

## PREDICCIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE TREHALOSA EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Saccharomyces cerevisiae*

### PREDICTING TREHALOSE CYTOPLASMIC CONTENT DURING A *Saccharomyces cerevisiae* BIOMASS PRODUCTION PROCESS

J. S. Aranda<sup>1\*</sup>, A. I. Cabrera<sup>2</sup> y J. I. Chairez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioingeniería y <sup>2</sup>Departamento de Bioelectrónica, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN, Av. Acueducto s/n, Col. La Laguna Ticomán, Del. G. A. Madero, C. P. 07340, México, D. F., México.

Recibido 10 de Septiembre 2007; Aceptado 3 de Abril 2008

#### Resumen

La trehalosa es un carbohidrato dimérico componente de la levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae*, y es considerado como indicador de la capacidad fermentativa y de la viabilidad de las células. En procesos de producción de levadura, se busca inducir una acumulación intracelular de trehalosa. Por ser un compuesto citoplásmico, la cuantificación de la trehalosa requiere de tomas de muestra y de métodos analíticos posteriores. Así, el conocimiento del contenido citoplásmico de trehalosa es siempre ulterior al desarrollo del proceso de producción de biomasa, y esto dificulta el ajuste en tiempo real de parámetros de operación para incrementar la cantidad de trehalosa en la biomasa. Por tanto, se requiere de alguna alternativa para estimación de la trehalosa intracelular en tiempo real. Este trabajo presenta una opción de predicción basada tanto en el metabolismo celular implicado durante la biosíntesis de trehalosa, como en un algoritmo de redes neuronales dinámicas para la estimación de la concentración intracelular del carbohidrato.

**Palabras clave:** *Saccharomyces cerevisiae*, trehalosa, producción de biomasa, redes neuronales dinámicas, modelación estructurada, identificación de proceso.

#### Abstract

Trehalose is a dimeric carbohydrate and yeast biomass component generally used as an indicator of good viability and fermentation capacity. Yeast biomass production processes aim at inducing an intracellular accumulation of trehalose. However, during a production process, the trehalose must be quantified by off-line analytical methods after sample taking because it is a cytoplasmic compound. Thus, knowing experimental measurements of yeast trehalose content is always delayed. As a result, not oportune actions can be implemented in order to lead the production process toward a high intracellular trehalose accumulation in the produced biomass. Therefore, an on-line estimation method to forecast real-time intracellular trehalose content in yeast is developed. It is based on the main metabolic events involved in trehalose biosynthesis, as well as on a differential neural network algorithm to estimate trehalose concentration in the cytoplasm.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, trehalose, biomass production, dynamical neural networks, structured modelling, process identification.

#### 1. Introducción

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un insumo principal en procesos como la producción de pan y de bebidas alcohólicas. La calidad final de estos alimentos depende de la condición fisiológica, la composición bioquímica y el comportamiento cinético de la levadura usada en sus respectivos procesos de elaboración (Aranda-Barradas y Salgado-Manjarrez, 2002). Dos parámetros de calidad de la levadura utilizada como insumo son su viabilidad y capacidad fermentativa (productividad

de CO<sub>2</sub> en consumo de glucosa). La concentración intracelular de trehalosa es un indicador fisiológico tanto de la viabilidad de la levadura (Slaughter y Nomura, 1992; Silljé y col., 1999) como de la capacidad de producción de CO<sub>2</sub> (Eturgay y col., 1997). El contenido de trehalosa en las células define su estado fisiológico y composición bioquímica, determinantes para usos subsecuentes de la levadura en la industria alimentaria. Por tanto, es importante inducir la acumulación de trehalosa en células de *S. cerevisiae* durante los procesos de producción de biomasa.

\* Autor para la correspondencia: E-mail: jaranda@acei.upibi.ipn.mx  
Tel. y Fax: 5729 6000 ext. 56 338

Las condiciones del proceso de producción influyen en la reserva de trehalosa dentro de las células de levadura. Con la implementación de limitaciones controladas en el suministro de sustrato carbonado o nitrogenado, es posible producir biomasa de levadura de alto contenido intracelular en trehalosa (Aranda y col., 2004; Parrou y col., 1999; Eturgay y col., 1997). La acumulación de trehalosa se cuantifica mediante la toma de muestra y el análisis químico ulterior, lo cual significa que la determinación cuantitativa de la concentración de trehalosa en citoplasma siempre está desfasada del proceso de producción de biomasa por lote alimentado. En tal caso, no es posible controlar el suministro de sustrato bajo un esquema de inducción de la biosíntesis intensificada de trehalosa en la levadura producida. Por tanto, se requiere de una estrategia metodológica para estimar el contenido intracelular de trehalosa en tiempo real del proceso de producción de la biomasa.

El planteamiento de una estrategia para la estimación de la concentración intracelular de trehalosa incluye dos elementos. Por un lado, la modelación estructurada (ME) de los eventos metabólicos principales involucrados en la biosíntesis de la trehalosa en *S. cerevisiae* (Aranda y col., 2004). Por otro lado, la estimación de la trehalosa como variable intracelular no cuantificada mediante un observador basado en redes neuronales dinámicas (Cabrera y col., 2002).

