



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUOLA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIERÍA
INDUSTRIAL VALENCIA

Curso Académico:

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por apoyarme y darme esperanza en estos tiempos tan difíciles.

A mis amigos, por hacer que los momentos más estresantes durante este proyecto me lo tomara con humor.

A Jesús Picó, por hacer de su entusiasmo por la biología sintética y sus ganas de enseñar, mi principal vía de aprendizaje.

A Pablo Carbonell, por haber estado siempre ahí para ayudarme cuando los obstáculos y desafíos de esta encomienda se me hacían cuesta arriba.

Resumen

La producción de metabolitos mediante factorías celulares es clave en los sectores fármaco y nutracéutico. La optimización de la ruta metabólica exógena asociada a la producción de un metabolismo de interés es compleja, ya que altera el estado natural de la célula huésped, rompiendo los equilibrios óptimos que esta ha alcanzado vía evolutiva. En este contexto, los modelos celulares multi-escala que integran los aspectos relevantes del metabolismo celular y expresión genética endógenos, y los exógenos introducidos por la ruta a diseñar, aportan una herramienta muy útil para la optimización racional basada en modelo. En este TFG se abordará el diseño de un modelo Multi-escala en *E. coli* para la producción de fenilpropanoides de interés nutracéutico. En particular, se considerará el caso de la producción de naringenina. Se partirá de dos modelos ya existentes: uno del metabolismo central de carbono del microorganismo *E. coli*, y otro de la relación entre la expresión genética de las proteínas endógenas de la célula huésped, la síntesis de las enzimas exógenas y el crecimiento celular. En el TFG se analizará y desarrollará la forma adecuada de integrar ambos tipos de modelos, gestionando las interacciones e intercambio de información necesario entre ambos. Se considerará también la integración con la dinámica celular poblacional y la asimilación de sustratos extracelulares en el marco de un biorreactor. El modelo multi-escala desarrollado se utilizará para diseñar la política óptima de síntesis de las enzimas en la ruta de la naringenina.

Palabras Clave: Biología computacional, carga metabólica, expresión genética, rutas metabólicas, síntesis de metabolitos, modelado multi-escala

Resum

La producció de metabòlits per mitjà de factories cel·lulars és clau en els sectors farma- i nutracèutic. L'optimització de la ruta metabòlica exògena associada a la producció d'un metabolisme d'interés és complexa, ja que altera l'estat natural de la cèl·lula hoste, trencant els equilibris òptims que esta ha aconseguit via evolutiva. En este context, els models cel·lulars multi-escala que integren els aspectes rellevants del metabolisme cel·lular i expressió genètica endògens, i els exògens introduïts per la ruta a dissenyar, aporten una ferramenta molt útil per a l'optimització racional basada en model. En este TFG s'abordarà el disseny d'un model Multi-escala en *E. coli* per a la producció de fenilpropanoides d'interés nutracèutic. En particular, es considerarà el cas de la producció de naringenina. Es partirà de dos models ja existents: un del metabolisme central de carboni del microorganisme *E. coli*, i un altre de la relació entre l'expressió genètica de les proteuet

Paraules Clau: Biologia computacional, càrrega metabòlica, expressió genètica, rutes metabòliques, síntesi de metabòlits, modelatge multi-escala

Abstract

The production of metabolites through cellular factories is key in the pharmaceutical and nutraceutical sectors. The optimization of the exogenous metabolic pathway associated with the production of a metabolism of interest is complex, since it alters the natural state of the host cell, breaking the optimal equilibrium that it has reached in its evolutionary path. In this context, multi-scale cell models that integrate the relevant aspects of endogenous cellular metabolism and gene expression, and the exogenous ones introduced by the pathway to be designed, provide a very useful tool for rational model-based optimization. This TFG will address the design of a multi-scale model in *E. coli* for the production of phenylpropanoids of nutraceutical interest. In particular, the case of naringenin production will be considered. It will start from two existing models: one of the central carbon metabolism of the microorganism *E. coli*, and the other of the relationship between the genetic expression of endogenous proteins of the host cell, the synthesis of exogenous enzymes and cell growth. The TFG will analyze and develop the appropriate way to integrate both types of models, managing the interactions and exchange of information necessary between both. Integration with population cell dynamics and the assimilation of extracellular substrates in the framework of a bioreactor will also be considered. The multi-scale model developed will be used to design the optimal synthesis policy for the set of enzymes in the naringenin pathway.

Keywords: Computational biology, metabolic load, genetic expression, metabolic routes, metabolic synthesis, multi-scale modeling

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS DEL TRABAJO FÍN DE GRADO

1) Documento Memoria: Documento que recoge la descripción y justificación de la solución de diseño adoptada, junto con un estudio económico.

2) Documento de Planos: Documento que agrupa el diagrama de flujos del modelo celular multi-escala diseñado .

3) Presupuesto: Documento que agrupa todos los costes asociados a la realización del proyecto.

DOCUMENTO MEMORIA

Índice general

1. Objetivo del proyecto	12
2. Introducción	13
2.1. Antecedentes	13
2.1.1. Fundamentos de la biología sintética	13
2.1.1.1. Ingeniería metabólica	14
2.1.2. La revolución de la experimentación <i>in silico</i>	15
2.1.2.1. Modelos estequiométricos	15
2.1.2.2. Modelos de carga metabólica	16
2.1.2.2.1. Modelado multiescala	18
2.2. Motivación y justificación	18
2.2.1. Necesidad de optimización de la ruta metabólica exógena	18
2.2.2. ¿Por qué <i>Escherichia Coli</i> ?	19
2.2.3. Importancia de los flavonoides	19
2.2.3.1. La naringenina, un compuesto excepcional	20
3. Materiales y métodos	22
3.1. Descripción de los submodelos celulares elegidos	22
3.1.1. Modelo estequiométrico iAF1260	22
3.1.2. Modelo de carga metabólica	22
3.2. Descripción del diseño de la solución	25
3.2.1. Programación de la ruta exógena de la naringenina	25

3.2.2. Integración de la ruta exógena con el modelo iAF1260	25
3.2.3. Integración del modelo estequiométrico con el modelo de carga	27
4. Resultados y discusión	28
5. Normativa	35
6. Ámbito de aplicación , rango de soluciones del trabajo y propuestas de mejora	36
7. Estudio económico y presupuesto	38
7.1. Estimación de los costes de explotación	38
7.2. Cálculo de precio de venta unitario	40
8. Impacto del proyecto	42
9. Planificación del Proyecto	44
10.Líneas futuras	49
11.Conclusiones	52
Bibliografía	53
12.Anejo	56
12.1. Cálculos y ecuaciones	56
12.2. Tablas	58

Índice de figuras

2.1. Técnica del ARN recombinante en bacterias [4]	14
2.2. Ejemplos de restricciones que se aplican en modelos estequiométricos.[6]	16
2.3. Diferentes aplicaciones de los modelos estequiométricos.[6]	17
2.4. La naringenina.[16]	20
2.5. Ruta metabólica de la naringenina.[17]	21
3.1. Metabolismo central de E. Coli.[18]	23

3.2. Estructura del modelo iAF1260 en MATLAB (COBRA toolbox).	24
3.3. Esquema del modelo de carga metabólica. [7]	24
4.1. FVA en condiciones naturales de crecimiento	28
4.2. FVA para diferentes limitaciones de crecimiento de la célula.	29
4.3. Disponibilidad de L-tirosina en función del crecimiento.	30
4.4. (superior) Flujo de tirosina, (inferior) tasa de crecimiento, para diferentes valores de flujo de oxígeno disponible	31
4.5. Flujo de naringenina para diferentes valores de fortaleza de RBS (K_{Co}^A), promotor ($N_A\omega_A$) y sustrato f(si) (se ha partido de valores de fortaleza medios para proteínas no ribosomales). Los símbolos negros (cuadrado, rombo) corresponden a los valores medios de $N_A\omega_A$, K_{Co}^A (si) para proteínas ribosomales y no ribosomales respectivamente. El símbolo blanco corresponde al valor de $N_A\omega_A$, K_{Co}^A (si) para sustrato saturado.	32
4.6. Flujo de naringenina para diferentes valores de fortaleza de RBS (K_{Co}^A), promotor ($N_A\omega_A$) y sustrato f(si). En este caso los rangos fortaleza del promotor son 10000 veces más altos que los de una proteína no ribosomal común.	33
4.7. Flujo de naringenina y crecimiento para diferentes valores promotor ($N_A\omega_A$) y sustrato f(si).	33
4.8. Flujo de naringenina y crecimiento para diferentes valores promotor ($N_A\omega_A$) y sustrato f(si).	34
4.9. Flujo de naringenina y crecimiento para diferentes valores de fortaleza de RBS (K_{Co}^A) y sustrato f(si).	34
7.1. Punto de equilibrio. [6]	41

Capítulo 1

Objetivo del proyecto

Este trabajo Fín de Grado tiene los siguientes objetivos:

1) Servir como predictor de producción robusto y preciso en factorías celulares, permitiendo así conocer los parámetros que se deben ajustar y en que porcentaje para una mejora de la productividad, mediante una política de expresión enzimática óptima, reduciendo en gran medida el costo y tiempo asociado a ensayos en el biorreactor.

2) Ayudar a conocer el efecto que produce en el rendimiento del producto final la modificación de parámetros celulares, difíciles de analizar experimentalmente a escala macroscópica poblacional.

En este proyecto se ha conseguido desarrollar un modelo que estima el flujo de naringenina en un cultivo celular en el marco de un biorreactor para *Escherichia Coli* para diferentes combinaciones de los dos parámetros controlables en el laboratorio: la fortaleza de RBS (*Ribosome Binding Site*) y de promotor.

También es capaz de mostrar las relaciones existentes de estos parámetros con la tasa de crecimiento, el flujo de las reacciones intracelulares y sus metabolitos involucrados.

Capítulo 2

Introducción

2.1. Antecedentes

2.1.1. Fundamentos de la biología sintética

A lo largo de la historia, la obtención de sustancias de interés farmacológico o nutracéutico con potenciales beneficios para la salud, estaba limitado a los productos que se podían procesar principalmente de nuestro entorno inmediato, esencialmente plantas o animales, y en las cantidades limitadas que estos eran capaces de producir.

En la actualidad, gracias al desarrollo de la química orgánica, somos capaces de aumentar tanto la diversidad como la cantidad de estas sustancias que somos capaces de producir, sin embargo, muchas veces requiere de procesos con solventes tóxicos y condiciones químicas extremas , que pueden limitar sus aplicaciones. [1]

Otra de las tecnologías emergentes para la producción de metabolitos de interés es la surgida a partir de la aplicación de los principios derivados de la fermentación ,que ayudado con el vertiginoso desarrollo de la biología sintética desde el siglo XX, ha logrado aumentar tanto la diversidad como la cantidad de estos productos que somos capaces de producir adaptándolo a las crecientes demandas de la población, que con los procedimientos tradicionales serían insuficientes.

La gran eficiencia de producción de las factorías celulares , capaces de convertir substratos de poco coste en productos de alto valor añadido han supuesto una revolución industrial que esta en constante desarrollo y que aumentan la productividad comparado con los métodos anteriormente mencionados significativamente. [2]

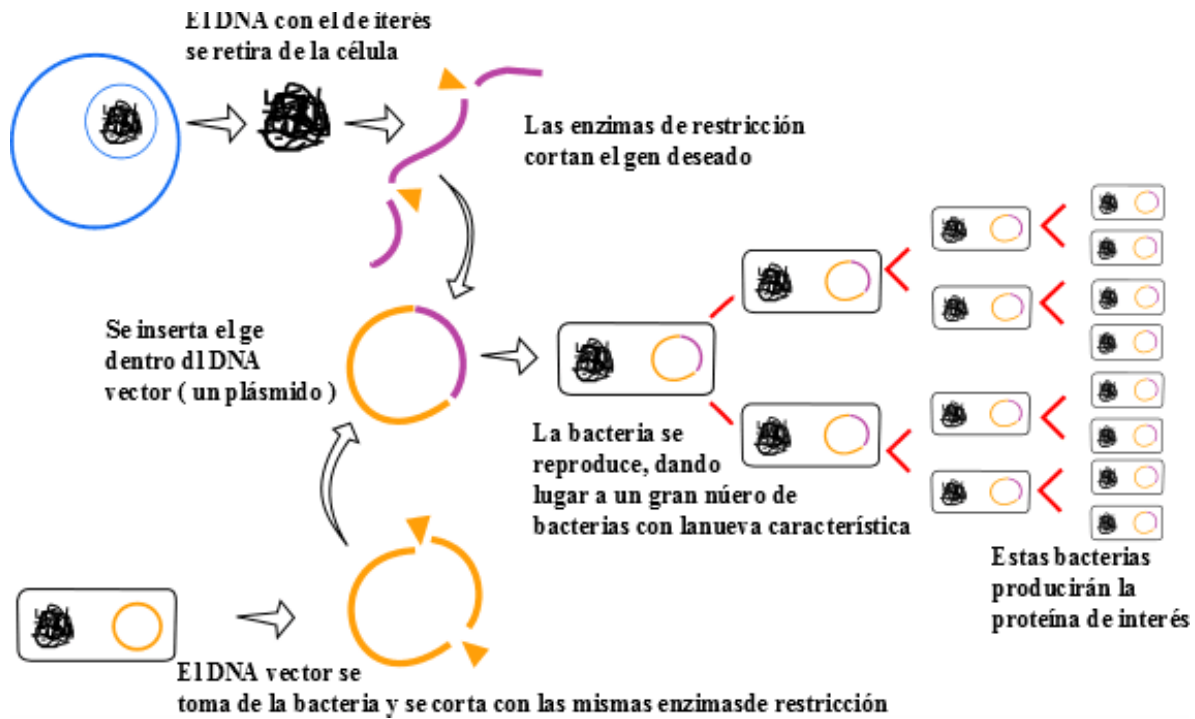


Figura 2.1: Técnica del ADN recombinante en bacterias [4]

2.1.1.1. Ingeniería metabólica

El mayor conocimiento progresivo de la biología molecular ha permitido a partir de la década de los 90 el desarrollo de una ciencia, llamada ingeniería metabólica, que consiste en la producción en organismos, mayoritariamente unicelulares, de vías bioquímicas exógenas que no se encuentran de forma natural.

