2) elaborado a base de levaduras (Yea Sacc<sup>1026</sup>, AllTech<sup>™</sup>), como una condición nutricional adicional.

### **5.2.1. Efecto de la composición del medio**

De los resultados presentados en las figuras 5.1 a 5.6 es evidente que la composición del medio de cultivo influyó de manera importante en el desarrollo de los cultivos.



**Figura 5.1.** Cinéticas de crecimiento de *Megasphaera elsdenii* en medio mínimo sin (A) y con (B) aditivo y en medio complejo sin (C) y con (D) aditivo.

En la Figura 5.1 se observa que, en medio mínimo (A y B), la presencia del aditivo redujo considerablemente la duración de la fase *lag* e incrementó la concentración máxima de biomasa (15%,  $P < 0.01$ ). La cinética de crecimiento en el medio mínimo con aditivo fue similar a la cinética de crecimiento en medio complejo sin aditivo, lo que sugiere que el aditivo podría contener algunos nutrientes similares a los que se encuentran en el extracto de levadura. Esto se ha sugerido para el caso del aditivo, de origen fúngico, denominado Amaferm (Waldrup y Martin, 1993). La Figura 5.1D muestra que, cuando el aditivo fue agregado al medio complejo, no hubo cambios en la duración de la fase *lag*, pero la concentración máxima de biomasa se incrementó en 23% ( $P < 0.01$ ), probablemente debido a la incorporación adicional de carbono contenido en el aditivo. Callaway y Martin (1997) no observaron crecimiento de *M. elsdenii* en medio sin componentes complejos; sin embargo, su medio mínimo no contenía las vitaminas a

las cuales *M. elsdenii* es auxótrofo. Las cinéticas de consumo de lactato (Fig. 5.2) siguieron el mismo perfil del crecimiento bacteriano. La reducción de la duración de la fase *lag*, en medio mínimo (A y B), también se observa en las cinéticas de consumo de lactato.

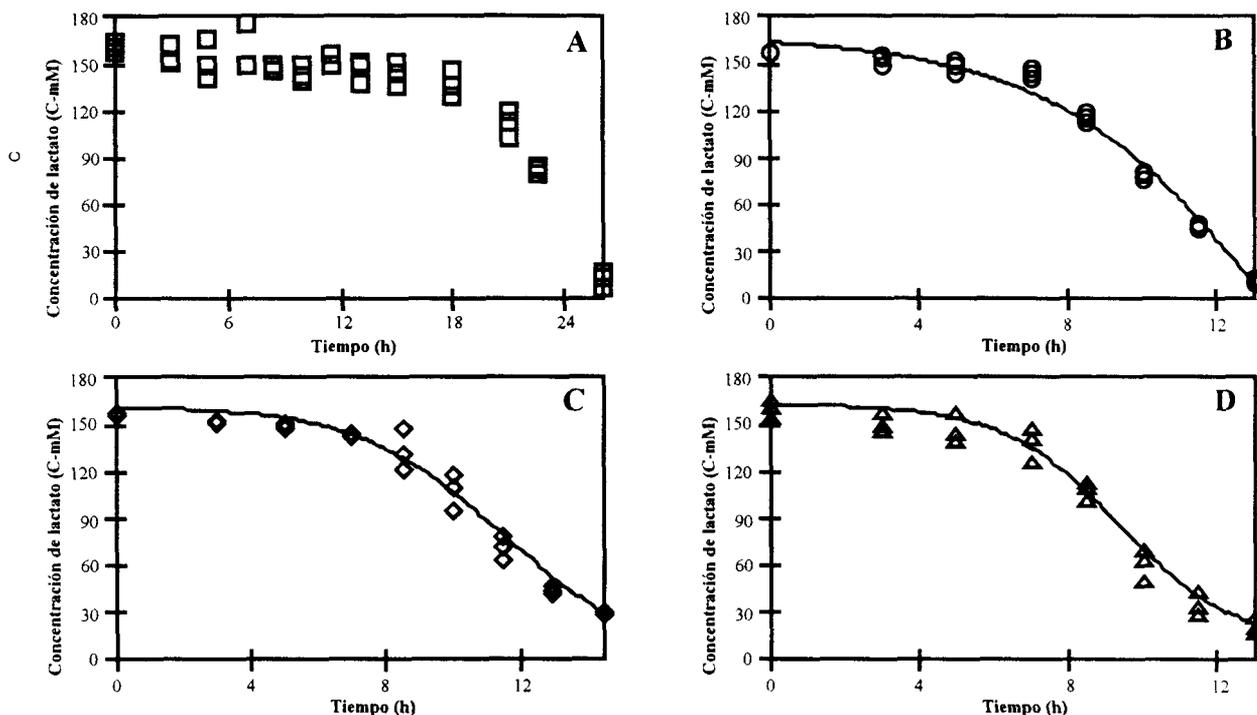


Figura 5.2. Cinéticas de consumo de lactato por *Megasphaera elsdenii* en medio mínimo sin (A) y con (B) aditivo y en medio complejo sin (C) y con (D) aditivo.

Los rendimientos de biomasa con respecto a lactato consumido fueron de 0.067, 0.081, 0.112 y 0.134 C-mol biomasa (C-mol lactato)<sup>-1</sup>, en los medios mínimo sin aditivo, mínimo con aditivo, complejo sin aditivo y complejo con aditivo, respectivamente. Al contrastar estos valores de rendimiento con los de la literatura, que aparecen en la Tabla 1.1 (página 17), se observa que son comparables con los determinados por otros autores al cultivar *M. elsdenii* sobre lactato. Por otra parte, las cinéticas de producción de AGV por *M. elsdenii* se presentan en las Figuras 5.3 a 5.6.

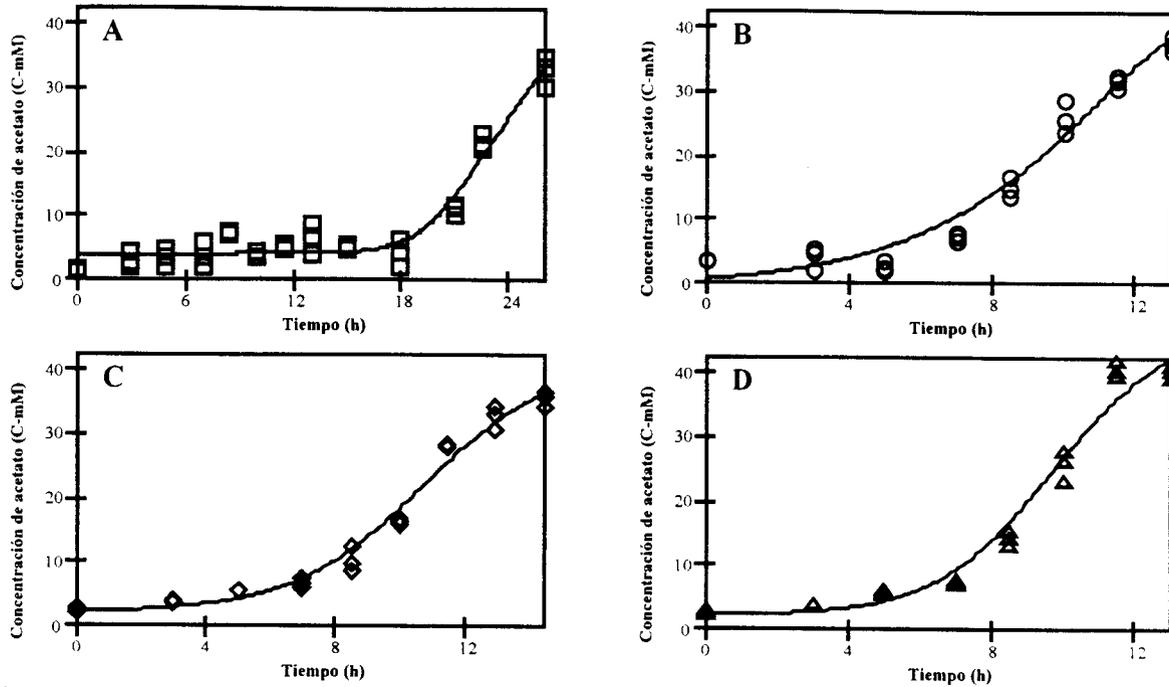


Figura 5.3. Cinéticas de producción de acetato por *Megasphaera elsdenii* en medio mínimo sin (A) y con (B) aditivo y en medio complejo sin (C) y con (D) aditivo.

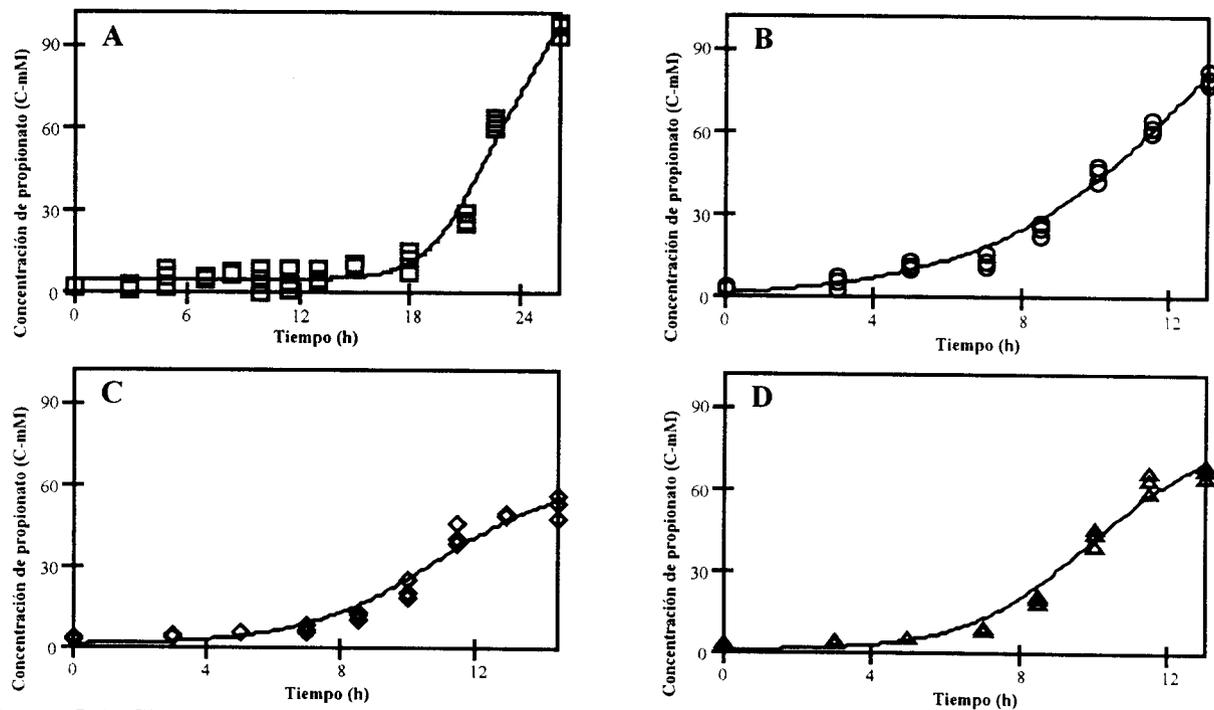


Figura 5.4. Cinéticas de producción de propionato por *Megasphaera elsdenii* en el medio mínimo sin (A) y con (B) aditivo y en medio complejo sin (C) y con (D) aditivo.

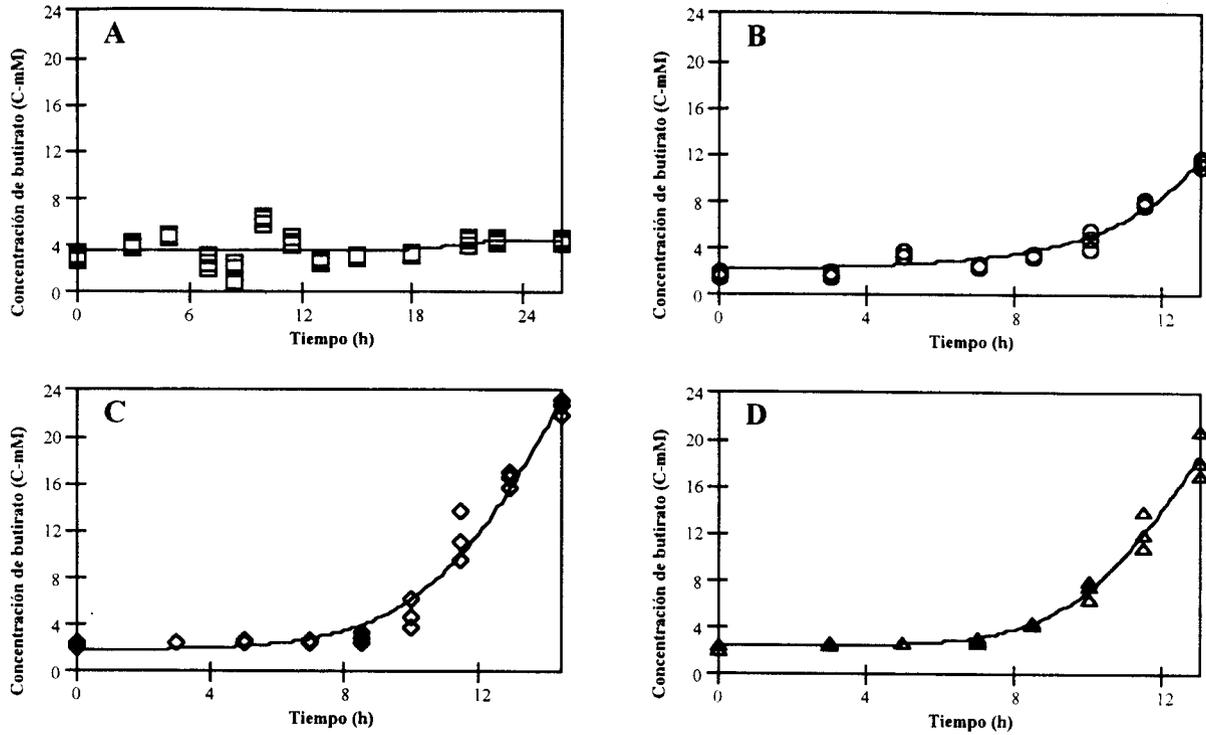


Figura 5.5. Cinéticas de producción de butirato por *Megasphaera elsdenii* en medio mínimo sin (A) y con (B) aditivo y en medio complejo sin (C) y con (D) aditivo.

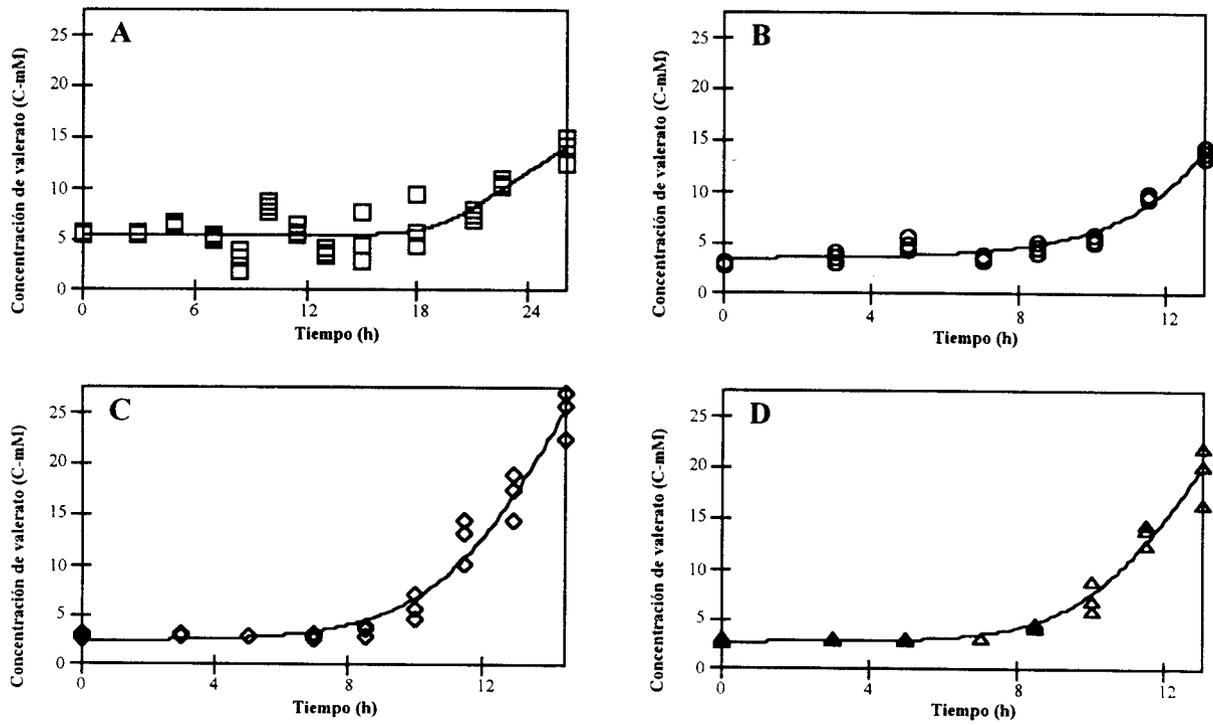


Figura 5.6. Cinéticas de producción de valerato por *Megasphaera elsdenii* en medio mínimo sin (A) y con (B) aditivo y en medio complejo sin (C) y con (D) aditivo.

Debe señalarse que, aunque se incluyeron los estándares correspondientes en los cromatogramas, no se detectaron picos que correspondientes a AGV de cadena ramificada, como isobutirato e isovalerato, ni caproato. Los únicos productos metabólicos detectados fueron acetato, propionato, butirato y valerato, además del CO<sub>2</sub> que no se midió. Aunque la concentración final de acetato fue prácticamente independiente de la composición del medio de cultivo (Fig. 5.3), la concentración final de propionato disminuyó al aumentar la complejidad del medio (Fig. 5.4). En contraste, las concentraciones finales de butirato y valerato fueron incrementadas al aumentar la complejidad del medio (Figs. 5.5 y 5.6). La Tabla 5.1 muestra los resultados de la distribución de carbono en los productos de la fermentación. Estos resultados corresponden a los tiempos de incubación en que se alcanzó la máxima concentración de biomasa.

**Tabla 5.1.** Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la distribución de carbono en AGV por *Megasphaera elsdenii* creciendo en diferentes condiciones nutricionales.

	Medio mínimo <sup>a</sup>		Medio complejo <sup>a</sup>	
	Sin aditivo	Con aditivo	Sin aditivo	Con aditivo
Biomasa (%)	6.7±0.3	5.7±0.2	7.9±0.6	7.6±0.4
Acetato (%)	21.0±1.6	12.7±0.7	15.1±0.9	15.4±0.7
Propionato (%)	63.4±1.8	41.2±2.6	22.8±2.9	26.3±1.5
Butirato (%)	1.1±0.1	8.6±0.2	13.3±0.3	9.9±1.2
Valerato (%)	5.6±0.5	16.7±0.3	16.5±1.4	15.3±1.6
CO <sub>2</sub> <sup>b</sup> (%)	12.1±0.4	14.0±0.2	17.5±0.6	20.4±0.5
C recuperado (%)	109.8±0.7	99.0±1.1	93.1±0.9	94.9±1.6

<sup>a</sup>Cada valor es el promedio (±desviación estándar) de tres cultivos al tiempo de incubación en que se obtuvo la máxima concentración de biomasa.

<sup>b</sup>Estimado a partir de la bioquímica y las cantidades producidas de acetato, butirato y valerato (explicación detallada en el párrafo que sigue a esta tabla).

Ya que la producción de CO<sub>2</sub> no fue medida, se estimó considerando: *i*) *M. elsdenii* produce una molécula de CO<sub>2</sub> por cada molécula de acetil-CoA formada en la vía del acrilato (Gottschalk, 1986) y, *ii*) para producir acetato, butirato y valerato, se requieren una, dos y una moléculas de acetil-CoA, respectivamente (Gottschalk, 1986; Russell y Wallace, 1988). De esta forma, la producción de CO<sub>2</sub> fue estimada en base a las cantidades producidas (en base molar) de acetato, butirato (multiplicada por dos) y valerato. La Tabla 5.1 muestra que, debido a la presencia del aditivo, en el medio mínimo disminuyó la cantidad de carbono encontrado en la biomasa (15%, P<0.05); sin embargo, en medio complejo, la cantidad de carbono encontrado en la biomasa no cambió (P<0.1). El contenido de carbono en el acetato disminuyó por la presencia del aditivo sólo en medio mínimo (40%, P<0.01). El carbono expresado como propionato disminuyó (35%, P<0.01) por la presencia del aditivo en medio mínimo, mientras que no cambió en medio complejo (P<0.1). En el medio mínimo, el contenido de carbono en butirato y valerato se incrementó 681% y 198%, respectivamente (P<0.01). En medio complejo, sólo el carbono expresado como butirato disminuyó (26%, P<0.01) cuando el aditivo fue agregado.

Por otra parte, la Tabla 5.1 también muestra que la proporción de carbono recuperado fue cercana a 100% (con un error menor al 10%) en todos los medios. Esto sugiere que productos diferentes a acetato, propionato, butirato, valerato y CO<sub>2</sub> no se formaron en cantidades significativas. En el caso del cultivo medio mínimo sin aditivo, la recuperación de carbono mayor a 100% debido probablemente a que la cantidad de CO<sub>2</sub> producido fue sobrestimada.

## 5.2.2. Implicaciones biológicas de los parámetros del modelo

La Tabla 5.2 muestra los parámetros relevantes ajustados ( $\pm$  el intervalo de confianza [95%]) para el crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), consumo de lactato ( $Y_{X/L}$  y  $m$ ) y producción de AGV ( $\alpha_i$  y  $\beta_i$ ).

**Tabla 5.2.** Parámetros relevantes de las ecuaciones logística, de Pirt y de Luedeking-Piret, para *Megasphaera elsdenii* creciendo en diferentes condiciones nutricionales. Para las unidades de los parámetros, ver el Apéndice 1 (nomenclatura).

	Medio mínimo <sup>a</sup>		Medio complejo <sup>a</sup>	
	Sin aditivo	Con aditivo	Sin aditivo	Con aditivo
<b>Biomasa</b>				
$\mu_{\max}$	0.20( $\pm$ 0.02)	0.38( $\pm$ 0.03)	0.35( $\pm$ 0.03)	0.41( $\pm$ 0.03)
$R^2$	0.996	0.987	0.992	0.976
<b>Lactato</b>				
$Y_{SX} \times 10^3$	61( $\pm$ 11.9)	73( $\pm$ 5.3)	130( $\pm$ 11.9)	134( $\pm$ 14.6)
$m$	0.22( $\pm$ 0.18)	-0.05( $\pm$ 0.07) <sup>b</sup>	0.05( $\pm$ 0.11) <sup>b</sup>	-0.01( $\pm$ 0.05) <sup>b</sup>
$R^2$	0.861	0.983	0.961	0.976
<b>Acetato</b>				
$\alpha_i$	1.62( $\pm$ 0.58)	3.48( $\pm$ 0.37)	2.11( $\pm$ 0.15)	1.76( $\pm$ 0.19)
$\beta_i$	0.13( $\pm$ 0.16) <sup>b</sup>	-0.07( $\pm$ 0.12) <sup>b</sup>	0.01( $\pm$ 0.05) <sup>b</sup>	0.04( $\pm$ 0.07) <sup>b</sup>
$R^2$	0.895	0.954	0.981	0.977
<b>Propionato</b>				
$\alpha_i$	3.84( $\pm$ 0.86)	7.04( $\pm$ 0.44)	3.05( $\pm$ 0.36)	2.66( $\pm$ 0.31)
$\beta_i$	0.11( $\pm$ 0.38) <sup>b</sup>	-0.08( $\pm$ 0.11) <sup>b</sup>	0.02( $\pm$ 0.11) <sup>b</sup>	0.11( $\pm$ 0.16) <sup>b</sup>
$R^2$	0.977	0.984	0.963	0.978
<b>Butirato</b>				
$\alpha_i$	0.32( $\pm$ 0.56) <sup>b</sup>	0.56( $\pm$ 0.11)	0.53( $\pm$ 0.15)	0.18( $\pm$ 0.06)
$\beta_i$	-0.03( $\pm$ 0.13) <sup>b</sup>	0.02( $\pm$ 0.01)	0.08( $\pm$ 0.02)	0.09( $\pm$ 0.01)
$R^2$	0.313	0.932	0.945	0.993
<b>Valerato</b>				
$\alpha_i$	0.23( $\pm$ 0.54) <sup>b</sup>	0.55( $\pm$ 0.13)	0.48( $\pm$ 0.14)	0.1( $\pm$ 0.05)
$\beta_i$	0.11( $\pm$ 0.24) <sup>b</sup>	0.04( $\pm$ 0.01)	0.1( $\pm$ 0.01)	0.13( $\pm$ 0.03)
$R^2$	0.273	0.923	0.952	0.991

<sup>a</sup>Los números entre paréntesis son los intervalos de confianza (95%) de cada parámetro.

<sup>b</sup>Intervalos de confianza que contienen el valor cero.