El uso de un modelo estructurado, aunque se basa en principios físico-químico-biológicos (las rutas de biosíntesis de la trehalosa), requiere de la identificación precisa de parámetros cinéticos, lo cual es difícil de obtener en la práctica. La predicción basada en un neuro-observador dinámico (NOD) genera valores aproximados de la cantidad de trehalosa acumulada en las células de levadura, pero la interpretación de tales estimaciones es limitada en tanto que excluye los fenómenos físicos subyacentes a la biosíntesis del disacárido trehalosa. Sin embargo, la síntesis de ambas metodologías (la modelación estructurada y la estimación por un neuro-observador dinámico) permite obtener predicciones suficientemente aproximadas, en tiempo real, de la trehalosa intracelular acumulada en el proceso de producción de *S. cerevisiae*.

## 2. Fundamentos teóricos de la estimación de trehalosa en citoplasma.

### 2.1 Estimación de la trehalosa intracelular en *Saccharomyces cerevisiae* por modelación estructurada (ME).

La trehalosa se sintetiza en citoplasma por condensación de una molécula de glucosa-6-fosfato (G-6-P) con el radical glucosil proveniente de uridil-difosfo-glucosa (UDPG), en una reacción catalizada por la enzima trehalosa sintasa (TS). Se puede

producir la ulterior hidrólisis de la trehalosa por la acción de la enzima trehalasa (TH).



La carencia prolongada de sustrato carbonado o nitrogenado durante el proceso de producción modifica la concentración intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), y este compuesto determina tanto la síntesis como la actividad enzimática de TS y TH (Thevelein y Beullens, 1985; Parrou y col., 1997), afectando directamente la acumulación de la trehalosa. Así, la variación del contenido intracelular de trehalosa respecto al tiempo de proceso se puede modelar a través del consumo de sustrato limitante, del cAMP citoplásmico y de las actividades enzimáticas TS y TH, en un proceso de producción de biomasa por lote alimentado. Se definen entonces tres variables o estados abióticos del medio líquido de producción (las concentraciones celular  $x$  y del sustrato  $s$  en el medio, y el volumen  $v$  del medio en el biorreactor), y cuatro componentes o estados bióticos principales de la célula (concentraciones citoplásmicas de trehalosa  $w_{T,ME}$  y  $cAMP$ , y actividades enzimáticas  $E_{TS}$  y  $E_{TH}$ ). La evolución de los estados bióticos y abióticos del proceso de producción de biomasa se representa mediante las ecuaciones de la Tabla 1.

Este sistema de ecuaciones diferenciales, acoplado a las ecuaciones cinéticas y resuelto tanto con los parámetros cinéticos identificados (Tabla 2) como con las condiciones iniciales específicas del proceso de producción (Tabla 3), permite una estimación del contenido intracelular de trehalosa ( $w_{T,ME}$ ) en curso de la producción de biomasa, basada en los fenómenos metabólicos centrales para la biosíntesis del disacárido.

### 2.2. Estimación de la concentración citoplásmica de trehalosa en *Saccharomyces cerevisiae* mediante un neuro-observador dinámico (NOD).

Las redes neuronales permiten una adecuada estimación de procesos no lineales, como la producción de biomasa de levadura enriquecida en trehalosa, aún sin incorporar sus fundamentos bioquímicos. En particular, las redes neuronales dinámicas (RND) evitan la búsqueda de óptimos globales mejorando la estimación de los estados (Pozniak y col., 2001). Una técnica denominada aproximación de estructura variable (AEV), ofrece estimaciones precisas en sistemas transitorios y aceptable estabilidad global con control del error local. Los procedimientos de cálculo con la aproximación de estructura variable usualmente explotan las funciones tipo signo (*SIGN*), que incorporadas en RND permiten el diseño de un neuro-observador dinámico (NOD), aplicable a la estimación de estados intracelulares altamente no lineales (Slotine, 1984), tales como el contenido citoplásmico de trehalosa. El NOD propuesto se basa

Tabla 1. Ecuaciones del modelo estructurado (ME).

Ecuación	Significado físico
<b>Estados abióticos</b>	
$\frac{dx}{dt} = \left( \mu - \frac{f_v}{v} \right) x$	Acumulación de biomasa en el medio de cultivo
$\frac{dv}{dt} = f_v$	Variación del volumen de medio en el biorreactor
<b>Estados bióticos</b>	
$\frac{dw_{T,ME}}{dt} = q_{ST} - q_{HT} - \mu w_T$	Variación intracelular de trehalosa
$\frac{dE_{TS}}{dt} = q_{ES} - q_{PS} - \mu E_{TS}$	Variación intracelular de TS
$\frac{dE_{TH}}{dt} = q_{EH} - q_{PH} - \mu E_{TH}$	Variación intracelular de TH
$\frac{d(cAMP)}{dt} = q_A - \mu(cAMP)$	Variación intracelular de cAMP
<b>Ecuaciones cinéticas</b>	
$q_s = \frac{f_v}{vx} s_0$	Velocidad específica de consumo de sustrato
$\mu = Y_x q_s$	Velocidad específica de crecimiento
$q_{ST} = k_S E_S$	Velocidad intrínseca de síntesis de trehalosa
$E_S = \frac{E_{TS}}{k_{eq1} [cAMP]^2 + 1}$	Concentración de la fracción activa de TS
$q_{HT} = k_H E_H$	Velocidad intrínseca de hidrólisis de trehalosa
$E_H = \frac{k_{eqA} [E_{TH}] [cAMP]}{k_{eqA} [cAMP] + 1}$	Concentración de la fracción activa de TH
$q_{ES} = k_{ES} \mu + \frac{k_1 [G_{TS}]}{k_{eqS} [R] + 1}$	Velocidad específica intrínseca de producción de TS
$q_{EH} = k_{EH} \mu + \frac{k_2 [G_{TH}]}{k_{eqH} [R] + 1}$	Velocidad específica intrínseca de producción de TH
$R = k_{eqR} [ApoR] [cAMP]$	Concentración intracelular de proteína represora
$q_A = k_A q_s$	Velocidad específica intrínseca de síntesis de cAMP
$q_{PS} = k_{PS} E_{TS}$	Velocidad específica intrínseca de proteólisis de TS
$q_{PH} = k_{PH} E_{TH}$	Velocidad específica intrínseca de proteólisis de TH