Esto se realiza mediante la modificación de la información genética del huésped, que causará con su expresión la producción de la proteína de interés. Por lo general, esta modificación se lleva a cabo mediante la creación de vectores de clonación por técnicas de ADN recombinante que llevan insertados los genes de interés. (ver Figura 2.1)

Hay diferentes tipos de vectores, como los plásmidos o los bacteriófagos, y cuando se introducen en el organismo de interés, este usará sus recursos celulares para la expresión del mismo. La cantidad de recursos que utilizará para dicha expresión vendrá dado por diversos factores: la tasa de transcripción y la facilidad de acople de los ribosomas al ARN mensajero en la traducción (Ribosome Site Strength). [3]

2.1.2. La revolución de la experimentación *in silico*

El avance de la capacidad de computo mediante ordenador debido al creciente desarrollo de microprocesadores cada vez más potentes ha permitido que en la actualidad seamos capaces de simular el funcionamiento de sistemas enormemente complejos, como es el de los seres vivos, de forma detallada y reproducible *in vivo* o *in vitro*.

Este tipo de experimentación supone grandes ventajas: permite reducir costes, aumenta la reproducibilidad de resultados al reducir el error asociado a la técnica de medición y variabilidad entre laboratorios; facilita la labor de difusión en la comunidad científica o reduce problemas éticos relacionados con la experimentación en seres vivos. [5]

Entre sus aplicaciones se encuentran estudios de toxicología, estudio de los efectos de fármacos o predicción de producción de metabolitos de interés en organismos modificados por ingeniería genética.

2.1.2.1. Modelos estequiométricos

Uno de los modelos de experimentación *in silico* más ampliamente usado en biología sintética es el estequiométrico. Estos modelos representan las rutas metabólicas del organismo a estudiar de forma computacional, siendo capaces de resolver de forma numérica los flujos que se producirán, atendiendo a una función objetivo. Aunque hay varias metodologías, los fundamentos son los siguientes:

Existe una matriz \mathbf{S} que recoge los coeficientes estequiométricos de los metabolitos \mathbf{n} (en filas) para cada una de las reacciones \mathbf{m} (columnas):

Por ejemplo, si tenemos cuatro metabolitos $\mathbf{C1}, \mathbf{C2}, \mathbf{C3}, \mathbf{C4}$ involucrados en 2 reacciones $\mathbf{R1}$ Y $\mathbf{R2}$ de la siguiente manera



Entonces la matriz estequiométrica \mathbf{S} sería;

$$S = \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 4 & 9 \\ 5 & -3 \\ -6 & 2 \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

Constraint	Type	Mathematical formulation
Systemic stoichiometry	Nonadjustable	$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = 0$ (the general equation)
Irreversibility of fluxes	Nonadjustable	$v > 0$
Enzyme/transporters capacities	Nonadjustable	$v < v_{\max}$
Measured fluxes	Adjustable	$v = v_m$ or $v_{m,\min} < v < v_{m,\max}$
Regulatory constraints	Adjustable	Example: $v_1 = 0$ if $(v_2 \neq 0)$
Kinetic constants	Adjustable	$v = k \cdot C_m$

C_m , Measured concentration.

Figura 2.2: Ejemplos de restricciones que se aplican en modelos estequiométricos. [6]

Si se producen flujos de estas reacciones, entonces aparece otra matriz \mathbf{v} llamada matriz de flujos intracelulares y debido al balance de masas, determinamos que:

$$\frac{d\mathbf{x}}{dt} = S\mathbf{v} - \mu\mathbf{x} \quad (2.4)$$

donde \mathbf{x} es la matriz de concentraciones de los metabolitos en cada instante de tiempo y μ es el parámetro de crecimiento específico de la célula.

Cuando se alcance el equilibrio de concentraciones de metabolitos, y teniendo en cuenta que el término $\mu \mathbf{x}$ es mucho más pequeño que el de la dinámica de flujos y se puede despreciar, entonces:

$$S\mathbf{v} = 0 \quad (2.5)$$

Donde el conjunto de soluciones de \mathbf{v} serán los distintos estados de flujos posibles para la célula.

Asumiendo la independencia lineal de \mathbf{S} y como generalmente $n > m$, la expresión [2.5] es un sistema homogéneo de ecuaciones lineales indeterminado.

Para resolver el problema de la indeterminación, lo que se usa generalmente son una serie de restricciones que se añaden al sistema que limita los posibles comportamientos de la célula. (Ver figura [2.2])

Dependiendo de la aplicación concreta se usarán unas u otras restricciones. Existen metodologías centradas en caracterizar todos las posibles distribuciones de flujo, y otras en encontrar el flujo actual del sistema. (ver Figura [2.3])

2.1.2.2. Modelos de carga metabólica

Los modelos estequiométricos asumen un estado pseudoestable de los metabolitos internos, hipótesis apoyada por el hecho de que la dinámica intracelular es mucho más rápida que la extracelular. [6]

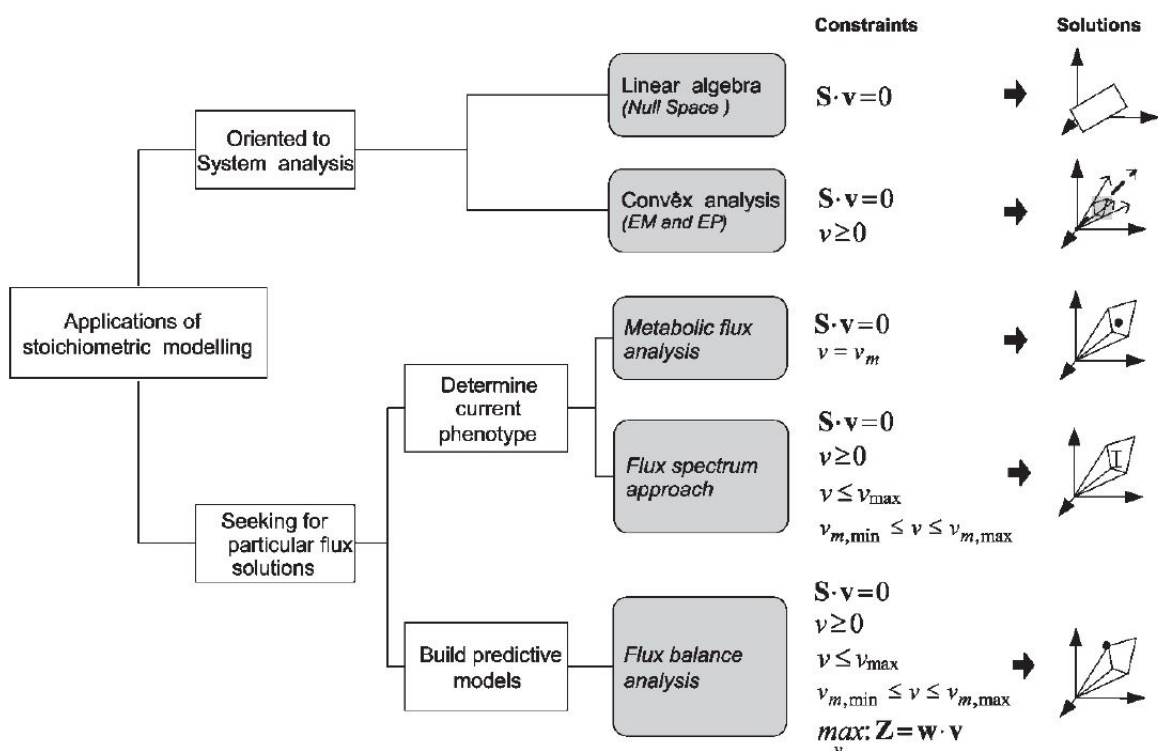


Figura 2.3: Diferentes aplicaciones de los modelos estequiométricos. [6]

Esta necesidad nace por el hecho de que los mecanismos intracelulares tienen una alta complejidad y han sido hasta recientemente más difíciles de simular.

Sin embargo, en la actualidad están empezando a surgir modelos que tienen en cuenta dichos mecanismos intracelulares, llamados de "carga metabólica" que ayudan a facilitar el diseño de circuitos genéticos sintéticos con la política óptima de la síntesis de enzimas de la ruta exógena.

Estos modelos tienen en cuenta que los recursos intracelulares, como el ARN polimerasa o los ribosomas, son limitados, y que introducir genes que provocan una carga metabólica sintética dedicada a la fabricación de las proteínas de interés, causará la disminución potencial de crecimiento de la célula, por no poder destinar recursos suficientes a esta función, lo cual si no lo tenemos en cuenta, afectará al rendimiento de producción del compuesto de interés.

Por otro lado estos modelos también tienen la capacidad de tener en cuenta la dinámica poblacional y la asimilación de sustratos extracelulares. [3] [7]

2.1.2.2.1. Modelado multiescala La integración de los modelos estequiométricos y de carga metabólica permiten en el diseño de rutas metabólicas exógenas tener en cuenta tanto la expresión genética de las proteínas endógenas de la célula huésped, como la síntesis de las enzimas de interés y el crecimiento celular.

Esta visión global permite optimizar la productividad de la sustancia objetivo optimizando el balance entre carga de recursos destinados a la ruta exógena en la célula huésped y el crecimiento celular. [7]

2.2. Motivación y justificación

2.2.1. Necesidad de optimización de la ruta metabólica exógena

Hasta ahora, los modelos usados para el diseño de rutas metabólicas exógenas han sido principalmente estequiométrico, como hemos comentado en los apartados anteriores.

Los problemas que esto produce es que los parámetros accesibles desde laboratorio en el potencial de expresión de las proteínas de interés: la fortaleza de promotor y del RBS (introducidas en el apartado anterior) que son óptimas para el balance entre crecimiento y producción de naringenina en el huésped, no se conocen con precisión.

Esto causa procesos de diseño de circuitos sintéticos ineficientes y largos basados en iteraciones de prueba y error. [3]

2.2.2. ¿Por qué Escherichia Coli?

Par tener una productividad de síntesis de sustancias de interés industrial que sea aceptable, necesitamos un organismo huésped que cumpla distintas características: alta tasa de crecimiento, facilidad de creación de células competentes, que tenga simplicidad genómica, que no necesite condiciones especiales de tratamiento y que sean tóxicas para el ser humano.

Así, aunque hay varias especies e incluso diferentes reinos de seres vivos que pueden cumplir parte de estas características, gran parte de la actividad de factorías celulares se realiza con Escherichia Coli.

Esto se debe a que su tasa de crecimiento es extraordinario (aproximadamente 1 generación por cada 20 minutos), además tiene un genoma simple (4 400 genes frente a los casi 30 000 que tiene por ejemplo el ser humano) y muy bien estudiado que hace que las técnicas de ADN recombinante sean sencillas. Por otro lado, el convertir células de E. Coli estándar en células competentes que adquieran los plásmidos sintéticos (vectores de clonación) es sencillo y la tasa de éxito es alta.

Por otro lado, debido a que esta bacteria vive normalmente en intestino humano, soporta muy bien las condiciones de laboratorio a una temperatura fácil de mantener de 36 °C. También presenta la ventaja de que la mayoría de cepas son inócuas para el ser humano. [8]

2.2.3. Importancia de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se encuentran de forma natural en frutas, verduras, semillas y curiosamente, también en bebidas fermentadas como la cerveza. Diversos estudios han demostrado su gran importancia como agentes antivirales, antialérgicos, anti-inflamatorios, antioxidantes y ayudan a protegernos de enfermedades cardíacas, cancerígenas, gracias a que evitan la formación de radicales libres. [9] Recientemente también se ha descubierto su efecto terapéutico anti-asmático. [10]

Así, hay un interés creciente por la fabricación de estos tipos de compuestos, concretamente de los llamados flavononas-(2S): la naringenina, la pinocembrina, el eriodictiol y el homoeriodictiol.

De forma natural, la producción de flavonoides se basa en su extracción de una gran diversidad de plantas, sin embargo, este tipo de fuente tiene un rendimiento bajo, difícil

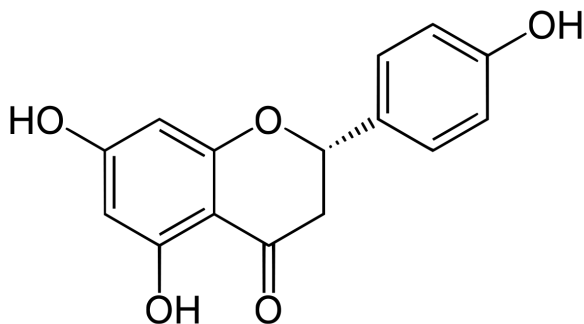


Figura 2.4: La naringenina. [16]

de cubrir las demandas actuales, sujeto además a la impredecibilidad de la cosecha y la necesidad de purificaciones posteriores hacen que el coste de producción sea elevado. [11]

La otra fuente de producción industrial de flavonoides es mediante síntesis química *de novo*. Aunque con esta técnica el rendimiento es mayor, requiere el uso de solventes tóxicos y condiciones de reacciones químicas difícil de conseguir. Esto limita sus posibles aplicaciones, al ser una producción poco respetuosa con el medio ambiente. [12]

Así, la producción de estos compuestos por factorías celulares posee gran atractivo, por aumentar el rendimiento y eliminar las desventajas específicos de la síntesis química. [13], habiéndose conseguido producir concentraciones excepcionales: 898 mg/l para la naringenina, 55 mg/l para la pinocembrina, 55 mg/l para el eriodictiol o 17 mg/l para el glicerol. [1]

2.2.3.1. La naringenina, un compuesto excepcional

Dentro de los flavonoides, la naringenina (ver figura 2.4) destaca por sus extraordinarias propiedades: a parte de las ya mencionadas anti-oxidantes y radioprotección, hay evidencia de su capacidad para reducir el colesterol [14] y prevenir la obesidad [15] y porque su ruta metabólica de obtención ha sido bien estudiada. (ver Figura 2.5)

Así, en este TFG nos centraremos en el diseño de un modelo multiescala para la producción sintética de naringenina que integre los aspectos relevantes del metabolismo celular y de la expresión genética, a partir un modelo estequiométrico y de carga metabólica respectivamente. Además el modelo tendrá en cuenta la dinámica poblacional y la asimilación de sustrato en el marco de un biorreactor.

