

Materia de
Articulación CEBI-E4b

Dra. M. Carolina Di Santo

*Lab. Interdisciplinario de Dinámica
Celular y Nano-Herramientas,
Departamento de Química Biológica,
FCEN-UBA, IQIBICEN-CONICET*

Carrera de
Especialización en
Biotecnología Industrial
(CEBI)
FCEyN -INTI

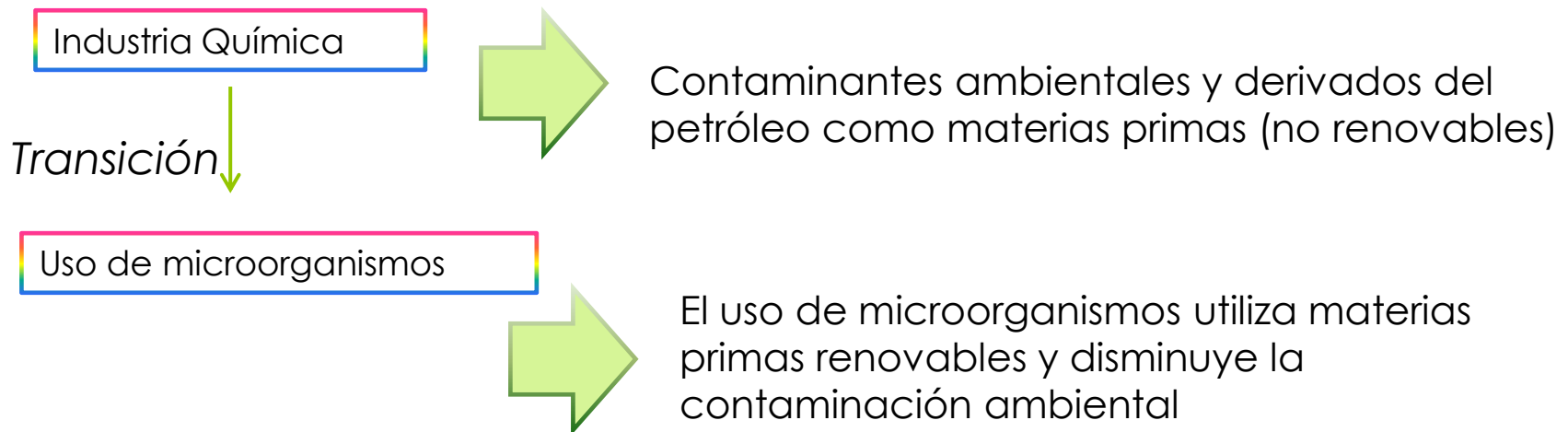
Ingeniería
Metabólica

CLASE 1.a

¿Que estudia la Ingeniería metabólica?

La **Ingeniería metabólica** es un campo relativamente nuevo (años 90's) que se refiere a la *modificación y optimización de rutas metabólicas*, principalmente en microorganismos, ya sea alterando genes implicados en la absorción de los nutrientes o en los flujos metabólicos para permitir la producción de un metabolito de interés industrial.

La Ingeniería metabólica se está convirtiendo en uno de los principales campos de la biotecnología. Su desarrollo fue posible gracias al conocimiento de las **técnicas de ADN recombinante** y la **secuenciación a gran escala de los genomas**.



Los **alcoholes** inferiores de **mayor importancia industrial** son metanol, etanol, isopropanol y los butanoles.

La fuente fundamental de estos alcoholes son los alquenos procedentes del craqueo de las naftas.

La producción mundial de etanol

a) Mediante síntesis química:

Por hidratación indirecta a partir de etileno (adicionando ácido sulfúrico y posterior hidrólisis del éster sulfúrico obtenido)

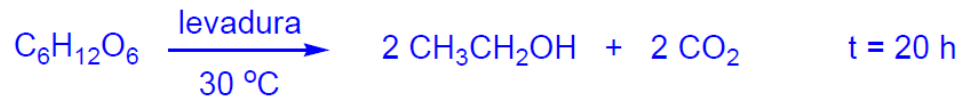
➡ muy contaminante

Se utiliza una mezcla de alquenos (etileno, propeno y 2-metilpropeno) procedente del craqueo de las naftas.

b) Por fermentación de productos agrícolas

Las materias primas son mosto de uva, melazas residuales de la fabricación de sacarosa, almidón hidrolizado de papa, de maíz, o de otros cereales, líquidos residuales de industrias de alimentos o caldos procedentes de la hidrólisis de materiales celulósicos (paja, tallos, residuos forestales...).

Brasil es un importante productor de etanol por fermentación a partir de caña de azúcar.



**Materias
Primas**



**Productos
Con
valor agregado**

El etanol puede servir como **combustible** y como material de partida en la producción de productos químicos como ácido acético, acetaldehído, butanol, etileno.

etileno → etanol

biomasa → etanol

Uso de Bioetanol

Vehículos convencionales 5-10%
Vehículos modificados 25%

Producción mundial de bioetanol/año

Brasil	12.5×10^9 l
USA	7.5×10^9 l
EU	0.45×10^9 l
España	0.23×10^9 l



Fuente: G. Castro

Brasil, (Programa Nacional de Alcohol, ProAlcool):

Dependencia del petróleo: 85% (1975) 10% (2002)

El final de un largo proceso 1975-2004

9 millones de vehículos llevan gasolina+20-22%etanol

5 millones vehículos usan etanol puro

Todos los vehículos nuevos llevan motores mixtos



USA, (Programas subvencionados, producción de etanol a partir de maíz)

Objetivo: es fomentar la adición de 10% de etanol a la gasolina para formar el GASOHOL

El GASOHOL es el 3% de la gasolina vendida en 2006 se pretende que esta cifra aumente hasta el 6% para el 2012.