Tabla 2. Parámetros cinéticos del modelo estructurado (Aranda y col., 2004).

Parámetro	Valor numérico	
	Sustrato limitante Carbono	Sustrato limitante Nitrógeno
$f_v = f_v(t)$	$0.11 e^{0.08t}$	$0.113 e^{0.10t}$
$Y_x$	$0.43 \pm 0.04$	$0.34 \pm 0.03$
$s_0$	$45.1 \pm 2.25$	$43.1 \pm 2.15$
$k_S$	$1.4328 \pm 0.262$ (g <sub>T</sub> /g <sub>TS</sub> h)	
$k_H$	$0.5198 \pm 0.158$ (g <sub>T</sub> /g <sub>TH</sub> h)	
$k_{ES}$	$0.0156 \pm 0.0034$ (g <sub>TS</sub> /g <sub>x</sub> )	
$k_{EH}$	$0.0218 \pm 0.0018$ (g <sub>TH</sub> /g <sub>x</sub> )	
$k_{eqS}$	$2 \cdot 10^9$ (Lee y Bailey, 1984a; 1984b)	
$k_{eqH}$	$2 \cdot 10^9$ (Lee y Bailey, 1984a; 1984b)	
$k_{eqR}$	$0.1269 \pm 0.0127$ (M <sup>-1</sup> )	
$k_A$	$0.0023 \pm 0.00014$	
$k_{eq1}$	$0.01 \cdot 10^{-6}$ (Lee y Bailey, 1984a; 1984b)	
$k_{eqA}$	$11.9483 \pm 2.309$ (M g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	
$k_1$	$3.0650 \pm 0.240$ (g <sub>TS</sub> /g <sub>x</sub> )	
$k_2$	$2.8327 \pm 0.194$ (g <sub>TH</sub> /g <sub>x</sub> )	
$k_{PS}$	$0.09$ (Lee y Bailey, 1984a; 1984b)	
$k_{PH}$	$0.07$ (Lee y Bailey, 1984a; 1984b)	
$G_{TH}$	$4 \cdot 10^{-9}$ (Lee y Bailey, 1984a; 1984b)	
$G_{TS}$	$4 \cdot 10^{-9}$ (Lee y Bailey, 1984a; 1984b)	
$ApoR$	$2 \cdot 10^{-8}$ (Lee y Bailey, 1984a; 1984b)	

en el conjunto de ecuaciones (2) expresadas como sigue:

$$\frac{d\hat{x}_i}{dt} = A\hat{x}_i + W_1\sigma(\hat{x}_i) + W_2\varphi(\hat{x}_i)\gamma(u_i) + K_1(y_i - \hat{y}_i) + K_2SIGN(y_i - \hat{y}_i) \quad (2)$$

$$\hat{y}_i = C\hat{x}_i$$

donde  $\hat{x}_{i,i}$  ( $i = 1, \dots, 4$ ) son elementos del vector NOD que representa al estimador de los estados abióticos ( $x_{t,1}$  es la variación de  $x$  en el proceso,  $x_{t,2}$  es la variación de  $s$ ,  $x_{t,3}$  es el volumen de trabajo  $v$ ) y la estimación ( $\hat{x}_{t,4}$ ) del contenido de trehalosa intracelular  $w_{T,NOD}$  como estado biótico no medido. El vector  $\hat{y}_{t,i}$  ( $i = 1, \dots, 4$ ) incluye estimaciones de las  $i$  salidas de RND correspondientes a los estados abióticos medidos  $y_{t,i}$ , siendo  $y_{t,1} = 0$ ,  $y_{t,2}$  la medición instantánea de  $s$ ,  $y_{t,3}$  el valor actual de  $v$  en el reactor, y  $y_{t,4} = 0$ . Las matrices  $A$ ,  $K_1$  y  $K_2$  se obtienen mediante el algoritmo de entrenamiento específico para el NOD (Tabla 4) (Pozniak y col., 2001), donde  $K_1$  es una matriz de términos correctivos lineales proporcionales basados en el error  $e(t) = y_{t,i} - \hat{y}_{t,i}$  (tipo Luenberger) y  $K_2$  es la matriz correctora de la función signo:

$$SIGN(v) = (sign(v_1), \dots, sign(v_2)) \quad (3)$$

Tabla 3. Condiciones iniciales del modelo estructurado.