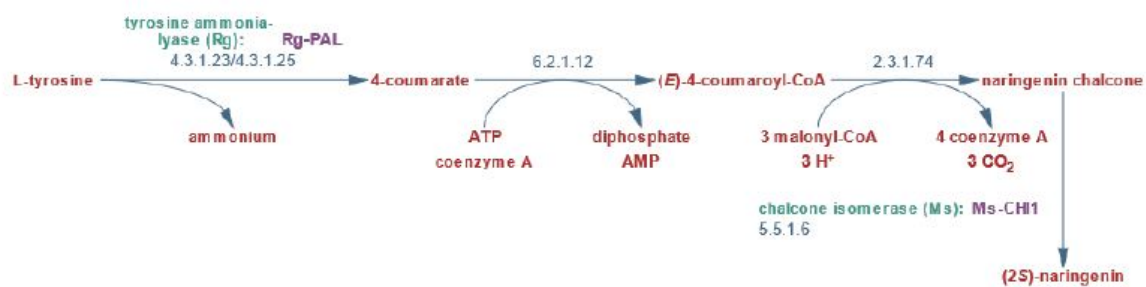


Figura 2.5: Ruta metabólica de la naringenina. [17]

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Descripción de los submodelos celulares elegidos

3.1.1. Modelo estequiométrico iAF1260

Como hemos comentado en el capítulo anterior, en este TFG se ha partido de dos modelos previos que dan información complementaria del comportamiento de la célula.

El modelo estequiométrico de partida usado en este proyecto es el iAF1260 de la base de datos BiGG. Este modelo es una reconstrucción de la red metabólica de *E. coli* K-12 MG1655 y consta de 1688 metabolitos y 2382 reacciones. (Ver figura [3.1](#) y [3.2](#))

La plataforma para trabajar con el modelo ha sido MATLAB con el complemento COBRA , (CO Nstraint-Based Reconstruction and Analysis Toolbox) el cual permiter hacer predicciones cuantitativas de redes bioquímicas celulares con modelos basados en restricciones.

3.1.2. Modelo de carga metabólica

El modelo de carga metabólica de partida, fue el desarrollado por el Instituto de Automática e Informática Industrial de la UPV [7](#), el cual simula el comportamiento de una célula en el marco de un biorreactor, y establece las relaciones entre substrato, tasa de crecimiento, carga celular y reclutamiento de recursos por la ruta exógena. (ver Figura [3.3](#))

Este modelo, además de representar la dinámica de expresión de las células endóge-

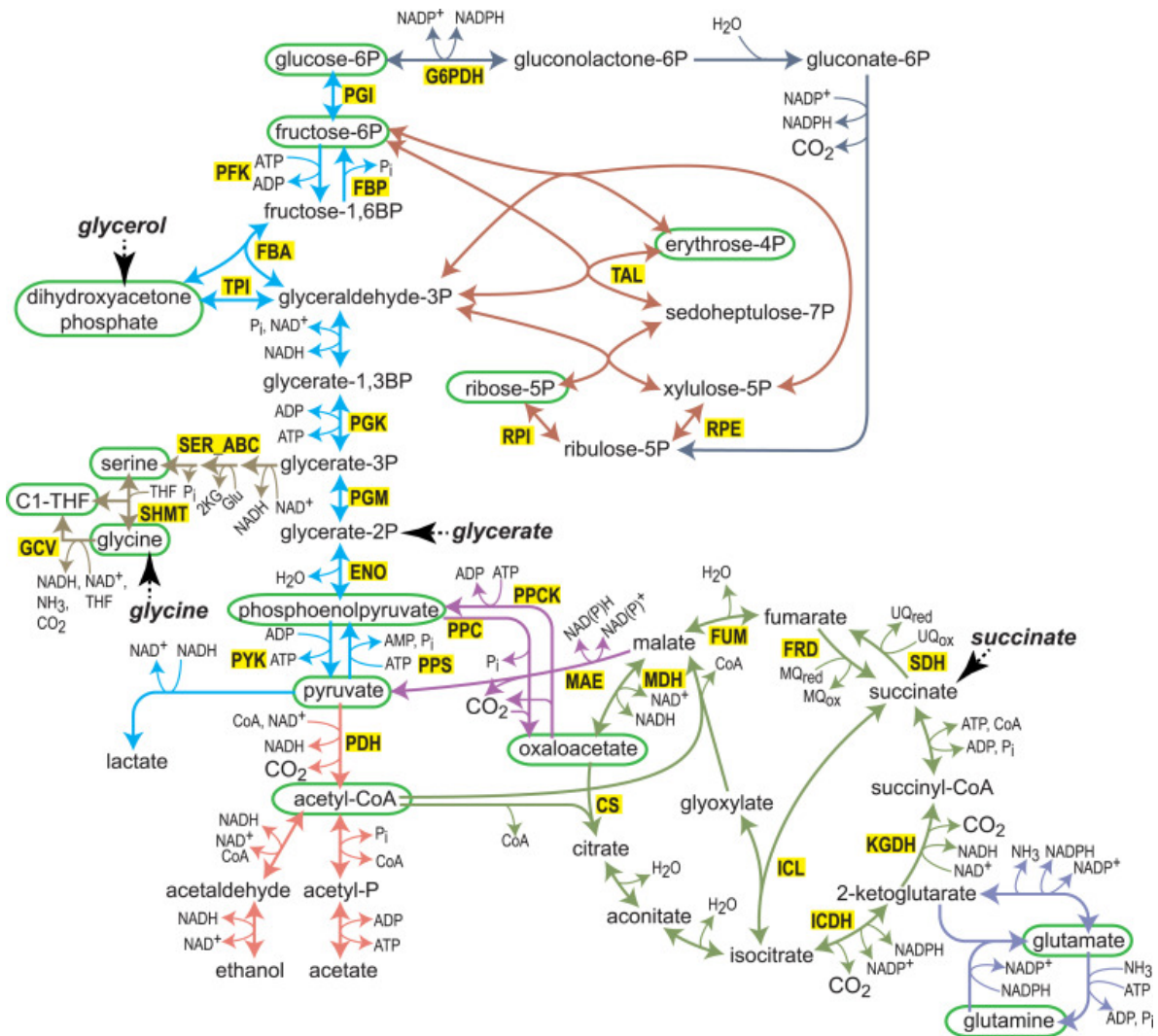


Figura 3.1: Metabolismo central de *E. Coli*. [18]

Field	Value
mets	1668x1 cell
metNames	1668x1 cell
metFormu...	1668x1 cell
metCharge	1668x1 double
genes	1261x1 cell
rxnGeneMat	2382x1261 sp...
grRules	2382x1 cell
rxns	2382x1 cell
rxnNames	2382x1 cell
subSystems	2382x1 cell
S	1668x2382 d...
lb	2382x1 double
ub	2382x1 double
b	1668x1 double
c	2382x1 double
rev	2382x1 int64
description	'iAF1260'

Figura 3.2: Estructura del modelo iAF1260 en MATLAB (COBRA toolbox).

nas de la célula, permite también simular cuál sería el efecto en el crecimiento y en la distribución de recursos intracelulares (ARNm y ribosomas) la introducción de un gen sintético que .obligue.^a la célula a dedicar parte de estos a la producción de un proteína genérica de interés.

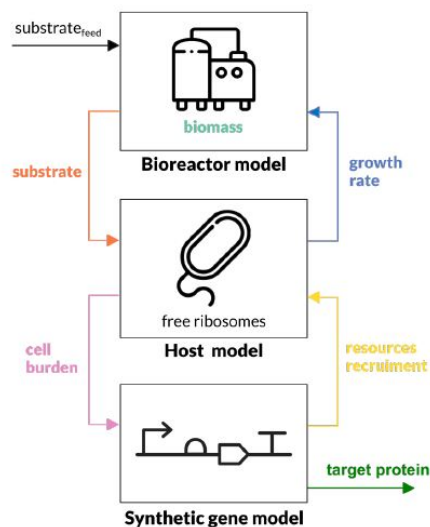


Figura 3.3: Esquema del modelo de carga metabólica. [7]

3.2. Descripción del diseño de la solución

3.2.1. Programación de la ruta exógena de la naringenina

El modelo de iAF1260 original solo incluye el metabolismo básico de Escherichia Coli, por lo que para simular cual sería la producción de naringenina cuando se modificara genéticamente a la célula, lo que se propuso en este trabajo es desarrollar un modelo bioquímico que recoja dicha ruta, mediante la cinemática de Michaelis Mendel, con las siguientes características:

Si la concentración de substrato es mucho mayor que la concentración de enzima $[S] \gg [E]$, entonces :

$$V_{max} = k_{cat} * [E] \quad (3.1)$$

y la velocidad de formación de producto será:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (3.2)$$

Por otro lado, Los parámetros K_m y k_{cat} de las enzimas que participan en la ruta de la naringenina son los de la Tabla [12.2](#) del Anexo).

3.2.2. Integración de la ruta exógena con el modelo iAF1260

Tras tener desarrollado en Matlab dicho modelo enzimático, se procedió a integrarlo con el modelo estequiométrico iAF1260.

Para ello se decidió que la variables de entrada del modelo enzimático sería el flujo de precursor y la tasa de crecimiento asociada provenientes del iAF1260. Como la cantidad de precursor (l-tirosina) disponible variará en función del que se esté utilizando para funciones de crecimiento, se hipotetizó que a mayor crecimiento, menor será el precursor disponible.

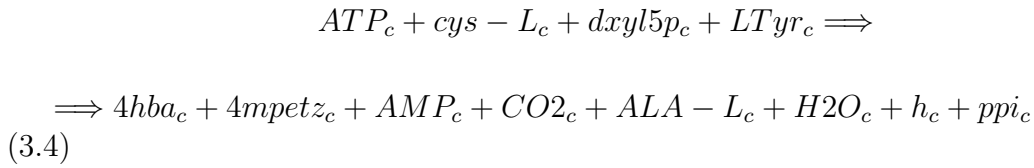
Para validar la hipótesis se realizó un Análisis de Variabilidad de Flujo (FVA), el cual consiste en conocer todos los valores posibles de un flujo para una reacción concreta donde se cumpla la ecuación [2.5](#). Matemáticamente:

$$\mathbf{v}_j^{superior} / \mathbf{v}_j^{inferior} = \max_v / \min_v v_j$$

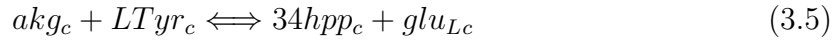
donde se cumpla $\mathbf{Sv}=0$ (3.3)

Para conocer el flujo de precursor, obtuvimos todas las reacciones donde actúa la L-tirosina, que fueron las siguientes:

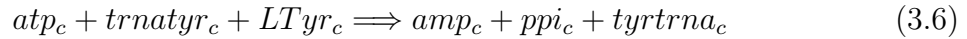
Síntesis de fosfato de tiazol



Tirosina transaminasa



Tirosil-tRNA sintetasa



Transporte reversible de L-tirosina a través del simportador de protones (periplasma)



Función objetivo de biomasa

Esta es la reacción del modelo que estima la tasa de crecimiento. No es una reacción como tal, si no que aglomera varias subreacciones. El coeficiente estequiométrico para la L tirosina es de -0.13 (se consume).

NOTA: el subíndice c indica que el metabolito se encuentra en el citosol y p en el periplasma.

Así, el flujo máximo de L-tirosina se produciría cuando todas las reacciones anteriores tuvieran un flujo mínimo, excepto la [3.7](#), que debería ser máxima.

3.2.3. Integración del modelo estequiométrico con el modelo de carga

Una vez que se había podido obtener con el modelo estequiométrico la relación entre el flujo de precursor para distintos valores de crecimiento, y también para diferentes valores de sustrato, se procedió a integrarlo con el modelo de carga metabólica.

Para ello se tuvo que solucionar algunos obstáculos , como la homogeneización de las unidades de medida y la relación entre distintas variables equivalentes entre los modelos (ver sección Cálculos del Anexo).

También se tuvo que incluir en el modelo de integración los valores de longitud de enzimas (en número de aminoácidos) que se extrajo de la base de datos BRENDA y hacer la suposición de que el gen sintético tenía la misma fortaleza de promotor y RBS para la expresión de las 5 enzimas de la ruta, es decir , que se comportaba como 5 copias del mismo gen.

Todo el código utilizado en este proyecto se encuentra disponible en: <https://gitlab.com/synbiotech/m/tree/master>

Capítulo 4

Resultados y discusión

Disponibilidad de sustrato en función del crecimiento de la célula

Por un lado realizamos un FVA sin limitar la tasa de crecimiento de la célula, el cual dió los resultados mostrados en la figura 4.1. Este experimento se realizó con unas condiciones de contorno de aporte de externo O_2 de $18.5 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y de glucosa de $8 \text{ mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

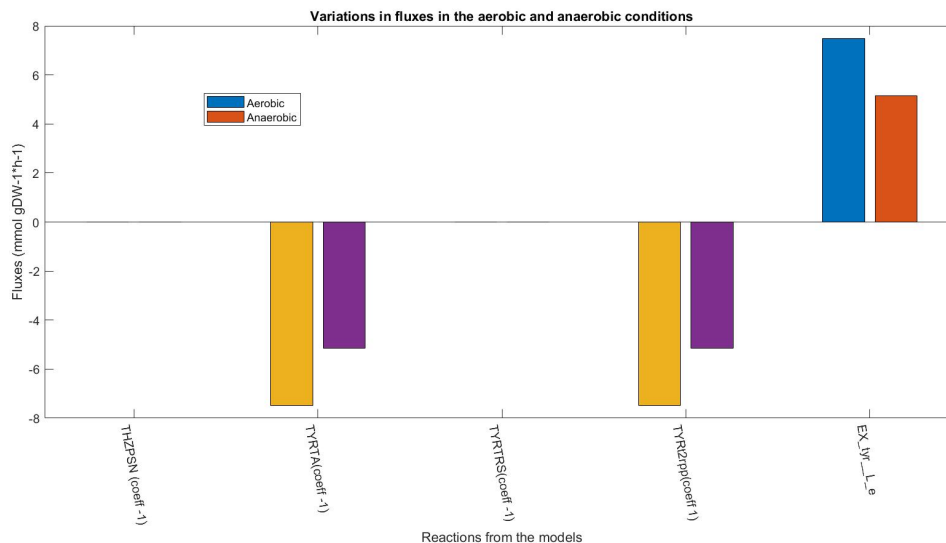


Figura 4.1: FVA en condiciones naturales de crecimiento

Después, aplicamos el FVA para distintas limitaciones de crecimiento, y el resultado fue el de la Figura 4.2

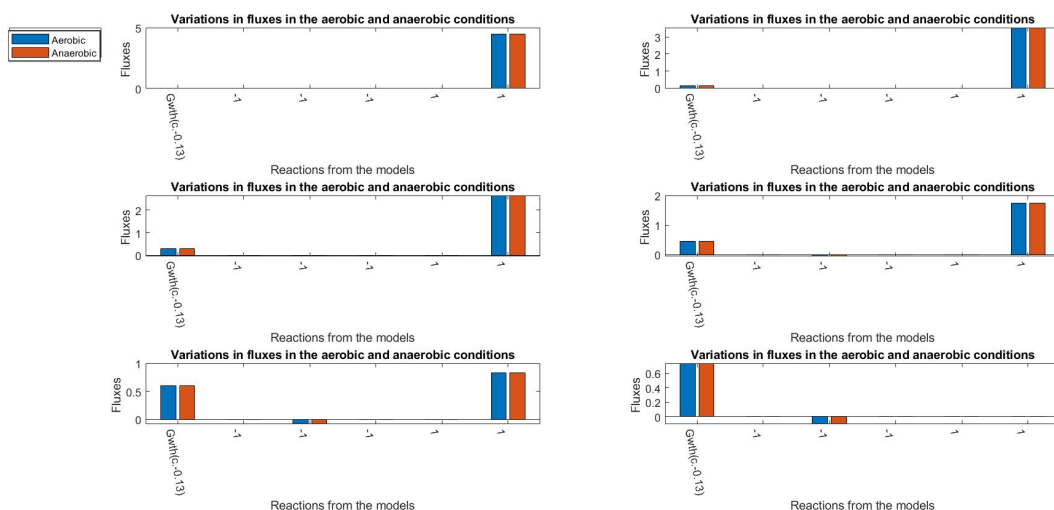


Figura 4.2: FVA para diferentes limitaciones de crecimiento de la célula.