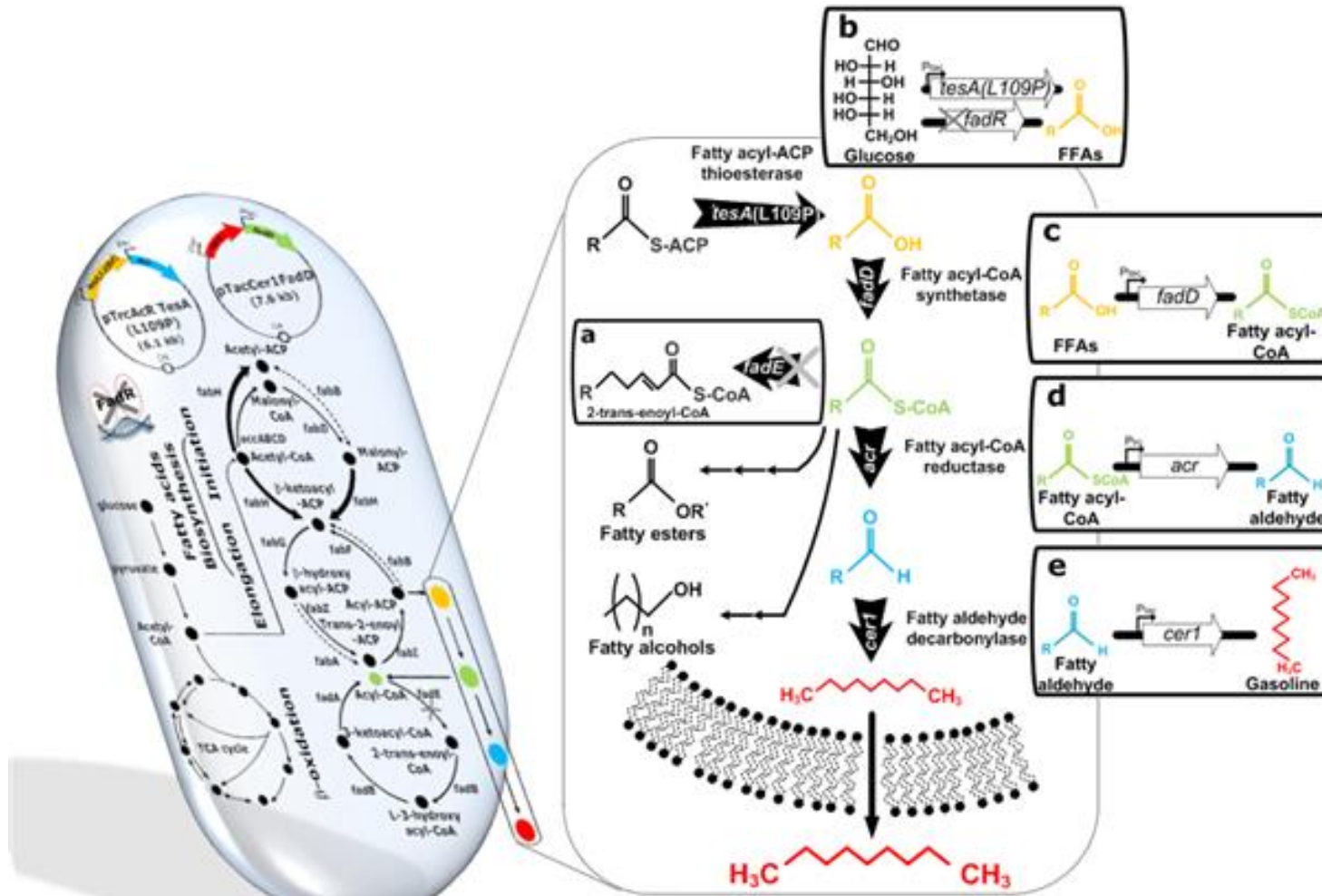
Hay 96 plantas de etanol y 33 en construcción

En Argentina....

- ✓ Cuenta actualmente con 14 plantas elaboradoras de etanol (5 a base de maíz y 9 a base de caña de azúcar)-Año 2016-
- ✓ Las plantas se localizan en zonas productivas donde la oferta de granos es mayor a la demanda y pueden aprovechar el subproducto (burlanda) para la alimentación animal *in situ*
- ✓ La provincia de Córdoba lidera el ranking de producción con el 39% del volumen total. Los suelos de la provincia son maiceros por excelencia factor por el cual residen 4 plantas de etanol a base de maíz.

2012

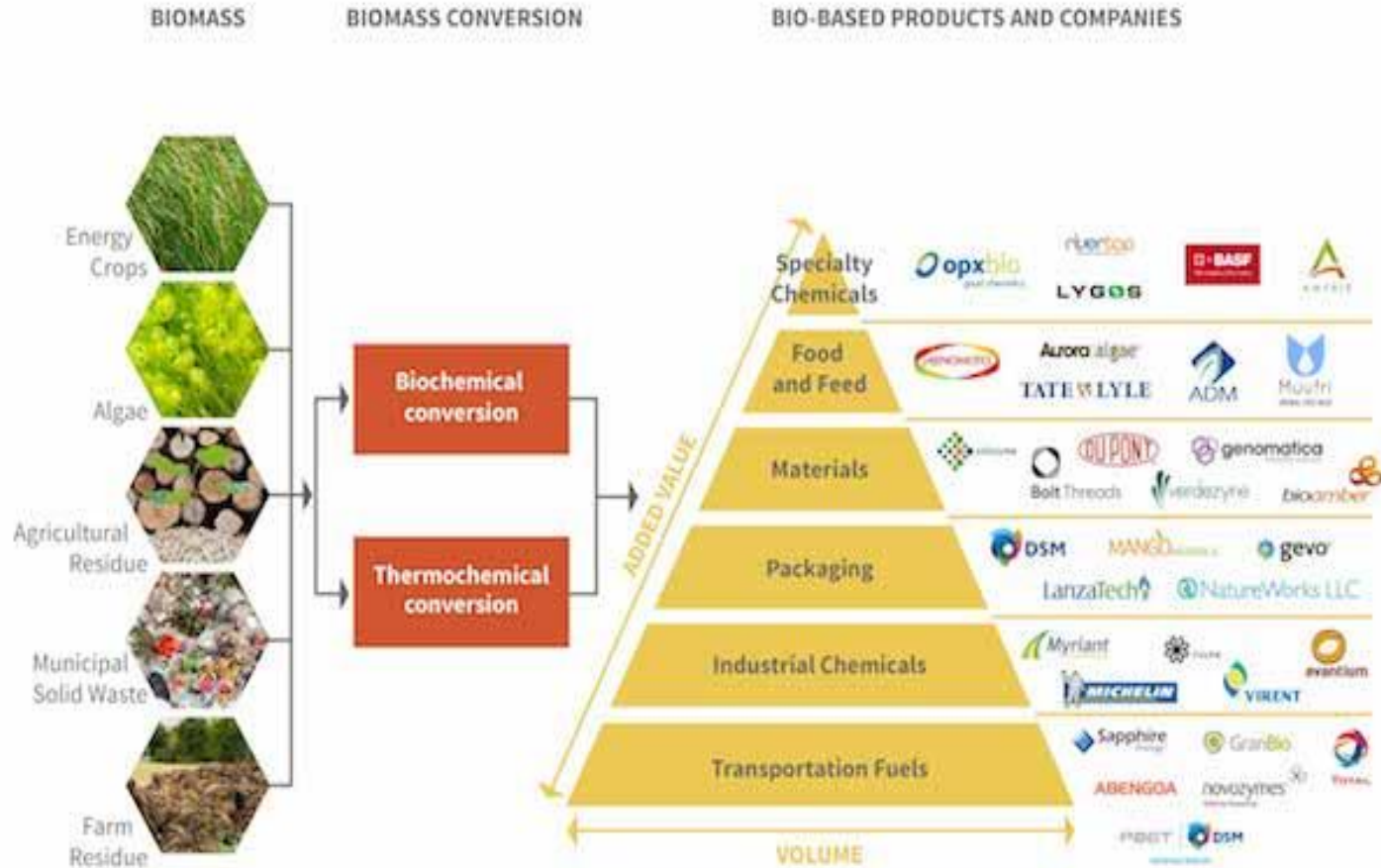
Producción microbiana de los alcanos de cadena corta



En este trabajo, los investigadores describen estrategias detalladas para:

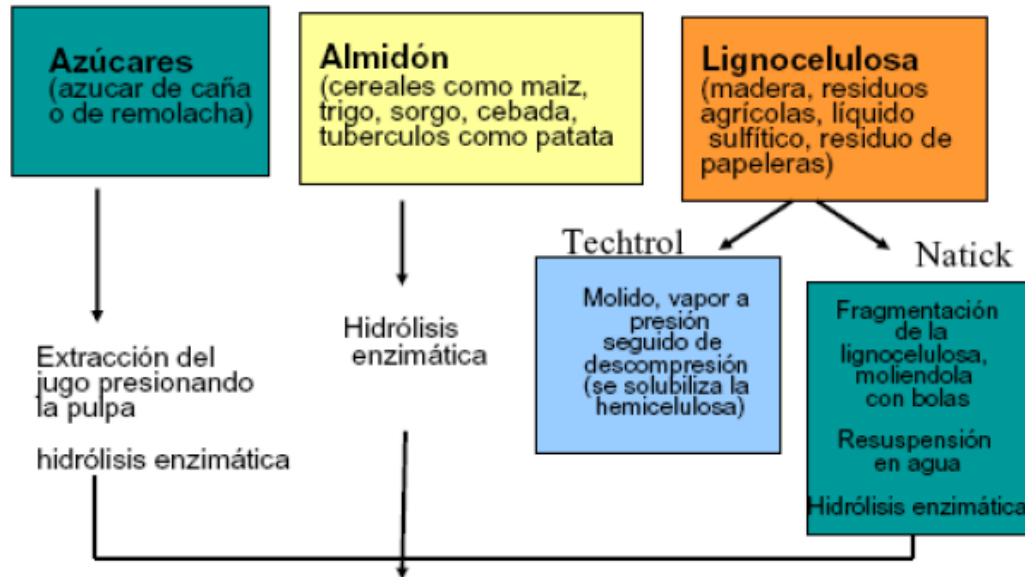
- La detección de enzimas asociadas a la producción de ácidos grasos
- La ingeniería de vías biosintéticas de enzimas y ácidos grasos para concentrar el flujo de carbono hacia la producción de ácidos grasos de cadena corta
- Conversión de ácidos grasos de cadena corta a sus correspondientes alcanos mediante la introducción de un nuevo camino biosintético y optimización de las condiciones de cultivo.

Conversión y uso de biomasa



Fuente: G. Castro

Etapa I: conversión de biomasa en azúcares fermentables



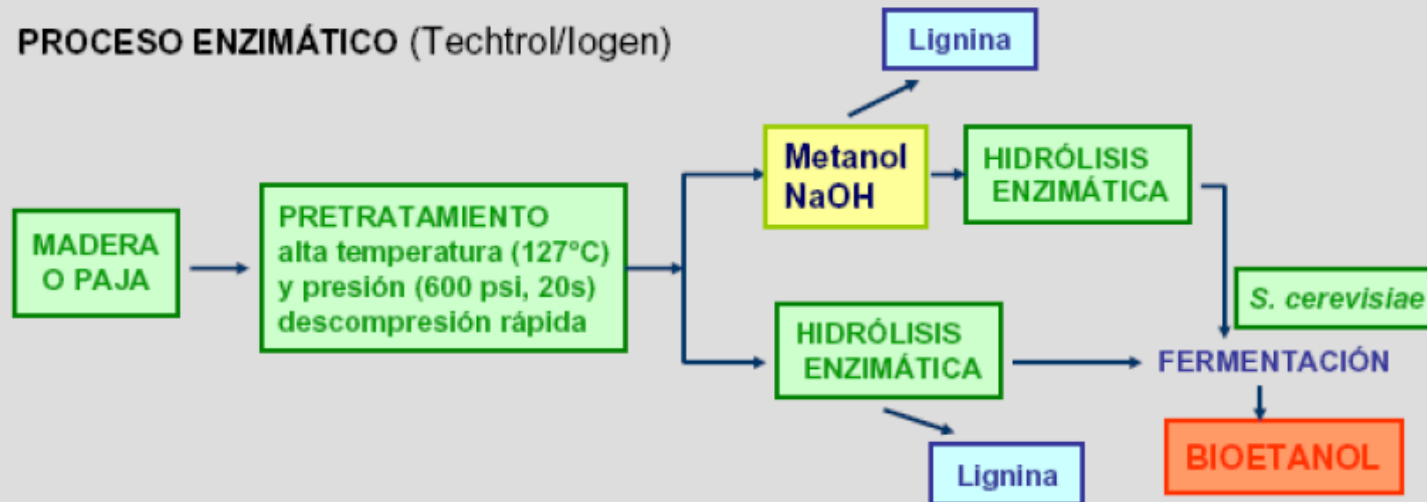
Etapa II: conversión de azúcar en alcohol (fermentación)

Etapa III: el alcohol es recuperado por destilación y posteriormente se somete a....
deshidratación y desnaturalización

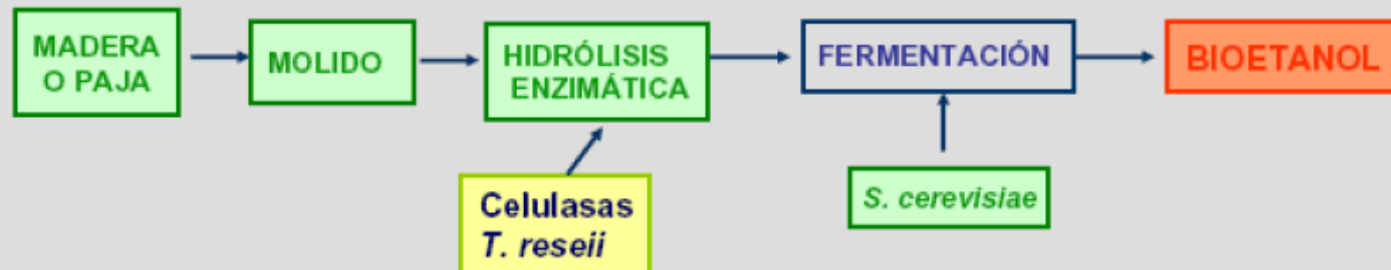
Fuente: G. Castro

Producción industrial de alcohol a partir de celulosa

PROCESO ENZIMÁTICO (Techtrol/logen)



PROCESO ENZIMÁTICO (Natick process)



Fuente: G. Castro

Parámetros relevantes

Rendimiento (Y): CUANTO se produce en función de los materiales que se consumen (fuente de C).

⇒ Re-direccionamiento de flujos metabólicos.