Los intervalos de confianza que contienen el valor cero, corresponden a parámetros que pueden removerse del modelo sin afectar significativamente el ajuste, por ejemplo, en el caso del intervalo de confianza para el coeficiente  $m$  en el medio mínimo que contiene aditivo, el intervalo de confianza es -1.5 a 0.3. Este intervalo de confianza contiene el valor cero y el coeficiente  $m$  puede ser eliminado del modelo en este caso (Dowdy y Wearden, 1985). Lo anterior significa que, estadísticamente, se puede afirmar que *M. elsdenii* utiliza el lactato sólo para el crecimiento en este medio, lo cual se discutirá un poco más adelante desde el punto de vista fisiológico. Esta propiedad del intervalo de confianza de ajuste, fue utilizada como un criterio cuantitativo para mantener (o despreciar) parámetros en los modelos de Pirt y Luedeking-Piret, lo cual no había sido propuesto anteriormente en la literatura sobre el tema.

La Tabla 5.2 muestra que  $\mu_{\max}$  se incrementa de 0.20 a 0.38 h<sup>-1</sup> (P<0.01) por la presencia de aditivo en medio mínimo. Los valores estimados de  $\mu_{\max}$  en medio mínimo con aditivo y en medio complejo sin aditivo fueron estadísticamente iguales (P<0.1), lo cual da soporte a la idea de que el aditivo utilizado puede contener nutrientes similares a los que se encuentran presentes en el extracto de levadura. En el medio complejo, la presencia del aditivo no incrementó significativamente  $\mu_{\max}$  (P<0.1). No se encontraron trabajos previos en los que se utilizara la ecuación logística para modelar el crecimiento de *M. elsdenii*, sin embargo, los valores ajustados para  $\mu_{\max}$  son comparables a los que aparecen en la Tabla 1.1, para la  $\mu_m$  del modelo de Monod, que fueron determinados en cultivo por lote utilizando medios complejos.

Acerca del consumo de lactato, la Tabla 5.2 muestra que  $Y_{SX}$  no cambió por la presencia del aditivo en ambos medios. Sin embargo, los valores estimados de  $Y_{SX}$  fueron mayores en medio complejo que en medio mínimo, probablemente debido a la mayor cantidad de carbono presente en este último. Por otra parte, de acuerdo con los intervalos de confianza, el parámetro  $m$  fue estadísticamente despreciable en todos los casos excepto en el medio mínimo sin aditivo. Esto sugiere que en medio complejo, *M. elsdenii* utiliza lactato principalmente para el crecimiento y formación de productos, mientras que en medio mínimo, una parte, estadísticamente significativa, de la energía obtenida del consumo de lactato tiene que ser usada para mantenimiento. Esto puede explicarse por la presencia en el medio complejo de compuestos, tales como aminoácidos, que pueden ser consumidos para satisfacer los requerimientos de energía de mantenimiento, como fue previamente propuesto por Wallace (1986). En cambio, en el medio mínimo, una parte de la energía obtenida de la vía del acrilato tiene que usarse para mantenimiento, ya que no hay otras fuentes de energía disponibles (Soto-Cruz *et al.*, 2002).

Por lo que se refiere a la producción de AGV, con base en el ya mencionado criterio estadístico, el término no asociado al crecimiento ( $\beta$ ) para acetato y propionato fue despreciable en todos los casos, mientras que ambos parámetros tienen que ser considerados en la producción de butirato y valerato. Debe señalarse que en el caso de la producción de butirato y valerato en medio mínimo sin aditivo, la gran dispersión de los datos experimentales (Figs. 5.5A y 5.6A) resultó en un ajuste muy pobre (baja  $R^2$ ) y los intervalos de confianza indican que ambos parámetros deben ser eliminados. De modo que el modelo no puede ser aplicado en estos casos. Sin embargo, debe considerarse que el término  $\beta$  para acetato y propionato sí se

despreció en medio mínimo, al igual que en los medios complejos. Por lo tanto, puede sugerirse que es razonable extrapolar los resultados de los medios complejos al medio mínimo, en el caso de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  para butirato y valerato.

De acuerdo a lo descrito previamente por diversos autores (Luedeking y Piret, 1959; Pirt, 1975; Wang *et al.*, 1979), los resultados presentados en la Tabla 5.2 indican que *M. elsdenii* produce acetato y propionato como productos asociados al crecimiento, mientras que butirato y valerato son formados como productos parcialmente asociados al crecimiento, lo cual es independiente de la composición del medio de cultivo o de la presencia del aditivo, al usar lactato como fuente de carbono. Por otra parte, ya que los productos relacionados al metabolismo energético son formados como productos asociados al crecimiento (Pirt, 1975; Wang *et al.*, 1979), la producción de acetato y propionato por *M. elsdenii* puede explicarse por la relación de estos productos al metabolismo energético en la vía del acrilato. La energía producida en la vía del acrilato debe entonces ser utilizada sólo para formar nuevo protoplasma bacteriano. Esto da soporte al hecho de que en medio complejo *M. elsdenii* utiliza lactato principalmente para el crecimiento y la formación de productos, mientras que para obtener energía para mantenimiento otros compuestos pueden ser consumidos.

### **5.3. Alcances del modelo no estructurado**

En fermentaciones anaerobias con vías bioquímicas ramificadas, algunos compuestos son producidos para ajustar la eficiencia termodinámica del metabolismo, principalmente

consumiendo equivalentes de reducción (Gottschalk, 1986; Thauer *et al.*, 1977). En este sentido, los flujos de carbono en las diferentes ramas del metabolismo son ajustados de manera que la ganancia de ATP y la eficiencia termodinámica sean óptimas, para las condiciones de crecimiento particulares del proceso (Thauer *et al.*, 1977).

Las secuencias de reacciones para producir butirato y valerato involucran, en ambos casos, el consumo de equivalentes de reducción (Russell y Wallace, 1988). Por otra parte, como puede verse en la Figura 1.1 (página 7), la vía del acrilato tiene dos ramas: una en la que se produce acetato y ATP junto con dos equivalentes de reducción a partir de D-lactato, mientras que en la otra se consumen los dos equivalentes de reducción, para reducir dos moléculas de L-lactato a dos de propionato. Es decir, no parecería haber necesidad de producir otros compuestos como el butirato y el valerato para consumir equivalentes de reducción. Sin embargo, la primera reacción de la rama en que se produce ATP, la conversión de D-lactato a piruvato tiene un  $\Delta G^0$  de  $+6.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Lehninger, 1982), por lo tanto es una reacción en la que el equilibrio termodinámico favorece la formación de D-lactato. Entonces, para que la reacción se lleve a cabo en el sentido que permite producir ATP, se debe mantener muy baja la concentración de equivalentes de reducción, lo cual está controlado por muchas reacciones dentro de la célula (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

En el caso de *M. elsdenii*, parece necesario mantener muy baja la concentración de equivalentes de reducción, lo cual se logra con la producción de propionato, butirato y valerato. Sin embargo, cabe cuestionarse acerca del hecho de que la producción de butirato y valerato se da

parcialmente asociada al crecimiento, es decir, ¿porqué butirato y valerato no se producen desde el inicio de la fermentación, como el propionato?. Pueden plantearse dos posibilidades. La primera es que alguna vía relacionada con la producción de monómeros para el anabolismo, por ejemplo la vía de las pentosas fosfato, puede también producir un exceso de equivalentes de reducción durante la fase de crecimiento exponencial (Soto-Cruz *et al.*, 2002). La otra posibilidad es que al inicio del cultivo la vía del acrilato puede, por sí misma, mantener la concentración de equivalentes de reducción lo suficientemente baja, como para producir ATP al ritmo que se requiere. Mientras que al entrar de lleno en la fase de crecimiento exponencial, la demanda de ATP se incrementa, por lo que para satisfacerla se requiere bajar aún más la concentración de equivalentes de reducción para aumentar la tasa de la reacción ya citada y, por lo tanto la producción de ATP.

De la discusión anterior puede verse que es necesario considerar la bioquímica del microorganismo. Desafortunadamente, no se cuenta con una red metabólica completa para *M. elsdenii*, por lo que se requiere proponerla y validarla. Para lograrlo, se propone recurrir a un modelo estructurado, como el análisis de flujos metabólicos, que será el tema del siguiente capítulo.

El modelo no estructurado del proceso permitió contribuir al conocimiento de la fisiología de *M. elsdenii*, estableciendo el nivel de asociación entre el crecimiento, el consumo de lactato y la producción de AGV. Además fue de utilidad para plantear explicaciones de lo encontrado, a nivel del metabolismo. Sin embargo, ya no es útil para seguir avanzando, puesto que no permite

sugerir alguna explicación para el hecho de que la formación de butirato y valerato sea como productos parcialmente asociados al crecimiento.

#### **5.4. Conclusiones**

La aplicación del modelo no estructurado permitió la estimación de los parámetros cinéticos de las ecuaciones de Pirt y Luedeking-Piret. Lo cual aportó evidencias de que en medio complejo *M. elsdenii* utiliza el lactato consumido sólo para crecimiento y producción de AGV, mientras que en medio mínimo una parte del lactato consumido se usa para mantenimiento. Por otra parte, el modelado sugiere que acetato y propionato son productos asociados al crecimiento, mientras que butirato y valerato son productos parcialmente asociados al crecimiento, lo que al parecer es independiente de la composición del medio de cultivo utilizado, cuando se utiliza lactato como fuente de carbono y energía. Finalmente, cabe resaltar que la utilización de un criterio cuantitativo ya establecido en la literatura, pero que no se había aplicado a los modelos de Pirt y Luedeking-Piret, permitió decidir entre eliminar o conservar parámetros en los mismos, lo cual no se encontró en la literatura revisada sobre el tema.

---

**6. MODELO ESTEQUIOMETRICO  
DEL METABOLISMO DE  
*Megasphaera elsdenii***

---

## 6. MODELO ESTEQUIOMETRICO DEL METABOLISMO DE *Megasphaera elsdenii*

En este capítulo se retoma el conocimiento previo del metabolismo de *M. elsdenii*, presentado en el capítulo 1, y se propone una red metabólica, soportada en las actividades enzimáticas determinadas en este trabajo. Una vez que se dispone de una red metabólica para *M. elsdenii*, en las siguientes páginas se presentan los resultados del cultivo continuo, el cual se llevó a cabo únicamente en medio mínimo, ya que el análisis de flujos metabólicos requiere conocer todos los posibles sustratos y productos (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Se utilizó cultivo continuo porque una vez que se obtienen condiciones de estado estacionario, se pueden calcular sin ambigüedad tasas de consumo/producción para los compuestos presentes en el sistema, lo que no sucede con el cultivo por lote, en el que el cálculo de tales tasas depende de una estimación adecuada de las derivadas en cada punto de la cinética (Goel *et al.*, 1993).

Posteriormente, se inicia el análisis con los balances generales de carbono y grado de reducción. A continuación, se presenta el análisis de los datos en un modelo de caja negra que, al tratarse de un sistema sobredeterminado, permite calcular el índice de consistencia,  $h_{MCN}$ , y validar la calidad de los datos experimentales. Después se retoma la red metabólica propuesta y se calcula el índice de consistencia para el modelo estequiométrico completo,  $h_{ME}$ , lo que permite validar la suposición de estado pseudoestacionario. Finalmente, se presentan y discuten los flujos metabólicos.

## 6.1. El modelo estequiométrico

### 6.1.1. Conocimiento previo del metabolismo de *Megasphaera elsdenii*

Una red metabólica, o modelo estequiométrico, representa adecuadamente el metabolismo global de la célula (Stephanopoulos *et al.*, 1998). El sistema bioquímico de degradación de lactato por *M. elsdenii*, que está bien establecido, se presentó en la Figura 1.1 y es conocido como la *vía del acrilato* (Gottschalk, 1986). De acuerdo a éste, tres moléculas de lactato se transforman en dos moléculas de propionato, una de acetato, una de CO<sub>2</sub> y una de ATP. La Figura 1.1 muestra que, para la obtención de energía en forma de ATP, el microorganismo únicamente necesita producir acetato y propionato. Sin embargo, experimentalmente se observa una proporción distinta a la que se espera por la vía del acrilato y, además, se observa también la producción de butirato y valerato, como productos parcialmente asociados al crecimiento. Las reacciones que llevan a la formación de butirato y valerato se presentaron en la Figura 1.2.

Por otra parte, como se mencionó en el capítulo 1, el crecimiento requiere de una serie de precursores para las reacciones de biosíntesis, los cuales son obtenidos de las vías EMP y PP, donde son intermediarios. Se señaló también que hay evidencias de la utilización de estas vías por *M. elsdenii*. Las actividades enzimáticas de fructosa difosfato aldolasa (EC 4.1.2.13) y transcetolasa (EC 2.2.1.1) se han presentado como evidencia de que *M. elsdenii* utiliza las vías EMP y PP (Joyner y Baldwin, 1966). Así mismo, se sabe que la gluconeogénesis utiliza las reacciones de la vía EMP en sentido inverso. Sin embargo, en la literatura no hay información acerca de las reacciones que permitirían evitar las reacciones irreversibles de la vía EMP

(fructosa-6-fosfato  $\rightarrow$  fructosa-1,6 difosfato y PEP  $\rightarrow$  piruvato), para utilizar la gluconeogénesis en conexión con la vía del acrilato, cuando el crecimiento se da sobre lactato como fuente de carbono.

### **6.1.2. Un modelo estequiométrico completo: actividades enzimáticas**

Para la detección de las actividades enzimáticas se obtuvieron extractos libres de células a partir de cultivos por lote de *M. elsdenii*. El volumen de cultivo en este caso fue de 3 litros, ya que la máxima concentración de biomasa es muy baja (aprox.  $0.2 \text{ g L}^{-1}$ ) al utilizar medio mínimo y para la detección de actividades enzimáticas en *M. elsdenii* se requiere entre 0.5 y 1 g de biomasa en peso seco, como se ha indicado previamente (Somerville, 1968; Hino y Kuroda, 1993). En el presente trabajo, dos sistemas enzimáticos fueron investigados para proponer un puente metabólico usado para producir oxalacetato, que es el intermediario en la síntesis de PEP a partir de piruvato (Lehninger, 1982; Gottschalk, 1986). Primero, se ha sugerido (Somerville, 1968) que el oxalacetato es formado a partir de piruvato por *M. elsdenii*, mediante la acción secuencial de la enzima málica (EC 1.1.1.40) y la malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37). Sin embargo, la actividad de la enzima málica no fue detectada en otro trabajo (Joyner & Baldwin, 1966). Segundo, ya que *M. elsdenii* es auxótrofo a la biotina (Forsberg, 1978) y esta vitamina ha sido asociada a la actividad de la piruvato carboxilasa (Gottschalk, 1986), se buscó detectar también esta enzima.

Así mismo, se buscó detectar actividades enzimáticas relacionadas con las vías EMP y PP, diferentes a las encontradas en la literatura. La actividad de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa fue determinada en sentido de la gluconeogénesis, mientras que la actividad de fructosa-1,6 difosfatasa (que cataliza la otra reacción irreversible de la vía EMP, en el sentido de la gluconeogénesis) fue también medida. Por otra parte, la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fue medida para soportar la utilización de la vía PP. En la Tabla 6.1 se presentan las actividades enzimáticas determinadas en extractos libres de células de *M. elsdenii* creciendo sobre lactato, que dan soporte a la utilización de la red metabólica propuesta.

**Tabla 6.1.** Actividades enzimáticas determinadas en extractos libres de células de *Megasphaera elsdenii* obtenidos a partir de cultivos sobre lactato

Enzima	Actividad [U (mg proteína) <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>	Reacción <sup>b</sup>
Piruvato carboxilasa	80	9
Enzima málica	No detectada	9
PEP carboxicinas	40	10
Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa	29	12
Fructosa-1,6 difosfatasa	60	13
Glucosa-6-P deshidrogenasa	40	15

<sup>a</sup>Una unidad de actividad (U) es definida como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un nmol de sustrato por minuto.

<sup>b</sup>Ver figura 6.1 más adelante.

De acuerdo a estas actividades, el puente metabólico que permite la formación de PEP a partir de piruvato se compone de dos reacciones: la conversión de piruvato en oxalacetato (catalizada por la piruvato carboxilasa) seguida de la transformación de oxalacetato en PEP (catalizada por la PEP carboxicinas). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Joyner y Baldwin (1968), quienes no detectaron actividad de enzima málica en extractos de *M. elsdenii*. Por otra parte, la presencia de las actividades enzimáticas de gliceraldehido-3-P deshidrogenasa y

fructosa-1,6 difosfatasa, sugiere que *M. elsdenii* utiliza la gluconeogénesis cuando crece sobre lactato. Finalmente, la actividad de glucosa-6-P deshidrogenasa indica que *M. elsdenii* utiliza la vía PP, como habían propuesto Joyner y Baldwin (1966). Así, se presenta evidencia enzimática adicional de la utilización de las vías EMP y PP, lo que refuerza la red metabólica propuesta.

A partir de toda esta información, la Figura 6.1 muestra la red metabólica, propuesta en este trabajo y usada para calcular los flujos metabólicos en *M. elsdenii* creciendo sobre lactato. En la Figura 6.1, se resaltan las reacciones propuestas a partir de las actividades enzimáticas determinadas: la reacción de la piruvato carboxilasa (reacción 9) y la reacción de la PEP carboxicinasas (reacción 10). Estas reacciones constituyen la conexión metabólica entre la vía del acrilato y la gluconeogénesis. Respecto a la red metabólica propuesta, se deben señalar las siguientes consideraciones:

- 1) Una vez que el L-lactato se asimila, se ignoran las dos formas isoméricas (D y L) y se considera simplemente como lactato, ya que la lactato racemasa intercambia los isómeros de acuerdo a las necesidades de la célula (Hino y Kuroda, 1993).
- 2) Las secuencias lineales de reacción se han agrupado en una sola reacción que las representa (Vallino y Stephanopoulos, 1990; Stephanopoulos *et al.*, 1998).
- 3) Todos los transportadores de electrones (ETFH<sub>2</sub>, FdH<sub>2</sub>, NADPH<sub>2</sub>, NADH<sub>2</sub>) se consideran únicamente como NADH<sub>2</sub>, ya que se ha encontrado la presencia de transhidrogenasas en *M. elsdenii* (Baldwin y Milligan, 1964, Gottschalk, 1986), las cuales acoplan los balaces de los transportadores de electrones y los hacen linealmente dependientes (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

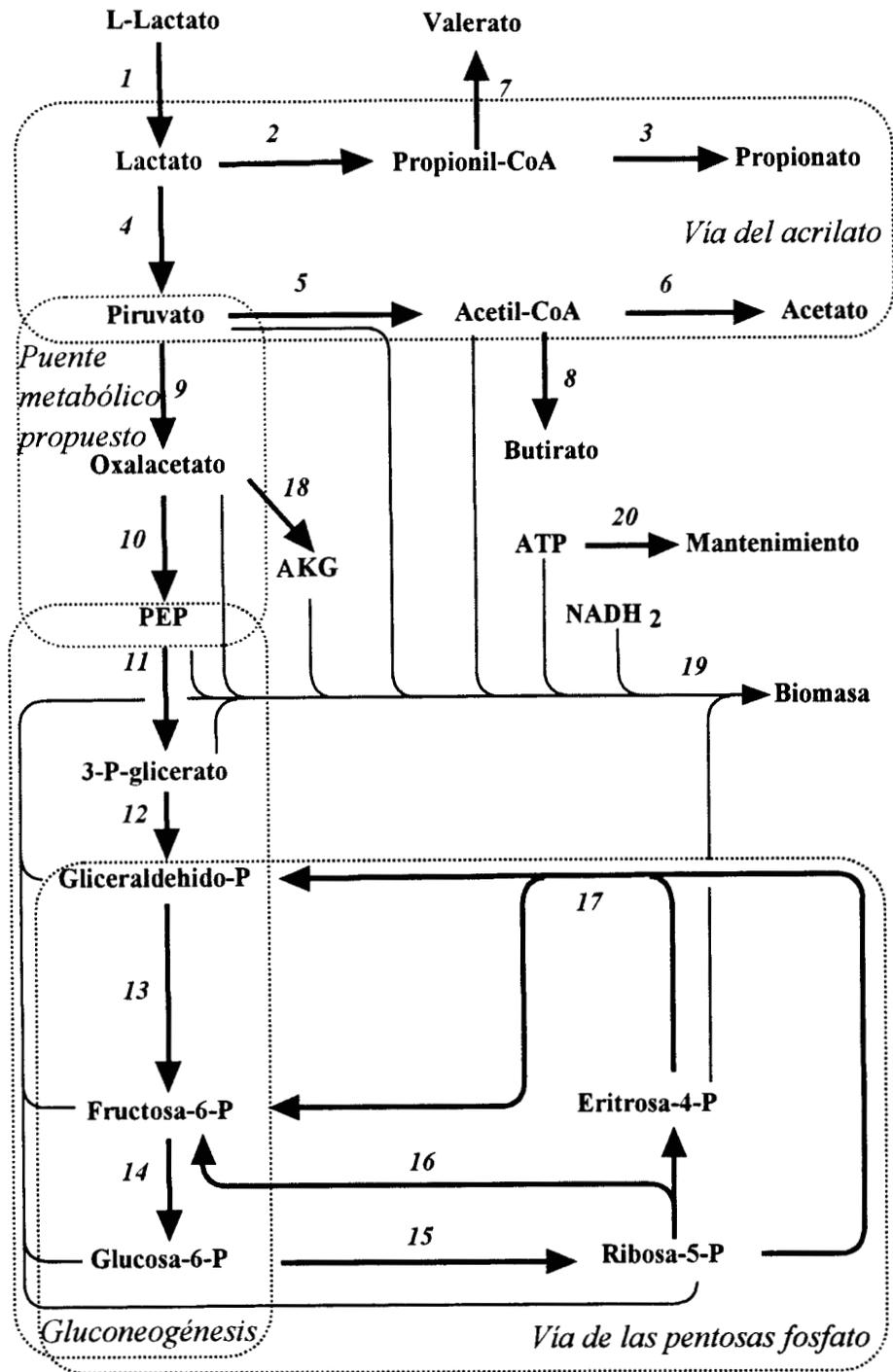


Figura 6.1. Sistema de reacción completo que se propone para la determinación de flujos metabólicos en *M. elsdenii* creciendo sobre lactato. Los números se refieren a las reacciones detalladas en la Tabla 6.2.

- 4) Por claridad, en la figura 6.1 se han omitido algunos metabolitos que participan en las reacciones (NADH<sub>2</sub>, ATP, CO<sub>2</sub>, entre otros). Estos metabolitos sí aparecen en las reacciones detalladas que se presentan en la Tabla 6.2.
- 5) Todas las reacciones involucradas en la síntesis de biomasa se presentan como una sola reacción (reacción 19), tomando la siguiente composición CH<sub>1.81</sub>O<sub>0.52</sub>N<sub>0.21</sub> (con un 6% p/p de cenizas), para la biomasa de *M. elsdenii*. Esta es una composición promedio que se considera una suposición razonable cuando no se conoce la composición exacta de la biomasa (Nielsen y Villadsen, 1994; Stephanopoulos *et al.*, 1998). La composición promedio para la biomasa está basada en los datos que presentaron Ingraham *et al.* (1983), para *Escherichia coli*. Esta composición promedio es similar a la composición de *M. elsdenii*, presentada por Mink y Hespell (1981) basados en análisis de DNA, RNA, proteína, lípidos y carbohidratos. Por lo tanto, se considera que la suposición acerca de la composición de la biomasa de *M. elsdenii* está bien soportada.
6. Se incluye una reacción adicional (reacción 20) que representa los requerimientos de ATP para mantenimiento (Vallino y Stephanopoulos, 1990; Stephanopoulos *et al.*, 1998).

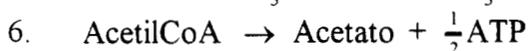
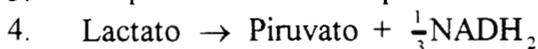
Cada una de las reacciones de la Figura 6.1 se detallan en la Tabla 6.2, normalizadas con respecto a la composición, en base C-mol, de todos los metabolitos que participan.

**Tabla 6.2.** Reacciones detalladas de la red metabólica propuesta para *M. elsdenii* creciendo sobre lactato. Las reacciones se separan de acuerdo a la vía bioquímica de la cual forman parte. Los números antes de cada reacción corresponden a los indicados en la Figura 6.1.