Así, obtuvimos que la disponibilidad de L-tirosina en función del crecimiento (ver figura 4.3).

Tal y como habíamos supuesto con nuestra hipótesis inicial, el flujo de precursor l-tirosina disponible, disminuye conforme aumenta la tasa de crecimiento, ya que este se consume en dicha reacción. Dicha disminución alcanza un valor mínimo cuando la tasa de crecimiento es $0.73 h^{-1}$, ya que es el límite fisiológico natural de crecimiento celular.

Sin embargo, dicho flujo es mucho mayor que lo que se establece en la literatura de *Escherichia Coli*, que estaría en torno a $20000 \frac{\text{moleculas}}{\text{minuto}}$ [19]. La tasa de crecimiento máxima si estaría entre los valores descritos en bibliografía para la cepa MG1456 (ver la sección Tablas en el Anejo)

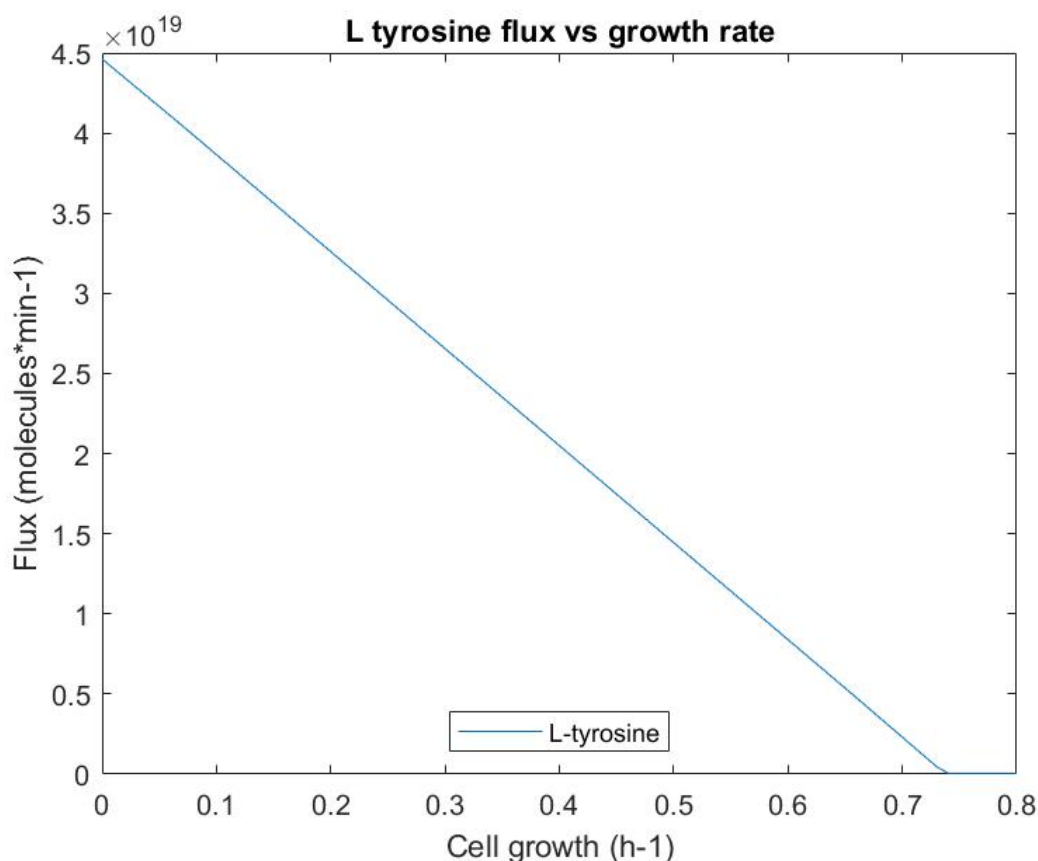


Figura 4.3: Disponibilidad de L-tirosina en función del crecimiento.

Disponibilidad de sustrato en función de las condiciones aeróbicas

Para diferentes flujos de oxígeno, se estudió la disponibilidad de l-tirosina y tasa de crecimiento. Los resultados se muestran en la figura [4.3](#).

Se ha interpretado que el motivo por el cual el flujo de tirosina aumenta linealmente al hacerlo el oxígeno disponible es porque la reacción de producción de este, el transporte reversible de L-tirosina a través del simportador de protones, cuya reacción es [3.7](#) necesita de protones, los cuales están involucrados a su vez en gran cantidad de reacciones (concretamente 2366) de las cuales en las que este compuesto se crea, numerosas necesitan oxígeno.

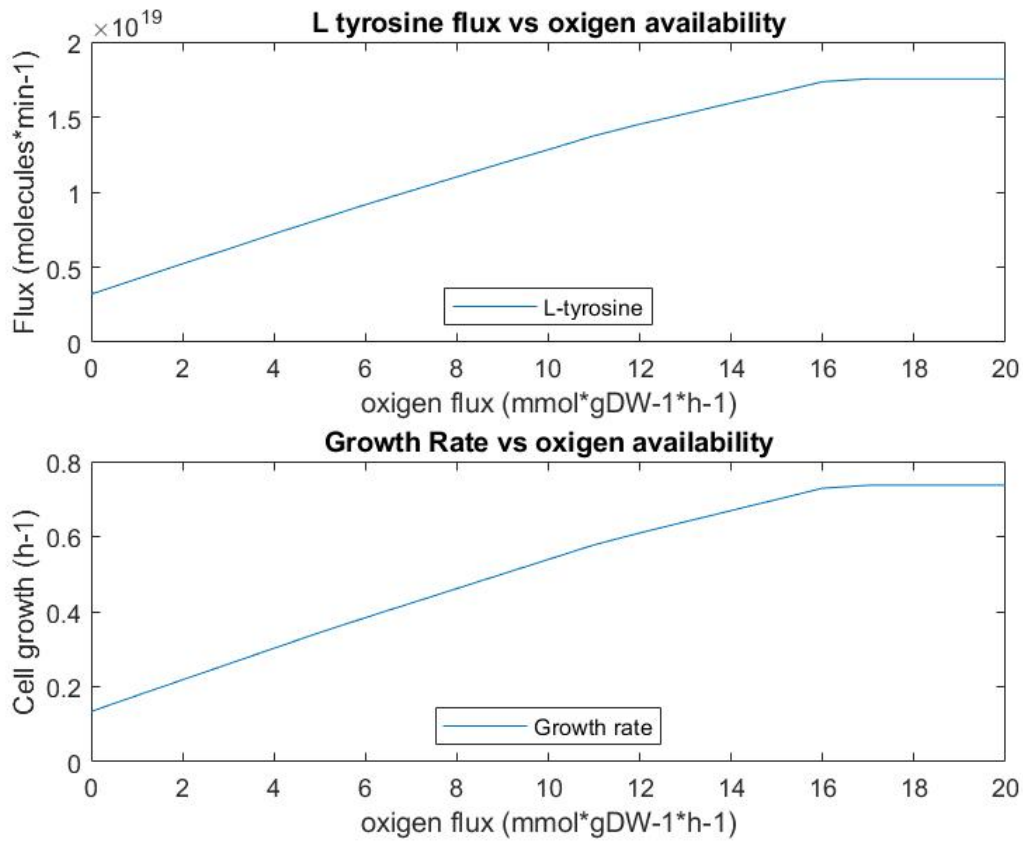


Figura 4.4: (superior) Flujo de tirosina, (inferior) tasa de crecimiento, para diferentes valores de flujo de oxígeno disponible

Producción de naringenina para diferentes cantidades de sustrato e intensidades de actividad del RBS , promotores

Como podemos ver en la figura [4.5](#), la política óptima de expresión de enzimas exógenas no debe ser maximizar la avidéz, J_a , del gen sintético (que viene dado por valores crecientes de fortaleza de promotor y RBS) , si no que para obtener la máxima productividad de naringenina, estos deben encontrarse en valores intermedios (área amarilla).

Además, podemos observar que en cuanto a la relación entre sustrato y producción

de naringenina, la información contenida en las figura 4.4 y 4.5 es coherente, ya que , a mayor sustrato (O2,glucosa) el modelo predice un mayor flujo de precursor, y por tanto mayor producción de naringenina.

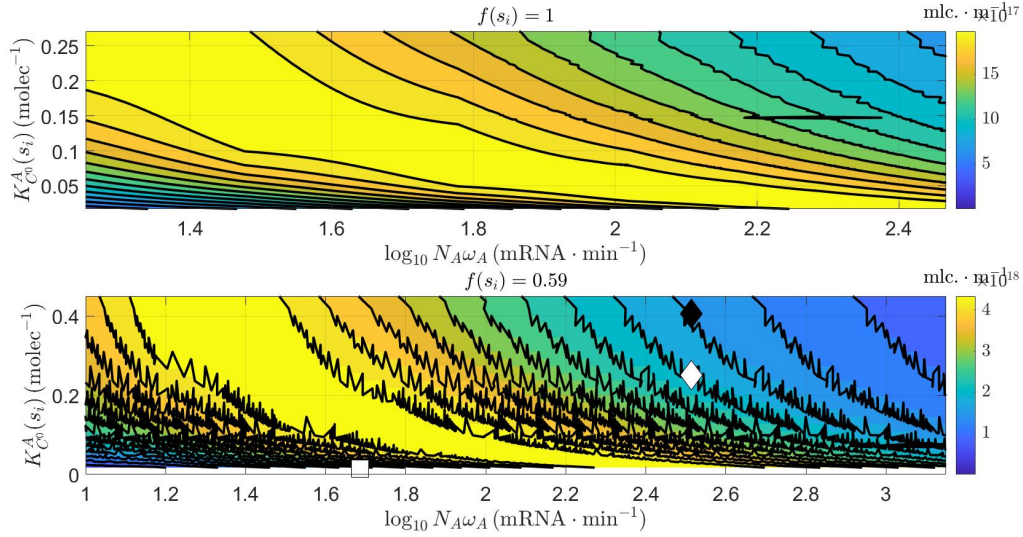


Figura 4.5: Flujo de naringenina para diferentes valores de fortaleza de RBS ($K_{C_o}^A$), promotor ($N_A \omega_A$) y sustrato $f(s_i)$ (se ha partido de valores de fortaleza medios para proteínas no ribosomales). Los símbolos negros (cuadrado, rombo) corresponden a los valores medios de $N_A \omega_A$, $K_{C_o}^A$ (si) para proteínas ribosomales y no ribosomales respectivamente. El símbolo blanco corresponde al valor de $N_A \omega_A$, $K_{C_o}^A$ (si) para sustrato saturado.

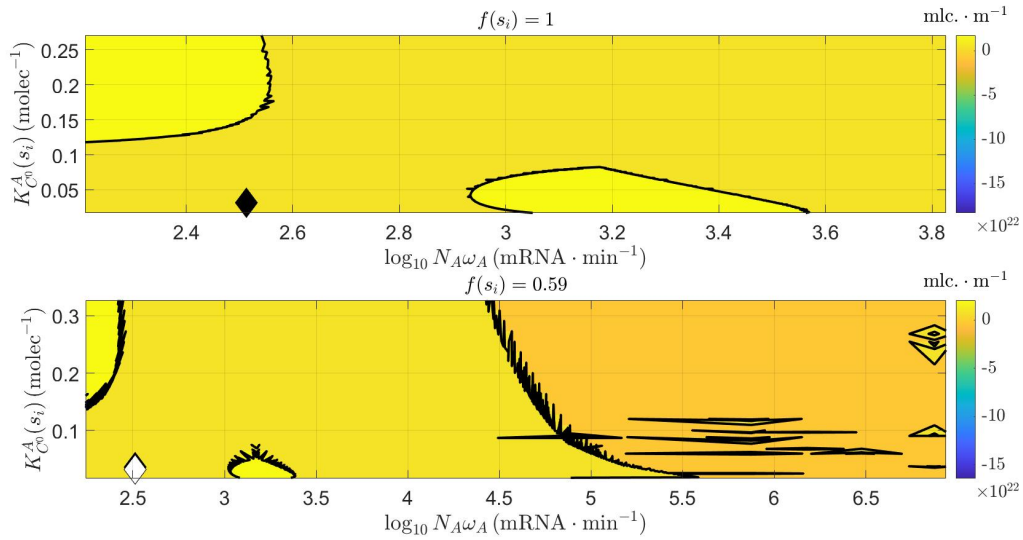


Figura 4.6: Flujo de naringenina para diferentes valores de fortaleza de RBS (K_{Co}^A), promotor ($N_A\omega_A$) y sustrato $f(s_i)$. En este caso los rangos fortaleza del promotor son 10000 veces más altos que los de una proteína no ribosomal común.