Sustrato limitante	Condiciones iniciales					
	$x$ (g <sub>x</sub> /L)	$v$ (L)	$w_T$ (g <sub>T</sub> /g <sub>x</sub> )	$E_{TS}$ (g <sub>TS</sub> /g <sub>x</sub> )	$E_{TH}$ (g <sub>TH</sub> /g <sub>x</sub> )	$A$ (μM)
<b>Carbono</b>	2.115	6.0	0.0232	$10^{-4}$	0	5.0
<b>Nitrógeno</b>	2.11	6.0	0.0237	$10^{-4}$	0	5.0

con,

$$\text{sign}(z) = \begin{cases} 1 & \text{si } z > 0 \\ -1 & \text{si } z < 0 \\ \text{no definido} & \text{si } z = 0 \end{cases} \quad (4)$$

Tabla 4. Matrices del neuro-observador dinámico (NOD).

Matriz	Sustrato limitante			
	Carbono y Nitrógeno			
A	-10.2	0	0	0
	0	-81	0	0
	0	0	-168.2	0
	0	0	0	-92.3
K <sub>1</sub>	[1 1 100 1] <sup>T</sup> x 0.01			
K <sub>2</sub>	diag[0 0.0313 0.0154 0]			

Las funciones  $\sigma(\cdot)$  y  $\varphi(\cdot)$  son sigmoideas estándar,  $\gamma(u_i)$  es la función de control aplicada al NOD y  $C = \text{diag}[0 \ 1 \ 1 \ 0]$ . La matrices de ponderación  $W_i$  ( $i = 1,2$ ) se ajustan en línea mediante una ley de aprendizaje diferencial específica (Pozniak y col., 2001). Luego de un proceso de entrenamiento de la RND, el observador (NOD) acoplado a ella genera estimaciones en tiempo real del estado biótico no medido ( $\hat{x}_{i,4}$ ), es decir, del contenido intracelular de trehalosa en la levadura *S. cerevisiae* producida.

2.3. Cálculo del valor experimental esperado de trehalosa intracelular en *Saccharomyces cerevisiae*.

Las estimaciones del contenido intracelular de trehalosa obtenidas por modelación estructurada ( $w_{T,ME}$ ) y mediante el neuro-observador dinámico ( $w_{T,NOD}$ ) son utilizadas para generar un valor esperado de concentración de trehalosa citoplásmica en *S. cerevisiae*.

Las estimaciones de la trehalosa citoplásmica calculadas mediante ME ( $w_{T,ME}$ ) se modifican en cada tiempo  $j$  del proceso con las correspondientes estimaciones del NOD ( $w_{T,NOD}$ ). La predicción ( $w_{T,pred,j}$ ) del contenido intracelular de trehalosa en tiempo real durante el proceso de producción de biomasa se obtiene entonces como la esperanza matemática dada por el cálculo de ME y la estimación de NOD:

$$w_{T,pred,j} = E(w_{T,exp,j}) = \left\{ w_{T,ME} P(w_{T,ME}) \right\}_j + \left\{ w_{T,NOD} P(w_{T,NOD}) \right\}_j \quad (5)$$

donde el índice  $j$  indica el valor instantáneo. Se hace la consideración de que los eventos son equiprobables,  $p(w_{T,ME}) = p(w_{T,NOD}) = 0.5$ . La Fig. 1 muestra el diagrama de bloques correspondiente al cálculo del valor experimental esperado para la concentración de trehalosa intracelular.

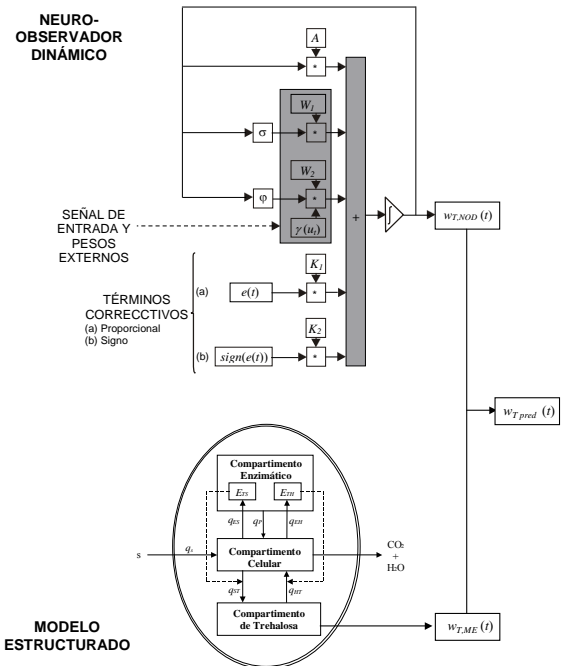


Fig. 1. Diagrama a bloques de la secuencia de cálculos para estimación de la concentración de trehalosa intracelular a partir de los valores calculados mediante el modelo estructurado (ME) y el neuro-observador dinámico (NOD).

3. Metodología experimental.

La producción de biomasa se implementó en cultivos por lote alimentado de 16 h de duración en un biorreactor de 15 L, manteniendo una condición de limitación de sustrato carbonado o nitrogenado en las 4 horas finales de cada cultivo. Una serie de cultivos preliminares permitió el cálculo de los parámetros cinéticos del modelo estructurado y el entrenamiento del NOD. A partir de esto, se efectuó la predicción de la concentración intracelular de trehalosa en la biomasa producida en otros procesos experimentales combinando las estimaciones generadas por el ME y por el NOD.