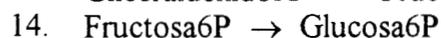
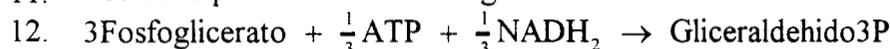
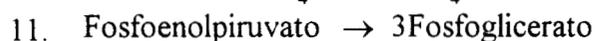
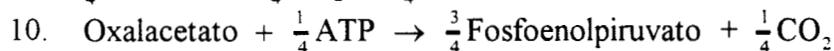
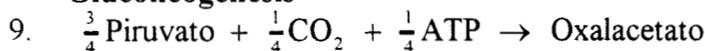
**Consumo de lactato**



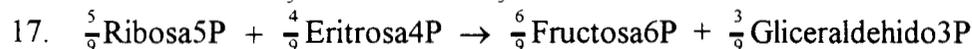
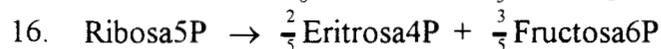
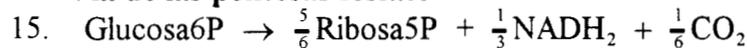
**Vía del acrilato**



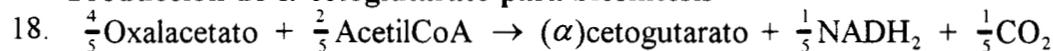
**Gluconeogénesis**



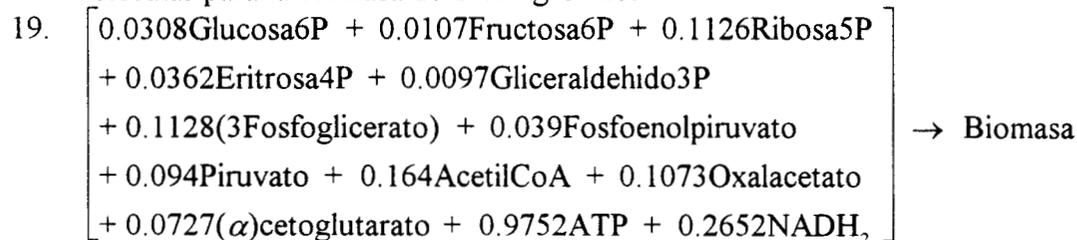
**Vía de las pentosas fosfato**



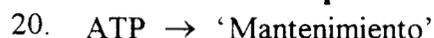
**Producción de  $\alpha$ -cetogutarato para biosíntesis**



**Producción de biomasa.** Se supone la composición promedio CH<sub>1.81</sub>O<sub>0.52</sub>N<sub>0.21</sub> (con un 6% p/p de cenizas) para la biomasa (Stephanopoulos *et al.*, 1998), esto significa un peso molecular para la biomasa de 25.07 g C-mol<sup>-1</sup>



**Consumo de ATP para funciones celulares diferentes al crecimiento**



Las composiciones, en base C-mol, de los metabolitos que aparecen en las reacciones de la Figura 6.1 y de la Tabla 6.2 se detallan a continuación en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.3.** Compuestos involucrados en las reacciones presentadas en la Tabla 6.2. Se indica la composición, en base C-mol, para cada compuesto en su forma disociada.

Compuesto	Formula en base C-mol
Lactato	$(\text{CH}_{\frac{1}{3}}\text{O})$
Biomasa	$(\text{CH}_{1.81}\text{O}_{0.52}\text{N}_{0.21})$
Acetato	$(\text{CH}_{\frac{1}{2}}\text{O})$
Propionato	$(\text{CH}_{\frac{1}{3}}\text{O}_{\frac{2}{3}})$
Butirato	$(\text{CH}_{\frac{1}{4}}\text{O}_{\frac{1}{2}})$
Valerato	$(\text{CH}_{\frac{1}{5}}\text{O}_{\frac{2}{5}})$
Propionil-CoA	$(\text{CH}_{\frac{1}{3}}\text{O}_{\frac{1}{3}}(\text{CoA})_{\frac{1}{3}})$
Acetil-CoA	$(\text{CH}_{\frac{1}{2}}\text{O}_{\frac{1}{2}}(\text{CoA})_{\frac{1}{2}})$
NADH <sub>2</sub>	('H')
Piruvato	(CHO)
ATP	
Oxalacetato	$(\text{CH}_{\frac{1}{2}}\text{O}_{\frac{1}{4}})$
Fosfoenolpiruvato (PEP)	$(\text{CH}_{\frac{1}{3}}\text{OP}_{\frac{1}{3}})$
3Fosfoglicerato	$(\text{CH}_{\frac{1}{3}}\text{O}_{\frac{4}{3}}\text{P}_{\frac{1}{3}})$
Gliceraldehido-3-fosfato	$(\text{CH}_{\frac{1}{3}}\text{OP}_{\frac{1}{3}})$
Fructosa-6-fosfato	$(\text{CH}_{\frac{1}{6}}\text{OP}_{\frac{1}{6}})$
Glucosa-6-fosfato	$(\text{CH}_{\frac{1}{6}}\text{OP}_{\frac{1}{6}})$
Ribosa-5-fosfato	$(\text{CH}_{\frac{1}{5}}\text{OP}_{\frac{1}{5}})$
Eritrosa-4-fosfato	$(\text{CH}_{\frac{1}{4}}\text{OP}_{\frac{1}{4}})$
$\alpha$ -cetoglutarato (AKG)	$(\text{CH}_{\frac{1}{5}}\text{O})$

La Figura 6.1 y las Tablas 6.2 y 6.3 representan el modelo estequiométrico propuesto, que se sustenta en la información disponible en la literatura y en las actividades enzimáticas

determinadas en este trabajo, las cuales no habían sido determinadas anteriormente en *M. elsdenii*. La validación del modelo estequiométrico estará basada en su aplicación para el análisis de datos de cultivo continuo, los cuales se presentan en la siguiente sección.

## **6.2. Cultivo continuo de *Megasphaera elsdenii***

### **6.2.1. Presentación de resultados y comparación con el cultivo por lote**

El cultivo continuo se llevó a cabo únicamente en medio mínimo, ya que el análisis de flujos metabólicos, para un modelo estequiométrico que incluya catabolismo y anabolismo, requiere conocer todos los posibles sustratos y productos, aunque no necesariamente medirlos todos (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Los resultados del cultivo continuo de *M. elsdenii* en medio mínimo se presentan en las Figuras 6.2 y 6.3. Los cultivos se consideraron en estado estacionario cuando todas las variables se estabilizaron a valores constantes durante cinco tiempos de residencia. El coeficiente de variación ( $[\text{Desviación estándar/Promedio}] * 100$ ) de los valores promedio de todas las variables de cultivo fue siempre menor a 2%. Cabe mencionar que los cultivos se iniciaron después de 22 h de operación por lote y, a partir de ese momento, se inició el cultivo continuo propiamente dicho.

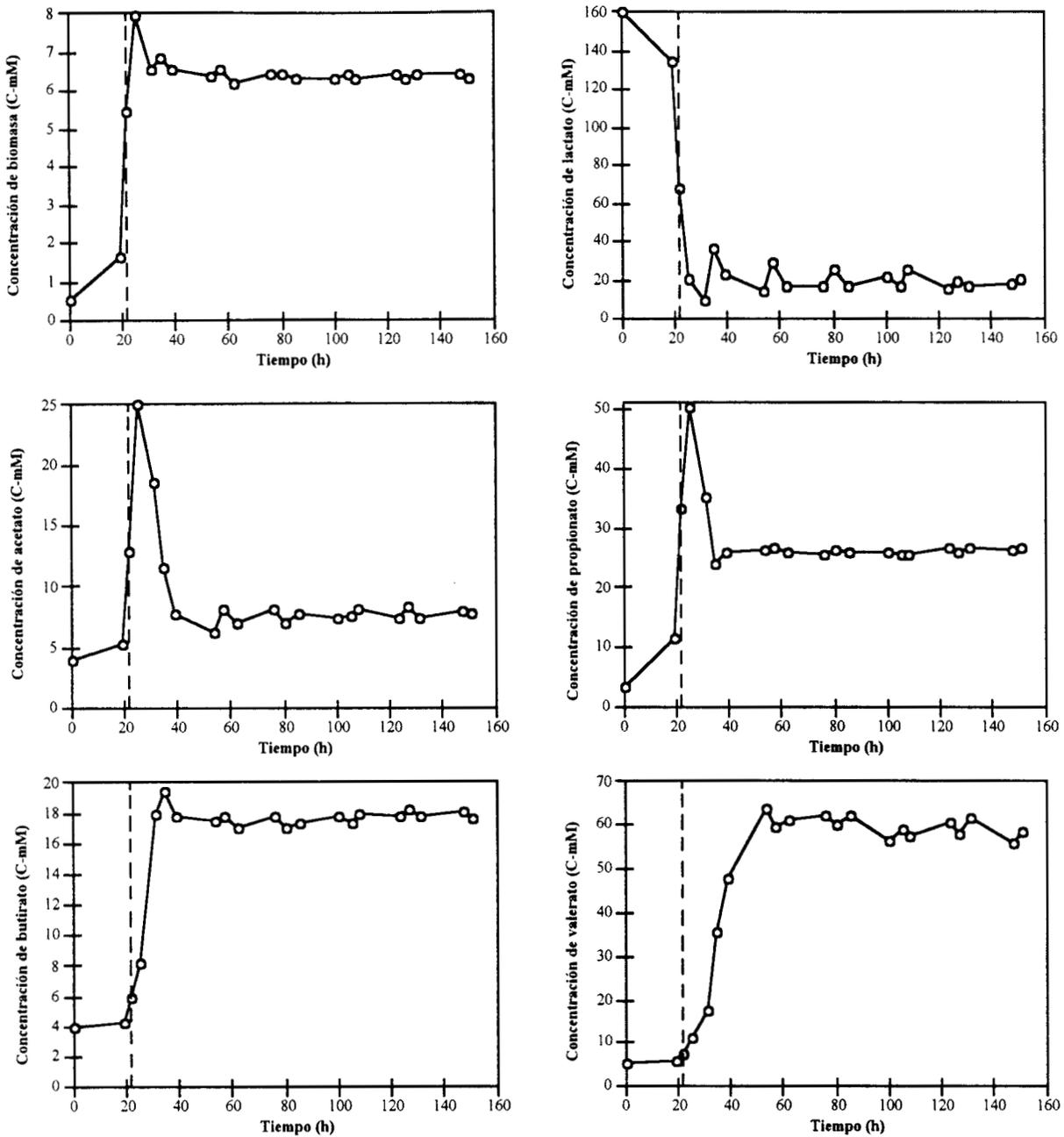


Figura 6.2. Gráficas del cultivo continuo de *Megasphaera elsdenii* en medio mínimo. Tasa de dilución  $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$ . La línea discontinua indica el tiempo en que comenzó el cultivo continuo.

La Figura 6.2 muestra las cinéticas de concentración de las variables medidas a una tasa de dilución de  $0.05 \text{ h}^{-1}$ . A pesar de que la concentración de biomasa fue constante desde

aproximadamente las 30 horas, el cultivo se consideró en estado estacionario de las 50 a las 150 horas (5 tiempos de residencia).

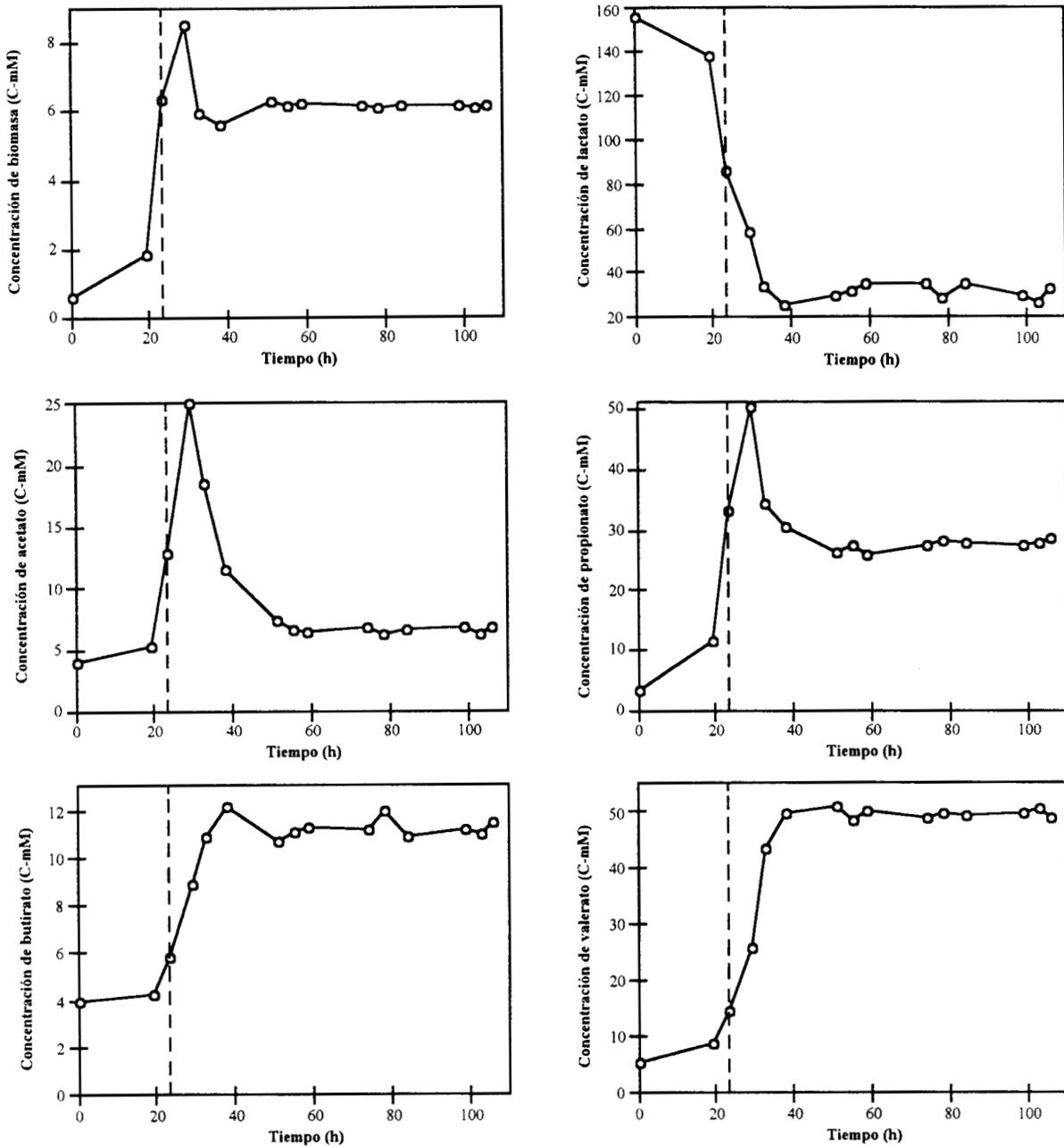


Figura 6.3. Gráficas del cultivo continuo de *Megasphaera elsdenii* en medio mínimo. Tasa de dilución  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ . La línea discontinua indica el tiempo en que comenzó el cultivo continuo.

La Figura 6.3 muestra las cinéticas de concentración de las variables medidas a una tasa de dilución de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . En este caso la concentración de biomasa también llegó a ser constante desde aproximadamente las 40 horas, sin embargo el cultivo se consideró en estado estacionario de las 50 a las 100 horas (5 tiempos de residencia). Las variaciones en las mediciones, observadas en las figuras anteriores, deben ser atribuidas al error de medición. Los coeficientes de variación de los estados estacionarios observados en las figuras y los correspondientes a las mediciones son de magnitudes similares (1.5% para la biomasa, 1% para el lactato y 3% para los AGV), excepto en el caso del lactato en la tasa de dilución  $0.05 \text{ h}^{-1}$  (1.3%), que fue ligeramente superior, pero del mismo orden de magnitud.

Los picos en la producción de biomasa, acetato y propionato pueden explicarse como resultado de la inercia del cultivo por lote inicial, ya que cuando se inició el cultivo continuo, el cultivo por lote ya se encontraba en fase exponencial (recuérdese que  $\mu_{\text{max}}$  en cultivo por lote fue de  $0.2 \text{ h}^{-1}$ ) y se requirió de un cierto tiempo para que comenzaran a observarse los efectos del flujo de medio de cultivo, ya que las tasas de dilución que se utilizaron estuvieron muy por debajo de  $\mu_{\text{max}}$ . El balance de carbono para el tiempo en que se observan los picos se cumple en un 92%, lo que indica que los picos no se deben a mediciones erróneas. Así mismo, la ausencia de picos similares en las cinéticas de producción de butirato y valerato, puede deberse a que son productos parcialmente asociados al crecimiento y al momento de iniciar el cultivo continuo su producción apenas había comenzado. Este comportamiento, al pasar de cultivo por lote a cultivo continuo, ya había sido observado en un trabajo previo (Soto-Cruz, 1997; Soto-Cruz *et al.*, 2001), utilizando un medio complejo con lactato como fuente de carbono.

Por otra parte, la Tabla 6.4 presenta los rendimientos, con respecto a lactato, de la biomasa y los productos de *M. elsdenii* en cultivo continuo.

**Tabla 6.4.** Rendimientos de biomasa, acetato, propionato, butirato y valerato para *Megasphaera elsdenii* creciendo sobre lactato en cultivo continuo.

Compuesto	Rendimiento con respecto a lactato [C-mol (C-mol lactato) <sup>-1</sup> ]		
	D = 0.05 h <sup>-1</sup>	D = 0.1 h <sup>-1</sup>	Lote
Biomasa (Y <sub>SX</sub> )	0.044	0.042	0.067
Acetato (Y <sub>SA</sub> )	0.052	0.046	0.211
Propionato (Y <sub>SP</sub> )	0.181	0.217	0.634
Butirato (Y <sub>SB</sub> )	0.122	0.115	0.011
Valerato (Y <sub>SV</sub> )	0.407	0.394	0.056
Suma del grado de reducción de los compuestos medidos	3.96	3.99	4.42
CO <sub>2</sub> (Y <sub>SC</sub> )*	0.189	0.185	0.121
∑Y <sub>S<sub>i</sub></sub>	0.995	0.999	1.098

\*Calculado por medio del modelo de caja negra (balances elementales de C, H, O y N).

La Tabla 6.4 muestra que aproximadamente el 96% (C-mol/C-mol) del lactato consumido fue metabolizado a productos distintos a la biomasa, lo que no fue afectado por la tasa de dilución. De hecho los rendimientos de biomasa no son significativamente diferentes (P<0.05). Los rendimientos de acetato y butirato disminuyeron 11.5 y 5.7% (P<0.05), respectivamente, mientras que el rendimiento de propionato se incrementó 20% (P<0.05), cuando la tasa de

dilución cambió de 0.05 a 0.1 h<sup>-1</sup>. El rendimiento de valerato no fue afectado significativamente (P<0.05) por en cambio en la tasa de dilución. Para tratar de explicar esta redistribución de los flujos de carbono hacia los diferentes productos, pueden tomarse en cuenta las siguientes consideraciones.

La necesidad de producir ATP, mientras se asegura el balance de equivalentes de reducción, obliga a los microorganismos anaerobios a producir toda una variedad de compuestos orgánicos, especialmente en los casos en que el aceptor final de electrones se genera a partir del donador primario (Morris, 1975). Este es el caso de *M. elsdenii*, ya que el aceptor final de electrones (acrililCoA), generado a partir del donador primario (lactato), es reducido a propionato (Gottschalk, 1986), a través del transporte de electrones mediado específicamente por ETPH<sub>2</sub> (Howard y Wood, 1975; Olson y Massey, 1979). Por otra parte, como se había argumentado al final del capítulo anterior, en la primera reacción de la rama de la vía del acrilato en la que se produce ATP (conversión de lactato a piruvato), el equilibrio termodinámico favorece la formación de lactato. Para que la reacción se lleve a cabo y se pueda producir ATP, se debe mantener muy baja la concentración de equivalentes de reducción, específicamente de ETPH<sub>2</sub> ya que la enzima que cataliza la reacción (D-lactato deshidrogenasa) es dependiente de este transportador de electrones (Olson y Massey, 1979). Lo anterior sugiere que el importante aumento en la producción de propionato, observado al aumentar la tasa de dilución, probablemente esté relacionado con una mayor necesidad de consumir equivalentes de reducción, producidos *directamente* en la vía del acrilato (ETPH<sub>2</sub>), para aumentar la tasa de formación de ATP.

Debe además recordarse que, de los tres compuestos cuya producción sirve para consumir equivalentes de reducción (propionato, butirato y valerato), el propionato es el único que no requiere de consumir acetilCoA. La producción de butirato requiere la condensación de dos moléculas de acetilCoA, mientras que la producción de valerato requiere la condensación de una molécula de acetilCoA y una de propionilCoA. Es decir, aumentar la producción de butirato y/o valerato significa dejar de producir acetato y ATP, lo cual sería contradictorio con una mayor demanda de ATP al aumentar la tasa de crecimiento. Por su parte, el aumento en la producción de propionato no significa disminuir la producción de ATP, ya que no se consume acetilCoA.

Por otra parte, a pesar de que en las determinaciones de cromatografía de gases se incluyeron varios estándares de AGV, en las muestras de fermentación sólo se detectaron los picos correspondientes a acetato, propionato, butirato y valerato. Más aún, los compuestos medidos suman aproximadamente el 81% del carbono consumido como lactato, pero la suma de su grado de reducción representa aproximadamente el 99.4% del grado de reducción del lactato consumido (Tabla 6.4). Por lo tanto, es razonable suponer que no se formaron productos diferentes al CO<sub>2</sub>, en cantidades significativas. Los rendimientos de CO<sub>2</sub> presentados en la Tabla 6.4 fueron estimados a partir del modelo de caja negra (balances elementales de C, H, O y N).

Debe señalarse que no se encontró otro estudio en la literatura en el que *M. elsdenii* fuera cultivado en continuo utilizando medio mínimo, por lo que no hay datos contra los cuales comparar los de este trabajo. Únicamente es posible hacer comparaciones contra datos de rendimientos de biomasa en cultivo continuo, utilizando medio complejo con glucosa como fuente de carbono (Russell y Baldwin, 1979b; Russell y Dombrowski, 1980; Wallace, 1986), que son de 7.5 a 15 veces más altos que los obtenidos en este trabajo, lo cual puede atribuirse a la mayor riqueza nutricional del medio de cultivo utilizado por aquellos autores. En cuanto a los productos formados, no se encontraron datos para cultivos continuos. En los perfiles metabólicos para cultivos por lote que presentan Henderson (1980) y Rossi y colaboradores (1995) predominan el acetato y sobre todo el propionato, por lo que son similares a los rendimientos en lote obtenidos en este trabajo.

Al comparar los rendimientos obtenidos en cultivo continuo con los observados en cultivo por lote se aprecia que son muy distintos. En cultivo por lote los rendimientos de biomasa, acetato y propionato son al rededor de 1.6, 4 y 3 veces más altos que en cultivo continuo, respectivamente. Por otra parte, los rendimientos de butirato y valerato en cultivo continuo son 11 y 7 veces más elevados que en cultivo por lote. Es decir, el nivel de producción de cada uno de los AGV es función del régimen de cultivo que se utilice. Un comportamiento similar ya había sido observado anteriormente en *M. elsdenii*. Hino y colaboradores (1991) observaron que el rendimiento de butirato con respecto a glucosa ( $\text{C-mol butirato} [\text{C-mol glucosa}]^{-1}$ ) aumentó 2.5 veces al pasar de cultivo por lote a cultivo continuo, en un medio complejo. Por otra parte, en un trabajo previo se observó que el butirato pasó de ser el producto menos

abundante en cultivo por lote, a ser el producto más abundante en cultivo continuo, utilizando un medio complejo (Soto-Cruz, 1997; Soto-Cruz *et al.*, 2001). No se ha realizado un trabajo específico para tratar de explicar estas observaciones, sin embargo es posible que, debido a las diferencias en el ambiente con respecto al cultivo por lote, el control del metabolismo sea diferente en cultivo continuo. Entre las diferencias ambientales del cultivo continuo con respecto al lote se encuentran: la concentración de sustrato es constante en lugar de disminuir, el estado redox del medio probablemente es diferente (la anaerobiosis se mantiene con N<sub>2</sub> en lugar de la mezcla de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 80/20), el sistema en continuo no se presuriza como ocurre con el sistema en lote.

En las siguientes páginas se presenta un análisis sistemático de los datos de cultivo continuo, el cual se inicia en la próxima sección con el análisis de caja negra.

### **6.2.2. Análisis de consistencia**

#### *A. Validación de los datos experimentales en el modelo de caja negra*

El análisis de los datos comienza planteando los balances elementales de C, H, O y N, lo cual se conoce como modelo de caja negra, considerando todos los compuestos que intervienen en el proceso, expresados en base C-mol, y sus tasas netas de consumo/producción. Los balances se llevan a cabo utilizando las composiciones de los ácidos no disociados, puesto que se trata de balances elementales, y escriben como sigue.

El balance de carbono es:

$$r_{\text{lactato}} + r_{\text{biomasa}} + r_{\text{acetato}} + r_{\text{propionato}} + r_{\text{butirato}} + r_{\text{valerato}} + r_{\text{CO}_2} = 0 \quad (6.1)$$

El balance de hidrógeno es:

$$2r_{\text{lactato}} + 1.81r_{\text{biomasa}} + 2r_{\text{acetato}} + 2r_{\text{propionato}} + 2r_{\text{butirato}} + 2r_{\text{valerato}} + 3r_{\text{NH}_3} + 2r_{\text{H}_2\text{O}} = 0 \quad (6.2)$$

El balance de oxígeno es:

$$r_{\text{lactato}} + 0.52r_{\text{biomasa}} + r_{\text{acetato}} + 2/3r_{\text{propionato}} + 1/2r_{\text{butirato}} + 2/5r_{\text{valerato}} + 2r_{\text{CO}_2} + r_{\text{H}_2\text{O}} = 0 \quad (6.3)$$

Y el balance de nitrógeno es:

$$0.21r_{\text{biomasa}} + r_{\text{NH}_3} = 0 \quad (6.4)$$

Estas cuatro ecuaciones constituyen un sistema lineal similar a la ecuación 1.4:

$$\mathbf{Er} = \mathbf{0} \quad (1.4)$$

la cual, para el caso del proceso estudiado en el presente trabajo, se escribe:

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 2 & 1.81 & 2 & 2 & 2 & 2 & 3 & 0 & 2 \\ 1 & 0.52 & 1 & 2/3 & 1/2 & 2/5 & 0 & 2 & 1 \\ 0 & 0.21 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{\text{Lactato}} \\ r_{\text{Biomasa}} \\ r_{\text{Acetato}} \\ r_{\text{Propionato}} \\ r_{\text{Butirato}} \\ r_{\text{Valerato}} \\ r_{\text{NH}_3} \\ r_{\text{CO}_2} \\ r_{\text{H}_2\text{O}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (6.5)$$

Cada renglón de la matriz **E** contiene los coeficientes estequiométricos de un balance elemental (de arriba a abajo, C, H, O y N) y cada columna contiene los coeficientes de la fórmula, en base C-mol, de los compuestos que intervienen en el proceso (de izquierda a derecha, lactato, biomasa, acetato, propionato, butirato, valerato, NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O). Se tienen dos sustratos (lactato y NH<sub>3</sub> [que proviene de la fuente de nitrógeno: sulfato de amonio]) y siete productos (biomasa, acetato, propionato, butirato, valerato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O), por lo tanto, los grados de libertad del sistema son:  $F = 2 + 7 - 4 = 5$ . De manera que se deben medir al menos cinco compuestos para que el sistema tenga solución única. Ya que se midieron seis compuestos (lactato, biomasa, acetato, propionato, butirato y valerato), el sistema es sobredeterminado y puede validarse la calidad de los datos experimentales, calculándose el índice de consistencia en el modelo de caja negra,  $h_{\text{MCN}}$  (Stephanopoulos *et al.*, 1998), para lo cual se utilizó la metodología detallada en el Apéndice 3.