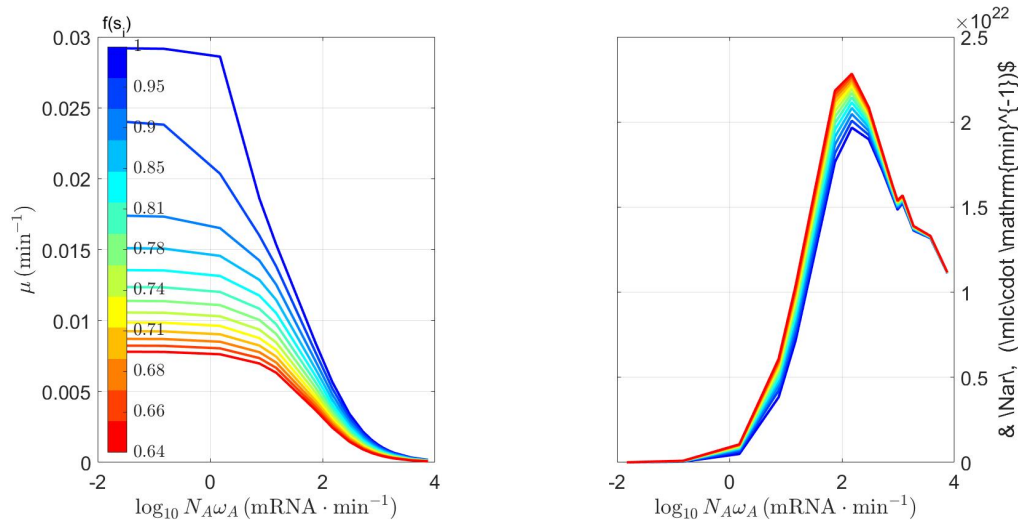


Figura 4.7: Flujo de naringenina y crecimiento para diferentes valores promotor ($N_A\omega_A$) y sustrato $f(s_i)$.

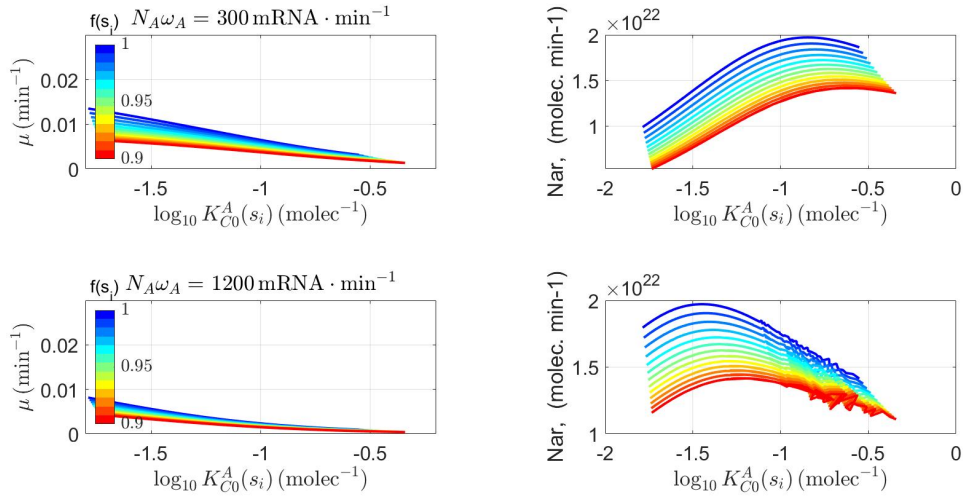


Figura 4.8: Flujo de naringenina y crecimiento para diferentes valores promotor ($N_A\omega_A$) y sustrato $f(s)$.

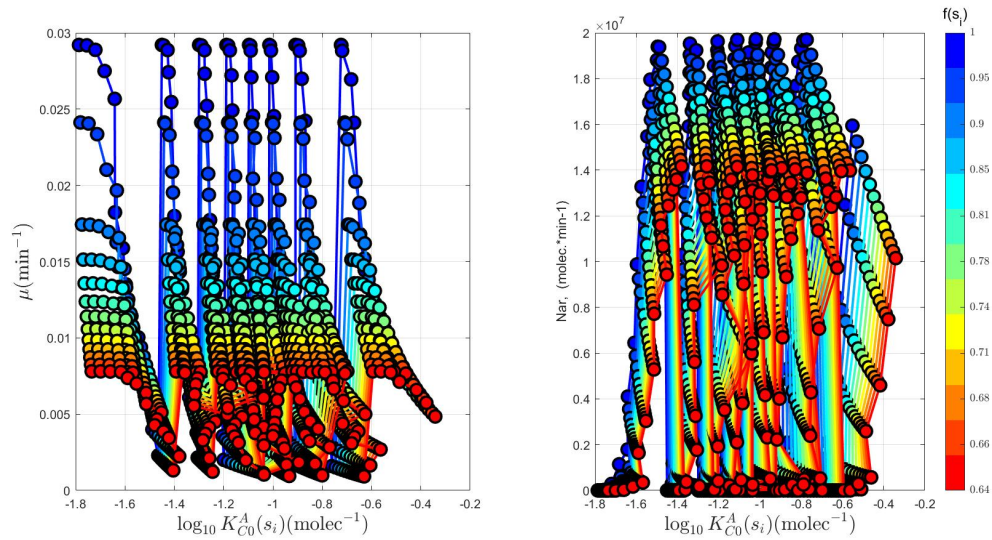


Figura 4.9: Flujo de naringenina y crecimiento para diferentes valores de fortaleza de RBS ($K_{C_0}^A$) y sustrato $f(s)$.

Capítulo 5

Normativa

En España, la producción de compuestos químicos de alto valor añadido en biofactorías está sujeta al reglamento dictado por la Ley 9/2003, de 25 de abril, *por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente*. [20]

A nivel de la Unión Europea, este tipo de actividades están reguladas por la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, *relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente*. [21] y Reglamento (CE) N^o 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003 *relativo a la trazabilidad y etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos*. [22]

Así, en el presente proyecto se ha estimado oportuno asegurar que el modelo de *Escherichia Coli* utilizado no pertenece a la cepas tóxicas que suponen un riesgo para el ser humano o el medio ambiente, como la O157:H7, para que ayude a que se cumpla con lo dispuesto en el párrafo primero del apartado 1 del artículo 7 de la Ley 9/2003; el apartado 5 de la Directiva 2009/41/CE.

Capítulo 6

Ámbito de aplicación , rango de soluciones del trabajo y propuestas de mejora

Ámbito de aplicación

El modelo multi-escala desarrollado ha sido construido a partir del metabolismo y parámetros intracelulares de *Escherichia Coli*, por tanto en principio, solo sería utilizable como predictor de producción en cultivos de esta especie.

Sin embargo, la estructura del modelo es fácilmente extrapolable a otras especies, necesitando para ello únicamente modificar los parámetros y usar el modelo metabólico del organismo en cuestión. También permitiría sustituir la ruta exógena de la naringenina por otra de interés, modificando las características genéticas y enzimáticas de esta.

Por otro lado, la solución propuesta se ha asumido en el marco de un biorreactor, principalmente en modo de funcionamiento "batch." alimentación continua, por lo que factorías celulares de otro diseño puede que afecte a los parámetros, como al de flujo de sustrato s_{feed} .

Finalmente, la cinética de Michaelis-Menten empleada asume que la concentración de sustrato o precursor es mucho mayor que la enzima , $[S] \gg [E]$.

Rango de soluciones del trabajo

El modelo multi-escala propuesto está diseñado con parámetros extraídos del metabolismo y del mecanismo de expresión proteica de *Escherichia Coli*, con la producción de naringenina mediante la introducción por ADN recombinante de un gen exógeno, en el marco de un biorreactor.

Aunque es fácilmente extrapolable a otras especies, rutas exógenas y entornos de producción (como se explica en el capítulo de Líneas Futuras), el uso directo de este modelo en estas situaciones pueden dar como resultado predicciones de producción no fiables.

Propuestas de mejora

Este modelo tiene la carencia de haber sido diseñado complementamente con experimentación *in silico* sin haber podido tener una realimentación de comprobación de resultados en un biorreactor real, por lo tanto toda la información que para obtenerla requería de experimentación *in vivo* se ha obtenido a partir de la bibliografía.

Esto tiene sus desventajas , ya que distintas fuentes han estado tratando con distintas cepas de *Escherichia Coli*, e integrar la información conjunta de estas como si se tratara de un mismo cultivo, puede no ser el procedimiento óptimo en cuanto a exactitud y precisión de los resultados.

Capítulo 7

Estudio económico y presupuesto

En este capítulo se expondrá un estudio económico de explotación del proyecto, y también se hará referencia a los costes de ejecución, desarrollados en el documento nº3 del presente TFG.

7.1. Estimación de los costes de explotación

	Coste esti- mado (€)	Periodo de amorti- zación (meses)	coste por año (€)
Ordenador	750	60	150
Conexión a internet	-	-	360
TOTAL	-	-	510

Tabla 7.1: Coste por utilización de equipos e instalaciones.

7.1. ESTIMACIÓN DE COSTOS ESTABLECIDA ECONÓMICO Y PRESUPUESTO

	coste por año (€)
1) Licencia Matlab	800
2) Adquisición modelos metabólico BiGG	0
TOTAL	800

Tabla 7.2: Coste por uso de material.

	coste por año (€)
1) Ingeniero software	30000
TOTAL	30000

Tabla 7.3: Coste por trabajo operario.

	coste por año (€)
Luz	675
TOTAL	675

Tabla 7.4: Otros.

7.2. CÁLCULO DE PRECIO DE VENTA UNITARIO ECONÓMICO Y PRESUPUESTO

	coste por año (€)
Coste equipos	510
Coste materiales	800
Coste personal	30000
Otros	675
Coste de explotación	31985
13 % Gastos Generales	4158,05
6 % Beneficio Industrial	1919,1
Suma	34322,15
21 % IVA	7207,66
COSTE TOTAL DE EX- PLOTACIÓN	41529,81
COSTE TOTAL EJEC. + EXPLOT. (1º año)	55543.32

Tabla 7.5: Coste total de explotación.

7.2. Cálculo de precio de venta unitario

Dado que hay escasez de software en el mercado con estas características, para estimar el precio de venta unitario se ha decidido partir de la reducción de costes que aporta el modelo en el cálculo de optimizar la política de expresión enzimática. (Determinado en el *capítulo 8*)

Si al cliente le supone un ahorro de 7015 €/año, entonces sería razonable un precio unitario de software de 1000€.

Punto de equilibrio

Para que la inversión sea rentable, se debe alcanzar al menos un volumen de ventas superior al punto de equilibrio, que está en 41 unidades, con el que se habrá cubierto el coste de explotación. (ver figura 7.1)

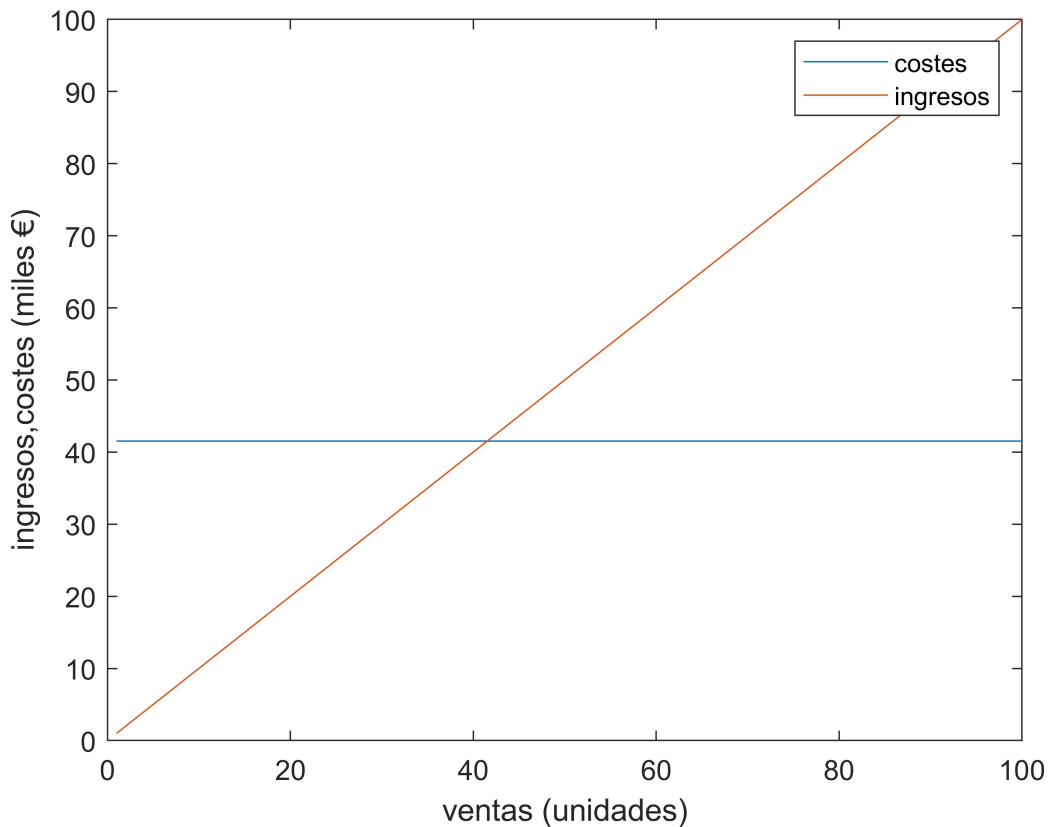


Figura 7.1: Punto de equilibrio. [6]

Capítulo 8

Impacto del proyecto

Para determinar el impacto del proyecto, se ha decidido estimar la reducción de costes que aporta el modelo en el cálculo de optimizar la política de expresión enzimática frente a realizar ensayos de diseño de circuitos genéticos sintéticos que no consideren la interacción del circuito en la célula huésped.

Si establecemos que:

1) los costes variables en un experimento con el biorreactor son los costes asociados al proceso de ARN recombinante, la adquisición de la cepa, la alimentación con sustrato externo (glucosa) y el coste de personal de laboratorio.

2) Que la duración hasta tener lista la producción es de 1 día, entonces podríamos estimar que aproximadamente el coste de cada ensayo. 3) Que pueden llevar unas 15 iteraciones probando diferentes valores de promotores y RBS conseguir la producción óptima del metabolito de interés. [1]

4) Que un equipo de investigación nutracéutico puede tener interés en sacar 10 líneas de productos nuevos al año.