3.1. Microorganismo.

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en todos los experimentos se aisló mediante diluciones consecutivas (hasta 10<sup>32</sup>) a partir de producto en barra de una marca comercial, hasta obtener una cepa de alta probabilidad monoclonal. La conservación consistió en resiembras periódicas en tubos inclinados con medio agar (20 g/L), glucosa (20 g/L) y extracto de levadura (10 g/L).

3.2. Medio de cultivo.

Todos los experimentos de producción en lote alimentado se efectuaron en un medio de cultivo cuya composición fue (g/L): glucosa 50, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25, NaCl 0.5, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; con

adición de solución de minerales (10 mL/L), y solución vitaminas (10 mL/L). La solución de minerales contiene (mg):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  278,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  288,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  7.5,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  25,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  169 y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  unas gotas (para disolver el sulfato de hierro) por cada 500 mL. La solución de vitaminas se preparó con (mg): biotina 1.5, pantotenato de calcio 20, inositol 125, piridoxina-HCl 25 y tiamina 50 por cada 500 mL (Aranda y col., 2004; Zhang y Greasham, 1999).

### 3.3. Producción de biomasa.

Un biorreactor de 15 L (Applikon Z81315 M607) se utilizó para producir la biomasa en lote alimentado. Las condiciones de cultivo en el proceso fueron: temperatura 30 °C, pH 5.0, flujo de aire 450 L/h, control de  $\text{O}_2$  disuelto en el medio líquido 10 % del valor de saturación (0.8  $\text{mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$ ). El pH del cultivo fue controlado con una solución al 20 % de amonio, que el mismo tiempo era el suministro de sustrato nitrogenado. El sustrato carbonado (glucosa) se adicionó continuamente al biorreactor manteniendo su concentración cercana a cero (g/L) en el medio de cultivo, la cual fue medida directamente durante el proceso. De acuerdo con evidencia experimental reportada, la intensificación de la biosíntesis de trehalosa se indujo en la fase final del proceso de producción de biomasa mediante una limitación de la adición de carbono o de nitrógeno al cultivo (Eturgay y col., 1997; Parrou y col., 1999; Aranda y col., 2004). Para los experimentos con limitación de fuente de carbono, el flujo de alimentación fue sustituido por una solución sin glucosa. En los cultivos con limitación por nitrógeno, la solución para control de pH fue sustituida por una solución de NaOH 2 N.

### 3.4. Métodos analíticos.

**Trehalosa.** Muestras de 20 mg de biomasa producida y deshidratada por calor seco se utilizaron para extracción de la trehalosa intracelular con 3 mL de ácido tricloroacético 0.05 M y en agitación continua durante 40 min. Posteriormente, la trehalosa fue medida con el método de la antrona (Slaughter y Nomura, 1992), consistente en una determinación colorimétrica basada en la reacción entre la trehalosa y la antrona que produce una especie colorida cuya formación es proporcional a la cantidad de trehalosa en la muestra. La absorbancia de la muestra colorida permite entonces la cuantificación de la trehalosa.

**Biomasa.** El crecimiento de la levadura fue determinado por medición de la densidad óptica de cada cultivo a 620 nm (espectrofotómetro Hitachi U-2000). La cantidad de biomasa se calculó a partir de una correlación lineal previamente establecida entre densidad óptica y concentración de biomasa.

**Glucosa.** La concentración de glucosa en el biorreactor se determinó mediante el método de la

glucosa oxidasa en un analizador automático (YSI 2700 Select).

### 3.5. Cálculo de la concentración citoplásmica de trehalosa.

A partir de mediciones de la concentración del sustrato en el medio de cultivo y del volumen instantáneo de medio en el biorreactor, es posible aplicar tanto la modelación estructurada (ME) como el neuro-observador dinámico (NOD) en la estimación del valor experimental esperado de trehalosa en la levadura. El equipo de cómputo utilizado es una computadora personal con procesador Pentium IV® y frecuencia 1.8 G Hz, donde se desarrolló el algoritmo descrito previamente (Fig. 1), codificado en MATLAB®. El tiempo de ejecución promedio para cada simulación fue de alrededor de 5 minutos (conjuntos de 14 puntos de datos experimentales), aunque los cálculos en tiempo real con el algoritmo entrenado (NOD) y los parámetros cinéticos estimados (ME) se reducen a centésimas de segundo con el equipo de cómputo mencionado.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Concentración intracelular experimental de trehalosa.

En cultivos por lote alimentado con una fase de inducción final para acumulación de trehalosa citoplásmica, se observa un incremento en las mediciones experimentales del disacárido (Fig. 2).