Los valores de  $h_{\text{MCN}}$  para los datos de la Tabla 6.4 fueron 0.02 y 0.003 para los cultivos continuos a tasas de dilución de 0.05 y 0.1 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores de la función  $h$

fueron comparados con la distribución  $\chi^2$  con dos grados de libertad y nivel de confianza de 0.95. De la comparación se observa que los valores de  $h$  fueron menores que el correspondiente valor de  $\chi^2$  (5.99, ver Tabla A.1), lo cual indica que no existe errores gruesos de medición y que los datos experimentales cumplen los balances elementales con residuos que no son significativamente diferentes de cero (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Por otra parte, la metodología permite obtener valores corregidos, para las variables medidas, que cumplen con los balances elementales con residuos iguales a cero (Stephanopoulos *et al.*, 1998). La Tabla 6.5 presenta una comparación de los datos experimentales contra los datos corregidos para las dos tasas de dilución utilizadas.

**Tabla 6.5.** Comparación de los datos experimentales (C-mmol [g biomasa]<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) contra los corregidos por el modelo de caja negra, para los compuestos medidos durante el cultivo continuo de *M. elsdenii*

Compuesto	0.05 h <sup>-1</sup>		0.1 h <sup>-1</sup>	
	Experimental	Corregido	Experimental	Corregido
Lactato	45.37	43.61	94.53	94.41
Biomasa	1.99	1.99	3.99	3.99
Acetato	2.38	2.37	4.34	4.34
Propionato	8.19	8.19	20.50	20.50
Butirato	5.53	5.53	10.84	10.84
Valerato	18.45	18.55	37.24	37.33

Como puede verse, los datos corregidos en el modelo de caja negra fueron muy similares a los datos experimentales, lo cual confirma lo encontrado por el análisis de consistencia. Es decir, se

dispone de datos experimentales de alta calidad en los que no existen errores gruesos de medición. De manera que los datos experimentales se consideraron de alta calidad, lo que indica que se puede continuar con el análisis que involucra al modelo estequiométrico propuesto.

### B. Validación de la suposición de estado pseudoestacionario

Una vez que se ha determinado que los datos experimentales cumplen satisfactoriamente con los balances elementales, se retoma el modelo estequiométrico propuesto en la sección 6.1 y se calcula la función índice de consistencia para el modelo estequiométrico propuesto,  $h_{ME}$ , para validar la suposición de estado pseudoestacionario (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Cada una de las reacciones de la Tabla 6.2 ocurre a una tasa de reacción desconocida hasta este momento. Para la  $i$ -ésima reacción,  $x_i$  representa su tasa de reacción (es decir, el flujo). La tasa global de cambio ( $r$ ), para cada metabolito intracelular, es la suma algebraica de los flujos de las reacciones en las que interviene multiplicados por los correspondientes coeficientes estequiométricos y, por la suposición de estado pseudoestacionario, es igual a cero. De manera que, para cada metabolito intracelular, puede escribirse:

$$\Gamma_{\text{Lactato}} = x_1 - x_2 - x_4 = 0 \quad (6.6)$$

$$\Gamma_{\text{PropionilCoA}} = x_2 - x_3 - 3/5x_7 = 0 \quad (6.7)$$

$$\Gamma_{\text{AcetilCoA}} = 2/3x_5 - x_6 - 2/5x_7 - x_8 - 2/5x_{18} - 0.164x_{19} = 0 \quad (6.8)$$

$$\Gamma_{\text{NADH}} = -1/3x_2 + 1/3x_4 + 1/3x_5 - 2/5x_7 - 1/2x_8 - 1/3x_{12} + 1/3x_{15} + 1/5x_{18} - 0.2652x_{19} = 0 \quad (6.9)$$

$$\Gamma_{\text{Piruvato}} = x_4 - x_5 - 3/4x_9 - 0.094x_{19} = 0 \quad (6.10)$$

$$\Gamma_{\text{ATP}} = 1/2x_6 + 1/5x_7 + 1/4x_8 - 1/4x_9 - 1/4x_{10} - 1/3x_{12} - 0.9752x_{19} - x_{20} = 0 \quad (6.11)$$

$$\Gamma_{\text{Oxalacetato}} = x_9 - x_{10} - 4/5x_{18} - 0.1073x_{19} = 0 \quad (6.12)$$

$$\Gamma_{\text{PEP}} = 3/4x_{10} - x_{11} - 0.039x_{19} = 0 \quad (6.13)$$

$$\Gamma_{\text{3Fosfoglicerato}} = x_{11} - x_{12} - 0.1128x_{19} = 0 \quad (6.14)$$

$$\Gamma_{\text{Gliceraldehido-3-fosfato}} = x_{12} - x_{13} + 3/9x_{17} - 0.0097x_{19} = 0 \quad (6.15)$$

$$\Gamma_{\text{Fructosa6P}} = x_{13} - x_{14} + 3/5x_{16} + 6/9x_{17} - 0.0107x_{19} = 0 \quad (6.16)$$

$$\Gamma_{\text{Glucosa6P}} = x_{14} - x_{15} - 0.0308x_{19} = 0 \quad (6.17)$$

$$\Gamma_{\text{Ribosa5P}} = 5/6x_{15} - x_{16} - 5/9x_{17} - 0.1126x_{19} = 0 \quad (6.18)$$

$$\Gamma_{\text{Eritrosa4P}} = 2/5x_{16} - 4/9x_{17} - 0.036x_{19} = 0 \quad (6.19)$$

$$\Gamma_{\alpha\text{-cetoglutarato}} = x_{18} - 0.0727x_{19} = 0 \quad (6.20)$$

Para el caso de la tasa global de cambio de cada metabolito en la red metabólica propuesta, las ecuaciones 6.6 a 6.20, se expresan en forma matricial como:

$$\begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -3/5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2/3 & -1 & -2/5 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -2/5 & -0.164 & 0 & 0 \\ 0 & -1/3 & 0 & 1/3 & 1/3 & 0 & -2/5 & -1/2 & 0 & 0 & 0 & -1/3 & 0 & 0 & 1/3 & 0 & 0 & 1/5 & -0.2652 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -3/4 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.094 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/2 & 1/5 & 1/4 & -1/4 & -1/4 & 0 & -1/3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.9752 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -4/5 & -0.1063 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 3/4 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.039 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.1128 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 3/9 & 0 & -0.0097 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 3/5 & 6/9 & 0 & -0.0107 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -0.0308 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 5/6 & -1 & -5/9 & 0 & -0.1126 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2/5 & -4/9 & 0 & -0.036 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -0.0727 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \\ x_5 \\ x_6 \\ x_7 \\ x_8 \\ x_9 \\ x_{10} \\ x_{11} \\ x_{12} \\ x_{13} \\ x_{14} \\ x_{15} \\ x_{16} \\ x_{17} \\ x_{18} \\ x_{19} \\ x_{20} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (6.21)$$

o bien:

$$\mathbf{Ax} = \mathbf{0} \quad (6.22)$$

que es *la ecuación del modelo estequiométrico*. En las ecuaciones 6.21 y 6.22 cada renglón de la matriz  $\mathbf{A}$  (15 metabolitos  $\times$  20 reacciones) representa una tasa global de cambio para un metabolito intracelular, mientras que las columnas contienen los coeficientes estequiométricos asociados a los compuestos de cada una de las reacciones que ocurren dentro de la célula. Este sistema lineal es utilizado para validar la suposición de estado pseudoestacionario y, posteriormente para la determinación de flujos metabólicos, de acuerdo a la metodología detallada en el Apéndice 3. En el caso del presente trabajo, el vector  $\mathbf{x}_m$  está dado por:

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ x_3 \\ x_6 \\ x_7 \\ x_8 \\ x_{19} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_{L-lactato} \\ r_{Propionato} \\ r_{Acetato} \\ r_{Valerato} \\ r_{Butirato} \\ r_{Biomasa} \end{pmatrix} \quad (6.23)$$

donde las tasas  $r_i$  corresponden a los flujos extracelulares medidos, lo cual puede deducirse de la Figura 6.1. Los valores de  $h_{ME}$  para la red metabólica propuesta y los datos experimentales presentados en la Tabla 6.4, fueron 3.48 y 0.01 (ver metodología en el apéndice 3) para los datos de estado estacionario a tasas de dilución 0.05 y 0.1 h<sup>-1</sup>, respectivamente. En este caso,  $h_{ME}$  se comparó con la distribución  $\chi^2$  con cinco grados de libertad a un nivel de confianza de

0.95. Los valores de  $h$  fueron menores al valor de  $\chi^2$  (11.10, ver Tabla A.1), en ambos casos. De manera que, la suposición de estado pseudoestacionario para la red metabólica utilizada, queda validada. La red metabólica fue propuesta en base a la información de la literatura y apoyada por mediciones de actividades enzimáticas, las cuales no se han medido antes en *M. elsdenii*. Aunque no hay conexión entre los valores de las actividades enzimáticas medidas y los correspondientes flujos metabólicos calculados (ver más adelante), lo más importante es la evidencia experimental que esas actividades dan a la red metabólica propuesta. En conjunto, la información de la literatura, las actividades enzimáticas determinadas y el análisis de consistencia permitieron validar rigurosamente la utilización del modelo estequiométrico propuesto. Esto permite llevar a cabo el análisis de flujos metabólicos con base en una red metabólica bien sustentada.

### 6.2.3. Análisis de flujos metabólicos

#### *A. Distribución de flujos metabólicos*

Una vez validada la suposición de estado pseudoestacionario, se utilizó el método de Tsai y Lee (1988), también descrito en detalle en el Apéndice 3, para obtener los mejores estimados de los flujos metabólicos medidos y no medidos. Las distribuciones de flujos metabólicos durante los estados estacionarios a tasas de dilución de 0.05 y 0.1 h<sup>-1</sup> son presentados en la Figura 6.4.

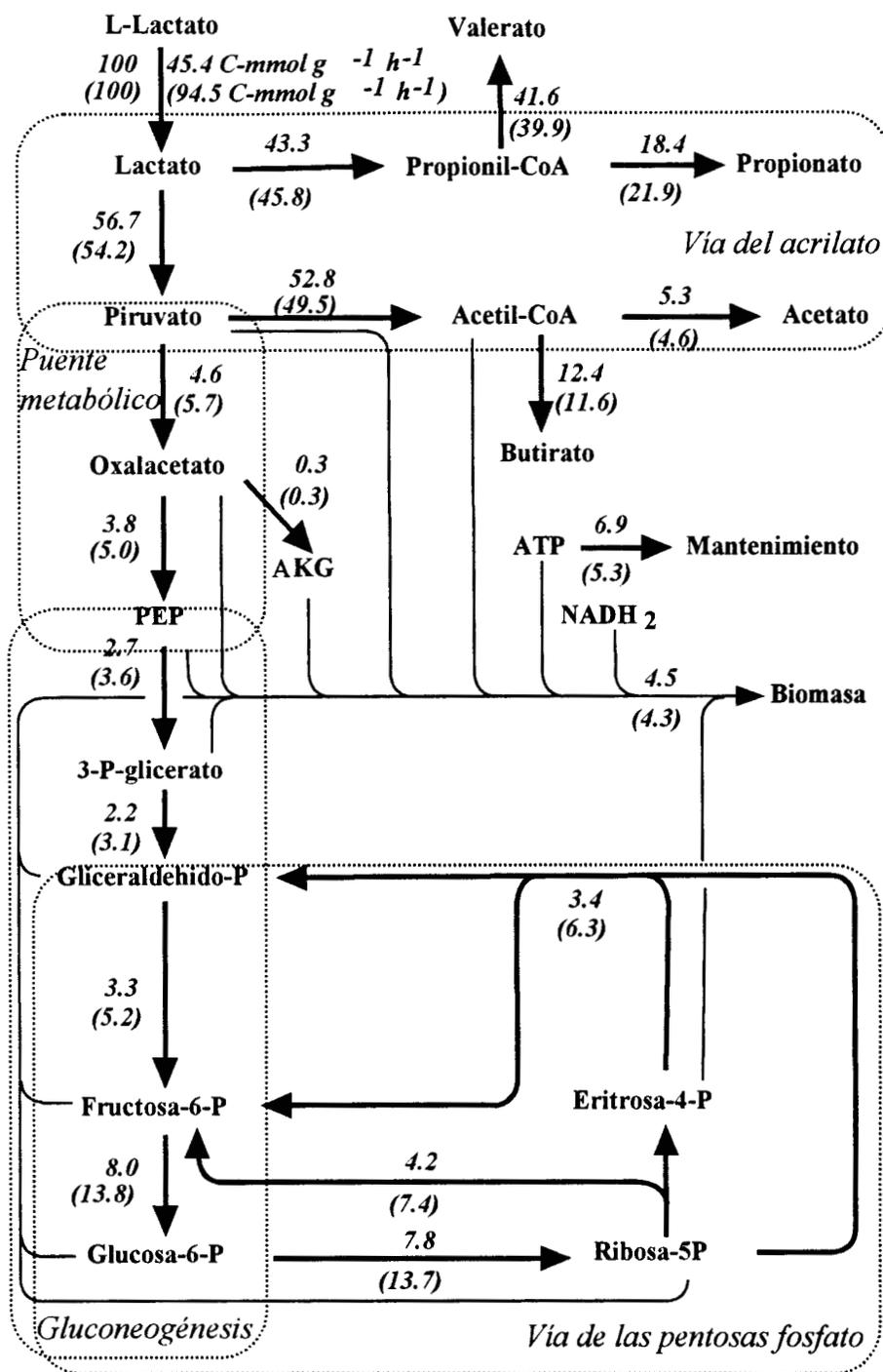


Figura 6.1. Sistema de reacción completo que se propone para la determinación de flujos metabólicos en *M. elsdenii* creciendo sobre lactato. Los números se refieren a las reacciones detalladas en la Tabla 6.2.

Los flujos son expresados en C-mmol (g biomasa)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y fueron normalizados con respecto a la tasa de consumo de lactato (reacción 1), de manera que se facilita su comparación.

En la figura 6.4 puede verse que hubo una importante redistribución de flujos en la gluconeogénesis y la vía de las pentosas fosfato, al pasar de la tasa de dilución de 0.05 h<sup>-1</sup> a 0.1 h<sup>-1</sup>. El flujo en la reacción inicial del puente metabólico se incrementó 24% y en las reacciones subsecuentes la diferencia fue creciendo, hasta alrededor de 80% en las reacciones de la vía de las pentosas fosfato.

El aumento del flujo de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato, al aumentar la tasa de dilución, ha sido observado en otros microorganismos, como *Bacillus subtilis* (Goel *et al.*, 1993), *Corynebacterium glutamicum* (Cocaing-Bousquet y Lindley, 1995) y *Saccharomyces cerevisiae* (Nissen *et al.*, 1997). Esto se ha atribuido a una mayor demanda de NADPH<sub>2</sub>, que se produce en la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato, para la síntesis de proteína y sobretodo ácido ribonucléico, al aumentar la tasa de crecimiento (Nissen *et al.*, 1997).

La disminución (4%) en el flujo de carbono hacia la formación de biomasa y la mayor demanda de NADPH<sub>2</sub>, probablemente obligaron a una mayor recirculación del flujo de carbono de la vía de las pentosas fosfato hacia la gluconeogénesis, lo cual explicaría las diferencias crecientes en el flujo hacia la vía de las pentosas fosfato, al incrementarse la tasa de dilución.

Por otra parte, las variaciones de los flujos de carbono en la vía del acrilato fueron más moderadas. El flujo de carbono hacia acetato disminuyó (13%) y los flujos hacia butirato y valerato disminuyeron ligeramente (6.5 y 4%), mientras que el flujo hacia propionato aumentó aproximadamente un 20%. Los cambios anteriores son muy similares a los cambios en los rendimientos, presentados en la Tabla 6.4 y subsecuentemente discutidos.

Una explicación contundente de la redistribución de flujos en la vía del acrilato, probablemente requiera de estudios más finos sobre los mecanismos que controlan la actividad de las enzimas que participan en los nodos donde se da la mayor partición de los flujos hacia los productos, como los nodos de propionilCoA y acetilCoA. La rigidez de los nodos, es decir la resistencia a modificar las proporciones de los flujos alrededor de cada nodo, depende tanto de factores genéticos como ambientales (Stephanopoulos y Vallino, 1991). Por ejemplo, en *Corynebacterium glutamicum* se determinó que el nodo de piruvato es flexible y el de PEP es rígido cuando se desarrolla en cultivo por lote sobre glucosa (Stephanopoulos y Vallino, 1991), mientras que al desarrollarse sobre lactato en cultivo continuo, el nodo de piruvato es rígido y el de PEP es flexible (Cocaing-Bousquet y Lindley, 1995).

Un estudio dirigido a la determinación de la rigidez de los nodos en la vía del acrilato, lo cual queda fuera de los objetivos del presente trabajo, probablemente contribuiría a explicar las observaciones encontradas. Debe resaltarse que, en el contexto de este trabajo, lo más importante es que las distribuciones de flujos metabólicos no presentan tasas de reacción negativas para reacciones irreversibles, como la reacción 15

(Glucosa6P  $\rightarrow$   $\frac{5}{6}$ Ribosa5P +  $\frac{1}{3}$ NADH<sub>2</sub> +  $\frac{1}{6}$ CO<sub>2</sub>), y para la reacción que representa el consumo de ATP para mantenimiento, lo cual indica que las distribuciones de flujos metabólicos proporcionan resultados congruentes con los principios de la bioquímica y la termodinámica (Stephanopoulos *et al.*, 1998) y contribuye a sustentar la utilización del modelo estequiométrico propuesto.

### B. Validación del modelo

Al trabajar con un sistema sobredeterminado, es posible eliminar de manera selectiva una de las tasas medidas del vector  $\mathbf{x}_m$  (ecuación 6.23), para validar el modelo. Cuando se selecciona cualquiera de los compuestos medidos, el error de estimación es similar y siempre menor al correspondiente error de medición, como lo muestran las Tablas 6.6 y 6.7.

**Tabla 6.6.** Comparación de las tasas de consumo/producción observadas y estimadas por análisis de flujos metabólicos, cuando uno de los compuestos medidos es eliminado del vector de tasas medidas, durante el cultivo continuo de *M. elsdenii* a  $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$ .

Compuesto eliminado	Tasa observada (C-mol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Tasa calculada (C-mol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Error (%)
Lactato	45.37	45.09	-0.6
Biomasa	1.99	2.02	1.5
Acetato	2.38	2.40	0.9
Propionato	8.19	8.12	-0.8
Butirato	5.53	5.60	1.3
Valerato	18.45	18.54	0.5

**Tabla 6.7.** Comparación de las tasas de consumo/producción observadas y estimadas por análisis de flujos metabólicos, cuando uno de los compuestos medidos es eliminado del vector de tasas medidas, durante el cultivo continuo de *M. elsdenii* a  $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ .

<b>Compuesto eliminado</b>	<b>Tasa observada (C-mol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tasa calculada (C-mol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Error (%)</b>
<b>Lactato</b>	94.53	93.49	-1.1
<b>Biomasa</b>	3.99	4.00	0.4
<b>Acetato</b>	4.34	4.33	-0.2
<b>Propionato</b>	20.50	20.52	0.1
<b>Butirato</b>	10.84	10.89	0.5
<b>Valerato</b>	37.24	37.13	-0.3

Por ejemplo, si se escoge eliminar la tasa de consumo de lactato y, se resuelve el sistema, se encuentra que las predicciones del modelo son 45.1 y 93.5 C-mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, para las tasas de dilución 0.05 y 0.1 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores representan errores de estimación de -0.6% y -1.1%, respectivamente, los cuales está en el rango del error experimental, lo cual contribuye a la validación del modelo, ya que este es capaz de reproducir las observaciones con un error menor al error experimental. Por otra parte, los rendimientos de CO<sub>2</sub>, calculados a partir de la distribución de flujos metabólicos ( $r_{\text{CO}_2} = 1/3x_5 - 1/4x_9 + 1/4x_{10} + 1/6x_{15} + 1/5x_{18}$ ), fueron de 0.188 y 0.187 C-mmol (C-mmol lactato)<sup>-1</sup> para las tasas de dilución de 0.05 y 0.1 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Estos valores son muy cercanos a los presentados en la Tabla 6.4, que se calcularon de manera independiente a partir del modelo de caja negra, lo cual coincide con la validación del modelo estequiométrico.

### C. Análisis de sensibilidad

Como fue señalado previamente por Nissen *et al.* (1997), cualquier modelo estequiométrico debe sujetarse a un análisis para detectar qué tan sensibles son los flujos metabólicos a errores en las mediciones o en la red metabólica propuesta. Para esto, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad de acuerdo a la descripción (ver sección 1.3.2) hecha por Vallino y Stephanopoulos (1990).

Este análisis, el cual usa los valores experimentales de los coeficientes de variación, permitió establecer que se requieren mediciones cuidadosas de la tasa de consumo de lactato y las tasas de producción de acetato y valerato para calcular los flujos correctos. Errores en esas mediciones afectan principalmente a los flujos en la gluconeogénesis y la vía PP. Un error relativo de 1% en la determinación de lactato conduce a un error relativo de 3% en los flujos de la gluconeogénesis y la vía PP, mientras que un error relativo de 3% en las mediciones de acetato y valerato lleva a errores, en la gluconeogénesis y la vía PP, de 2.5 y 4.5%, respectivamente. Los errores en la medición de cualquier otro compuesto sólo conducen a flujos incorrectos en la reacción de síntesis del compuesto en cuestión. Los errores en los flujos son de la misma magnitud que los errores en las mediciones correspondientes.

Finalmente, suponiendo que hubiera errores hasta del 50% en los coeficientes de la reacción de producción de biomasa, estos llevarían a errores del 5% en los flujos de la gluconeogénesis, la vía PP y el mantenimiento. Esto significa que la suposición de que los coeficientes reportados

para otras bacterias pueden utilizarse en el análisis de flujos metabólicos para *M. elsdenii*, presenta poco error y es probable que sea correcta.

El modelo estequiométrico se sujetó a varias pruebas. En primer lugar, la suposición de estado pseudoestacionario fue validada, mientras que el análisis de flujos metabólicos proporcionó predicciones correctas para los flujos eliminados del vector de flujos medidos y para el flujo no medido de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se demostró que el modelo no viola principios bioquímicos ni termodinámicos y que no tiene problemas de sensibilidad. De manera que puede considerarse que el modelo estequiométrico propuesto fue suficientemente validado usando los datos obtenidos a dos diferentes tasas de dilución.

### 6.3. Alcances del modelo estequiométrico

El modelo estequiométrico del metabolismo de *M. elsdenii* ha sido propuesto y validado. Al final del capítulo anterior se argumentó que la concentración de equivalentes de reducción podría ser clave en la búsqueda de una explicación para el hecho de que butirato y valerato sean producidos parcialmente asociados al crecimiento. Por otra parte, el análisis de flujos metabólicos es una excelente herramienta para examinar la importancia de reacciones en el metabolismo (Nissen *et al.*, 1997), lo cual se hace eliminando una reacción y observando el efecto que esto tiene sobre el índice de consistencia y los flujos metabólicos (Nissen *et al.*, 1997; Stephanopoulos *et al.*, 1998). Por lo tanto, puede utilizarse esta propiedad del análisis de flujos metabólicos para intentar discernir entre alguna de las posibilidades planteadas al final del

capítulo anterior, acerca de la razón de que butirato y valerato sean producidos parcialmente asociados al crecimiento.

Dado que una de las posibilidades es que la vía de las pentosas fosfato podría producir un exceso de equivalentes de reducción, se puede eliminar la reacción 15 del modelo estequiométrico:



es decir, la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato, que es en la reacción en que se producen equivalentes de reducción (en forma de NADPH<sub>2</sub>) en esta vía. Esta reacción puede ser eliminada porque las demás reacciones de la vía son reversibles, lo que permite sintetizar la eritrosa-4 fosfato y la ribosa-5 fosfato, necesarias para el anabolismo (ver Figura 6.1). Ninguna otra reacción de la red metabólica puede ser eliminada, sin que se deje de producir algún precursor para el anabolismo.