5) Que los costes del cliente asociados al uso del modelo son los mismos que los costes de explotación del desarrollador (determinados en Costes de explotación, *capítulo 7*), sin tener en cuenta gastos generales, beneficio industrial ni IVA.

Entonces obtenemos los costes de la tabla [8.1](#)

CAPÍTULO 8. IMPACTO DEL PROYECTO

	coste en- sayo (€)
Coste ADN recombinante	100
Coste personal lab	100
Coste cepa	30
Coste sustrato	20
Otros (electricidad)	10
TOTAL/ens.	260
TOTAL/prod.	3900
TOTAL/año.	39000
Ahorro/año estimado con solución propuesta:	7015

Tabla 8.1: Estimación de coste de obtención de la política de expresión enzimática óptima con procedimiento tradicional y mediante la solución propuesta.

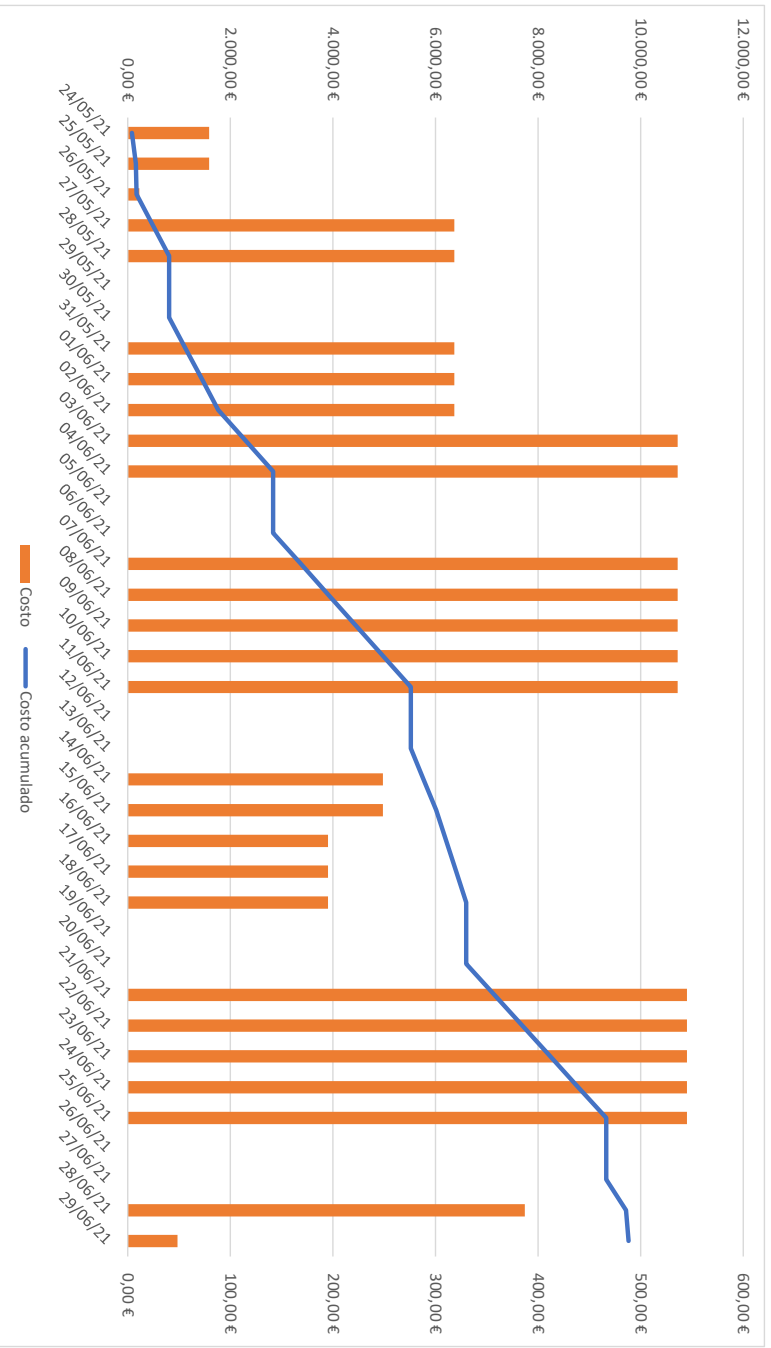
Capítulo 9

Planificación del Proyecto



Id	Nombre de tarea	Costo	Gantt chart showing task duration and costs from May 17, 2021, to July 19, 2021.											
1	Definición de proyecto Fin de	€79,40	17/05											
2	Reunión inicial con director y cotutor	€79,40	24/05											
3	Estudio del estado del arte	€2.165,70	Mano de Obra[77,00 €];Materiales[2,40 €]											
4	Reunión y discusión de	€79,40	Mano de Obra[77,00 €];Materiales[2,40 €]											
5	Impresión de bibliografía en	€11,50	Materiales[1,50 €]											
6	Estudio de Bibliogr	€750,00	Mano de Obra[750,00 €]											
7	Formación en COBRA toolbox	€1.324,80	Mano de Obra[480,00 €];Materiales[844,80 €]											
8	Diseño de modelo multi-escala	€6.253,50												
9	Preprocesado de d	€3.037,50	Mano de Obra[1.189,00 €];Materiales[1.848,50 €]											
10	Diseño de algoritmo del	€733,00	Mano de Obra[649,00 €];Materiales[84,00 €]											
11	Desarrollo de modelo en	€2.483,00	Mano de Obra[979,00 €];Materiales[1.504,00 €]											
12	Redacción de TFG	€1.263,87												
13	Plasmar resultados en	€236,00	Mano de Obra[181,00 €];Materiales[55,00 €]											
14	Plasmar resultados en	€102,50	Mano de Obra[90,50 €];Materiales[12,00 €]											
15	redactar TFG con Overleaf	€925,37	Mano de Obra[600,50 €];Materiales[324,87 €]											

Curva de Costes



Datos del proyecto

Nombre	Comienzo	Fin	Costo	Duración	Nombres de los recursos
Definición de proyecto Fín de Grado	lun 24/05/21	lun 24/05/ 21	79,40 €	1 día	
Reunión inicial con director y cotutor	lun 24/05/21	lun 24/05/ 21	79,40 €	1 día	Mano de Obra[77,00 €];Materiale s[2,40 €]
Estudio del estado del arte	mar 25/05/21	mar 15/06/ 21	2.165,70 €	16 días	
Reunión y discusión de bibliografía a estudiar	mar 25/05/21	mar 25/05/ 21	79,40 €	1 día	Mano de Obra[77,00 €];Materiale s[2,40 €]
Impresión de biblografía en papel	mié 26/05/21	mié 26/05/ 21	11,50 €	1 día	Materiales[1 1,50 €]
Estudio de Bibliografía	jue 27/05/21	mar 15/06/ 21	750,00 €	14 días	Mano de Obra[750,00 €]
Formación en COBRA toolbox	jue 27/05/21	mié 02/06/ 21	1.324,80 €	5 días	Mano de Obra[480,00 €];Materiale s[844,80 €]
Diseño de modelo multi-escala	jue 03/06/21	vie 25/06/ 21	6.253,50 €	17 días	
Preprocesado de datos	jue 03/06/21	vie 11/06/ 21	3.037,50 €	7 días	Mano de Obra[1.189, 00 €];Materiale s[1.848.50 €]

Diseño de algoritmo del modelo	lun 14/06/21	vie 18/06/21	733,00 €	5 días	Mano de Obra[649,00 €];Materiales[84,00 €]
Desarrollo de modelo en MATLAB	lun 21/06/21	vie 25/06/21	2.483,00 €	5 días	Mano de Obra[979,00 €];Materiales[1.504,00 €]
Redacción de TFG	jue 03/06/21	mar 29/06/21	1.263,87 €	19 días	
Plasmar resultados en Gitlab	lun 28/06/21	lun 28/06/21	236,00 €	1 día	Mano de Obra[181,00 €];Materiales[55,00 €]
Plasmar resultados en Wikidot	lun 28/06/21	lun 28/06/21	102,50 €	1 día	Mano de Obra[90,50 €];Materiales[12,00 €]
redactar TFG con Overleaf	jue 03/06/21	mar 29/06/21	925,37 €	19 días	Mano de Obra[600,50 €];Materiales[324,87 €]

Capítulo 10

Líneas futuras

Relación entre la distribución de flujos de aminoácidos y ATP del modelo estequiométrico con la distribución de proteínas ribosomales y no ribosomales del modelo de carga

Entre ambos modelos existe información equivalente aunque calculada de diferente manera, es el caso del sustrato (homogeneizado en el apartado *Cálculos del Anejo*).

Sin embargo, también sería posible la integración de la información de distribución proteica que dan ambos modelos. Para ello habría que conocer la composición de aminoácidos en los ribosomas de *Escherichia Coli* y los flujos de cada aminoácido para hacer una mejor estimación de cuál es la relación entre producción de proteínas ribosomales y no ribosomales, que tendría al final un efecto en la exactitud de predicción de producción de la proteína de interés.

Modelo de carga capaz de dar información sobre el efecto de producción de varias proteínas de interés con diferentes características

El modelo de carga utilizado solo es capaz de dar información sobre el efecto en la célula huésped de la producción de una proteína A. Para nuestro caso, que contábamos con la producción de 5 enzimas, hemos tenido que solventar el problema mediante la

razonable estimación de que estas enzimas tenían un gen sintético asociado con una fortaleza de promotor y RBS parecidos. Sin embargo, sería de interés que el modelo fuera más versátil para proteínas con diferentes características.

Comprobación de la fiabilidad del modelo con producción real

Los resultados que se han obtenido en este proyecto deben ser contrastados con experimentación real en biofactorias para poder tener posibilidades comerciales. Específicamente se necesita estudiar la desviación de la estimación de producción de naringenina y el crecimiento celular de este modelo. Para ello habría que incluir lo más fidedignamente posible las condiciones de contorno del biorreactor en el modelo, como el flujo de oxígeno, de sustrato o las características de la cepa concreta utilizada.

Inclusión en modelo la dinámica poblacional

Este modelo multi-escala es capaz de predecir la producción de un producto de interés (naringenina) en el marco de un de biorreactor en modo de funcionamiento *batch*, teniendo en cuenta los efectos de perturbación en la célula huésped. Sin embargo, futuros trabajos deberán poder predecir también la producción total, teniendo en cuenta todo el cultivo y efectos de la población en la célula individual.

Exportación del modelo a otros entornos de programación

Este modelo ha sido programado en el software MATLAB (IDE), futuros trabajos deberán permitir trabajar en otros entornos como Python o Octave, para ayudar a la eliminación de barreras económicas.

Expansión del modelo para la experimentación *in silico* de otras rutas sintéticas y especies

Este modelo está diseñado con parámetros extraídos de la literatura para la ruta exógena de naringenina, aunque mediante la obtención de los datos enzimáticos (Km, Kcat y número de aminoácidos por enzima) para otras rutas, junto con sus respectivos precursores e intermediarios, podría ser fácilmente extrapolable a otras rutas exógenas.

En cuanto a las especies, los parámetros usados en este modelo son de *Escherichia Coli*. Obteniendo los modelos estequiométricos y recogiendo parámetros intracelulares de otras especies, puede ser fácilmente extrapolable, incluso para diferentes entornos de producción (por ejemplo, variando la asimilación de sustrato).

Capítulo 11

Conclusiones

En este proyecto ha ayudado a reforzar lo ya propuesto en la publicación de *Nobel et al., 2020* : que para una producción óptima de una proteína de interés, incrementar la fortaleza del RBS tiene un efecto limitado, saturando cuando este parámetro es muy alto. Sin embargo, aumentar la fortaleza del promotor si que aumenta la productividad sin que se produzca saturación.

Estos resultados pueden ser muy valiosos para la comunidad de investigación de biología sintética, industria farma o nutracéutica, ya que tradicionalmente se ha relacionado un más potente RBS con mayor producción, siendo estos más caros conforme este valor aumenta, por tanto este cambio de paradigma puede lograr una reducción de costes.

Por otro lado, esto proyecto ha expandido el modelo diseñado en [3], (que predecía los efectos en productividad de modificar la fortaleza RBS y promotor para una única proteína genérica A) , a una ruta sintética que consta de varias enzimas , flujo de precursores e intermediarios, necesitando por tanto su integración con un modelo estequiométrico capaz de dar dichas información suplementaria.

Además, este modelo predice que el aumento de la tasa de crecimiento es indirectamente proporcional con el flujo de precursor libre para la ruta exógena, ya que se consume en dicho crecimiento, y por tanto , también reduce la producción de naringina. Sin embargo, a nivel macroscópico poblacional esta relación no tiene por qué cumplirse, ya que entran en juego otras variables, como una mayor cantidad de enzimas totales involucradas en la ruta o mayor precursor total.

Por último, este modelo predice que el aumento de sustrato, concretamente el O₂, es directamente proporcional a la tasa de crecimiento y al flujo de precursor.