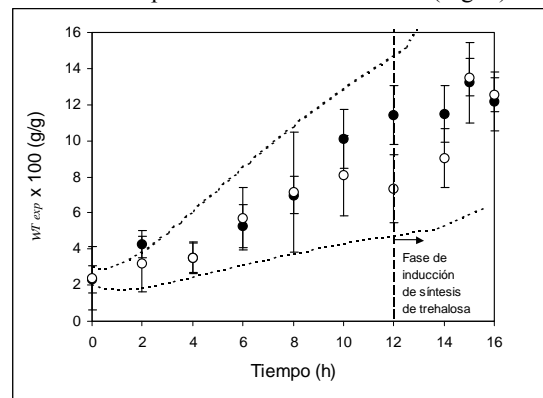


Fig. 2. Determinaciones experimentales del contenido intracelular de trehalosa ( $w_T \text{ exp}$ ) en procesos de producción de *S. cerevisiae*. Cultivos con limitación de C (●) o de N (○) en fase de inducción de la biosíntesis intensificada de trehalosa. Las líneas punteadas muestran los límites de confianza del modelo estructurado (ME).

La concentración inicial de trehalosa en las células fue de 0.025 – 0.035  $\text{g}_T/\text{g}_x$ . La condición  $s \approx 0$  sostenida experimentalmente durante el proceso permite una acumulación paulatina y

sostenida del disacárido, hasta la fase final de inducción en donde se alcanzan incrementos de hasta 0.13 g<sub>T</sub>/g<sub>s</sub>, correspondientes al 13 % de la biomasa seca producida. Este nivel de trehalosa se considera como un indicador adecuado de la calidad de la levadura (Slaughter y Nomura, 1992). Sin embargo, para lograr que las células acumulen esas cantidades de trehalosa en citoplasma, se requiere mantener un esquema de adición de sustrato tal que limite el crecimiento de la biomasa sin detenerlo completamente. En estas condiciones, se favorece en principio la biosíntesis intensificada del dímero (Parrou, 1999; Aranda y col., 2004), pero se requiere alguna verificación de la cantidad de trehalosa en las células durante el proceso de producción de biomasa. La determinación experimental del disacárido en citoplasma es relativamente lenta, lo que impide una retroalimentación adecuada para establecer los esquemas de suministro del sustrato. Por tanto, se hace necesaria la predicción en tiempo real de la concentración intracelular de trehalosa.

#### 4.2. Predicción del contenido citoplásmico de trehalosa.

En la predicción del comportamiento de un sistema se busca fundamentar los cálculos en modelos matemáticos basados en principios físicos. Sin embargo, con sistemas biológicos no lineales se presentan dificultades que impiden predicciones suficientemente precisas, tales como la estimación numérica de los parámetros cinéticos del modelo estructurado (ME). Aunque los intervalos de confianza de los parámetros son reducidos, los errores se propagan en el tiempo del proceso; y hacia la fase de inducción de la trehalosa se producen estimaciones muy imprecisas (Fig. 2).

El neuro-observador dinámico (NOD) genera valores estimados de la trehalosa intracelular muy cercanos a los datos experimentales. No obstante, tales valores estimados no pueden ser utilizados en el proceso de producción de biomasa porque los algoritmos de cálculo aplicados por el NOD no utilizan en forma directa la estructura metabólica de *S. cerevisiae* en la estimación. A pesar de esto, las estimaciones por NOD son válidas si son corregidas por las estimaciones de la ME fundadas en el metabolismo de biosíntesis de la trehalosa. La predicción basada en las estimaciones de una red neuronal dinámica, y corregida por las rutas bioquímicas y controles metabólicos de la biosíntesis citoplásmica de trehalosa, constituye una estrategia suficientemente precisa y aplicable en procesos de producción de biomasa enriquecida en el disacárido (Fig. 3 y 4).

En el instante en que se calculan por ME los valores puntuales de  $w_{T,ME}$  en el proceso, el dato experimental es desconocido. Nótese que los cálculos basados en ME no predicen convenientemente los valores de concentración

intracelular de trehalosa en tiempo real (Fig. 2). Sin embargo, la compensación introducida por NOD incrementa la precisión y al mismo tiempo la verosimilitud de la predicción. El error relativo promedio de la predicción se reduce entre 2.5 y 3.9% por la corrección de NOD aplicada a la estimación por ME.

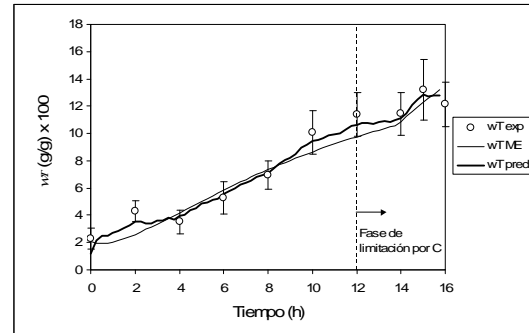


Fig. 3. Predicción del contenido de trehalosa intracelular ( $w_{T, pred}$ , línea gruesa) en un proceso de producción de biomasa (*S. cerevisiae*) limitado por carbono. La línea delgada es el cálculo basado en modelación estructurada ( $w_{T, ME}$ ) y los marcadores (○) son datos experimentales del proceso ( $w_{T, exp}$ ).

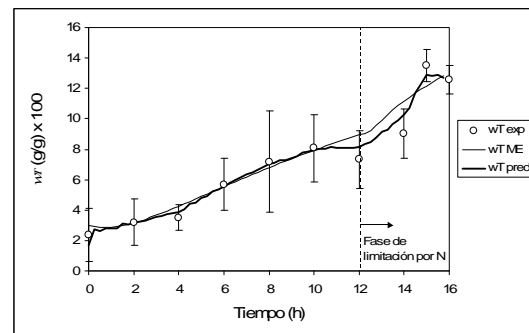


Fig. 4. Predicción del contenido de trehalosa intracelular ( $w_{T, pred}$ , línea gruesa) en un proceso de producción de biomasa (*S. cerevisiae*) limitado por nitrógeno. La línea delgada es el cálculo basado en modelación estructurada ( $w_{T, ME}$ ) y los marcadores (○) son datos experimentales del proceso ( $w_{T, exp}$ ).