Si se elimina la reacción 15 y se calculan los índices de consistencia para el modelo estequiométrico,  $h_{ME}$ , se obtienen los valores de 19.2 y 101.6 para los cultivos continuos a tasas de dilución de 0.05 y 0.1 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Cuando se comparan estos valores de  $h_{ME}$  con la distribución  $\chi^2$  con cinco grados de libertad y nivel de confianza de 0.95, se observa que los valores de  $h_{ME}$  son mayores que el correspondiente valor de  $\chi^2$  (11.10, ver Tabla A.1). Por lo tanto, si se elimina la reacción 15, la suposición de estado pseudoestacionario no se cumple y

habría que eliminar, uno a la vez, los balances para cada metabolito intracelular, con el propósito de localizar cuál de ellos es el que no se cumple (Heijden *et al.*, 1994b,c). Cuando se hace esto, se encuentra que al eliminar el balance para el  $\text{NADH}_2$ , los valores de  $h_{\text{ME}}$  son 2.47 y 0.26 para los cultivos continuos a tasas de dilución de 0.05 y 0.1  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Es decir, al eliminar el balance de  $\text{NADH}_2$  en un modelo estequiométrico que no contiene la reacción 15, se cumple de nuevo la suposición de estado pseudoestacionario.

Del análisis anterior, se puede concluir que la reacción 15 contribuye de manera importante a mantener el balance de equivalentes de reducción en el modelo estequiométrico, sin llegar a ser la responsable de proporcionar todo el poder reductor que se consume en la producción de butirato y valerato. Lo anterior sugiere que probablemente la razón de que butirato y valerato sean producidos parcialmente asociados al crecimiento, es una combinación de las dos posibilidades planteadas al final del capítulo 5. Es decir, que la necesidad de favorecer termodinámicamente la conversión de D-lactato en piruvato, a través de mantener muy baja la concentración de equivalentes de reducción se vea incrementada por dos factores, durante la fase exponencial de crecimiento: *i*) la mayor demanda de ATP y *ii*) una mayor producción de equivalentes de reducción (en forma de  $\text{NADPH}_2$ ) en la vía de las pentosas fosfato. Esto posiblemente induciría a la célula a producir butirato y valerato como productos parcialmente asociados al crecimiento, para mantener la concentración de equivalentes de reducción lo suficientemente baja para optimizar la eficiencia termodinámica del metabolismo y la producción de ATP.

El estudio del control de la concentración de equivalentes de reducción, a nivel de la célula en su conjunto, podría llevarse a cabo mediante un estudio de análisis del control metabólico, el cual puede aplicarse a vías bioquímicas aisladas o al conjunto del metabolismo celular (Stephanopoulos *et al.*, 1998), lo cual queda fuera del alcance de este trabajo. El análisis de flujos metabólicos no permite avanzar más, y habría que recurrir a otro tipo de estudios para hacer nuevas aportaciones. Sin embargo, esta metodología ha demostrado ser una herramienta valiosa en el estudio de *M. elsdenii*, permitiendo hacer contribuciones importantes al conocimiento del metabolismo de este microorganismo ruminal.

#### 6.4. Conclusiones

La determinación de actividades enzimáticas aporta nueva evidencia experimental de que *M. elsdenii* utiliza la vía de las pentosas fosfato y la gluconeogénesis, mientras que la detección de actividades de piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa permite afirmar que *M. elsdenii* usa las reacciones catalizadas por estas enzimas, como un puente metabólico entre la vía del acrilato y la gluconeogénesis.

El análisis de consistencia aplicado a los balances elementales para C, H, O y N, confirmó que los datos experimentales para los cultivos continuos fueron de alta calidad, mientras que aplicado al modelo estequiométrico, la suposición de estado pseudoestacionario para los metabolitos intracelulares fue validada. Por su parte, el análisis de flujos metabólicos permitió validar el modelo estequiométrico propuesto, comparando las tasas de consumo de lactato y

producción de AGV con los valores que predice el análisis de flujos metabólicos. Por lo que puede afirmarse que, cuando el lactato es utilizado como fuente de carbono y energía, el modelo estequiométrico propuesto representa adecuadamente el crecimiento y la producción de AGV por *Megasphaera elsdenii*.

Finalmente, el análisis de consistencia, aplicado al modelo estequiométrico sin la reacción 15, sugiere que la necesidad de favorecer la conversión de D-lactato en piruvato se incrementa, durante la fase exponencial de crecimiento, por la mayor demanda de ATP y la producción de equivalentes de reducción en la vía de las pentosas fosfato, lo que induciría la producción de butirato y valerato como productos parcialmente asociados al crecimiento.

---

## **7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

---

---

## 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Antes de recapitular las conclusiones más relevantes que se obtuvieron, es importante recordar los tres aspectos originales del presente trabajo, hasta donde se pudo averiguar con la revisión bibliográfica. Es el primer estudio sistemático de las cinéticas de consumo de lactato y producción de AGV por *M. elsdenii*. En segundo lugar, el modelo estequiométrico propuesto en este documento, integra por primera vez la información sobre la bioquímica de *M. elsdenii* en una red metabólica completa. Finalmente, la aplicación de las herramientas del análisis de flujos metabólicos fue realizada por primera vez para un microorganismo del rumen. Dicho esto, a continuación se enumeran las conclusiones obtenidas a partir de los resultados del presente trabajo.

1. La estimación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Pirt aportó evidencias que sugieren que en medio complejo *M. elsdenii* utiliza el lactato consumido sólo para crecimiento y producción de AGV, mientras que en medio mínimo una parte del lactato consumido se usa para mantenimiento.
2. La estimación de los parámetros de la ecuación de Luedeking y Piret indicó que acetato y propionato son productos asociados al crecimiento, mientras que butirato y valerato son productos parcialmente asociados al crecimiento, lo cual parece ser independiente de la composición del medio de cultivo utilizado, cuando se usa lactato como fuente de carbono y energía.

3. La utilización de un criterio estadístico ya establecido en la literatura, pero que no se había aplicado a los modelos de Pirt y Luedeking y Piret, permitió decidir entre eliminar o conservar parámetros en los mismos.
4. El análisis de consistencia, aplicado al modelo de caja negra (balances elementales para C, H, O y N), permitió establecer que los datos experimentales para los cultivos continuos fueron de alta calidad, lo que permitió utilizarlos en el análisis de flujos metabólicos.
5. La información de la literatura, sintetizada en un modelo estequiométrico del metabolismo de *M. elsdenii*, y completada con la determinación de actividades enzimáticas, hizo posible extender el conocimiento del metabolismo de este microorganismo y disponer de una red metabólica bien soportada. Las contribuciones más importantes al conocimiento del metabolismo, durante el crecimiento sobre lactato, son:
  - 5.1. El aporte de nueva evidencia experimental, en el sentido que *M. elsdenii* dispone de los sistemas enzimáticos necesarios para utilizar la vía de las pentosas fosfato y la gluconeogénesis.
  - 5.2. La detección de las actividades enzimáticas que permiten a *M. elsdenii* usar un puente metabólico entre la vía del acrilato y la gluconeogénesis.

6. El análisis de consistencia, aplicado al modelo estequiométrico propuesto, permitió validar la suposición de estado pseudoestacionario para los metabolitos intracelulares de la red metabólica.
  
7. El análisis de consistencia, aplicado al modelo estequiométrico que carece de la reacción 15 ( $\text{Glucosa6P} \rightarrow \frac{5}{6}\text{Ribosa5P} + \frac{1}{3}\text{NADH}_2 + \frac{1}{6}\text{CO}_2$ ), sugiere que la necesidad de favorecer termodinámicamente la conversión de D-lactato en piruvato se podría ver incrementada, durante la fase exponencial de crecimiento, por la mayor demanda de ATP y la producción de equivalentes de reducción en la vía de las pentosas fosfato. Esto induciría a la célula a producir butirato y valerato como productos parcialmente asociados al crecimiento, para mantener la concentración de equivalentes de reducción lo suficientemente baja para optimizar la eficiencia termodinámica del metabolismo y la producción de ATP.
  
8. Los resultados del análisis de flujos metabólicos permitieron validar el modelo estequiométrico propuesto, comparando las tasas de consumo de lactato y producción de AGV con los valores que predice el análisis de flujos metabólicos. Por lo que puede afirmarse que el modelo estequiométrico propuesto representa adecuadamente el crecimiento y la producción de AGV por *Megasphaera elsdenii*, cuando el lactato es utilizado como fuente de carbono y energía.

La importancia de haber aplicado ambos tipos de modelos, radica en el hecho de que el modelo no estructurado permitió iniciar el estudio de *M. elsdenii*, hacer algunas contribuciones y

plantear interrogantes que sirvieron de punto de partida para iniciar con la aplicación del modelo estructurado. De esta forma, el uso de modelos matemáticos no estructurados (Pirt y Luedeking y Piret) y estructurados (análisis de flujos metabólicos) se manifiesta como una poderosa herramienta que permite extender el conocimiento de la fisiología y el metabolismo microbiano.

Algunas perspectivas o recomendaciones que se pueden plantear para trabajos futuros, a la luz de las experiencias del presente trabajo, son:

1. Llevar a cabo un estudio de la rigidez de nodos en el modelo estequiométrico que permita explicar la redistribución de flujos al cambiar la tasa de dilución.
2. Se propone también que un análisis de control metabólico contribuiría a explicar la producción de butirato y valerato, como productos parcialmente asociados al crecimiento.
3. Llevar a cabo un estudio similar utilizando glucosa como sustrato. Esto permitiría reforzar las conclusiones alcanzadas acerca de la utilización de las vías EMP y PP.
3. Utilizar cultivos continuos, con lactato como sustrato, utilizando tasas de dilución diferentes para poder detectar cambios en las distribuciones de flujos metabólicos. Lo anterior contribuiría a establecer la importancia de diversas reacciones en el metabolismo, ya que a diferentes tasas de dilución tal vez algunas reacciones no estarían activas o quizá se

activarían otras que no se han considerado, lo que ha sido observado para otros microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (Nissen *et al.*, 1997).

3. Se ha propuesto utilizar una cepa diferente de *M. elsdenii* para la producción de caproato (Roddick y Britz, 1997), lo que sugiere que esta bacteria puede ser objeto de manipulaciones de ingeniería metabólica para incrementar el rendimiento de algún producto de interés comercial. Esto abriría todo un campo de estudio, ya que habría que determinar el nivel de rigidez de nodos e implementar un programa de ingeniería genética dirigida a través de los métodos de la ingeniería metabólica (Stephanopoulos y Vallino, 1991).

---

**REFERENCIAS  
BIBLIOGRAFICAS**

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Aiba, S. and Matsuoka, M. (1979). Identification of metabolic model: citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1373-1386.
- Amrane, A. and Prigent, Y. (1994). Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: model development and simulation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **60**, 241 - 246.
- Allison, M. J. (1978). Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 872-877.
- Ayres, G. (1970). *Análisis químico cuantitativo*. Harla, S. A. de C. V. México, D. F.
- Bader, F. B. (1982). Kinetics of double substrate limited growth. In *Microbial population dynamics*. Edited by M. J. Bazin. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 2 - 32
- Baldwin, R. L. and Milligan, L. P. (1964). Electron transport in *Peptostreptococcus elsdenii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **92**, 421-432.
- Baldwin, R. L., Wood, W. A. and Emery, R. S. (1965). Lactate metabolism by *Peptostreptococcus elsdenii*: evidence for lactyl coenzyme A dehydrase. *Biochim. Biophys. Acta.* **97**, 202-213.
- Bailey, J. E. (1998). Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnol. Prog.* **14**, 8-20.
- Bailey, J. E. and Ollis, D. F. (1986). *Biochemical engineering fundamentals*. Second edition. McGraw-Hill International editions. New York, NY.

- Bauchop, T. and Elsdén, S. R. (1960). The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* **23**, 457-469.
- Bellgardt, K. H. (1991). Cell models. In *Biotechnology Vol. 4. Measuring, Modelling and Control*. Edited by H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. Stadler. K. Schugerl (Volume Editor). VCH. Weinheim, Federal Republic of Germany. pp. 267 - 298.
- Benthin, S. and Villadsen, J. (1996). Amino acid utilization by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 during growth on yeast extract or casein peptone. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 65-72.
- Bentle, L. A. and Lardy, H. A. (1976). Interaction of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **251**, 2916-2921.
- Bergen, W. G. and Bates, D. B. (1984). Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* **58**, 1465-1483.
- Bird, R. B. Stewart, W. E. y Lightfoot, E. N. (1987). *Fenómenos de transporte*. Ediciones REPLA, S. A. México, D. F.
- Blanch, H. W. and Clark, D. S. (1994). *Biochemical engineering*, Marcel Dekker. New York, NY
- Brockman, H. L. and Wood, W. A. (1975). Electron transferring flavoprotein of *Peptostreptococcus elsdénii* that functions in the reduction of acrylyl-Coenzyme A. *J. Bacteriol.* **124**, 1447-1453.
- Broughall, J. M., Anslow, P. A. and Kilsby, D. C. (1983). Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 101-110.

- Bryant, M. P. and Robinson, I. M. (1962). Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria *J. Bacteriol.* **84**, 605-614.
- Bryant, M. P. (1972). Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Amer. J. Clin. Nutr.* **25**, 1324-1328.
- Callaway, E. S. and Martin, S. A. (1997). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on the ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* **80**, 2035-2044.
- Charles, S. A. and Halliwell, B. (1980). Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. *Biochem. J.* **189**, 373-376.
- Cocaing-Bousquet, M. and Lindley, N. D. (1995). Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enz. Microb. Technol.* **17**, 260-267.
- Conway, J., Gaudreau, H. and Champagne, C. P. (2001). The effect of the addition of proteases and glucanases during yeast autolysis on the production and properties of yeast extract. *Can. J. Microbiol.* **47**, 18-24.
- Counotte, G. H., Prins, R. A., Janssen, R. H. A. M., deBie, M. J. A. (1981). Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL(2-<sup>13</sup>C) lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 649-655.
- Crundwell, F. K. (1994). Mathematical modelling of batch and continuous bacterial leaching. *Chem. Eng. J.* **54**, 207-220.
- Dills, S. S., Lee, A. and Saier, Jr. M. H. (1981). Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase activity in *Megasphaera elsdenii*. *Can J. Microbiol.* **27**, 949-956

- Djordjevic, S., Pace, C. P., Stankovich, M.T. and Jung-Ja, P. (1995). Three-dimensional structure of butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochemistry* **34**, 2163-2171.
- Dowdy, S. and Wearden, S. (1985). *Statistics for research*. Second edition. John Wiley & Sons. New York, NY.
- Elsden, S. R., Volcani, B. E., Gilchrist, F. M. and Lewis, D. (1956). Properties of a fatty acid forming organism from the rumen of the sheep. *J. Bacteriol.*, **72**, 681-689.
- Erickson, L. E., Minkevich, I. G. and Eroshin, V. K. (1978). Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1595-1621.
- Fell, D. A. and Small, J. R. (1986). Fat synthesis in adipose tissue. An examination of stoichiometric constraints. *Biochem. J.* **238**, 781-786.
- Fonty, G., Gouet, P., Jouang, J. P. and Senaud, J. (1987). Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1835-1843.
- Forsberg, C. W. (1978). Nutritional characteristics of *Megasphaera elsdenii*. *Can. J. Microbiol.* **24**, 981-985.
- Fredrickson, A. G., McGee, R. D. and Tsuchiya, H. M. (1970). Mathematical models in fermentation processes. *Adv. Appl. Microbiol.* **23**, 419.
- Ganter, C & Pluckthun, A (1990). Glycine to alanine substitutions in helices of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: effects on stability. *Biochemistry* **29**, 9395-9402.
- Goel, A., Ferrance, J., Jeong, J. and Atai, M. M. (1993). Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 688-696.

- Goodhue, C. T., Rosazza, J. P. and Peruzzotti, G. P. (1986). Methods for transformation of organic compounds. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Edited by A. L. Demain and N. A. Solomon, N. A. American Society for Microbiology: Washington DC. pp 97-121.
- Gotschalk, G. (1986). *Bacterial metabolism*. Second edition. Springer-Verlag. New York, NY.
- Hanselman, D. and Littlefield, B. (1997). *The student edition of MATLAB®. User's guide*. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ.
- Henderson, C. (1980). The influence of extracellular hydrogen on the metabolism of *Bacteroides ruminicola*, *Anaerovibrio lipolytica* and *Selenomonas ruminantium*. *J. Gen. Microbiol.* **119**, 485-491.
- Hino, T., Miyazaki, K. and Kuroda, S. (1991). Role of extracellular acetate in the fermentation of glucose by a ruminal bacterium, *Megasphaera elsdenii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**, 121-129.
- Hino, T. and Kuroda, S. (1993). Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 255-259.
- Hino, T., Shimada, K., Maruyama, T. (1994). Substrate preference in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1827-1831.
- Hishinuma, F., Kanegasaky, S and Takahashi, H. (1968). Ruminal fermentation and sugar concentrations. A model experiment with *Selenomonas ruminantium*. *Agri. Biol. Chem.* **32**, 1325-1330.

- Hobson, P. N., Mann, S. O. and Oxford, A. E. (1958). Some studies of the occurrence and properties of a large Gram-negative coccus from the rumen. *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 462-472
- Hodrová, B., Kopečný, J. and Petr, O. (1995). Interaction of the rumen fungus *Orpinomyces jayonii* with *Megasphaera elsdenii* and *Eubacterium limosum*. *Letters Appl. Microbiol.* **21**, 34-37.
- Howell, J. A. (1983). Mathematical models in microbiology: mathematical tool-kit. In *Mathematics in Microbiology*. Edited by M. Bazin. Academic Press. London, UK. pp 37-76.
- Howard, L. and Wood, W. A. (1975). Electron-transferring flavoprotein of *Peptostreptococcus elsdenii* that functions in the reduction of acrylyl-Coenzyme A. *J. Bacteriol.* **124**, 1447-1453.
- Hungate, R. E. (1966). *The rumen and its microbes*. Academic Press. New York, NY.
- Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in microbiology*, Vol. 3B. Edited by J. R. Norris and D. W. Ribbons. Academic Press Inc. New York, NY. pp. 117-132.
- Ingraham, J. L., Maaløe, O. and Neidhardt, F. C. (1983). *Growth of the bacterial cell*. Sinauer Associated, Sunderland.
- Jørgensen, H., Nielsen, J., Villadsen, J. and Mølgaard, H. (1995). Metabolic flux distributions in *Penicillium chrysogenum* during fed-batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 117-131.

- Jouany, J. P. (1982), Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments*, **2**, 131-144.
- Joyner, A. E. and Baldwin, R. L. (1966). Enzymatic studies of pure cultures of rumen microorganisms. *J. Bacteriol.* **92**, 1321-1330.
- Kreyszig, E. (1997). *Matemáticas avanzadas para ingeniería*. Segunda Edición. Limusa, México, D. F.
- Kung, L. and Hession, A. (1995). Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* **73**, 250 - 256.
- Ladd, J. N. and Walker, D. J. (1959). The fermentation of lactate and acrylate by the rumen micro-organism LC. *Biochem. J.* **71**, 364-373.
- Lehninger, A. L. (1982). *Bioquímica*. Segunda Edición, Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España.
- Ljungdahl, L. G. and Wiegel, J. (1986). Working with anaerobic bacteria. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Edited by A. L. Demain and N. A. Solomon, N. A. American Society for Microbiology: Washington DC. pp 97-121.
- Loesche, W. J. (1969). Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* **18**, 723-727.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Luedeking, R. and Piret, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1**, 393-412.

- Luyben, W. L. (1973). *Process modelling, simulation and control for chemical engineers*. International Student Edition. McGraw-Hill. New York, NY.
- Macy, J. M., Snellen, J. E. and Hungate, R. E. (1972). Use of syringe methods for anaerobiosis. *Amer. J. Clin. Nutr.* **25**, 1318-1323.
- Maher, M., Roux, G. and Dahhou, B. (1995). A method for estimating the state variables and parameters of fermentation systems. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **63**, 153-159.
- Marounek, M. and Bartos, S. (1987). Interactions between rumen amylolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 233-238.
- Marounek, M., Fliegrova, K. and Bartos, S. (1989). Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1570-1573.
- Marquardt, D. W. (1963). An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **2**, 431-441.
- Martin, S. A. (1994). Nutrient transport in ruminal bacteria: a review. *J. Anim. Sci.* **72**, 3019-3031.
- Martin, S. A. and Russell, J. B. (1986). Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of hexoses by ruminal bacteria: evidence for the phosphotransferase transport system. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1348-1352.
- Martin, S. A. and Wani, E. L. (2000). Factors affecting glucose and maltose phosphorylation by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Curr. Microbiol.* **40**, 387-391.
- Mercier, P., Yerushalmi, L., Rouleau, D. and Dochain, D. (1992). Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **55**, 111-121.

- Miller, T. L. and Wolin, M. J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* **27**, 985-987.
- Mink, R. W. and Hespell, R. B. (1981). Survival of *Megasphaera elsdenii* during starvation. *Curr. Microbiol.* **5**, 51-56.
- Miwa, T. Esaki, H, Umemori, J. and Hino, T. (1997). Activity of H<sup>+</sup>-ATPase in ruminal bacteria with special reference to acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2155-2158.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 371 - 394.
- Morris, J. G. (1975). The physiology of obligate anaerobiosis. *Adv. Microb. Physiol.* **12**, 169-233.
- Munack, A. (1985). On parameter identification for complex biotechnical systems. In *Modelling and control of biotechnological processes. Proceedings of the 1st International Federation of Automatic Control Symposium*. Edited by A. Johnson., 11-13 December. Noordwijkerhout, The Netherlands.
- Nagaraja, T. G., Towne, G. and Beharka., A. A. (1992). Moderation of ruminal fermentation by ciliated in cattle fed a high grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2410-2414.
- Nielsen, J. and Villadsen, J. (1994) *Bioreaction engineering principles*. Plenum Press. New York, NY.
- Nielsen, J. (2001). Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 263-283.
- Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* **143**, 302-218.

- Noble, B. and Daniel, J. W. (1977). *Applied linear algebra*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, NJ.
- Ohta, H., Miyagi, A., Kato, K. and Fukui, K. (1996). The relationships between leukotoxin production, growth rate and the bicarbonate concentration in a toxin-production-variable strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol.* **42**, 963-970.
- Olson, S. T. and Massey, V. (1979). Purification and properties of the flavoenzyme D-lactate dehydrogenasa from *Megasphaera elsdenii*. *Biochemistry*. **18**, 4714-4724.
- O'Neil, P. V. (1994). *Matemáticas avanzadas para ingeniería*. Compañía Editorial Continental S. A. de C. V. México, D. F.
- Ooijkaas, L. P., Buitelaar, R. M., Tramper, J. and Rinzema, A. (2000). Growth and sporulation stoichiometry and kinetics of *Coniothyrium minitans* on agar media. *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 292-300.
- Passos, F. V., Fleming, H. P., Ollis, D. F., Felder, R. M. and McFeeters, R. F. (1994). Kinetics and modeling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2627-2636.
- Perlmutter, D. D. (1972). *Stability of chemical reactors*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NY.
- Pirt, S. J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications. London, UK.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, A. and van Dijken, J. P. (1989). Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 468-477.

- Press, W. H., Flannery, B. P., Teukolsky, S. A. and Vetterling, W. T. (1990). *Numerical recipes, the art of scientific computing*. Cambridge University Press. New York, NY.
- Roddick, F. A. and Britz, M. L. (1997). Production of hexanoic acid by free and immobilised cells of *Megasphaera elsdenii*: influence of in-situ product removal using ion exchange resin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **69**, 383-391.
- Roels, J. A. (1980). Application of macroscopic principles to microbial metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* **12**, 2457 - 2514.
- Roels, J. A. (1982). Mathematical models and the design of biochemical reactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **32**, 59 - 72.
- Roels, J. A. (1983). *Energetics and kinetics in biotechnology*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam.
- Rogosa, M. (1971). Transfer of *Peptostreptococcus elsdenii* Gutierrez *et al.* to a new genus *Megasphaera* [*M. elsdenii* (Gutierrez *et al.*) comb. nov.]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 187-189.
- Rossi, F., Coconcelli, P. S. and Masoero, F. (1995). Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Ann. Zootech.* **44**, 403-409.
- Russell, J. B. (1991). Intracellular pH of acid-tolerant rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3383-3384.
- Russell, J. B. and Baldwin, R. L. (1978). Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 319-329.

- Russell, J. B. and Baldwin, R. L. (1979a). Comparison of substrate affinities among several rumen bacteria: a possible determinant of rumen bacterial competition. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 531-536.
- Russell, J. B. and Baldwin, R.L. (1979b). Comparison of maintenance energy expenditures and growth yields among several rumen bacteria grown on continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 537-543.
- Russell, J. B. and Baldwin, R.L. (1979c). Effects of combinations of substrates on maximum growth rates of several rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 544-549.
- Russell, J. B., Sharp, W. M. and Baldwin, R. L. (1979). The effect of pH on maximum bacterial growth rate and its possible role as a determinant of bacterial competition in the rumen. *J. Anim. Sci.* **48**, 251-255.
- Russell, J. B. and Dombrowsky, D. B. (1980). Effect of pH on efficiency of growth by pure culture of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 604-610.
- Russell, J. B. and Wallace, J. (1988). Energy yielding and consuming reactions. In *The rumen microbial ecosystem*. Edited by P. N. Hobson. Elsevier Applied Science. London, UK. pp 185-215.
- Russell, J. B., Sharp, W. M. and Baldwin, R. L. (1979). The effect of pH on maximum bacterial growth rate and its possible role as a determinant of bacterial competition in the rumen. *J. Anim. Sci.* **48**, 351-355.