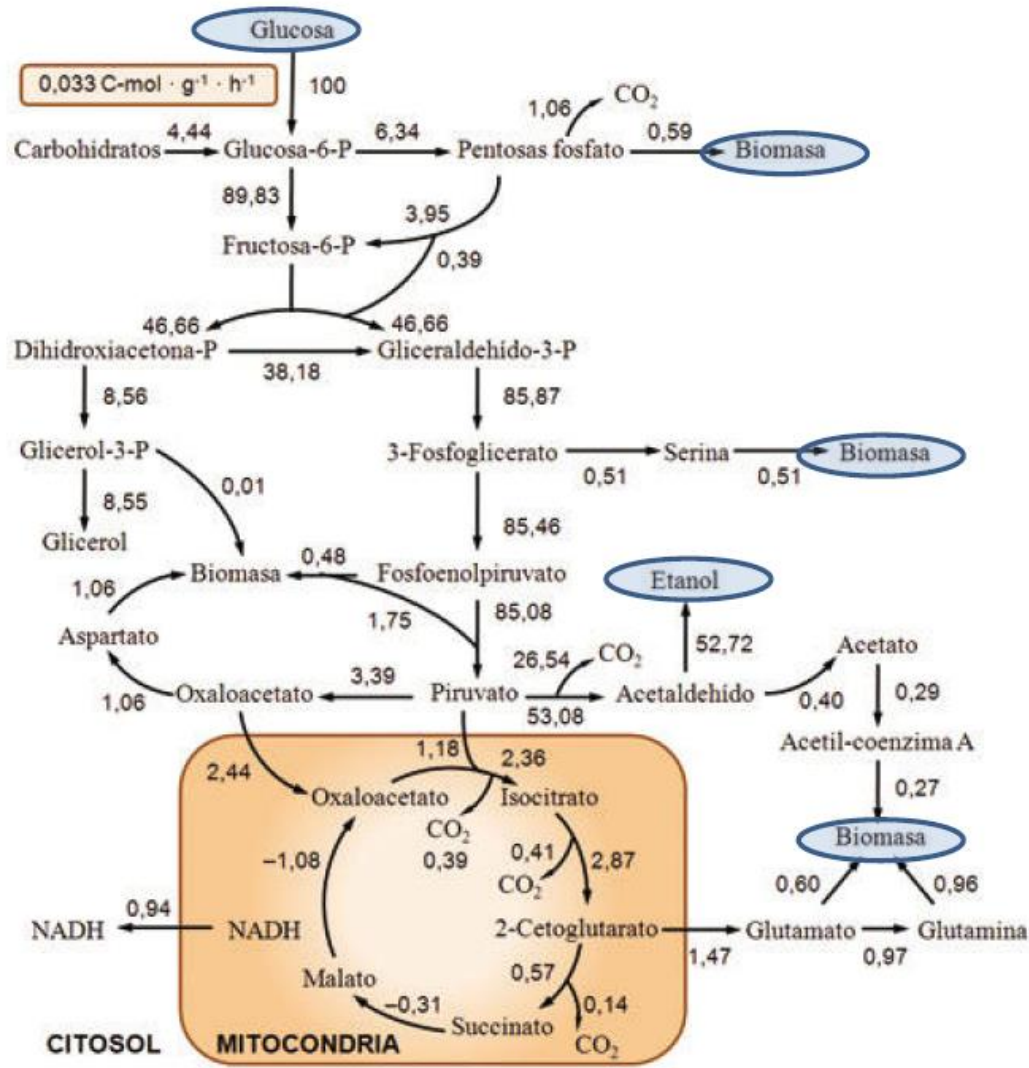
Productividad (P): lo que se produce en función de lo que se invierte.
Depende de la velocidad específica de incorporación del sustrato considerado limitante.

⇒ Amplificación de los flujos metabólicos.

Relevancia Social: *Green Chemistry*

Fuente: G. Castro

Mapa de Flujo Metabólico



Se busca

- Maximizar el crecimiento celular
- Minimizar el potencial redox y la producción de ATP (eficiencia energética de la células)
- Minimizar el consumo de sustrato

Bacterias han evolucionado in ambientes naturales competitivos, no para la produccion de compuestos quimicos deseados por los seres humanos!

- El metabolismo ha sido optimizado para bajas concentraciones de nutrientes
 - Poseen sistemas de defensa
- No hacen naturalmente lo que nosotros queremos!

-Represión de la expresión de genes

- *RNA antisentido* (uso de oligonucleótidos antisentido RNA ds degradado por RNAsa H, uso de ribozimas específicas para la degradación de RNA específicos, degradación de RNA mediante uso de siRNAs) Ej. La inhibición de un inhibidor
- *Mutantes por delección* Ej. Delección de un gen WT para expresar uno con sitio reg. mutado

-Sobreexpresión de Genes

Vectores con promotores fuertes o inducibles (lac, lambda, nisina, GAL, tetraciclina etc..) Ej. Aumentar el flujo en la formación de un producto en una vía existente



- ***Modificación de vías metabólicas***
- ***Establecimiento del estado fisiológico del organismo transformado***

Ingeniería Metabólica Inversa (IME)

- Muchas veces se realizan mutaciones al azar y se busca el fenotipo deseado,
- Otro ejemplo, relacionado con el mejoramiento de la utilización de xilosa por *S. cerevisiae* aplicando IME. Se produjo una librería genómica de fragmentos de *Pichia stipitis*, se transformaron en *S. cerevisiae*, y las cepas se testearon por su velocidad de crecimiento en xilosa. Se secuenciaron aquellas cepas con mayor velocidad de crecimiento y se lograron identificar dos genes *xyl3* and *psTal1* que fueron los responsables de esta mejora.



MUY COSTOSO

Elección del organismo hospedador

Características deseables

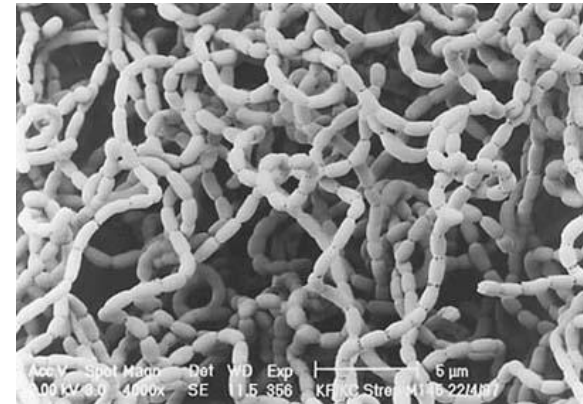
- No patógeno
- Capaz de vivir en condiciones extremas de pH y temperatura
- Bajo costo y rapidez de crecimiento
- Capaz de crecer en sustratos alternativos
- Información genómica y metabolómica disponibles



Escherichia coli



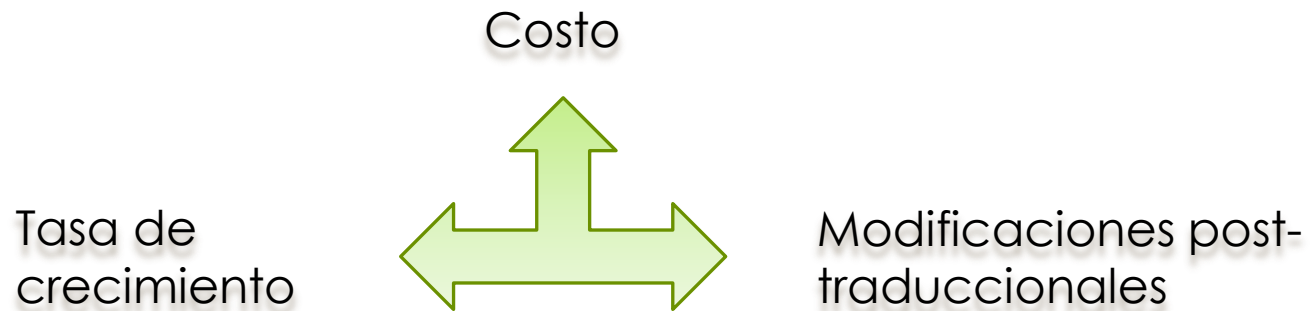
Bacillus subtilis
Bacillus megaterium
Bacillus licheniformis