## Conclusiones

Para la producción de biomasa de levadura con estándares de calidad elevados, es necesario un seguimiento continuo de la fracción intracelular de trehalosa en curso del proceso. Los resultados de la estimación de la trehalosa citoplásmica en la levadura obtenidos mediante la combinación de un modelo de la dinámica del metabolismo celular, con el sistema de neuro-observador basado en la técnica de redes neuronales diferenciales, muestran que la trayectoria predicha es cercana a la producida en una serie de experimentos, donde el contenido de trehalosa en las células fue determinado experimentalmente y la inducción de su biosíntesis

se produjo en condiciones controladas. El coeficiente de variación promedio de las estimaciones es de tan sólo 3.7 %. Estos resultados permiten afirmar la factibilidad de sistemas predictores en los cuales la compensación a los errores producidos por el proceso de observación de la red neuronal sea corregido por un modelo bioquímico básico. Por un lado, la finalidad del modelo básico es la de incorporar las características del metabolismo en la dinámica del proceso, sin que sean consideradas en forma completa por la red neuronal. Por otro lado, el neuro-observador dinámico aporta mayor precisión a las estimaciones basadas en el modelo físico. De esta forma, la combinación de estos métodos establece las bases para el desarrollo de sensores de tipo virtual, cuya función consista en estimar la evolución de una variable que físicamente no es medida en el proceso, tal como el contenido intracelular de trehalosa en la producción de biomasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

### Agradecimientos

Los autores expresan su reconocimiento a la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte financiero necesario para la realización del presente trabajo. Parte del trabajo experimental fue realizado en el Equipe Bioréacteurs et Fermentations del Institut National Polytechnique de Toulouse, Francia. J. S. Aranda agradece la asistencia técnica y la disponibilidad de los equipos de investigación a la Dra. P. Taillandier.

### Nomenclatura

$A$	matriz de estimación de estados $\hat{x}_i$
$AR$	concentración citoplásmica de co-represor, M
$AEV$	aproximación de estructura variable en redes neuronales dinámicas
$ApoR$	concentración citoplásmica de aporepresor, M
$C$	matriz de salidas $\hat{y}_i$
$cAMP, cAMP$	monofosfato de adenosina cíclico y su concentración molar, M
$E(\cdot)$	esperanza matemática del evento $(\cdot)$ .
$E_H$	concentración de la fracción activa de TH, $g_{TH}/g_x$
$E_S$	concentración de la fracción activa de TS, $g_{TS}/g_x$
$E_{TS}$	fracción másica intracelular de la trehalosa sintasa, $g_{TS}/g_x$
$E_{TH}$	fracción másica intracelular de la trehalasa, $g_{TH}/g_x$
$e_H$	concentración de la fracción inactiva de TH, $g_{TH}/g_x$
$e_S$	concentración de la fracción inactiva de TS, $g_{TS}/g_x$
$f_v$	flujo de alimentación de medio al biorreactor, L/h

$G_H$	concentración del gene no reprimido para la síntesis de TH, M
$G_{HR}$	concentración del gene reprimido para la síntesis de TH, M
$G_S$	concentración del gene no reprimido para la síntesis de TS, M
$G_{HS}$	concentración del gene reprimido para la síntesis de TS, M
G-6-P	glucosa-6-fosfato
$K_1$	matriz correctiva lineal proporcional del entrenamiento de la RND
$K_2$	matriz correctora de la función <i>SIGN</i> en el entrenamiento de la RND
$k_A$	constante de producción de cAMP, M $g_x/g_s$
$k_{EH}$	constante de reacción para la producción constitutiva de TH, $g_{TH}/g_x$
$k_{ES}$	constante de reacción para la producción constitutiva de TS, $g_{TS}/g_x$
$k_{eqA}$	constante de equilibrio para la reacción $e_H + cAMP \leftrightarrow E_H, M^{-1}$
$k_{eqH}$	constante de equilibrio para la reacción $G_H + R \leftrightarrow G_{HR}, M^{-1}$
$k_{eqI}$	constante de equilibrio para la reacción $E_S + 2 cAMP \leftrightarrow e_S, M^{-2}$
$k_{eqR}$	constante de equilibrio para la reacción $ApoR + AR \leftrightarrow R, M^{-1}$
$k_{eqS}$	constante de equilibrio para la reacción $G_S + R \leftrightarrow G_{SR}, M^{-1}$
$k_H$	constante de reacción para la hidrólisis de trehalosa, $g_T/g_{TH} h$
$k_{PH}$	constante de reacción para la proteólisis de TH, $h^{-1}$
$k_{PS}$	constante de reacción para la proteólisis de TS, $h^{-1}$
$k_S$	constante de reacción para la síntesis de trehalosa, $g_T/g_{TS} h$
$k_1$	constante de reacción para la producción inducible de TS, $g_{TS}/g_x$
$k_2$	constante de reacción para la producción inducible de TH, $g_{TH}/g_x$
ME	modelación estructurada de la acumulación de trehalosa intracelular
NOD	neuro-observador dinámico para la acumulación de trehalosa intracelular
$p(\cdot)$	probabilidad del evento $(\cdot)$
$q_A$	velocidad específica intrínseca de síntesis de cAMP, M/h
$q_{ES}$	velocidad específica intrínseca de producción de TS, $g_{TS}/g_x h$
$q_{EH}$	velocidad específica intrínseca de producción de TH, $g_{TH}/g_x h$
$q_{HT}$	velocidad específica intrínseca de hidrólisis de trehalosa, $g_T/g_x h$
$q_{PS}$	velocidad específica intrínseca de proteólisis de TS, $g_{TS}/g_x h$
$q_{PH}$	velocidad específica intrínseca de proteólisis de TH, $g_{TH}/g_x h$
$q_{ST}$	velocidad específica intrínseca de síntesis de trehalosa, $g_T/g_x h$