- Russell, J. B., Cotta, M. A. and Dombrowsky, D. B. (1981). Rumen bacterial competition in continuous culture: *Streptococcus bovis* versus *Megasphaera elsdenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1394-1399.
- Savinell, J. M. and Palsson, B. O. (1992). Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization: I. Development of mathematical formalism. *J. Theor. Biol.* **154**, 421-454.
- Schügerl, K. (1985). Modelling of biotechnological processes. In *Modelling and control of biotechnological processes. Proceedings of the 1st International Federation of Automatic Control Symposium*. Edited by A. Johnson. 11-13 December, Noordwijkerhout, The Netherlands.
- Schulze, U. (1995). *Anaerobic physiology of Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis. Technical University of Denmark. Lyngby, Denmark.
- Segel, I. H. (1993). *Enzyme kinetics*. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.
- Shiloach, J. and Bauer, R. A. S. (1975). High-yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench-scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 227-239
- Slyter, L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* **43**, 910-929.
- Somerville, H. J. (1968). Enzymic studies on the biosynthesis of amino acids from lactate by *Peptostreptococcus elsdenii*. *Biochem. J.* **108**, 107-119.
- Soto-Cruz, O. (1997). *Estudio del efecto probiótico mediante el modelado matemático del cultivo de la bacteria ruminal Megasphaera elsdenii*. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México D. F.

- Soto-Cruz, O., Chávez-Rivera, R. and Saucedo-Castañeda, G. (2001). Stimulation of the *Megasphaera elsdenii*'s butyrate production in continuous culture by a yeast additive. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **44**, 179-184.
- Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E. and Saucedo-Castañeda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnol. Prog.* (In press).
- Stephanopoulos, G. and Vallino, J. J. (1991). Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*. **252**, 1675-1681.
- Stephanopoulos, G., Nielsen, J. and Aristidou, A. (1998). *Metabolic engineering. Principles and methodologies*. Academic Press, N. Y.
- Stouthamer, A. H. (1969). Determination and significance of molar growth yields. In *Methods in microbiology*. Vol. 1. Edited by J. R. Norris and D. W. Ribbons. Academic Press. London, UK. pp. 629-663.
- Thauer, R. K., Jungerman, K. and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**, 100-180.
- Tosaka, O., Morioka, H and Takinani, K. (1979). The role of biotin dependent pyruvate carboxylase in L-lysine production. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1513-1519.
- Tsai, S. P. and Lee, Y. H. (1988). Application of metabolic pathway stoichiometry to statistical analysis of bioreactor measurement data. *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 713-715.
- Tsuchiya, H. M., Fredrickson, A. G. and Aris, R. (1966). Dynamics of microbial cell populations. *Adv. Chem. Eng.* **6**, 125.

- Vallino, J. J. and Stephanopoulos, G. (1990). Flux determination in cellular bioreaction networks: applications to lysine fermentation. In *Frontiers in bioprocessing*. Edited by S. K. Sikdar, M. Bierand P. Todd. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 205-219.
- Vallino, J. J. and Stephanopoulos, G. (1993). FALTA
- van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. & Luyben, K. Ch. A. M. (1994a). Linear constraint relations in biochemical reaction system: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnol Bioeng.* **43**, 3-10.
- van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. & Luyben, K. Ch. A. M. (1994b). Linear constraint relations in biochemical reaction system: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnol Bioeng.* **43**, 11-20.
- van der Heijden, R. T. J. M., Romein, B., Heijnen, J. J., Hellinga, C. & Luyben, K. Ch. A. M. (1994c). Linear constraint relations in biochemical reaction system: III. Sequential application of data reconciliation for sensitive detection of systematic errors. *Biotechnol Bioeng.* **44**, 781-791.
- van Gulik, W. M. and Heijden, J. J. (1995). A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnol. Bioeng.* **48**, 681-698.
- van Gylswyk, N. O. (1970). The effect of supplementing a low protein hay on the cellulolytic bacteria in the rumen of sheep and on the digestibility of cellulose and hemicellulose. *J. Agric. Sci.* **74**, 169-180.

- van Gylswyk, N. O., Wejdemar, K. and Kulander, K. (1992). Comparative growth rates of various rumen bacteria in clarified rumen fluid from cows and sheep fed different diets. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 99-105.
- Vanrolleghem, P. A. and Heijnen, J. J. (1998). A structured approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 133-138.
- Varma, A., Boesch, B. W. and Palsson, B. O. (1993a). Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 59-73.
- Varma, A., Boesch, B. W. and Palsson, B.O. (1993b). Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* catabolism under various oxygenation rates. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2465-2473.
- Varma, A. and Palsson, B. O. (1994). Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Biotechnol.* **12**, 994-998.
- Waldrip, H. M. and Martin, S. A. (1993). Effects of an *Aspergillus oryzae* fermentation extract and other factors on lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* **71**, 2770-2776.
- Wallace, R. J. (1986). Catabolism of amino acids by *Megasphaera elsdenii* LC1. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1141-1143.
- Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Humphrey, A. E. and Lilly, M. D. (1979). *Fermentation and enzyme technology*. John Wiley & Sons. New York, NY.
- Wang, N. S. and Stephanopoulos, G. (1983). Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 2177-2208.

Watson, M. R. (1986). A discrete model of bacterial metabolism. *Comp. Appl. Biosci.* **2**, 23-27.

Williamson, G., and Engel, P.C. (1984). Butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. Specificity of the catalytic reaction. *Biochem. J.* **218**, 521-529.

Yamane, T., Chen, X. and Ueda, S. (1996). Growth-associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from n-pentanol by a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 380-384.

---

---

## **APENDICES**

---

---

---

**Apéndice 1. Nomenclatura**

<b>A</b>	Matriz de coeficientes en el modelo estequiométrico
<b>A<sub>c</sub></b>	Matriz de coeficientes para los compuestos no medidos en el modelo estequiométrico
<b>A<sub>m</sub></b>	Matriz de coeficientes para los compuestos medidos en el modelo estequiométrico
<b>A<sup>#</sup></b>	Pseudoinversa de Moore-Penrose
<b>AGV</b>	Acidos grasos volátiles
<b>AKG</b>	$\alpha$ -cetoglutarato
<b>C</b>	Número de condición
<b>E</b>	Matriz de coeficientes estequiométricos en el modelo de caja negra
<b>E<sub>C</sub></b>	Matriz de coeficientes estequiométricos para los compuestos no medidos en el modelo de caja negra
<b>E<sub>M</sub></b>	Matriz de coeficientes estequiométricos para los compuestos medidos en el modelo de caja negra
<b>EMP</b>	Embden-Meyehorff-Parnas
<b>F</b>	Matriz de varianza-covarianza para los datos experimentales en los modelos de caja negra y estequiométrico
<b>h<sub>MEN</sub></b>	Indice de consistencia en el modelo de caja negra
<b>h<sub>ME</sub></b>	Indice de consistencia en el modelo estequiométrico
<b>I</b>	Matriz identidad
<b>K<sub>S</sub></b>	Constante de afinidad en la ecuación de Monod (C-mM)
<b>L</b>	Concentración de lactato (C-mM)
<b>L<sub>0</sub></b>	Concentración inicial de lactato (C-mM)
<b>m</b>	Coefficiente de mantenimiento (C-mol lactato h <sup>-1</sup> [C-mol biomasa] <sup>-1</sup> )
<b>P</b>	Matriz de varianza-covarianza para los residuos en los modelos de caja negra y estequiométrico

---

$P_i$	Concentración del producto $i$ (C-mM)
$P_{i,0}$	Concentración inicial del producto $i$ (C-mM)
PEP	Fosfoenolpiruvato
PP	Pentosas fosfato
$r$	Vector de tasas específicas de consumo/producción
$r_c$	Vector de tasas específicas de consumo/producción no medidas
$r_m$	Vector de tasas específicas de consumo/producción medidas
$\bar{r}_m$	Vector de los mejores estimados de las tasas de consumo/producción medidas
$r_p$	Vector de tasas específicas de formación de productos
$r_s$	Vector de tasas específicas de consumo de sustratos
$R$	Matriz de redundancia
$R_r$	Matriz reducida de redundancia
$R^2$	Coefficiente de correlación
$t$	Tiempo (h)
$x$	Vector de flujos metabólicos en el modelo estequiométrico
$x_c$	Vector de flujos metabólicos no medidos en el modelo estequiométrico
$x_m$	Vector de flujos metabólicos medidos en el modelo estequiométrico
$X$	Concentración de biomasa (C-mM)
$X_{max}$	Concentración máxima de biomasa (C-mM)
$X_0$	Concentración inicial de biomasa (C-mM)
$Y_{SC}$	Coefficiente de rendimiento de $CO_2$ con respecto al lactato consumido (C-mol $CO_2$ [C-mol lactato] <sup>-1</sup> )
$Y_{SA}$	Coefficiente de rendimiento de acetato con respecto al lactato consumido (C-mol acetato [C-mol lactato] <sup>-1</sup> )
$Y_{SB}$	Coefficiente de rendimiento de butirato con respecto al lactato consumido (C-mol butirato [C-mol lactato] <sup>-1</sup> )

$Y_{SP}$	Coeficiente de rendimiento de propionato con respecto al lactato consumido (C-mol propionato [C-mol lactato] <sup>-1</sup> )
$Y_{SV}$	Coeficiente de rendimiento de valerato con respecto al lactato consumido (C-mol valerato [C-mol lactato] <sup>-1</sup> )
$Y_{SX}$	Coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto al lactato consumido (C-mol biomasa [C-mol lactato] <sup>-1</sup> )

### Símbolos griegos

$\alpha_i$	Coeficiente de formación del producto $i$ asociado al crecimiento en la ecuación de Luedeking-Piret (C-mol producto [C-mol biomasa] <sup>-1</sup> )
$\beta_i$	Coeficiente de formación del producto $i$ no asociado al crecimiento en la ecuación de Luedeking-Piret (C-mol producto h <sup>-1</sup> [C-mol biomasa] <sup>-1</sup> )
$\gamma_X$	Grado de reducción de la biomasa = 4.14 (considerando una composición de CH <sub>1.81</sub> O <sub>0.52</sub> N <sub>0.21</sub> para la biomasa)
$\gamma_A$	Grado de reducción del acetato = 4
$\gamma_B$	Grado de reducción del butirato = 5
$\gamma_L$	Grado de reducción del lactato = 4
$\gamma_P$	Grado de reducción del propionato = 4.67
$\gamma_V$	Grado de reducción del valerato = 5.2
$\delta$	Vector de estimados de los errores de medición en el modelo de caja negra
$\varepsilon$	Vector de residuos en el modelo de caja negra
$\mu$	Tasa específica de crecimiento (h <sup>-1</sup> )
$\mu_m$	Tasa específica máxima de crecimiento en la ecuación de Monod (h <sup>-1</sup> )
$\mu_{max}$	Tasa específica máxima de crecimiento en la ecuación logística (h <sup>-1</sup> )
$\chi^2$	Distribución "chi" cuadrada

## Apéndice 2. Cálculos para transformar datos a términos de unidades C-mol

Como se explicó en el apartado 1.3.1 del presente documento, los compuestos involucrados en un proceso de fermentación pueden expresarse en base a un átomo de carbono a partir de su fórmula mínima. Así por ejemplo, la glucosa, que tiene  $C_6H_{12}O_6$  como fórmula mínima, se expresa como  $CH_2O$ , al igual que el lactato y el acetato; el butirato, que tiene  $C_4H_8O_2$  como fórmula mínima, se expresa como  $CH_2O_{0.5}$ . A esta forma de expresar los compuestos se le denomina base C-mol.

A partir de las fórmulas mínimas así expresadas se puede calcular el peso molecular en base C-mol. De modo que el peso molecular de la glucosa, que en base a su fórmula mínima es  $180 \text{ g mol}^{-1}$ , en base C-mol es  $30 \text{ g C-mol}^{-1}$ . Utilizando los pesos moleculares convencionales y los pesos moleculares en base C-mol se puede transformar a base C-mol datos que están expresados en base másica o molar, como se describe a continuación. Si se tiene, por ejemplo, que la concentración de glucosa en ciertas circunstancias es de  $15 \text{ g L}^{-1}$ , la correspondiente concentración en base C-mol es:

$$\frac{15 \text{ g glucosa}}{\text{L}} \left| \frac{1 \text{ C - mol glucosa}}{30 \text{ g glucosa}} \right| = \frac{0.5 \text{ C - mol glucosa}}{\text{L}} \quad (\text{A.1})$$

En cambio, si la concentración de glucosa es de  $15 \text{ mM}$ , la concentración en base C-mol es:

$$\frac{0.015 \text{ mol glucosa}}{\text{L}} \left| \frac{180 \text{ g glucosa}}{1 \text{ mol glucosa}} \right| \left| \frac{1 \text{ C - mol glucosa}}{30 \text{ g glucosa}} \right| = \frac{0.09 \text{ C - mol glucosa}}{\text{L}} \quad (\text{A.2})$$

### Apéndice 3. Metodología del análisis de flujos metabólicos

Las operaciones con matrices que se utilizan en las siguientes páginas, puede revisarse en los excelentes textos de Kreyszig (1997) y O'Neil. (1994). Las operaciones con matrices se llevaron a cabo en *MatLab 5.0*, utilizando aritmética de doble precisión (Hanselman y Littlefield, 1997).

#### *El modelo de caja negra*

La matriz y el vector del lado izquierdo de la ecuación 6.5:

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 2 & 1.81 & 2 & 2 & 2 & 2 & 3 & 0 & 2 \\ 1 & 0.52 & 1 & 2/3 & 1/2 & 2/5 & 0 & 2 & 1 \\ 0 & 0.21 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{\text{Lactato}} \\ r_{\text{Biomasa}} \\ r_{\text{Acetato}} \\ r_{\text{Propionato}} \\ r_{\text{Butirato}} \\ r_{\text{Valerato}} \\ r_{\text{NH}_3} \\ r_{\text{CO}_2} \\ r_{\text{H}_2\text{O}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (6.5)$$

pueden verse como vectores de dos componentes que tienen como entradas a la matriz  $E_m$  y  $E_c$ , y los vectores  $r_m$  y  $r_c$ , respectivamente, como se muestra a continuación:

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 2 & 1.81 & 2 & 2 & 2 & 2 \\ 1 & 0.52 & 1 & 2/3 & 1/2 & 2/5 \\ 0 & 0.21 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 3 & 0 & 2 \\ 0 & 2 & 1 \\ 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_{\text{Lactato}} \\ r_{\text{Biomasa}} \\ r_{\text{Acetato}} \\ r_{\text{Propionato}} \\ r_{\text{Butirato}} \\ r_{\text{Valerato}} \\ r_{\text{NH}_3} \\ r_{\text{CO}_2} \\ r_{\text{H}_2\text{O}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.9})$$

o bien:

$$(\mathbf{E}_m \quad \mathbf{E}_c) \begin{pmatrix} \mathbf{r}_m \\ \mathbf{r}_c \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{A.10})$$

De manera que al hacer la multiplicación de matrices del lado izquierdo de la ecuación A.10, se obtiene:

$$\mathbf{E}_m \mathbf{r}_m + \mathbf{E}_c \mathbf{r}_c = \mathbf{0} \quad (\text{A.11})$$

La matriz  $\mathbf{E}_m$  contiene los coeficientes de la composición elemental de los compuestos medidos y el vector  $\mathbf{r}_m$  contiene las tasas de consumo/producción de tales compuestos. Por su parte, la matriz  $\mathbf{E}_c$  contiene los coeficientes de la composición elemental de los compuestos no medidos, mientras que el vector  $\mathbf{r}_c$  contiene las tasas de consumo/producción de los compuestos no

medidos. Como el sistema es sobredeterminado y la matriz  $\mathbf{E}_c$  no es cuadrada, la solución del sistema está dada por la ecuación (Noble y Daniel, 1977):

$$\mathbf{r}_c = (\mathbf{E}_c^T \mathbf{E}_c)^{-1} \mathbf{E}_m \mathbf{r}_m \quad (\text{A.12})$$

Una vez calculadas las tasas de consumo/producción, puede validarse la consistencia global de las tasas medidas y calculadas. Para esto, se inserta la ecuación A.12 en la ecuación A.11, con lo que se obtiene:

$$\mathbf{R} \mathbf{r}_m = \mathbf{0} \quad (\text{A.13})$$

donde  $\mathbf{R}$  es la *matriz de redundancia* (Heijden *et al.*, 1994a,b) que está dada por:

$$\mathbf{R} = \mathbf{E}_m - \mathbf{E}_c (\mathbf{E}_c^T \mathbf{E}_c)^{-1} \mathbf{E}_c^T \mathbf{E}_m \quad (\text{A.14})$$

El rango de  $\mathbf{R}$ , es decir, el número de vectores renglón linealmente independientes, está relacionado con las variables medidas y especifica el número de ecuaciones independientes que tienen que satisfacerse. Las ecuaciones linealmente dependientes se eliminan, quedando la matriz de redundancia reducida,  $\mathbf{R}_r$ , la cual constituye la base del análisis posterior.

Como consecuencia del error experimental, la ecuación A.13 no se cumple exactamente. Al eliminar los renglones linealmente dependientes y multiplicar  $\mathbf{R}_r$  por  $\mathbf{r}_m$ , debería obtenerse un

vector cero. Sin embargo, debido al error experimental lo que se obtiene es un vector de residuos,  $\varepsilon$ , dado por:

$$\varepsilon = \mathbf{R}_r \mathbf{r}_m \quad (\text{A.15})$$

De manera que, si se dispone de estimaciones de los errores de medición, se puede suponer que el vector de error es normalmente distribuido, con media cero y *matriz de varianza-covarianza*  $\mathbf{F}$ . Heijden *et al.* (1994b) demostraron que los residuos de la ecuación A.15 también son normalmente distribuidos, con media cero y matriz de varianza-covarianza,  $\mathbf{P}$ , dada por:

$$\mathbf{P} = \mathbf{R}_r \mathbf{F} \mathbf{R}_r^T \quad (\text{A.16})$$

La matriz  $\mathbf{F}$  es una matriz diagonal cuadrada, cuyos elementos de la diagonal principal se calculan elevando al cuadrado el producto de los correspondientes valores de las tasas medidas por sus desviaciones estándar (Wang y Stephanopoulos, 1983).

Una vez que se tienen calculados el vector de residuos ( $\varepsilon$ ) y su correspondiente matriz de varianza-covarianza ( $\mathbf{P}$ ), se puede calcular el índice de consistencia,  $h$ , dado por:

$$h = \varepsilon^T \mathbf{P}^{-1} \varepsilon \quad (\text{A.17})$$

que es una función de prueba, la cual permite establecer si los residuos son significativamente diferentes de cero. Si esto ocurre, el modelo es incorrecto o existe error sistemático en al menos una medición (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que la función  $h$  sigue una distribución  $\chi^2$  y que los grados de libertad son iguales al rango de  $\mathbf{R}$  (Wang y Stephanopoulos, 1983; Heijden *et al.*, 1994b,c). Por lo tanto, comparando el valor calculado de la función  $h$  con los valores de la distribución  $\chi^2$  a los grados de libertad correspondientes [ $\text{rango}(\mathbf{R})$ ], es posible validar la calidad de los datos y la aplicabilidad del modelo (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Los valores de la distribución  $\chi^2$  se presentan en la Tabla A.1, a continuación.

**Tabla A.1.** Valores de la distribución  $\chi^2$  hasta cinco grados de libertad (Tomada de Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Grados de libertad	Nivel de confianza					
	0.500	0.750	0.900	0.950	0.975	0.990
1	0.46	1.32	2.71	3.84	5.02	6.63
2	1.39	2.77	4.61	5.99	7.38	9.21
3	2.37	4.11	6.25	7.81	9.35	11.30
4	3.36	5.39	7.78	9.49	11.10	13.30
5	4.35	6.63	9.24	11.10	12.80	15.10

La manera de interpretar los datos obtenidos es la siguiente. Se rechaza la hipótesis de que *la cantidad de error presente en las mediciones no es significativa*, si  $h \geq \chi^2$  a un nivel de confianza y grados de libertad dados. Un nivel de confianza de 90 o 95% es usualmente adecuado (Wang y Stephanopoulos, 1983).

Una vez que se ha determinado que no existen errores gruesos de medición, es decir, que la calidad de los datos se ha validado, se pueden calcular las tasas de consumo/producción no medidas que contiene el vector  $\mathbf{r}_c$ , utilizando la ecuación A.12 (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Más aún, es posible calcular mejores estimados para las tasas medidas, utilizando la ecuación:

$$\bar{\mathbf{r}}_m = \mathbf{r}_m + \delta \quad (\text{A.18})$$

donde  $\bar{\mathbf{r}}_m$  es el vector de estimados de las variables medidas y  $\delta$  es el vector de los estimados de los errores de medición, que está dado por (Heijden *et al.*, 1994b):

$$\delta = \mathbf{F}\mathbf{R}_r^T\mathbf{P}^{-1}\mathbf{R}_r\mathbf{r}_m \quad (\text{A.19})$$

#### *Análisis de consistencia en el modelo estequiométrico*

En las ecuaciones 6.21 y 6.22:

$$\begin{pmatrix}
 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -3/5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 2/3 & -1 & -2/5 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -2/5 & -0.164 & 0 \\
 0 & -1/3 & 0 & 1/3 & 0 & 0 & -2/5 & -1/2 & 0 & 0 & 0 & -1/3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/5 & -0.2652 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -3/4 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.094 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/2 & 1/5 & 1/4 & -1/4 & -1/4 & 0 & -1/3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.9752 & -1 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -4/5 & -0.1063 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 3/4 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.039 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.1128 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 3/9 & 0 & -0.0097 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 3/5 & 6/9 & 0 & -0.0107 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -0.0308 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 5/6 & -1 & -5/9 & 0 & -0.1126 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2/5 & -4/9 & 0 & -0.036 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -0.0727 & 0
 \end{pmatrix}
 \begin{pmatrix}
 x_1 \\
 x_2 \\
 x_3 \\
 x_4 \\
 x_5 \\
 x_6 \\
 x_7 \\
 x_8 \\
 x_9 \\
 x_{10} \\
 x_{11} \\
 x_{12} \\
 x_{13} \\
 x_{14} \\
 x_{15} \\
 x_{16} \\
 x_{17} \\
 x_{18} \\
 x_{19} \\
 x_{20}
 \end{pmatrix}
 =
 \begin{pmatrix}
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0
 \end{pmatrix}
 \tag{6.21}$$

$$\mathbf{Ax} = \mathbf{0} \tag{6.22}$$

La matriz **A** es equivalente a la matriz **E**, utilizada en el modelo de caja negra, por lo que puede ser separada en dos matrices **A<sub>m</sub>** y **A<sub>c</sub>** que contengan los coeficientes estequiométricos correspondientes a las tasas de reacción medidas y no medidas, respectivamente. De manera similar, el vector **x** (vector de flujos desconocidos de las reacciones =  $[x_1, x_2, \dots, x_{20}]^T$ ) puede separarse en dos vectores **x<sub>m</sub>** y **x<sub>c</sub>** que contengan las tasas de reacción medidas y no medidas, respectivamente. Así, la ecuación A.36 puede escribirse como:

$$\mathbf{A}_m \mathbf{x}_m + \mathbf{A}_c \mathbf{x}_c = \mathbf{0} \tag{A.20}$$

Ya que se tienen 20 flujos intracelulares desconocidos y 15 balances estequiométricos, los grados de libertad del sistema son 5, es decir, se requiere medir al menos 5 flujos para poder

resolver el sistema. Sin embargo, ya que se midieron 6 flujos, el sistema es sobredeterminado. Por la similitud de la matriz  $\mathbf{A}$  con la matriz  $\mathbf{E}$ , las ecuaciones A.13 a A.17 se utilizan para calcular la función  $h$ , usando  $\mathbf{x}_m$ ,  $\mathbf{A}_m$  y  $\mathbf{A}_c$  en lugar de  $\mathbf{r}_m$ ,  $\mathbf{E}_m$  y  $\mathbf{E}_c$ , para el modelo estequiométrico, con lo que se puede validar la suposición de estado pseudoestacionario (Heijden *et al.*, 1994a,b,c). Aunque en estos cálculos también se valida la calidad de los datos experimentales, el diagnóstico de errores debe hacerse preferentemente usando el modelo de caja negra. Posteriormente, el conjunto de los datos corregidos que se obtuvieron de las ecuaciones A.12 y A.18, debe usarse para validar la suposición de estado pseudoestacionario y para calcular los mejores estimados de los flujos metabólicos (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Como se argumentó en el capítulo 6, en el caso del presente trabajo, el vector  $\mathbf{x}_m$  está dado por:

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ x_3 \\ x_6 \\ x_7 \\ x_8 \\ x_{19} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} r_{L-lactato} \\ r_{Pr opionato} \\ r_{Acetato} \\ r_{Valerato} \\ r_{Butirato} \\ r_{Biomasa} \end{pmatrix} \quad (6.23)$$

donde las tasas  $r_i$  corresponden a los flujos extracelulares medidos, lo cual puede deducirse de la Figura 6.1. Por lo tanto, el vector  $\mathbf{x}_c$  contiene los restantes flujos metabólicos desconocidos. La matriz  $\mathbf{A}_m$  contiene las columnas 1, 3, 6, 7, 8 y 19 de la matriz  $\mathbf{A}$ , que corresponden a los flujos medidos, mientras que la matriz  $\mathbf{A}_c$  contiene las restantes columnas de la matriz  $\mathbf{A}$ .