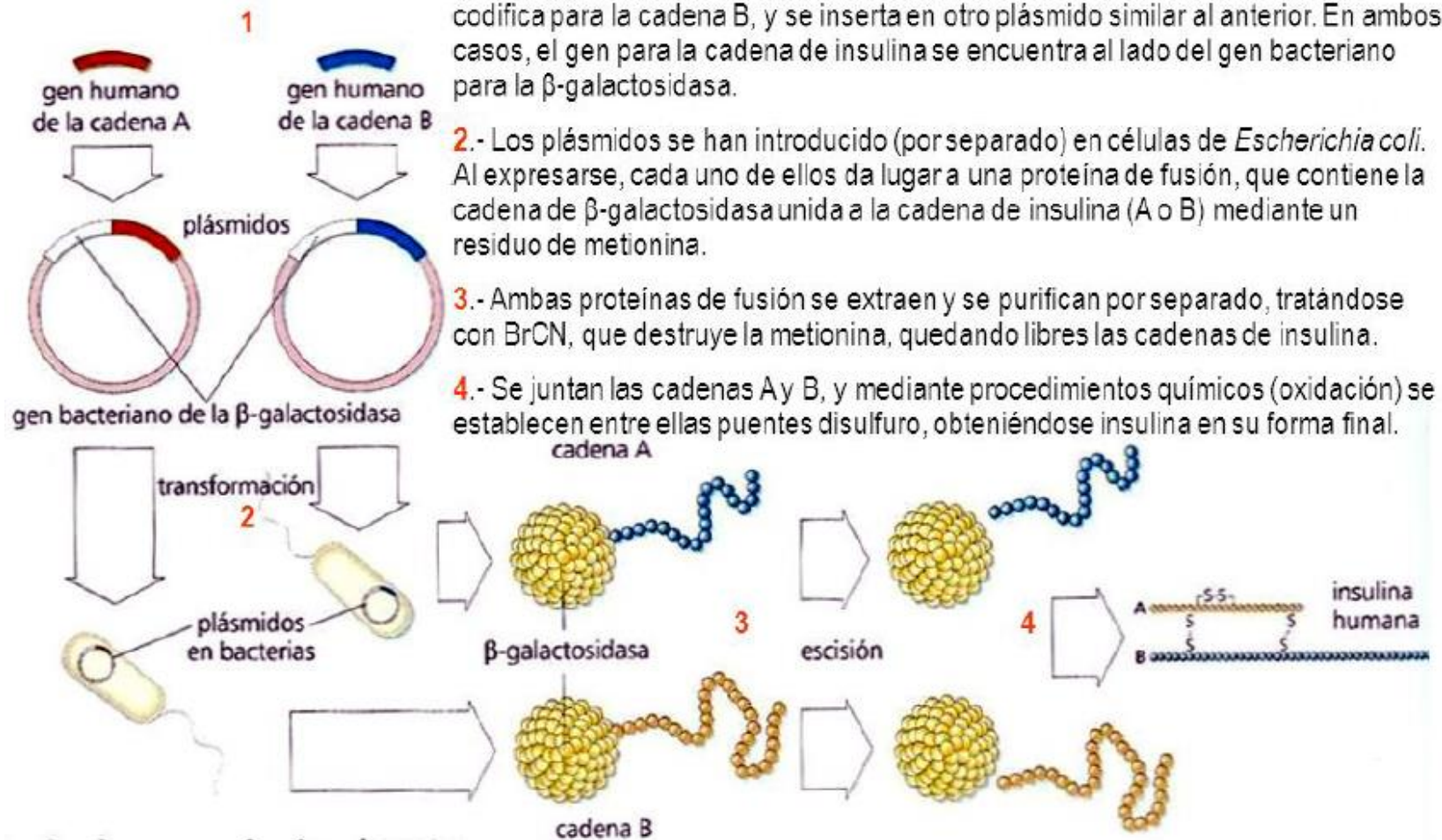
Streptomyces
coelicolor

Elección del hospedador

	Doubling Time	Cost	Glycosylation
E. coli	30 min	Low	None
S. cerevisiae	1-2 hours	Low	Yes, but often incompatible with human
Mammalian (CHO/BHK)	~ day	Very High	Yes, and more similar with human



Producción de insulina humana por ingeniería genética en bacterias



1.- Se fabrica en el laboratorio un ADN que codifica para la cadena A de la insulina humana, y se inserta en un plásmido bacteriano. Se fabrica también ADN que codifica para la cadena B, y se inserta en otro plásmido similar al anterior. En ambos casos, el gen para la cadena de insulina se encuentra al lado del gen bacteriano para la β -galactosidasa.

2.- Los plásmidos se han introducido (por separado) en células de *Escherichia coli*. Al expresarse, cada uno de ellos da lugar a una proteína de fusión, que contiene la cadena de β -galactosidasa unida a la cadena de insulina (A o B) mediante un residuo de metionina.

3.- Ambas proteínas de fusión se extraen y se purifican por separado, tratándose con BrCN, que destruye la metionina, quedando libres las cadenas de insulina.

4.- Se juntan las cadenas A y B, y mediante procedimientos químicos (oxidación) se establecen entre ellas puentes disulfuro, obteniéndose insulina en su forma final.

Las bacterias Gram (+) positivas como ***Bacillus subtilis*** y ***Bacillus megaterium*** también se han usado para la producción de PR

- *B. subtilis* es muy importante en la producción industrial de proteasas y de algunas vitaminas.
- Al carecer de membrana externa, estas bacterias pueden secretar una gran cantidad de proteínas plegadas al medio extracelular

Desventajas

- ❑ Los plásmidos recombinantes son poco estables en *B. subtilis*. Los rendimientos de PR son menores que en bacterias Gram (-).
- ❑ Alta actividad de proteasas, cuya producción aumenta cuando *B. subtilis* se encuentra en condiciones de estrés. Esto último también puede conducir a su esporulación.

Producción de *Proteínas Recombinantes (PR)* en bacterias

Ej.
Producción de insulina humana o de Factores de crecimiento humano en *E. coli*

Aplicación de la Ingeniería genética



Fig. 1. Principales pasos involucrados en la producción de proteína recombinante.