Bibliografía

- [1] Mark S. Dunstan y col. “Engineering *Escherichia coli* towards de novo production of gatekeeper (2S)-flavanones: Naringenin, pinocembrin, eriodictyol and homoeriodictyol”. En: *Synthetic Biology* 5.1 (ene. de 2020). ISSN: 23977000. DOI: [10.1093/SYNBIO/YSAA012](https://doi.org/10.1093/SYNBIO/YSAA012). URL: <https://academic.oup.com/synbio/article/5/1/ysaa012/5882030>.
 - [2] Amanda K. Fisher y col. *A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories*. Ago. de 2014. DOI: [10.1016/j.csbj.2014.08.010](https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.08.010).
 - [3] Fernando Nóbél y Jesús Picó. “Resources allocation explains the differential roles of RBS and promoter strengths in cell mass distribution and optimal protein expression productivity”. En: *bioRxiv* (2020), págs. 1-36. ISSN: 26928205.
 - [4] *Ingeniería genética: técnicas y aplicaciones. ADN recombinante. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. URL: https://biologia-geologia.com/BG4/210_ingenieria_genetica_tecnicas_y_aplicaciones.html (visitado 31-05-2021).
 - [5] Luis G. Valerio. *In silico toxicology for the pharmaceutical sciences*. Dic. de 2009. DOI: [10.1016/j.taap.2009.08.022](https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.022). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19716836/>.
 - [6] Francisco Llaneras y Jesús Picó. “Stoichiometric modelling of cell metabolism”. En: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105.1 (2008), págs. 1-11. ISSN: 13891723. DOI: [10.1263/jbb.105.1](https://doi.org/10.1263/jbb.105.1).
 - [7] Fernando N Santos-navarro, Yadira Boada y Alejandro Vignoni. “Gene expression space shapes the bioprocess trade-offs among titer , yield and productivity”. En: 36 (2021), págs. 1-20.
 - [8] *Reasons E. coli Is Used for Gene Cloning*. URL: <https://www.thoughtco.com/top-reasons-e-coli-is-used-for-gene-cloning-375742> (visitado 01-06-2021).
-

- [9] Susana Martínez-Florez. *Flavonoids: Properties and antioxidizing action Anti-inflammatory effects of physical exercise in the elderly View project The sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (SphK/S1P) pathway in liver diseases View project*. Inf. téc. 2002. URL: <https://www.researchgate.net/publication/10961859>.
- [10] Toshio Tanaka y Ryo Takahashi. *Flavonoids and asthma*. Jun. de 2013. DOI: [10.3390/nu5062128](https://doi.org/10.3390/nu5062128). URL: [/pmc/articles/PMC3725497/%20/pmc/articles/PMC3725497/?report=abstract%20https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3725497/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3725497/).
- [11] Emmanouil A. Trantas y col. “When plants produce not enough or at all: Metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts”. En: *Frontiers in Plant Science* 6.JAN (ene. de 2015), págs. 1-16. ISSN: 1664462X. DOI: [10.3389/fpls.2015.00007](https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00007). URL: www.frontiersin.org.
- [12] Muhammad Kamran Khan, Zill-E-Huma y Olivier Dangles. *A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols*. Feb. de 2014. DOI: [10.1016/j.jfca.2013.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004).
- [13] Christopher J. Robinson y col. “Rapid prototyping of microbial production strains for the biomanufacture of potential materials monomers”. En: *Metabolic Engineering* 60 (jul. de 2020), págs. 168-182. ISSN: 10967184. DOI: [10.1016/j.ymben.2020.04.008](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.04.008).
- [14] S. H. Lee y col. “Cholesterol-lowering activity of naringenin via inhibition of 8-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase in rats”. En: *Annals of Nutrition and Metabolism* 43.3 (mayo de 1999), págs. 173-180. ISSN: 02506807. DOI: [10.1159/000012783](https://doi.org/10.1159/000012783). URL: <https://www.karger.com/Article/FullText/12783%20https://www.karger.com/Article/Abstract/12783>.
- [15] Erin E. Mulvihill y col. “Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance”. En: *Diabetes* 58.10 (oct. de 2009), págs. 2198-2210. ISSN: 00121797. DOI: [10.2337/db09-0634](https://doi.org/10.2337/db09-0634). URL: [/pmc/articles/PMC2750228/%20/pmc/articles/PMC2750228/?report=abstract%20https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2750228/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2750228/).
- [16] *Naringenina* - *Wikipedia, la enciclopedia libre*. URL: <https://es.wikipedia.org/wiki/Naringenina> (visitado 01-06-2021).
- [17] *MetaCyc naringenin biosynthesis (engineered)*. URL: <https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-7397&orgids=AAE0224324> (visitado 01-06-2021).

- [18] Selçuk Aslan y col. “Design and engineering of E. coli metabolic sensor strains with a wide sensitivity range for glycerate”. En: *Metabolic Engineering* 57 (ene. de 2020), págs. 96-109. ISSN: 10967184. DOI: [10.1016/j.ymben.2019.09.002](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.09.002).
- [19] Yadira Boada y col. “Extended Metabolic Biosensor Design for Dynamic Pathway Regulation of Cell Factories”. En: *iScience* 23.7 (2020). ISSN: 25890042. DOI: [10.1016/j.isci.2020.101305](https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101305).
- [20] *BOE.es - BOE-A-2003-8588 Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente*. URL: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2003-8588> (visitado 06-06-2021).
- [21] *EUR-Lex - 32009L0041 - EN - EUR-Lex*. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=celex:32009L0041> (visitado 06-06-2021).
- [22] *EUR-Lex - 32003R1829 - EN - EUR-Lex*. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32003R1829> (visitado 06-06-2021).
- [23] *Growth, uptake, and production rates of seven - Bacteria Escherichia coli - BNID 113215*. URL: <https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?s=n&v=1&id=113215> (visitado 20-06-2021).

Capítulo 12

Anejo

12.1. Cálculos y ecuaciones

Flujo de metabolitos

Como el modelo enzimático calcula los flujos en $\frac{\text{moleculas}}{\text{minuto}}$, y el estequiométricos en $\frac{\text{mmol}}{\text{gDW} \cdot \text{h}}$, debemos pasar todo a la misma unidad de $\frac{\text{moleculas}}{\text{minuto}}$.

Para ello debemos multiplicar el flujo del m. estequiométrico por el número de partículas que hay en un milimol ($6,022 \cdot 10^{20}$) y dividirlo por 60 para pasarlo a minutos^{-1} :

$$\frac{\text{mmol}}{\text{gDW} \cdot \text{h}} \cdot 6,022 \cdot 10^{20} \frac{\text{moleculas}}{\text{mmol}} \cdot \frac{1 \text{ h}}{60 \text{ min}} = \frac{\text{moleculas}}{\text{min}} \quad (12.1)$$

Obtención de la relación entre el sustrato y el flujo de precursor

Como se observa en la figura [4.4](#) la relación entre el flujo de precursor (KLt) con el de oxígeno (KO_2) es lineal, igual que ocurre con la relación de este último con el crecimiento μ . Siendo, en la zona lineal:

$$KLt_{ss}(KO_2) = 0,08 \cdot 10^{19} KO_2 + 0,4 \cdot 10^{19} \quad (12.2)$$

$$\mu_{ss} = 0,0375 \cdot KO_2 + 0,15 \quad (12.3)$$

Por tanto,

$$K Lt(\mu_{ss}) = 0,08 \cdot 10^{19} \cdot \frac{\mu_{ss}(KO2) - 0,15}{0,0375} + 0,4 \cdot 10^{19} \quad (12.4)$$

La cantidad de sustrato (Si) que llega a la célula depende, entre otros factores, del flujo de oxígeno: $s_i = f(KO2)$

Por otro lado, en el modelo de carga metabólica, existe una relación interna entre la función sustrato y el crecimiento, dada por:

$$\mu_{ss}(s_i) = \frac{\nu_t(s_i)}{N_r l_p^r} \Phi_t \Phi_r^t \quad (12.5)$$

Siendo μ_{ss} la tasa de crecimiento en régimen permanente, $\nu_t(s_i)$ la tasa de transcripción efectiva, N_r la cantidad de proteínas ribosomales, l_p^r la longitud en aminoácidos de una proteína ribosomal media y $\Phi_t \Phi_r^t$ la fracción de ribosomas activamente unidos a mRNA utilizados en la producción de los propios ribosomas relativos al número total de ribosomas.

Por tanto, ya tenemos podemos relacionar $K Lt_{ss}$ como función del sustrato:

$$K Lt(\mu_{ss}) = 0,08 \cdot 10^{19} \cdot \frac{\mu_{ss}(s_i) - 0,15}{0,0375} + 0,4 \cdot 10^{19} \quad (12.6)$$

12.2. Tablas

Table 1. Growth, Uptake, and Production Rates of Seven *E. coli* Strains in Aerobic and Anaerobic Batch Culture

Specific Rate (mmol gDW ⁻¹ h ⁻¹)	Condition	Strain						
		BL21	C	Crooks	DH5 α	MG1655	W	W3110
μ_{max} (h ⁻¹)	Aerobic	0.76 ± 0.02	0.83 ± 0.02	0.96 ± 0.02	0.77 ± 0.01	0.73 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.61 ± 0.01
	Anaerobic	0.29 ± 0.05	0.61 ± 0.02	0.77 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.90 ± 0.06	0.52 ± 0.00
Glucose	Aerobic	-8.01 ± 0.27	-9.86 ± 0.09	-12.47 ± 0.53	-9.67 ± 0.35	-9.53 ± 0.27	-9.90 ± 0.1	-6.65 ± 0.08
	Anaerobic	-11.32 ± 0.51	-22.20 ± 0.75	-30.88 ± 2.19	-8.48 ± 1.72	-16.69 ± 0.24	-27.21 ± 1.39	-17.49 ± 0.45
Acetate	Aerobic	0.00 ± 0.00	3.35 ± 0.06	0.00 ± 0.00	3.12 ± 0.13	3.49 ± 0.50	0.00 ± 0.00	2.95 ± 0.12
	Anaerobic	8.83 ± 0.91	16.33 ± 0.38	19.09 ± 1.27	7.34 ± 0.37	11.71 ± 1.14	21.06 ± 0.75	10.59 ± 0.12
Formate	Aerobic	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Anaerobic	20.06 ± 0.89	33.85 ± 0.71	34.82 ± 2.45	14.51 ± 2.59	22.17 ± 1.69	40.03 ± 1.05	19.86 ± 0.18
Ethanol	Aerobic	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Anaerobic	10.51 ± 1.27	16.33 ± 0.38	19.09 ± 1.27	7.85 ± 0.87	11.22 ± 0.60	16.32 ± 2.98	7.85 ± 0.87
Lactate	Aerobic	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.19 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Anaerobic	1.75 ± 0.53	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.05 ± 0.14	0.00 ± 0.00	21.06 ± 0.75	0.00 ± 0.00
Succinate	Aerobic	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Anaerobic	0.71 ± 0.2	2.90 ± 0.05	3.82 ± 0.27	1.00 ± 0.30	1.86 ± 0.40	3.08 ± 0.03	1.61 ± 0.07

Means ± SD are shown (n = 3). Means were compared by Tukey-Kramer HSD ($\alpha_{0.05}$).

Tabla 12.1: Tasas metabólicas de distintas cepas de Escherichi Coli [23]

	Km (molecules)	kcat(min ⁻¹)	referencia
TAL	1.9e4	1.2	[19]
4CL	1.4e4	0.492	
CHS	1e-3	1.68	
CHI	2.8e4	4.2	
F3H	5e8	174	

Tabla 12.2: Parámetros de las enzimas de la ruta de la naringenina usados en el modelo bioquímico.

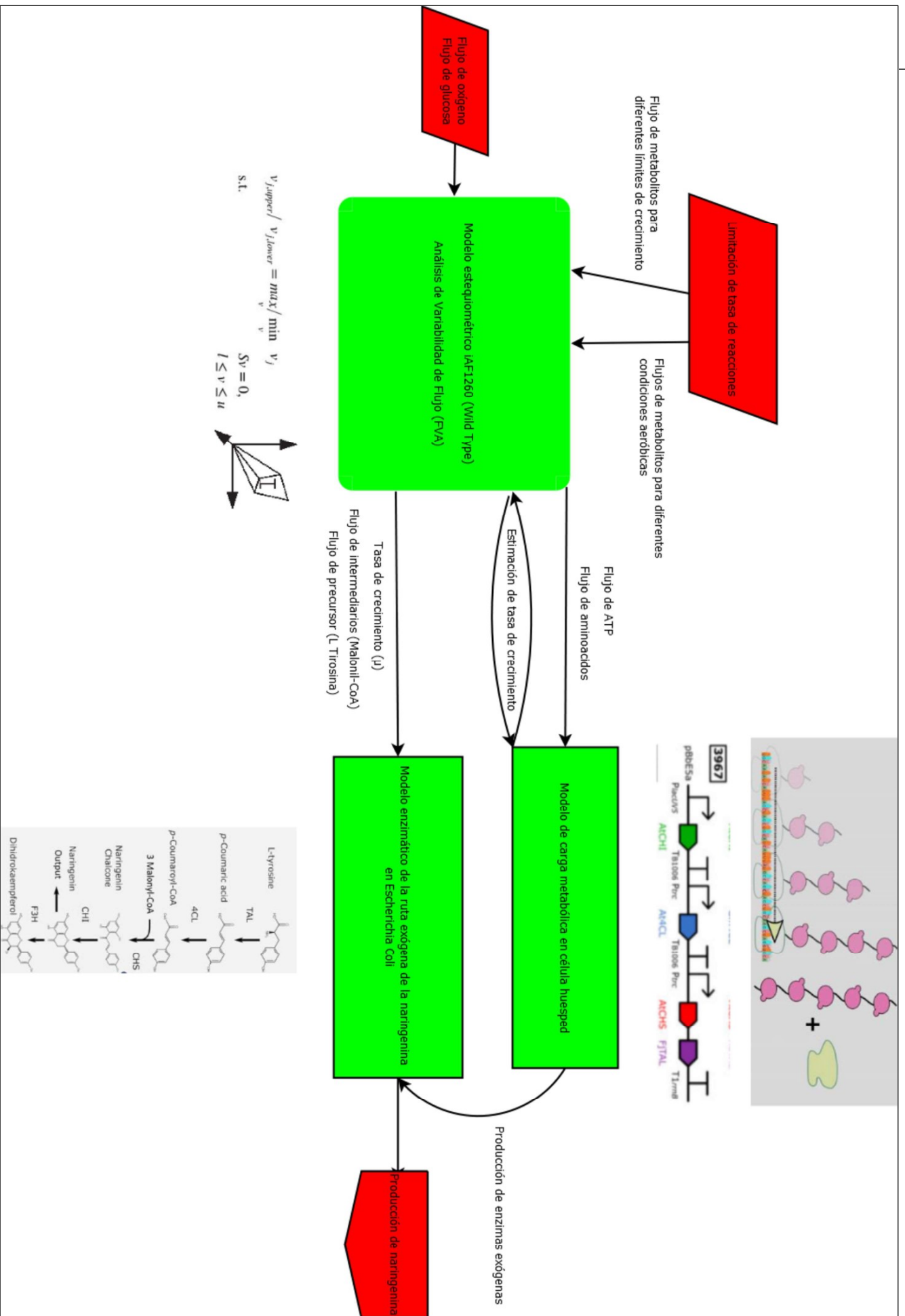
Documento PLANOS

Alberto Martínez Moreno

May 2021

Diagrama de flujo del modelo multi-escala





Presupuesto.

- Cuadro de Precios Unitarios. MO, MT, MQ.
- Cuadro de Precios Auxiliares y Descompuestos.
- Cuadro de Precios nº1. En Letra.
- Cuadro de Precios nº2. MO, MT, MQ, RESTOS DE OBRA, COSTES INDIRECTOS.
- Presupuesto con Medición Detallada. Por capítulos.
- Resumen de Presupuesto. PEM, PEC, PCA.