*Distribución de flujos metabólicos*

Una vez validada la suposición de estado pseudoestacionario, las ecuaciones A.12 y A.18 podrían utilizarse para calcular los flujos metabólicos desconocidos, es decir, los elementos del vector  $\mathbf{x}_c$  (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Sin embargo, un método diferente descrito por Tsai y Lee (1988), proporciona los mejores estimados para los flujos metabólicos medidos y no medidos. En este método la ecuación A.20 se reformula para expresarse como:

$$\begin{pmatrix} \mathbf{x}_m \\ \mathbf{0} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{I} & \mathbf{0} \\ \mathbf{A}_m & \mathbf{A}_c \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{x}_m \\ \mathbf{x}_c \end{pmatrix} = \mathbf{T}\mathbf{x} \quad (\text{A.21})$$

donde  $\mathbf{I}$  es la matriz identidad de dimensión igual al número de flujos medidos (en este caso de 6X6). En la matriz  $\mathbf{A}$  las columnas se intercambian para que al principio se tengan juntas las columnas que corresponden a las reacciones cuyos flujos son medidos, mientras que otro tanto se hace con el vector  $\mathbf{x}$ .

El primer renglón de la ecuación A.21 simplemente establece que  $\mathbf{x}_m$  es igual a  $\mathbf{x}_m$ , mientras que el segundo renglón es idéntico con la ecuación A.20.

La ecuación A.21 se escribe de manera extendida como (ecuación A.22):





y la matriz  $\mathbf{F}$  es la matriz de varianza-covarianza que se utilizó en el modelo de caja negra. Finalmente, la mejor estimación del vector  $\mathbf{x}_2$ , que contiene todos los flujos metabólicos desconocidos, se calcula:

$$\bar{\mathbf{x}}_2 = -\mathbf{T}_{22}^{-1} \mathbf{T}_{21} \bar{\mathbf{x}}_1 \quad (\text{A.27})$$

Las ecuaciones A.25 y A.27 proporcionan los mejores estimados de todos los flujos en el modelo estequiométrico.

**Apéndice 4. Productos de la formación doctoral***Trabajos presentados en eventos especializados*

**Soto-Cruz, O.**, Saucedo-Castañeda, G. y Favela-Torres, E. (1999). Efecto del nivel de inóculo sobre el cultivo por lote de la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. 12 a 17 de septiembre de 1999. Huatulco, Oax.

**Soto-Cruz, O.**, Saucedo-Castañeda, G. y Favela-Torres, E. (1999). Análisis de la cinética de formación de productos por la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii* en cultivo por lote. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. 12 a 17 de septiembre de 1999. Huatulco, Oax.

**Soto-Cruz, O.**, Saucedo-Castañeda, G. y Favela-Torres, E. (2001). Actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de lactato y glucosa en la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. 10 a 14 de septiembre de 2001. Veracruz, Ver.

García-Saucedo, C., **Soto-Cruz, O.**, y Saucedo-Castañeda, G. (2001). Evaluación *in vitro* de utilización de productos de fermentación sólida de la pulpa de café como aditivos de la alimentación de rumiantes. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. 10 a 14 de septiembre de 2001. Veracruz, Ver.

**Soto-Cruz, O.,** Saucedo-Castañeda, G. y Favela-Torres, E (2001). Relación entre el crecimiento y la producción de ácidos grasos volátiles por la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii*, a partir de lactato. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. 10 a 14 de septiembre de 2001. Veracruz, Ver.

#### *Conferencias por invitación*

*Evaluación microbiológica de aditivos para la alimentación de rumiantes.* Presentada en la XVII Semana Académica Cultural, por invitación del Ing. Pascual Avila Pérez, Director de la Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón. Torreón, Coah., 19 de octubre de 1999.

*Crecimiento de la bacteria ruminal Megasphaera elsdenii y producción de AGV's a partir de lactato: Uso de modelos no estructurados y análisis de flujos metabólicos.* Presentada por invitación del Dr. Juan Carlos Ku Vera, Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yuc. 1 de octubre de 2001.

#### *Publicaciones con arbitraje*

**Soto-Cruz, N. O.,** Favela-Torres, E. Saucedo-Castañeda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnol. Prog.* (En prensa).

**Soto-Cruz, N. O.,** Favela-Torres, E. Saucedo-Castañeda, G. (2002). Stoichiometric model of *Megasphaera elsdenii* metabolism during growth in lactate: validation by data consistency and metabolic flux analysis. *Microbiol.* (Enviado).

# Modeling of Growth, Lactate Consumption, and Volatile Fatty Acid Production by *Megasphaera elsdenii* Cultivated in Minimal and Complex Media

Oscar Soto-Cruz, Ernesto Favela-Torres, and Gerardo Saucedo-Castañeda\*

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, C.P. 09340, México D.F., México

Use of the Pirt and Luedeking–Piret equations permits the determination of the effect of medium composition on the metabolic patterns of *Megasphaera elsdenii* grown in minimal and complex media with lactate as the major carbon source. To establish the significance of the parameters involved in the Pirt and Luedeking–Piret equations, a quantitative statistical criterion was proposed. In the complex medium, lactate was completely used for growth and product formation, whereas in the minimal medium a fraction of the energy obtained from lactate was used for maintenance purposes. Modeling of VFA production by the Luedeking–Piret equation showed that, independent of the type of medium, acetate and propionate are growth-associated products, while butyrate and valerate are only partially growth-associated. The growth-associated products are related to energy-yielding metabolism and the non-growth-associated products are related to the consumption of reducing equivalents.

## Introduction

*Megasphaera elsdenii* is the main lactate-utilizing species in the rumen and has been considered one of the most important ruminal microorganisms (1–3). It is able to ferment up to 97% of the rumen lactate (1). Lactate removal is important in rumen ecology, because its accumulation causes dysfunction such as reduced salivation, redistribution of water in the body, and damage to the rumen and other tissues, among other disorders (4).

Many important physiological characteristics of *M. elsdenii* grown on lactate, which is fermented via the acrylate pathway (5), have been established previously. It is known that (i) the volatile fatty acids (VFA) acetate, propionate butyrate, and valerate are the main products of lactate metabolism (2); (ii) *M. elsdenii* utilizes lactate in preference to glucose in media with both carbon sources (2, 3); (iii) *M. elsdenii* is the only lactate-utilizing microorganism in the rumen that is not subject to catabolite repression by soluble sugars (6, 7); and (iv) lactate transport across the membrane appears to occur by active transport that is not dependent on Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> (8), among other characteristics. Although it has been reported that the production of VFA by *M. elsdenii* strongly depends on the strain employed and culture medium composition (7, 9, 10), the kinetic relationship between growth and product formation has not been reported.

On the other hand, the relationship between growth and substrate consumption and product synthesis can be established by simple visual inspection of growth and substrate consumption time plots or by kinetic analysis using the Pirt or Luedeking–Piret equations. By using the graphic method, Yamane et al. (11) found that poly-(3-hydroxyvalerate) production by *Paracoccus denitrifi-*

*cans* was growth-associated. However, this method does not allow a quantitative determination of the association level of product formation. In contrast, the Pirt and Luedeking–Piret equations have been used to quantitatively describe the relationship between growth and substrate consumption and product formation, respectively (12). This approach was recently used to analyze the anaerobic production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* (13) and the anaerobic production of leukotoxin by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (14). In both cases, a partially growth-associated production was established.

In this paper a model for the kinetics of growth, lactate consumption, and VFA production by this ruminal bacterium was applied. The model permitted us to establish the degree of association between growth, lactate consumption, and VFA production under different nutritional conditions.

## Theoretical Considerations

The Pirt and Luedeking–Piret equations have been used to establish the relationship between growth, substrate consumption, and product synthesis, respectively. In this sense, an approach similar to that used by Ooijkaas et al. (15) is proposed here. Using the logistic, Pirt and Luedeking–Piret equations, these authors developed mathematical expressions for growth, substrate consumption, and product synthesis as a function of the time. Nevertheless, in this work, following a different mathematical procedure of integration, simpler equations were developed. The following equations were used.

Frequently, bacterial growth has been adequately described by the logistic equation (16–18):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (1)$$

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: +52-58046554; Fax: +52-58044712. E-mail: saucedo@xanum.uam.mx.

the Pirt equation (19) for lactate (substrate) consumption:

$$-\frac{dL}{dt} = \frac{1}{Y_{XL}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (2)$$

and the Luedeking-Piret equation (20) for each VFA ( $P_i$ ) produced by *M. elsdenii*:

$$\frac{dP_i}{dt} = \alpha_i \frac{dX}{dt} + \beta_i X \quad (3)$$

where  $X$  is the biomass concentration,  $t$  is the time,  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate,  $X_{\max}$  is the maximum biomass concentration,  $L$  is the lactate concentration,  $Y_{XL}$  is the biomass/lactate yield,  $m$  is the maintenance coefficient,  $P_i$  is the concentration of the product  $i$ ,  $\alpha_i$  is the growth-associated coefficient for the product  $i$ , and  $\beta_i$  is the non-growth-associated coefficient for the product  $i$ .

Luedeking and Piret (20), studying lactate production from glucose by *Lactobacillus delbrueckii*, considered two components in total lactate production: one fraction of the lactate is produced in order to obtain the energy required to form new bacterial protoplasm, while the other fraction is produced to obtain the energy necessary for the normal metabolic activity irrespective of growth (i.e., maintenance). Therefore, in eqs 2 and 3, the first term of the right side is the rate of consumption/synthesis that is proportional to the growth rate, while the second term is the rate of consumption/synthesis related to the total biomass present (19–21).

The integration of eq 1 gives

$$X(t) = \frac{X_{\max}}{1 + \left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right)e^{-\mu_{\max}t}} \quad (4)$$

where  $X_0$  is the biomass concentration at  $t = 0$ . On the other hand, eq 2 can be written as follows:

$$-\frac{d(L - XY_{XL})}{dt} = mX \quad (5)$$

Dividing eq 5 by eq 1 gives

$$-\frac{d(L - XY_{XL})}{dX} = \frac{m}{\mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)} \quad (6)$$

The integration of eq 6 gives

$$L(X) = L_0 - \frac{1}{Y_{XL}}(X - X_0) - \frac{mX_{\max}}{\mu_{\max}} \text{Ln} \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right) \quad (7)$$

where  $L_0$  is the lactate concentration at  $t = 0$ . In a similar way, rewriting eq 3 by dividing by eq 1 and integrating results in

$$P_i(X) = P_{i,0} + \alpha_i(X - X_0) + \frac{\beta_i X_{\max}}{\mu_{\max}} \text{Ln} \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right) \quad (8)$$

where  $P_{i,0}$  is the concentration of the product  $i$  at  $t = 0$ .

## Material and Methods

**Strain and Culture Media.** *Megasphaera elsdenii* CECT (Spanish Type Culture Collection) 390 was preserved in glycerol (30% v/v) at  $-20^\circ\text{C}$ .

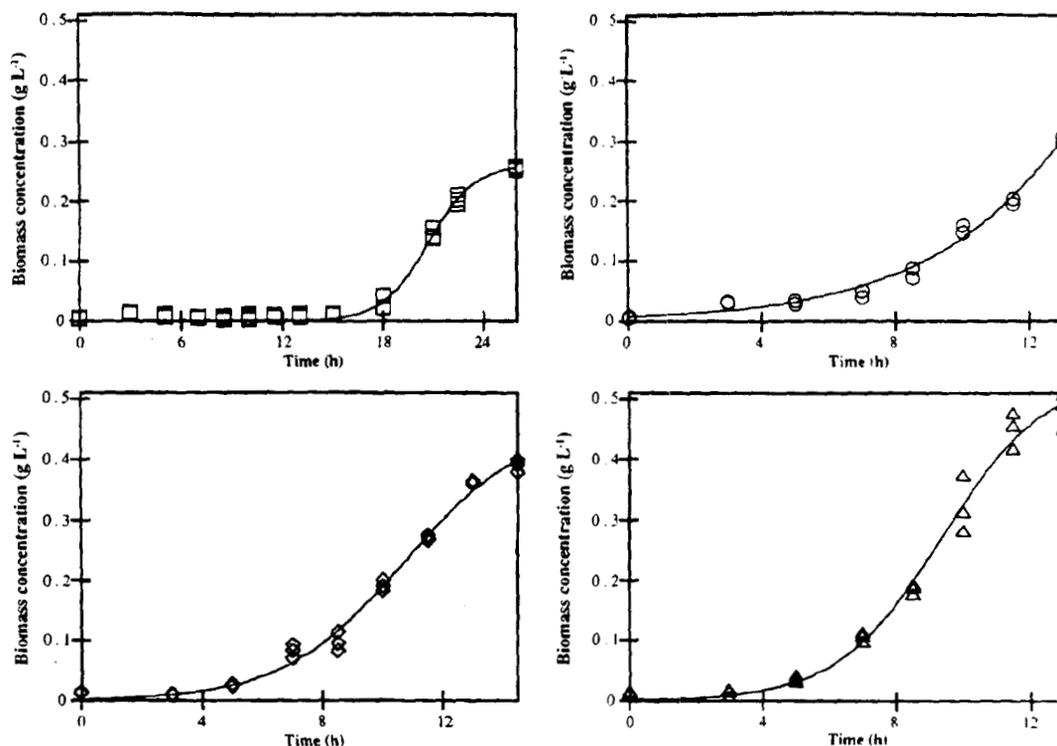
The minimal medium contained 5 g L<sup>-1</sup> L-lactate (from sodium L-lactate syrup 60% w/v), 0.5 g L<sup>-1</sup> cysteine hydrochloride, 1 mL L<sup>-1</sup> vitamin solution, and 40 mL L<sup>-1</sup> mineral solution 1. The vitamin solution contained 0.5 mg L<sup>-1</sup> biotin, 20 mg L<sup>-1</sup> pyridoxine, and 20 mg L<sup>-1</sup> calcium pantothenate. The mineral solution 1 contained 0.125 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.125 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 2 g L<sup>-1</sup> NaCl, 2.5 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.05 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 0.005 g L<sup>-1</sup> CoSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O. The medium pH was adjusted to 7.0 using 8 N KOH. The complex medium contained 5 g L<sup>-1</sup> L-lactate (from sodium L-lactate syrup 60% w/v), 0.6 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 0.5 g L<sup>-1</sup> cysteine hydrochloride, and 40 mL L<sup>-1</sup> mineral solution 2. The mineral solution 2 contained 0.2 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, and 2 g L<sup>-1</sup> NaCl. The medium pH was adjusted to 7.0 using 8 N KOH.

The yeast additive (Yea Sacc,<sup>1026</sup> AllTech) was prepared as reported previously (22), with the following modifications: 4 g of yeast additive plus 50 mL of deionized water were stirred for 1 h at room temperature. The suspension was filtered through Whatman no. 41 paper and sterilized by filtration through a 0.45 μm Millipore membrane. The sterile liquid was aseptically bubbled with O<sub>2</sub>-free CO<sub>2</sub> for 10 min. The resulting solution was added to both media at a final concentration of 2% v/v.

**Growth Conditions and Analytical Methods.** Bacteria were grown under anaerobic conditions at 38 °C in 250-mL flasks sealed with butyl rubber stoppers. All cultures were performed in triplicate. Flasks containing 135 mL of medium were inoculated with 15 mL of an exponentially growing culture with an optical density of 0.6 (660 nm). Samples of 5 mL were extracted from the flasks using a sterile syringe and immediately centrifuged at 5 000 ×  $g$  for 20 min at room temperature.

Cells were washed with distilled water and resuspended in the same volume to measure optical density at 660 nm (23), which was converted to cell concentration by using a standard curve. There were no differences in optical density when cells were washed with isoosmotic solution. The cell-free supernatant was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analyzed. An enzymatic analyzer (YSI 2700 SELECT, Yellow Springs Instruments) was employed to measure lactate concentration. This analyzer employs a membrane with immobilized L-lactate oxidase, which catalyzes the reaction between L-lactate and oxygen to produce hydrogen peroxide and pyruvate. Subsequently, the hydrogen peroxide concentration is electrochemically measured and the L-lactate concentration is calculated from the stoichiometry of the reaction. The volatile fatty acids (VFA) acetate, propionate, butyrate, and valerate were analyzed by gas chromatography (Perkin-Elmer AutoSystem XL) using a Perkin-Elmer-FFAP capillary column. Helium at 40 cm s<sup>-1</sup> was used as the carrier gas. The column temperature was programmed as follows: 100 °C for 3.5 min, 100–170 at 10 °C min<sup>-1</sup>, and 170 °C for 1 min. A split injection with a 1:50 ratio was employed. The temperatures of the injector and detector (FID) were 250 and 300 °C, respectively.

The mass balance for carbon was calculated considering lactate consumption, products formed, and the carbon contents of the biomass reported previously (24). The total organic carbon in the yeast additive (11.8 g L<sup>-1</sup>) and yeast extract (15.8 g L<sup>-1</sup>) was measured using a total organic carbon analyzer TOC-5000P (Shimadzu) as described previously (25). In the calculation of the carbon balance, it was assumed that the carbon content from



**Figure 1.** Growth kinetics of *Megasphaera elsdenii* in the minimal medium without (□) and with (○) yeast additive and in the complex medium without (◇) and with (Δ) yeast additive.

the yeast extract and/or yeast additive was totally consumed. On the other hand, carbon dioxide was not measured, although the amount of carbon dioxide produced was estimated from the biochemical pathways (5, 26) and the amounts of acetate, butyrate, and valerate as discussed below.

**Parameter Fitting.** The kinetic data were used to fit all parameters using *StatGraphics plus 2.1 for Windows*, which utilizes Marquardt's algorithm (27) and calculates the 95% confidence interval of each fitted parameter. Equation 4 was used to estimate the parameters  $X_0$ ,  $X_{max}$ , and  $\mu_{max}$ . Equation 7 permits a data fit of growth and lactate consumption to estimate the parameters  $L_0$ ,  $Y_{NL}$ , and  $m$ , while eq 8 was used to estimate the parameters  $P_{i0}$ , the growth-associated ( $\alpha_i$ ) and non-growth-associated ( $\beta_i$ ) coefficients for each product formed by *M. elsdenii*. The values of  $X_0$ ,  $X_{max}$ , and  $\mu_{max}$  estimated from eq 4 were used in eqs 7 and 8.

## Results and Discussion

The experimental results of growth, lactate consumption, and VFA production by *M. elsdenii* are presented in Figures 1–6. The data are expressed in g L<sup>-1</sup> for biomass and mM for VFA. The figures present the data up until the fermentation time when the maximum concentration of biomass was obtained. After this time the data were not considered because of the occurrence of death of the culture. Model predictions are represented by solid lines in these figures.

**Effect of the Medium Composition.** Forsberg (28) demonstrated that *M. elsdenii* is able to grow in a chemically defined medium containing minerals, lactate as the sole carbon and energy source,  $NH_4^+$  as the sole nitrogen source, sulfate as the source of sulfur, and the vitamins biotin, pyridoxine, and calcium pantothenate. In our complex medium vitamins, some minerals (Mn, Fe, Zn, and Co) and nitrogen source were substituted by

yeast extract, because it is recognized as a sufficient source of these nutrients (29, 30). Since interest in the effects of microbial feed additives on animal performance has increased recently (10), it was decided to include a yeast feed additive as another nutritional condition. It was evident that the medium composition had an important influence on the results presented here. In Figure 1, it is observed that the yeast additive included in the minimal medium reduced considerably the duration of the lag phase and increased the maximum biomass concentration (15%,  $P < 0.01$ ).

The growth kinetics with yeast additive with the minimal medium was similar to that with the complex medium without additive, indicating that the yeast additive could contain some nutrients similar to those present in yeast extract. This has also been suggested for the fungal additive Amaferm (7). Figure 1 also shows that, when yeast additive was added to the complex medium, there were no changes in the duration of the lag phase, but the maximum biomass concentration was increased by 23% ( $P < 0.01$ ). Callaway and Martin (10) did not observe the growth of *M. elsdenii* in medium without complex components; however, their minimal medium did not contain the vitamins for which *M. elsdenii* is auxotrophic. The profiles of lactate consumption (Figure 2) followed the same pattern of bacterial growth. The reduction of the duration of the lag phase was also observed in the lactate consumption kinetics, and the effect of medium composition on the biomass/lactate yield is discussed below.

The kinetics of volatile fatty acid production by *M. elsdenii* are presented in Figures 3–6. It should be pointed out that there were no significant peaks corresponding to branched-chain VFA or caproate in the chromatograms. Although final acetate concentration was almost independent of the medium composition (Figure 3), final propionate concentration was diminished when

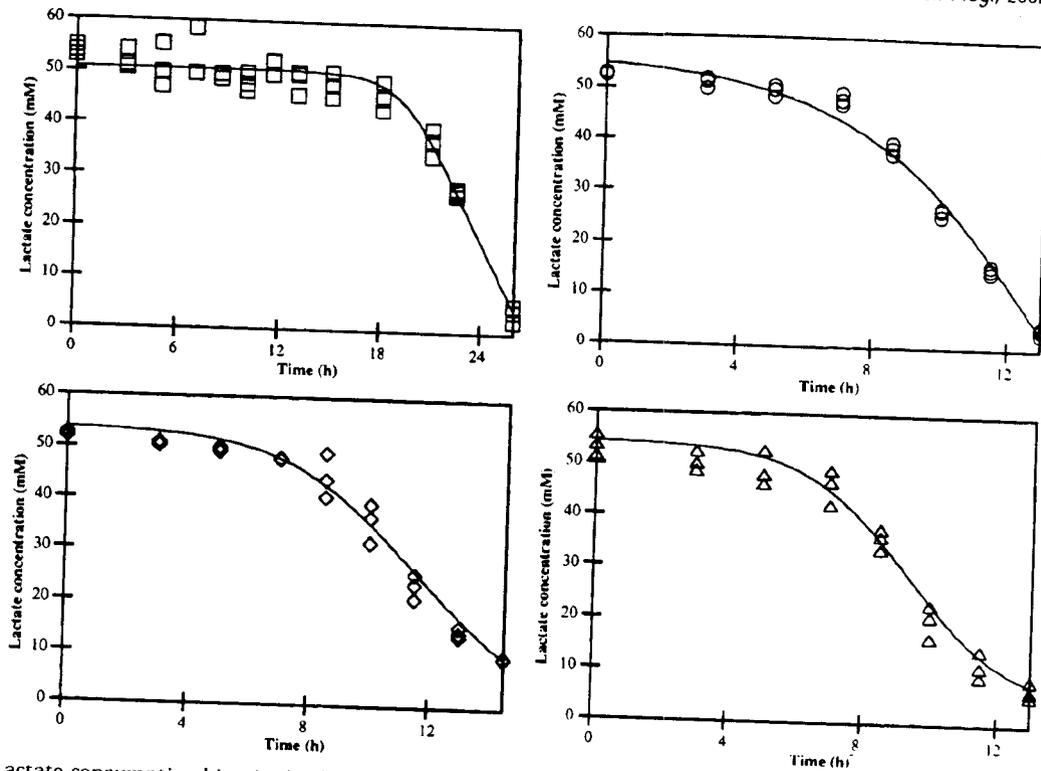


Figure 2. Lactate consumption kinetics by *Megasphaera elsdenii* in the minimal medium without (□) and with (○) yeast additive and in the complex medium without (◇) and with (△) yeast additive.

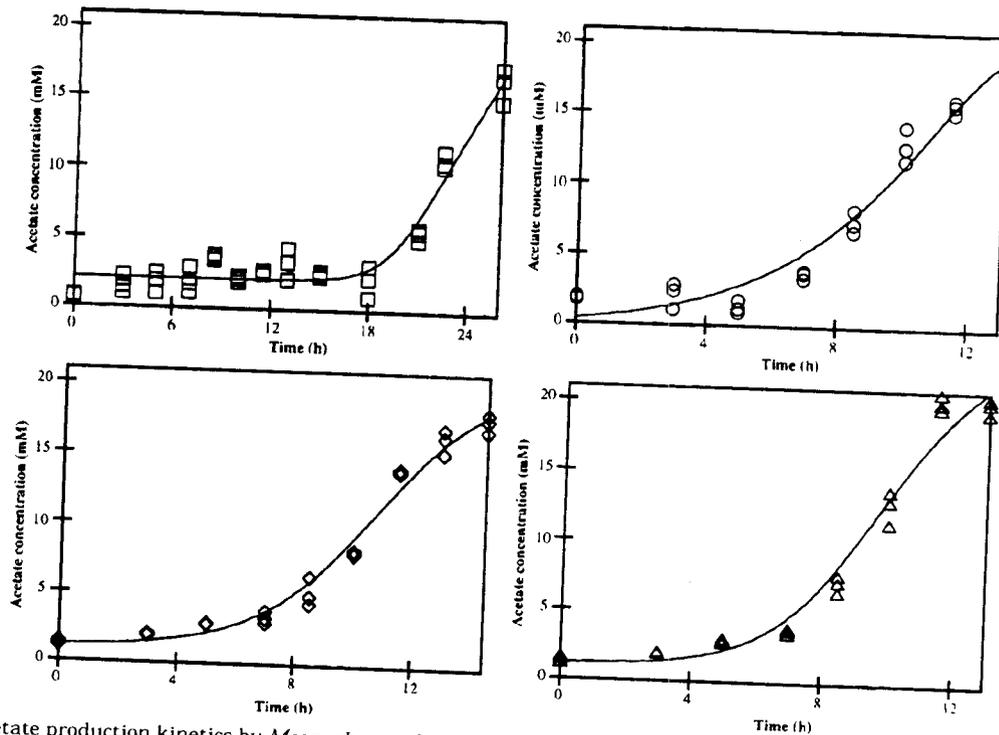


Figure 3. Acetate production kinetics by *Megasphaera elsdenii* in the minimal medium without (□) and with (○) yeast additive and in the complex medium without (◇) and with (△) yeast additive.

the medium complexity was increased (Figure 4). In contrast, final concentrations of butyrate and valerate were enhanced by the medium complexity (Figures 5 and 6).