Producción de PR (ej, Insulina)



-Involucra el estudio de los mecanismos que permiten sobreexpresar un determinado gen en un microorganismo



Ingeniería Genética

Producción de Metabolitos (ej, aminoácidos)



-Involucra el estudio de muchas reacciones bioquímicas, Su interrelación y sus mecanismos de regulación



Ingeniería Metabólica



Biología de Sistemas

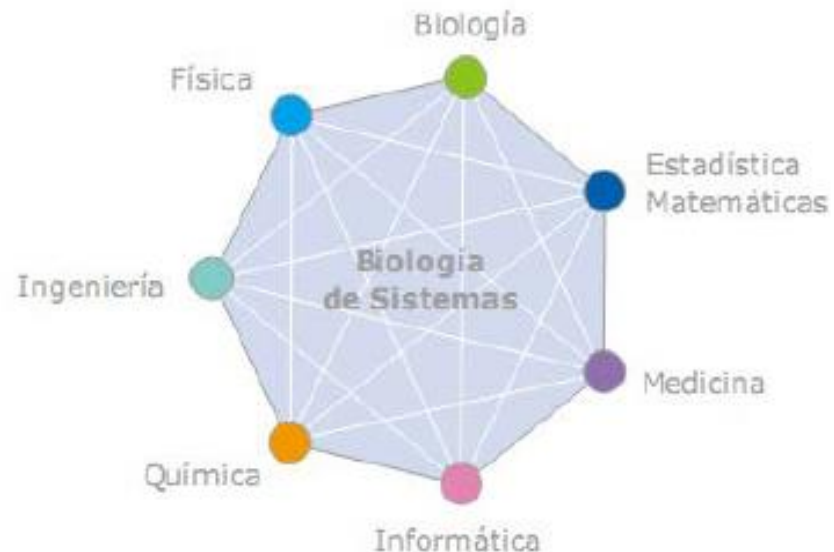
CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS

El aspecto más importante del concepto sistema es la idea de un **conjunto de elementos interconectados** para formar un todo que presenta propiedades y características propias que no se encuentran en ninguno de los elementos aislados, esto es lo que denominamos

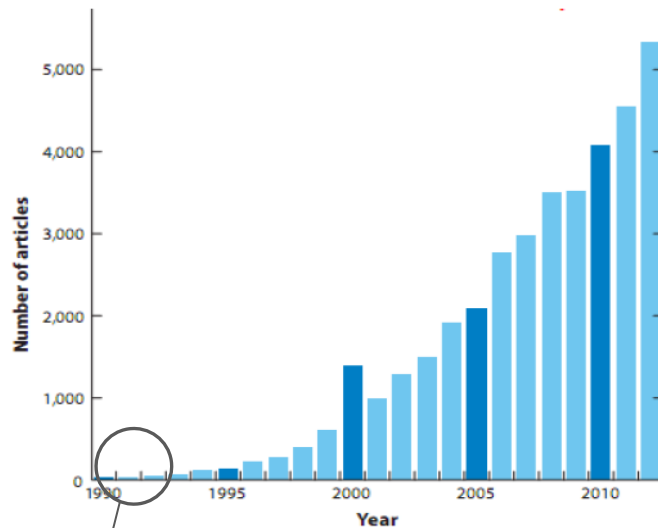
emergente sistémico

Principales características de la Biología de Sistemas

- Estudia los sistemas biológicos de una forma global, a nivel molecular.
- Contrasta con la aproximación clásica lineal (un gen, una proteína).
- Integra el conocimiento de diferentes plataformas o disciplinas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, fisiología, patología, etc.).
- Maneja una gran colección de datos procedentes de estudios experimentales.
- Propone modelos matemáticos que pueden explicar algunos de los fenómenos biológicos estudiados.
- Proporciona soluciones matemáticas que permiten obtener predicciones para los procesos biológicos.
- Realiza estudios de comprobación de la calidad de los modelos descritos por medio de la comparación entre las simulaciones numéricas y los datos experimentales.



Crecimiento de la literatura científica relacionada con la Ingeniería Metabólica

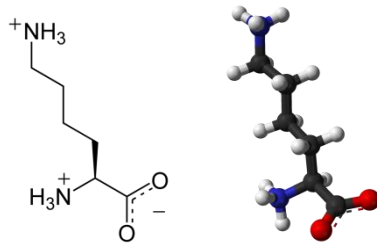


“Computer-aided synthesis of biochemical pathways” *



- Brindaba información sobre la máxima producción esperable (maximal yield)
- Sugería estrategias para evadir cuellos de botella críticos
- Permitía identificar intermediarios claves


- ❑ Surge el primer **método de enumeración de Pathways** completo
- ❑ Fue usado para identificar posibles rutas en la biosíntesis de Lisina (Lys), un aminoácido esencial



Lisina (Lys – K)

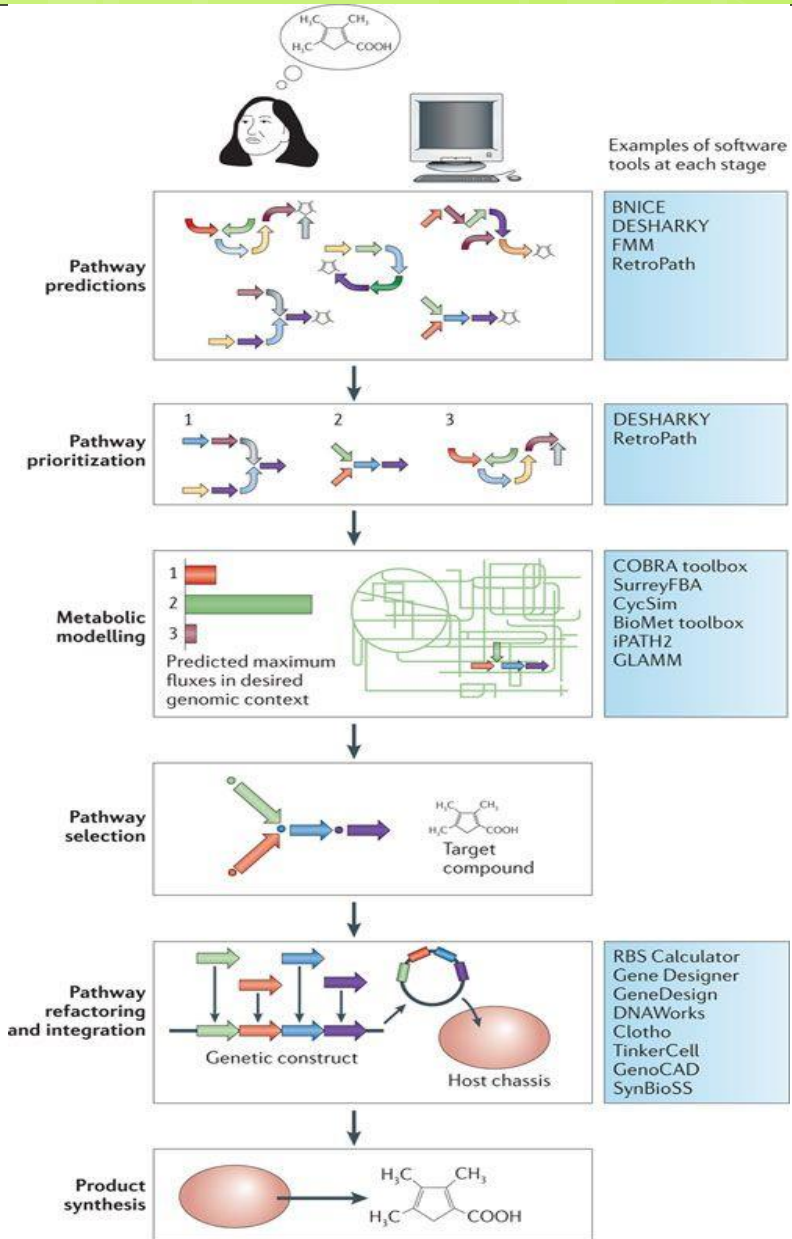
* Mavrovouniotis ML, Stephanopoulos G. 1990. Computer-aided synthesis of biochemical pathways. *Biotechnol. Bioeng.* 36(11):1119–32