$q_s$	velocidad específica de consumo de sustrato, $g/g \cdot h$
$R$	concentración intracelular de proteína represora R, M
RND	redes neuronales dinámicas
$SIGN$	función definida por la Ec. (3)
$sign$	función definida por la Ec. (4)
$s$	concentración de sustrato en el medio de cultivo del biorreactor, $g/L$
$s_0$	concentración de sustrato en la alimentación $f_v$ , $g_s/L$
TH	enzima trehalasa
TS	enzima trehalosa sintasa
$t$	tiempo, h
$u_i$	función de entrada a la NOD
UDPG	uridil-difosfo-glucosa
$v$	volumen del medio de cultivo en el biorreactor, L
$W_1, W_2$	matrices de ponderación del NOD (Ec. (19))
$w_{T,ME}$	fracción intracelular de trehalosa calculada por ME, $g_T/g_x$
$w_{T,NOD}$	fracción intracelular de trehalosa estimada por NOD, $g_T/g_x$
$w_{T,exp}$	fracción intracelular experimental de trehalosa, $g_T/g_x$
$w_{T,pred}$	predicción de la fracción intracelular de trehalosa, $g_T/g_x$
$x$	concentración de biomasa en el medio de cultivo del biorreactor, $g_x/L$
$\hat{x}_r$	estimador NOD
$Y_x$	rendimiento de biomasa en base a sustrato, $g_x/g_s$
$\hat{y}_i$	salidas de RND para los estados abióticos medidos
<b>Símbolos griegos</b>	
$\varphi(\cdot)$	función sigmoideal estándar
$\gamma(\cdot)$	función de control aplicada al NOD
$\mu$	velocidad específica de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , $h^{-1}$
$\sigma(\cdot)$	función sigmoideal estándar

## Referencias

Aranda, J.S., Salgado, E., Taillandier, P. (2004). Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling. *Biochemical Engineering Journal* 17; 129-140.

Aranda-Barradas, J.S. y Salgado-Manjarrez, E. (2002). Biomass production from *Saccharomyces cerevisiae* and uses in food industry. *Tecnología Alimentaria* 37, 7-15.

Cabrera, A., Poznyac, A., Poznyac, T. y Aranda, J. (2002). Identification of a fed-batch fermentation process: comparison of computational and

laboratory experiments. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24, 319-317.

Eturgay, N., Hamamci, H. y Bayindirli, A. (1997). Fed-batch cultivation of baker's yeast: effect of nutrient depletion and heat stress on cell composition. *Folia Microbiologica* 42, 214-218.

Lee, S.B. y Bailey, J.E. (1984a). Genetically structured models for lac Promoter-Operator function in the *Escherichia coli* chromosome and in multicopy plasmids: lac Operon function. *Biotechnology and Bioengineering* 26, 1372-1382.

Lee, S.B. y Bailey, J.E. (1984b). Genetically structured models for lac Promoter-Operator function in the *Escherichia coli* chromosome and in multicopy plasmids: lac Promoter function. *Biotechnology and Bioengineering* 26, 1383-1389.

Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., Gonzalez, B. y François J. (1999). Dynamic responses of reserve carbohydrates metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 191-203.

Parrou, J.L., Test, M.A. y François J. (1997). Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* 143, 1891-1900.

Poznyak, A.S., Sanchez, E.N. y Yu, W. (2001). *Dynamic Neural Networks for Nonlinear Control: Identification, State Estimation and Trajectory Tracking*. World Scientific, New Jersey.

Silljé, H.H.W., Paalman, J.W.G., ter Shure, E.G., Olsthoorn, S.Q.B., Verkleij, A.J., Boonstra, J. y Verrips, C.T. (1999). Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 181, 396-400.

Slaughter, J.C. y Nomura, T. (1992). Intracellular glycogen and trehalose contents as predictors of yeast viability. *Enzyme and Microbiology Technology* 14, 64-67.

Slotine, J.J.E. (1984). Sliding controller design for nonlinear systems. *International Journal of Control* 40, 421-434.

Thevelein, J.M. y Beullens, M. (1985). Cyclic AMP and the stimulation of trehalase activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by carbon sources, nitrogen sources and inhibitors of protein synthesis. *Journal of Genetics and Microbiology* 131, 3199-3209.

Zhang, J. y Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 407-421.