Table 1 shows the results of the carbon distribution in the fermentation products, when the highest biomass concentration was reached. For the estimation of carbon

dioxide production, two facts were considered: (i) *M. elsdenii* produces one molecule of carbon dioxide for each molecule of acetyl-CoA formed in the acrylate pathway (5), and (ii) in order to produce acetate, butyrate, and valerate, one, two, and one molecules of acetyl-CoA are needed, respectively (5, 26). In this way, carbon dioxide production was calculated by adding the produced

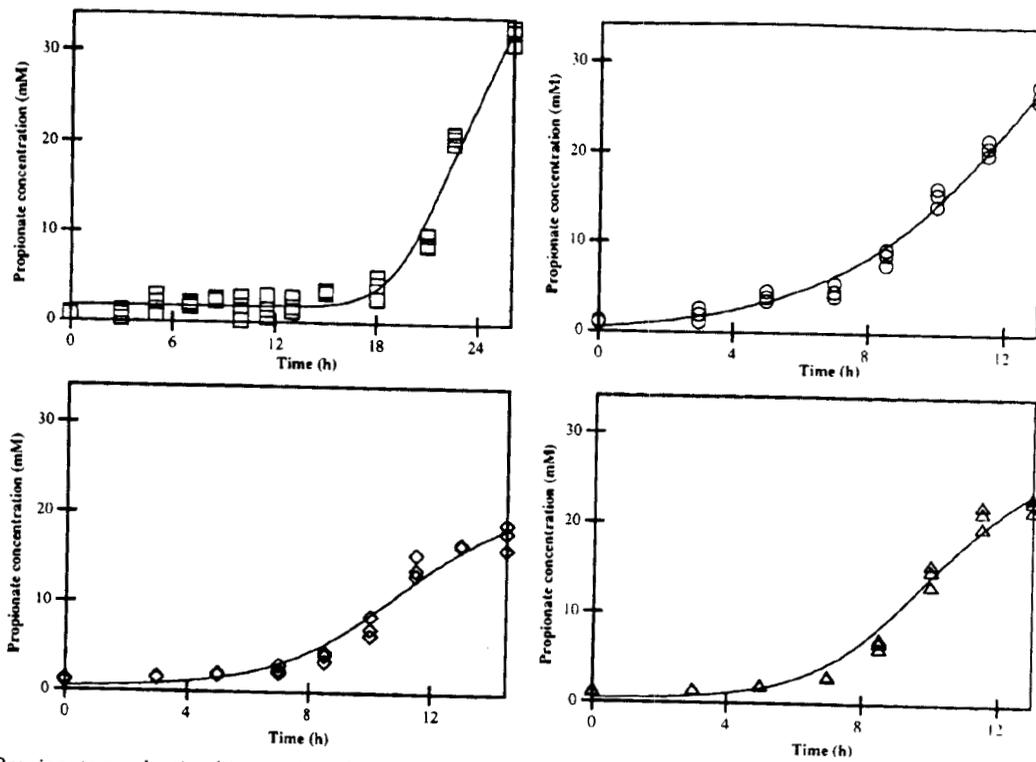


Figure 4. Propionate production kinetics by *Megasphaera elsdenii* in the minimal medium without (□) and with (○) yeast additive and in the complex medium without (◇) and with (△) yeast additive.

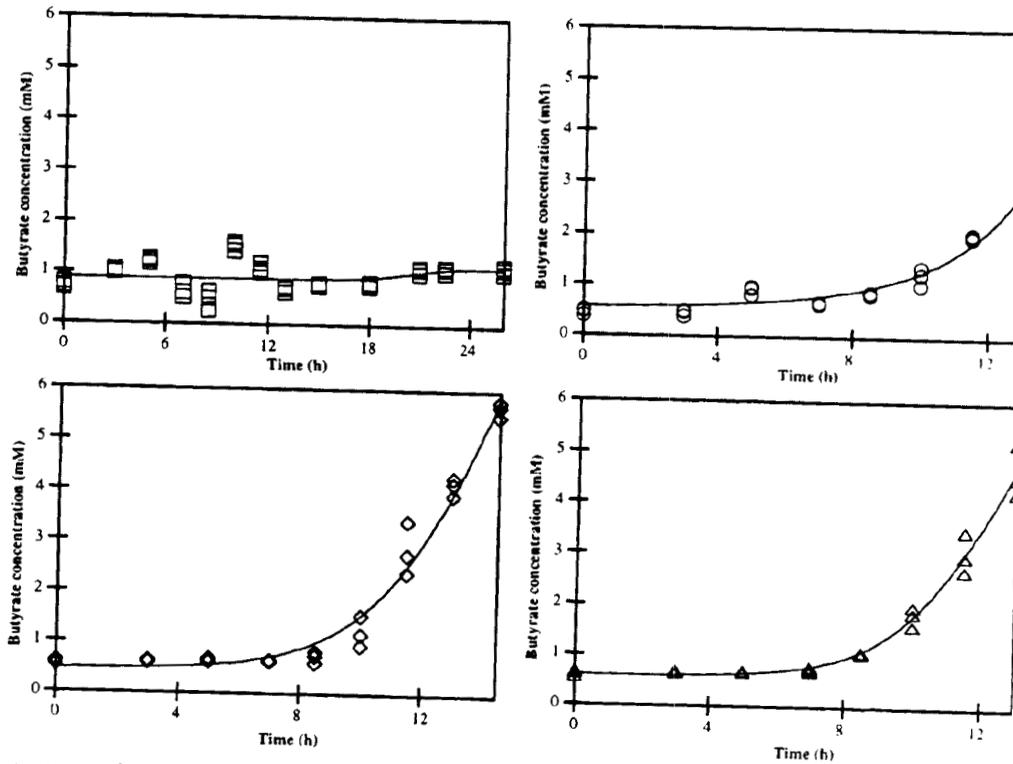


Figure 5. Butyrate production kinetics by *Megasphaera elsdenii* in the minimal medium without (□) and with (○) yeast additive and in the complex medium without (◇) and with (△) yeast additive.

amounts (on a molar basis) of acetate, butyrate (multiplied by two), and valerate. The addition of yeast additive to the minimal medium decreased the carbon found in the biomass (15%,  $P < 0.05$ ); however, in complex media the carbon found in the biomass did not change ( $P < 0.1$ ).

Carbon content as acetate was decreased by the presence of the yeast additive only in minimal medium (40%,  $P < 0.01$ ). Carbon expressed as propionate decreased (35%,  $P < 0.01$ ) with the presence of yeast additive in the minimal medium, while it did not change in the complex

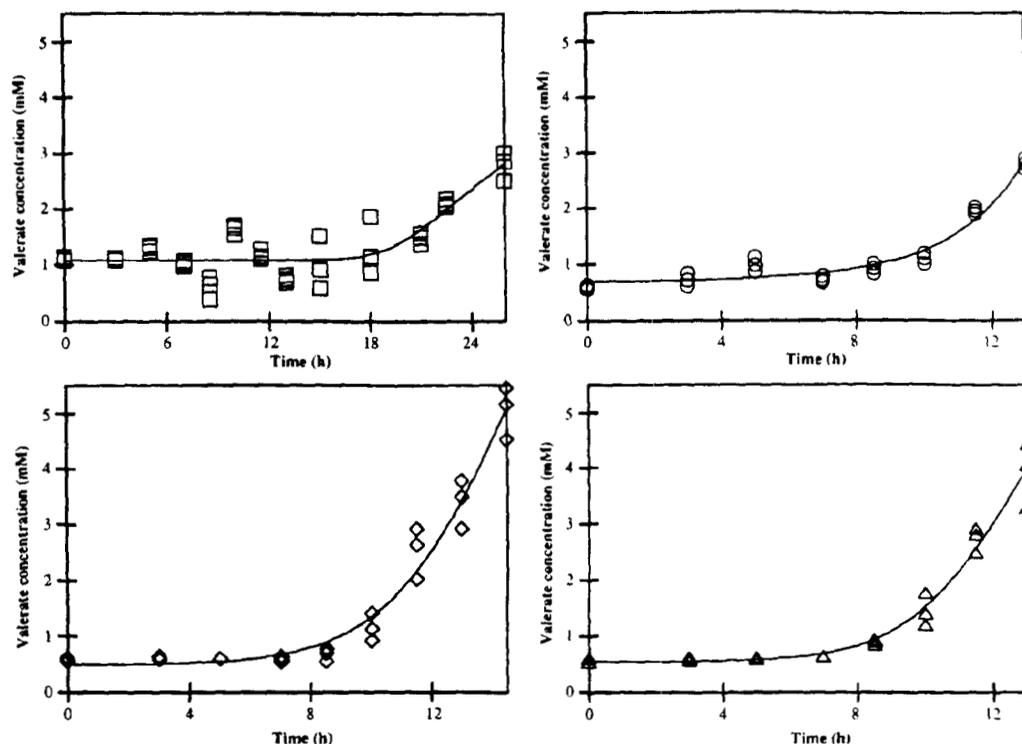


Figure 6. Valerate production kinetics by *Megasphaera elsdenii* in the minimal medium without ( $\square$ ) and with ( $\circ$ ) yeast additive and in the complex medium without ( $\diamond$ ) and with ( $\triangle$ ) yeast additive.

Table 1. Effect of the Medium Composition on VFA Carbon Distribution in *Megasphaera elsdenii* Grown on Lactate as Carbon Source

	minimal medium <sup>a</sup>		complex medium <sup>a</sup>	
	control	yeast additive	control	yeast additive
biomass (%)	6.7 ± 0.3	5.7 ± 0.2	7.9 ± 0.6	7.6 ± 0.4
acetate (%)	21.0 ± 1.6	12.7 ± 0.7	15.1 ± 0.9	15.4 ± 0.7
propionate (%)	63.4 ± 1.8	41.2 ± 2.6	22.8 ± 2.9	26.3 ± 1.5
butyrate (%)	1.1 ± 0.1	8.6 ± 0.2	13.3 ± 0.3	9.9 ± 1.2
valerate (%)	5.6 ± 0.5	16.7 ± 0.3	16.5 ± 1.4	15.3 ± 1.6
CO <sub>2</sub> <sup>b</sup> (%)	12.1 ± 0.4	14.0 ± 0.2	17.5 ± 0.6	20.4 ± 0.5
C recovery (%)	109.8 ± 0.7	99.0 ± 1.1	93.1 ± 0.9	94.9 ± 1.6

<sup>a</sup> Each value is the average ( $\pm$  standard deviation) of three cultures at the fermentation time when the maximum concentration of biomass was obtained. <sup>b</sup> Estimated from the biochemistry and the produced amounts of acetate, butyrate, and valerate (see the text for detailed explanation).

medium ( $P < 0.1$ ). With the minimal medium, the carbon content in butyrate and valerate increased 681% and 198%, respectively ( $P < 0.01$ ). With complex medium only the carbon expressed as butyrate decreased (26%,  $P < 0.01$ ) when yeast additive was added. Table 1 shows that carbon recovery was close to 100% (with an error less than 10%) in all media. This suggested that products other than acetate, propionate, butyrate, valerate, and CO<sub>2</sub> were not produced in significant amounts. Since CO<sub>2</sub> production was estimated instead of measured, it could be the reason carbon recovery was not 100%.

**Biological Implications of Model Parameters.** The solid lines in Figures 1–6 are the fitted curves, and Table 2 shows the relevant fitted parameters ( $\pm 95\%$  confidence interval) for growth ( $\mu_{\max}$ ), lactate consumption ( $Y_{NL}$  and  $m$ ), and VFA production ( $\alpha_i$  and  $\beta_i$ ). Confidence intervals containing the value zero correspond to parameters that may be removed from the model without harming the fit (31). For example, in the case of the coefficient  $m$  with

Table 2. Parameters of the Logistic, Pirt, and Luedeking–Piret Equations for *Megasphaera elsdenii* Grown in Minimal and Complex Media<sup>a</sup>

	minimal medium <sup>b</sup>		complex medium <sup>b</sup>	
	control	yeast additive	control	yeast additive
Biomass				
$\mu_{\max}$	0.20( $\pm 0.02$ )	0.38( $\pm 0.03$ )	0.35( $\pm 0.03$ )	0.41( $\pm 0.03$ )
$R^2$	0.996	0.987	0.992	0.976
Lactate				
$Y_{NL} \times 10^3$	4.6( $\pm 0.9$ )	5.5( $\pm 0.4$ )	9.8( $\pm 0.9$ )	10.1( $\pm 1.1$ )
$m$	2.9( $\pm 2.5$ )	-0.6( $\pm 0.9$ ) <sup>c</sup>	0.6( $\pm 1.4$ ) <sup>c</sup>	-0.1( $\pm 0.6$ ) <sup>c</sup>
$R^2$	0.861	0.983	0.961	0.976
Acetate				
$\alpha_i$	32.3( $\pm 11.6$ )	69.3( $\pm 7.3$ )	42( $\pm 3$ )	35( $\pm 3.7$ )
$\beta_i$	2.5( $\pm 3.1$ ) <sup>c</sup>	-1.44( $\pm 2.39$ ) <sup>c</sup>	0.1( $\pm 1$ ) <sup>c</sup>	0.8( $\pm 1.4$ ) <sup>c</sup>
$R^2$	0.895	0.954	0.981	0.977
Propionate				
$\alpha_i$	51.1( $\pm 11.4$ )	93.6( $\pm 5.8$ )	40.5( $\pm 4.2$ )	35.3( $\pm 4.1$ )
$\beta_i$	1.4( $\pm 5.1$ ) <sup>c</sup>	-1.1( $\pm 1.4$ ) <sup>c</sup>	0.2( $\pm 1.5$ ) <sup>c</sup>	1.5( $\pm 2.1$ ) <sup>c</sup>
$R^2$	0.977	0.984	0.963	0.978
Butyrate				
$\alpha_i$	3.2( $\pm 5.6$ ) <sup>c</sup>	5.6( $\pm 1.1$ )	5.3( $\pm 1.5$ )	1.8( $\pm 0.6$ )
$\beta_i$	-0.3( $\pm 1.3$ ) <sup>c</sup>	0.2( $\pm 0.1$ )	0.8( $\pm 0.2$ )	0.9( $\pm 0.1$ )
$R^2$	0.313	0.932	0.945	0.993
Valerate				
$\alpha_i$	1.8( $\pm 4.3$ ) <sup>c</sup>	4.4( $\pm 1$ )	3.8( $\pm 1.1$ )	0.8( $\pm 0.4$ )
$\beta_i$	0.9( $\pm 1.9$ ) <sup>c</sup>	0.3( $\pm 0.1$ )	0.8( $\pm 0.1$ )	1( $\pm 0.2$ )
$R^2$	0.273	0.923	0.952	0.991

<sup>a</sup> See Notation for the units of the parameters. <sup>b</sup> Numbers in parentheses are the 95% confidence interval of the corresponded parameter. <sup>c</sup> Parameters neglected after statistical analysis.

the minimal medium containing yeast additive ( $-0.6 \pm 0.9$ ), the corresponded confidence interval is  $-1.5$  to  $0.3$ , which contains the value zero, and  $m$  may be removed from the model in this case. This was used as a quantitative criterion to maintain (or neglect) fitted parameters in the models.

Table 2 shows that  $\mu_{\max}$  increased from 0.20 to 0.38  $\text{h}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ) with the presence of the yeast additive in minimal medium. The estimated values of  $\mu_{\max}$  in minimal medium with additive and complex medium without additive were statistically equal ( $P < 0.1$ ), supporting the fact that the yeast additive could contain some nutrients similar to those present in yeast extract. In the complex medium  $\mu_{\max}$  was also enhanced by the presence of the yeast additive.

In regard to the lactate consumption, Table 2 shows that  $Y_{NL}$  was not changed by the presence of the yeast additive in either medium. Nevertheless, the estimated values of  $Y_{NL}$  were greater in complex medium than in minimal medium. On the other hand, according to the confidence intervals, the parameter  $m$  was statistically negligible in all cases except with the minimal medium without additive. This indicates that in complex medium, *M. elsdenii* utilizes lactate mainly for growth and for product formation, while in the minimal medium, a statistically significant part of the energy obtained from lactate consumption must be used for maintenance.

On the basis of the above-mentioned statistical criterion, the non-growth-associated term ( $\beta$ ) for acetate and propionate was negligible in all cases, while both parameters must be considered for butyrate and valerate production. According to reports described previously (19–21), *M. elsdenii* produces acetate and propionate as growth-associated products, whereas butyrate and valerate are formed as partially growth-linked products. This fact was independent of the medium composition or the presence of yeast additive. In the case of butyrate and valerate production in minimal medium without yeast additive, the large data dispersion resulted in a poor fit (very low  $R^2$ ) and confidence intervals indicate that both parameters may be neglected. Therefore, the model cannot be applied in these cases.

Since products related to energy metabolism are formed as growth-associated products (19, 21), production of acetate and propionate in *M. elsdenii* may be explained by the relationship of these products to energy metabolism in the acrylate pathway. The energy produced via the acrylate pathway would then be utilized only to form new bacterial protoplasm. This supports the fact that in complex medium *M. elsdenii* utilizes lactate mainly for growth and product formation, while to obtain energy for maintenance other compounds, such as amino acids, may be consumed as proposed previously (32). On the other hand, with the minimal medium, a part of the energy obtained from acrylate pathway must be used for maintenance, because there are no other energy sources.

In anaerobic fermentation with branched pathways, some compounds are produced in order to adjust the thermodynamic efficiency of the metabolism, mainly consuming reducing equivalents (5, 33). In this sense, carbon fluxes in different branches are adjusted such that the ATP gain and thermodynamic efficiency are optimal for the respective growth conditions (33). Two molecules of acetyl-CoA are condensed to produce butyrate, while valerate is formed by combining an acetyl-CoA and a propionyl-CoA (26). The sequence of reactions involve the consumption of reducing equivalents; however, the acrylate pathway is balanced in reducing equivalents (5). For that reason, butyrate and valerate production may not be related to this pathway. Therefore, it may be speculated that the necessary reducing equivalents should be produced via another pathway of *M. elsdenii* metabolism. The production of butyrate and valerate increases when growth is greater, which suggests that a pathway related to the production of monomers for anabolism, such as the

pentose phosphate pathway, could also produce an excess of reducing equivalents.

## Conclusion

Estimation of kinetic parameters was used to establish two important facts about *M. elsdenii* physiology and metabolism. First, in complex medium *M. elsdenii* utilizes lactate only for growth and product formation, while in minimal medium a part of the consumed lactate appears to be used for maintenance. Second, acetate and propionate are growth-associated products, whereas butyrate and valerate are partially growth-associated products, which is independent of the medium composition. In this sense, mathematical modeling allowed us to extend our knowledge of *M. elsdenii* physiology and metabolism. Finally, it is important to point out that, to our knowledge, there is no quantitative criterion in the literature that allows the decision of whether to eliminate or to conserve a parameter in the Pirt and Luedeking–Pirt models, as does the statistical criterion proposed here.

## Acknowledgment

Financial support for this research was provided by the European Community and the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Project number I.C.18\*-CT970185. The authors wish to thank the Spanish Type Culture Collection for strain donation.

## Notation

$t$	time (h)
$X$	biomass concentration ( $\text{g L}^{-1}$ )
$X_0$	biomass concentration at $t = 0$ ( $\text{g L}^{-1}$ )
$X_{\max}$	maximum biomass concentration ( $\text{g L}^{-1}$ )
$L$	lactate concentration (mM)
$L_0$	lactate concentration at $t = 0$ (mM)
$P_i$	concentration of the product $i$ [acetate, propionate, butyrate, or valerate] (mM)
$P_{i,0}$	concentration of the product $i$ at $t = 0$ (mM)
$Y_{NL}$	biomass/lactate yield ( $\text{g biomass [mmol lactate]}^{-1}$ )
$m$	maintenance coefficient ( $\text{mmol lactate [g biomass]}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

## Greek symbols

$\mu_{\max}$	maximum specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )
$\alpha_i$	growth-associated coefficient for product $i$ ( $\text{mmol } i \text{ [g biomass]}^{-1}$ )
$\beta_i$	non-growth-associated coefficient for product $i$ ( $\text{mmol } i \text{ [g biomass]}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

## References and Notes

- (1) Counotte, G. H.; Prins, R. A.; Janssen, R. H. A. M.; deBie, M. J. A. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-(2- $^{13}\text{C}$ ) lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, *42*, 649–655.
- (2) Marounek, M.; Fliegrova, K.; Bartos, S. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 1570–1573.
- (3) Hino, T.; Shinada, K.; Maruyama, T. Substrate preference in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 1827–1831.
- (4) Slyter, L. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* **1976**, *43*, 910–929.
- (5) Gotschalk, G. *Bacterial Metabolism*, 2nd ed.; Springer-Verlag: New York, 1986.

- (6) Russell, J. B.; Baldwin, R. L. Substrate preferences in rumen bacteria: Evidence of catabolite regulatory mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *36*, 319–329.
- (7) Waldrip, H. M.; Martin, S. A. Effects of an *Aspergillus oryzae* fermentation extract and other factors on lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* **1993**, *71*, 2770–2776.
- (8) Martin, S. A. Nutrient transport in ruminal bacteria: A review. *J. Anim. Sci.* **1994**, *72*, 3019–3031.
- (9) Rossi, F.; Cocconcelli, P. S.; Masoero, F. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Ann. Zootech.* **1995**, *44*, 403–409.
- (10) Callaway, E. S.; Martin, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on the ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* **1997**, *80*, 2035–2044.
- (11) Yamane, T.; Chen, X.; Ueda, S. Growth-associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from *n*-pentanol by a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 380–384.
- (12) Nielsen, J.; Villadsen, J. *Bioreaction Engineering Principles*, 1st ed.; Plenum Press: New York, 1994.
- (13) Passos, F. V.; Fleming, H. P.; Ollis, D. F.; Felder, R. M.; McFeeters, R. F. Kinetics and modeling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2627–2636.
- (14) Ohta, H.; Miyagi, A.; Kato, K.; Fukui, K. The relationships between leukotoxin production, growth rate and the bicarbonate concentration in a toxin-production-variable strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology* **1996**, *42*, 963–970.
- (15) Ooijkaas, L. P.; Buitelaar, R. M.; Tramper, J.; Rinzema, A. Growth and sporulation stoichiometry and kinetics of *Coniothyrium mintans* on agar media. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 292–300.
- (16) Howell, J. A. Mathematical models in microbiology: mathematical tool-kit. In *Mathematics in Microbiology*; Bazin, M., Ed.; Academic Press: London, 1983; pp 37–76.
- (17) Broughall, J. M.; Anslow, P. A.; Kilsby, D. C. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. *J. Appl. Bacteriol.* **1983**, *55*, 101–110.
- (18) Mercier, P.; Yerushalmi, L.; Rouleau, D.; Dochain, D. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1992**, *55*, 111–121.
- (19) Pirt, S. J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, 1st ed.; Blackwell Scientific Publications: London, 1975.
- (20) Luedeking, R.; Piret, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1959**, *1*, 393–412.
- (21) Wang, D. I. C.; Cooney, C. L.; Demain, A. L.; Dunnill, P.; Humphrey, A. E.; Lilly, M. D. *Fermentation and Enzyme Technology*, 1st ed.; John Wiley & Sons: New York, 1979.
- (22) Nisbet, D. J.; Martin, S. A. Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *56*, 3515–3518.
- (23) Goodhue, C. T.; Rosazza, J. P.; Peruzzotti, G. P. Methods for transformation of organic compounds. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*; Demain, A. L., Solomon, N. A., Eds.; American Society for Microbiology: Washington, DC, 1986; pp 97–121.
- (24) Papoutsakis, E. T. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 174–187.
- (25) Azeredo, J.; Oliveira, R.; Lazarova, V. A new method for extraction of exopolymers from activated sludges. *Water Sci. Technol.* **1998**, *37*, 367–370.
- (26) Russell, J. B.; Wallace, J. Energy yielding and consuming reactions. In *The Rumen Microbial Ecosystem*; Hobson, P. N., Ed.; Elsevier Applied Science: London, 1988; pp 185–215.
- (27) Marquardt, D. W. An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **1963**, *2*, 431–441.
- (28) Forsberg, C. W. Nutritional characteristics of *Megasphaera elsdenii*. *Can. J. Microbiol.* **1978**, *24*, 981–985.
- (29) Benthin, S.; Villadsen, J. Amino acid utilization by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 during growth on yeast extract or casein peptone. *J. Appl. Bacteriol.* **1996**, *80*, 65–72.
- (30) Conway, J.; Gaudreau, H.; Champagne, C. P. The effect of the addition of proteases and glucanases during yeast autolysis on the production and properties of yeast extract. *Can. J. Microbiol.* **2001**, *47*, 18–24.
- (31) Dowdy, S.; Wearden, S. *Statistics for Research*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, 1985.
- (32) Wallace, R. J. Catabolism of amino acids by *Megasphaera elsdenii* LC1. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 1141–1143.
- (33) Thauer, R. K.; Jungerman, K.; Decker, K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **1977**, *41*, 100–180.

Accepted for publication December 12, 2001.

BP010189Y