Año 2000

Surge un algoritmo mas generalizado 

BNICE *The biochemical Network Integrated Computational Explorer*

1. Considera la estructura química de sustratos y productos
2. Considera un set de clasificación enzimática basada en el coeficiente de elasticidad (EC)
3. Permitió analizar numerosos caminos metabólicos posibles para la síntesis de aminoácido aromáticos



Herramientas *in silico* para Ingeniería Metabólica

Biosíntesis de Aminoácidos

Esqueleto carbono en aminoácidos deriva de precursores metabólicos de 3 fuentes:

Camino de pentosas

Glucolisis

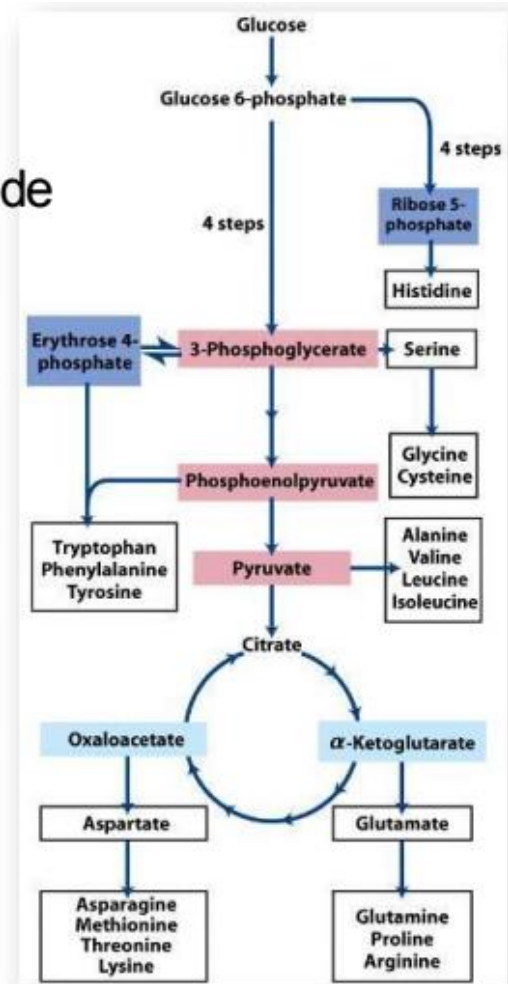
Anaerobiosis



Aerobiosis

Ciclo Krebs

Plantas y bacterias: todos
Mamíferos solo 10/20



Sandra M. Ruzal BIMA

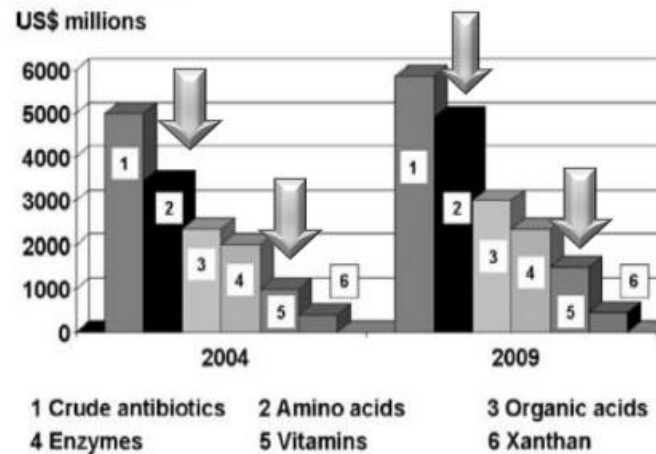
BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Tres categorías de productos microbianos de importancia industrial

- Metabolitos primarios
- Metabolitos secundarios
- Enzimas

AMINOÁCIDOS (Lisina y Glutamato)

VITAMINAS (B₁₂ y B₂)



Fuente: Sandra Ruzal

Antibióticos, pigmentos forman parte del metabolismo secundario

¿Por qué producción microbiológica de aminoácidos?

Extracción de aa de hidrolizados de proteínas, es costosa

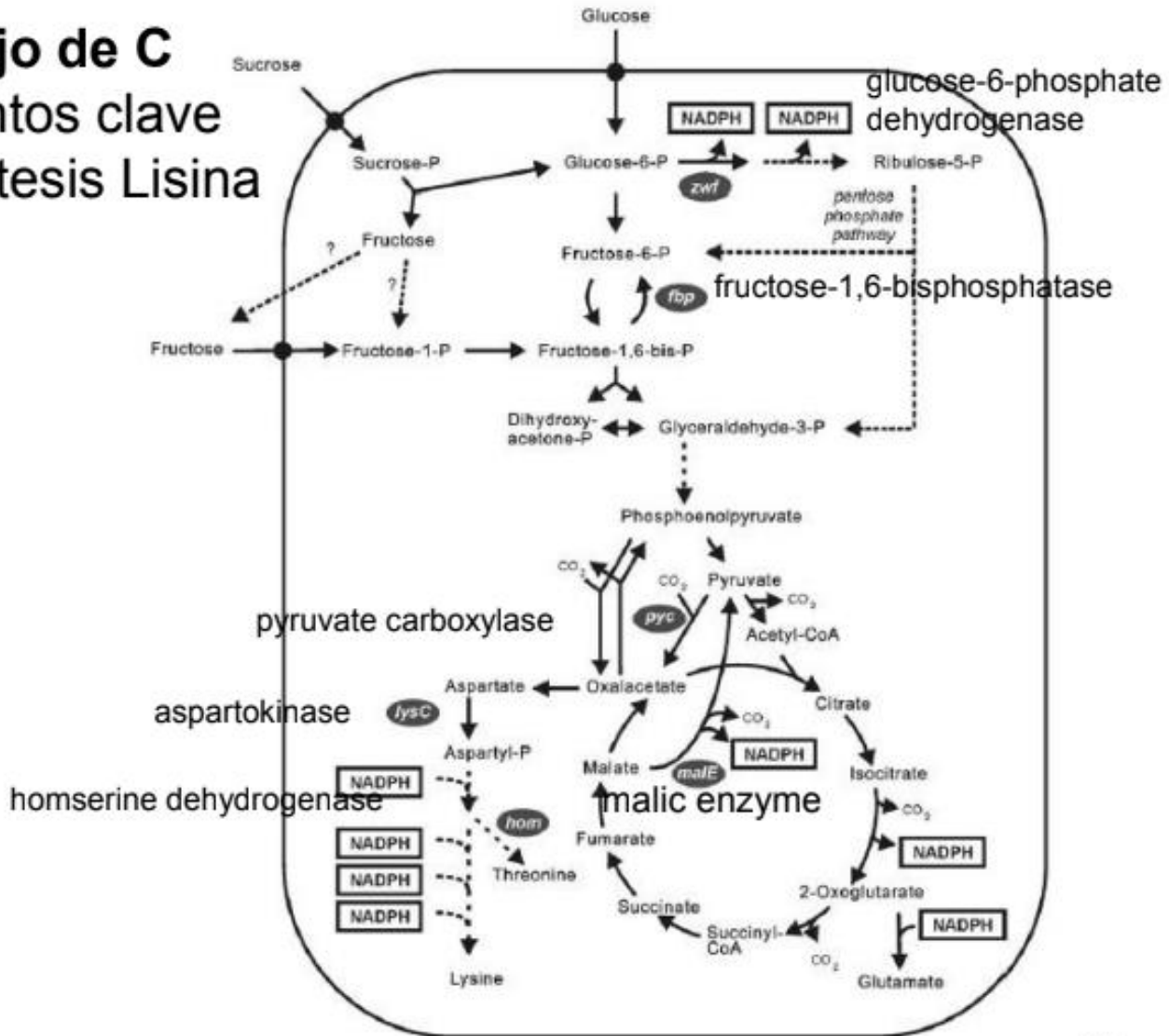
Síntesis química resulta en mezclas racémica ópticamente inactivas
D y L