Cuadro de mano de obra

Nº	Designación	Importe		
		Precio (Euros)	Cantidad (Horas)	Total (Euros)
1	Tutoría de Director de TFG	31,00	5,500 h	170,50
2	Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00	300,000 h	4.500,00
3	Tutoría de Cotutor de TFG	31,00	13,000 h	403,00
			Importe total:	5.073,50
	València, Junio 2021 Ingeniería Biomédica			
	Alberto Martínez Moreno			

Cuadro de materiales

Nº	Designación	Importe		
		Precio (Euros)	Cantidad Empleada	Total (Euros)
1	Licencia Microsoft Project	5,88	39,000 h	229,32
2	Licencia MATLAB Estándar	24,00	159,000 h	3.816,00
3	Licencia Overleaf	0,05	39,000 h	1,95
4	Licencia Windows 10	0,90	250,000 h	225,00
5	Portátil	1,50	251,000 h	376,50
6	Impresión papel	0,05	200,000 u	10,00
			Importe total:	4.658,77
	València, Junio 2021 Ingeniería Biomédica			
	Alberto Martínez Moreno			

Cuadro de maquinaria

Importe total: 0,00

València, Junio 2021
Ingeniería Biomédica

Alberto Martínez Moreno

Cuadro de precios auxiliares

València, Junio 2021
Ingeniería Biomédica

Alberto Martínez Moreno

Cuadro de Precios Descompuestos

Nº	Código	Ud	Descripción		Total
1 Definición del Proyecto Fin de Grado					
1.1 01.01		h	Reunión inicial con tutor y cotutor TFG		
	MO.CU	1,000 h	Director de TFG	31,00	31,00
	MO.PTU	1,000 h	Cotutor de TFG	31,00	31,00
	MO.IB	1,000 h	Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00	15,00
	MES.PCp	1,000 h	Portátil	1,50	1,50
	MES.LW10	1,000 h	Licencia Windows 10	0,90	0,90
			Precio total por h		79,40
					Son setenta y nueve Euros con cuarenta céntimos

Cuadro de Precios Descompuestos

Nº	Código	Ud	Descripción	Total
2 Estudio del estado del arte				
2.1	02.01	h	Reunión y discusión de material a estudiar	
	MO.CU	1,000 h	Director de TFG	31,00
	MO.PTU	1,000 h	Cotutor de TFG	31,00
	MO.IB	1,000 h	Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00
	MES.PCp	1,000 h	Portátil	1,50
	MES.LW10	1,000 h	Licencia Windows 10	0,90
Precio total por h				79,40
Son setenta y nueve Euros con cuarenta céntimos				
2.2	02.02	h	Impresión de bibliografía en papel	
	MES.PCp	1,000 h	Portátil	1,50
	MES.imp	200,000 u	Impresión papel	0,05
Precio total por h				11,50
Son once Euros con cincuenta céntimos				
2.3	02.03	h	Estudio de Bibliografía	
	MO.IB	50,000 h	Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00
Precio total por h				750,00
Son setecientos cincuenta Euros				
2.4	02.04	h	Formación en COBRA toolbox	
	MES.PCp	32,000 h	Portátil	1,50
	MES.LMatlab	32,000 h	Licencia MATLAB Estándar	24,00
	MES.LW10	32,000 h	Licencia Windows 10	0,90
	MO.IB	32,000 h	Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00
Precio total por h				1.324,80
Son mil trescientos veinticuatro Euros con ochenta céntimos				

Cuadro de Precios Descompuestos

Nº	Código	Ud	Descripción	Total
3 Diseño de modelo multi-escala				
3.1	03.01	h	Preprocesado de información de los modelos para que tengan datos comunes e integrables (unidades, nombre de metabolitos y reacciones, variables de interés,...)	
		MES.PCp	70,000 h Portátil	1,50 105,00
		MES.LMatlab	70,000 h Licencia MATLAB Estándar	24,00 1.680,00
		MES.LW10	70,000 h Licencia Windows 10	0,90 63,00
		MO.CU	1,500 h Director de TFG	31,00 46,50
		MO.PTU	3,000 h Cotutor de TFG	31,00 93,00
		MO.IB	70,000 h Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00 1.050,00
Precio total por h				3.037,50
Son tres mil treinta y siete Euros con cincuenta céntimos				
3.2	03.02	h	Desarrollo del algoritmo del modelo	
		MO.IB	35,000 h Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00 525,00
		MO.CU	1,000 h Director de TFG	31,00 31,00
		MO.PTU	3,000 h Cotutor de TFG	31,00 93,00
		MES.LW10	35,000 h Licencia Windows 10	0,90 31,50
		MES.PCp	35,000 h Portátil	1,50 52,50
Precio total por h				733,00
Son setecientos treinta y tres Euros				
3.3	03.03	h	Desarrollo del modelo en MATLAB	
		MO.IB	57,000 h Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00 855,00
		MO.CU	1,000 h Director de TFG	31,00 31,00
		MO.PTU	3,000 h Cotutor de TFG	31,00 93,00
		MES.LW10	57,000 h Licencia Windows 10	0,90 51,30
		MES.PCp	57,000 h Portátil	1,50 85,50
		MES.LMatlab	57,000 h Licencia MATLAB Estándar	24,00 1.368,00
Precio total por h				2.483,80
Son dos mil cuatrocientos ochenta y tres Euros con ochenta céntimos				

Cuadro de Precios Descompuestos

Nº	Código	Ud	Descripción	Total
4 Redacción de TFG				
4.1	04.01	h	Plasmar resultados en Gitlab	
	MES.LW10	10,000 h	Licencia Windows 10	0,90
	MES.PCp	10,000 h	Portátil	1,50
	MO.IB	10,000 h	Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00
	MO.PTU	1,000 h	Cotutor de TFG	31,00
			Precio total por h	205,00
Son doscientos cinco Euros				
4.2	04.02	h	Redactar resultados en Wikidot	
	MO.IB	5,000 h	Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00
	MES.LW10	5,000 h	Licencia Windows 10	0,90
	MES.PCp	5,000 h	Portátil	1,50
	MO.PTU	0,500 h	Cotutor de TFG	31,00
			Precio total por h	102,50
Son ciento dos Euros con cincuenta céntimos				
4.3	04.03	h	Redactar Trabajo Fin de Grado en Overleaf	
	MO.IB	39,000 h	Estudiante Ingeniería Biomédica	15,00
	MES.LW10	39,000 h	Licencia Windows 10	0,90
	MES.PCp	39,000 h	Portátil	1,50
	MO.PTU	0,500 h	Cotutor de TFG	31,00
	MES.LOverl...	39,000 h	Licencia Overleaf	0,05
	MES.LMProj...	39,000 h	Licencia Microsoft Project	5,88
			Precio total por h	925,37
Son novecientos veinticinco Euros con treinta y siete céntimos				

Cuadro de precios nº 1

Nº	Designación	Importe	
		En cifra (Euros)	En letra (Euros)
1.1	1 Definición del Proyecto Fin de Grado h Reunión inicial con tutor y cotutor TFG	79,40	SETENTA Y NUEVE EUROS CON CUARENTA CÉNTIMOS
2.1	2 Estudio del estado del arte h Reunión y discusión de material a estudiar	79,40	SETENTA Y NUEVE EUROS CON CUARENTA CÉNTIMOS
2.2	h Impresión de bibliografía en papel	11,50	ONCE EUROS CON CINCUENTA CÉNTIMOS
2.3	h Estudio de Bibliografía	750,00	SETECIENTOS CINCUENTA EUROS
2.4	h Formación en COBRA toolbox	1.324,80	MIL TRESCIENTOS VEINTICUATRO EUROS CON OCHENTA CÉNTIMOS
3.1	3 Diseño de modelo multi-escala h Preprocesado de información de los modelos para que tengan datos comunes e integrables (unidades, nombre de metabolitos y reacciones, variables de interés,...)	3.037,50	TRES MIL TREINTA Y SIETE EUROS CON CINCUENTA CÉNTIMOS
3.2	h Desarrollo del algoritmo del modelo	733,00	SETECIENTOS TREINTA Y TRES EUROS
3.3	h Desarrollo del modelo en MATLAB	2.483,80	DOS MIL CUATROCIENTOS OCHENTA Y TRES EUROS CON OCHENTA CÉNTIMOS
4.1	4 Redacción de TFG h Plasmar resultados en Gitlab	205,00	DOSCIENTOS CINCO EUROS
4.2	h Redactar resultados en Wikidot	102,50	CIENTO DOS EUROS CON CINCUENTA CÉNTIMOS
4.3	h Redactar Trabajo Fin de Grado en Overleaf	925,37	NOVECIENTOS VEINTICINCO EUROS CON TREINTA Y SIETE CÉNTIMOS
	València, Junio 2021 Ingeniería Biomédica		
	Alberto Martínez Moreno		

Cuadro de precios nº 2

Nº	Designación	Importe	
		Parcial (Euros)	Total (Euros)
1.1	1 Definición del Proyecto Fin de Grado		
	h Reunión inicial con tutor y cotutor TFG		
	<i>Mano de obra</i>	77,00	
	<i>Materiales</i>	2,40	
			79,40
2.1	2 Estudio del estado del arte		
	h Reunión y discusión de material a estudiar		
	<i>Mano de obra</i>	77,00	
	<i>Materiales</i>	2,40	
			79,40
2.2	h Impresión de bibliografía en papel		
	<i>Materiales</i>	11,50	
			11,50
2.3	h Estudio de Bibliografía		
	<i>Mano de obra</i>	750,00	
			750,00
2.4	h Formación en COBRA toolbox		
	<i>Mano de obra</i>	480,00	
	<i>Materiales</i>	844,80	
			1.324,80
3.1	3 Diseño de modelo multi-escala		
	h Preprocesado de información de los modelos para que tengan datos comunes e integrables (unidades, nombre de metabolitos y reacciones, variables de interés,...)		
	<i>Mano de obra</i>	1.189,50	
	<i>Materiales</i>	1.848,00	
			3.037,50
3.2	h Desarrollo del algoritmo del modelo		
	<i>Mano de obra</i>	649,00	
	<i>Materiales</i>	84,00	
			733,00
3.3	h Desarrollo del modelo en MATLAB		
	<i>Mano de obra</i>	979,00	
	<i>Materiales</i>	1.504,80	
			2.483,80
4.1	4 Redacción de TFG		
	h Plasmar resultados en Gittlab		
	<i>Mano de obra</i>	181,00	
	<i>Materiales</i>	24,00	
			205,00
4.2	h Redactar resultados en Wikidot		
	<i>Mano de obra</i>	90,50	
	<i>Materiales</i>	12,00	
			102,50
4.3	h Redactar Trabajo Fin de Grado en Overleaf		
	<i>Mano de obra</i>	600,50	
	<i>Materiales</i>	324,87	
			925,37
	València, Junio 2021 Ingeniería Biomédica		
	Alberto Martínez Moreno		

PRESUPUESTO Y MEDICION

PRESUPUESTO PARCIAL Nº 1 Definición del Proyecto Fin de Grado

Nº	DESCRIPCION	UDS.	LARGO	ANCHO	ALTO	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE
1.1	H. Reunión inicial con tutor y cotutor TFG					1,00	79,40	79,40

Total presupuesto parcial nº 1 ... 79,40

PRESUPUESTO PARCIAL Nº 2 Estudio del estado del arte

Nº	DESCRIPCION	UDS.	LARGO	ANCHO	ALTO	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE
2.1	H. Reunión y discusión de material a estudiar					1,00	79,40	79,40
2.2	H. Impresión de bibliografía en papel					1,00	11,50	11,50
2.3	H. Estudio de Bibliografía					1,00	750,00	750,00
2.4	H. Formación en COBRA toolbox					1,00	1.324,80	1.324,80

Total presupuesto parcial nº 2 ... 2.165,70

PRESUPUESTO PARCIAL N° 3 Diseño de modelo multi-escala

N°	DESCRIPCION	UDS.	LARGO	ANCHO	ALTO	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE
3.1	H. Preprocesado de información de los modelos para que tengan datos comunes e integrables (unidades, nombre de metabolitos y reacciones, variables de interés,...)					1,00	3.037,50	3.037,50
3.2	H. Desarrollo del algoritmo del modelo					1,00	733,00	733,00
3.3	H. Desarrollo del modelo en MATLAB					1,00	2.483,80	2.483,80

Total presupuesto parcial n° 3 ... 6.254,30

PRESUPUESTO PARCIAL N° 4 Redacción de TFG

Nº	DESCRIPCION	UDS.	LARGO	ANCHO	ALTO	CANTIDAD	PRECIO	IMPORTE
4.1	H. Plasmar resultados en Gitlab					1,00	205,00	205,00
4.2	H. Redactar resultados en Wikidot					1,00	102,50	102,50
4.3	H. Redactar Trabajo Fín de Grado en Overleaf					1,00	925,37	925,37

Total presupuesto parcial nº 4 ... 1.232,87

RESUMEN POR CAPITULOS

CAPITULO DEFINICIÓN DEL PROYECTO FÍN DE GRADO	79,40
CAPITULO ESTUDIO DEL ESTADO DEL ARTE	2.165,70
CAPITULO DISEÑO DE MODELO MULTI-ESCALA	6.254,30
CAPITULO REDACCIÓN DE TFG	1.232,87
REDONDEO.....	_____
PRESUPUESTO DE EJECUCION MATERIAL.....	<u>9.732,27</u>

EL PRESUPUESTO DE EJECUCION MATERIAL ASCIENDE A LAS EXPRESADAS NUEVE MIL SETECIENTOS TREINTA Y DOS EUROS CON VEINTISIETE CÉNTIMOS.

Proyecto: TFG

Capítulo	Importe
Capítulo 1 Definición del Proyecto Fin de Grado	79,40
Capítulo 2 Estudio del estado del arte	2.165,70
Capítulo 3 Diseño de modelo multi-escala	6.254,30
Capítulo 4 Redacción de TFG	1.232,87
Presupuesto de ejecución material	9.732,27
13% de gastos generales	1.265,20
6% de beneficio industrial	583,94
Suma	11.581,41
21% IVA	2.432,10
Presupuesto de ejecución por contrata	14.013,51

Asciende el presupuesto de ejecución por contrata a la expresada cantidad de CATORCE MIL TRECE EUROS CON CINCUENTA Y UN CÉNTIMOS.

València, Junio 2021
Ingeniería Biomédica

Alberto Martínez Moreno