La producción microbiológica de aminoácidos es estereoespecífica y biológicamente activa

Por otro lado, las proteínas vegetales son deficientes en aas como lisina, metionina y triptofano

Flujo de C
Puntos clave
Síntesis Lisina



Modelo metabólico para la
síntesis de lisina por
Corinebacterium glutamicum

- 1) $G + PEP \longrightarrow G6P + PIR$
- 2) $G6P \longleftarrow F6P$
- 3) $F6P + ATP \longrightarrow 2 T3P$ (DiOH aceton P + G3P)
- 4) $T3P \longleftarrow 3PG + ATP + NADH$
- 5) $3PG \longleftarrow PEP$
- 6) $PEP \longrightarrow PIR + ATP$
- 7) $PIR + CoA \longrightarrow AcCoA + NADH + CO_2$ (Ingreso a Krebs)
- 8) $AcCoA + OAA \longrightarrow ICT + CoA$
- 9) $ICT \longrightarrow OGA + NADPH + CO_2$
- 10) $OGA + CoA \longrightarrow SucCoA + CO_2 + NADH$
- 11) $SucCoA \longleftarrow Suc + ATP + CoA$
- 12) $Suc \longleftarrow MAL + FADH$
- 13) $MAL \longleftarrow OAA + NADH$
- 14) **$PEP + CO_2 \longrightarrow OAA$**
- 15) $G6P \longrightarrow RU5P + 2 NADPH + CO_2$ (ingreso a PPP)
- 16) $RU5P \longleftarrow X5P$
- 17) $RU5P \longleftarrow R5P$
- 18) $X5P + R5P \longleftarrow T3P + S7P$
- 19) $T3P + S7P \longleftarrow F6P + E4P$
- 20) $X5P + E4P \longleftarrow T3P + F6P$

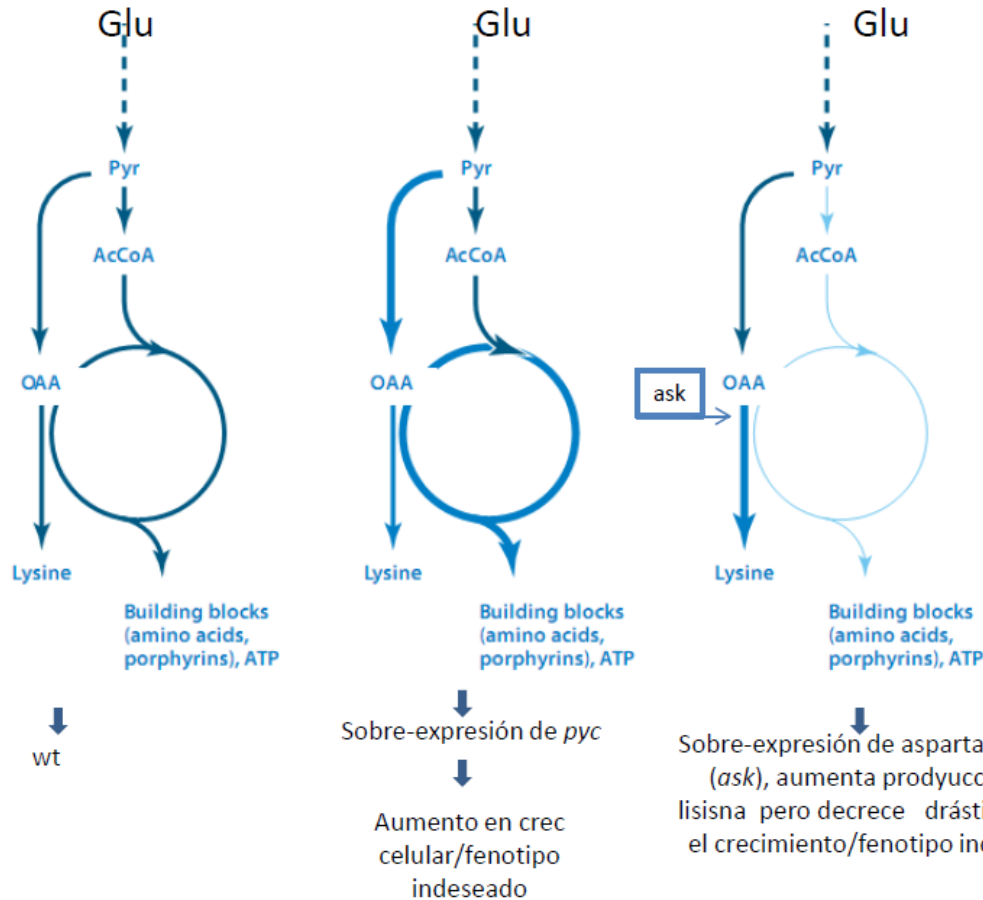
- 21) $NADH + 1/2 O_2 \longrightarrow H_2O + (P/O) ATP$
- 22) $FADH + 1/2 O_2 \longrightarrow H_2O + 1/2 (P/O) ATP$
- 23) $ATP \longrightarrow ADP$ (mantenimiento)

Síntesis de Lisina

- 24) $OGA + NH_3 + NADPH \longrightarrow GLM$
- 25) $OAA + GLM \longrightarrow ASP + OGA$
- 26) $ASP + PIR + 2 NADPH + SucCoA + GLM + ATP \longrightarrow Suc + OGA + Lisin + CoA + CO_2$

Ej: Producción de lisina por *Corynebacterium glutamicum*

Mediante AFM se determinó que el 90% de la lisina proviene de la acción de la piruvato carboxilasa (*pyc*)



Finalmente: sobreexpresión de piruvato carboxilasa y aspartato kinasa incrementa la productividad sin afectar marcadamente el crecimiento

Koffas MA, Jung GY, Stephanopoulos G. 2003. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression. *Metab. Eng.* 5(1):32-41