
PROYECTO 2

Herramientas Computacionales para Ingeniería Metabólica

Desarrollo de una estrategia de ingeniería metabólica para la optimización de producción de Treonina en *Escherichia coli*

Alejandro Castellanos^{1,2,3*} | Sergio Pachón^{1,2*}

¹Maestría en Biología Computacional, Departamento de Ciencias Biológicas y Departamento de Ingeniería de Sistemas y Computación, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

²Grupo de Biología de Sistemas (BioSys), Laboratorio de Biofísica, Departamento de Física, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

³Max Planck Tandem Group en Biología Computacional y Ecología Microbiana (BCEM), Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

†**Repositorio de GitHub del Proyecto:**
<https://github.com/alejandrocs98/Proyectos-HCIM/tree/main/Proyecto-02>

Correspondencia

Email: a.castellanoss@uniandes.edu.co,
s.pachond@uniandes.edu.co

La treonina es un aminoácido esencial de alto interés industrial debido a su valor nutricional y a la falta de capacidad de los seres humanos de producir este metabolito. *E. coli* se plantea como un modelo idóneo para optimizar la producción de este metabolito mediante una aproximación de delección de genes. En este estudio se encuentra que la delección de 2 genes con un nivel mínimo de biomasa mínimo de 5 son los parámetros óptimos para la optimización de la producción de este aminoácidos en la cepa K-12 de *E. coli* y que las patologías halladas en el modelo inicial probablemente no afecten las predicciones iniciales además de que existen mecanismos para solucionarlas..

PALABRAS CLAVE

E. coli, Producción de treonina, Reconstrucción metabólica a escala genómica, Modelamiento de optimización de cepas, Curación de reconstrucciones metabólicas

1 | INTRODUCCIÓN

La utilización de aproximaciones COBRA utilizando GEMs ha permitido modelar el metabolismo de organismos (siendo particularmente exitoso en microorganismos) *in silico*, por lo cual se ha vuelto una herramienta muy valiosa en ingeniería metabólica ya que permite hacer un proceso de diseño y optimización de un sistema biológico antes

Abreviaciones: GEMs: Modelos a Escala Genómica, COBRA: Reconstrucción y Análisis Basado en Restricciones, FBA: Flux Balance Analysis, THRS: treonina sintasa.

* Estos autores contribuyeron igualmente.

de pasar a experimentar en el laboratorio, hecho que reduce costos y tiempo de exploración de las distintas variables que pueden estar implicadas en el sistema [1]. Una restricción (o dependencia) importante de esta aproximación es la disponibilidad de genomas bien ensamblados y debidamente anotados para poder realizar una reconstrucción metabólica apropiada de la cual partir, por lo cual la utilización de organismos modelo se ha vuelto particularmente importante para este fin [2].

Herramientas como el COBRA Toolbox [3] y el RAVEN Toolbox [4], desarrollados por los equipos liderados por Bernhard Palsson y Eduard Kerkhoven respectivamente, permiten obtener reconstrucciones metabólicas a escala genómica e implementar distintos algoritmos de optimización y análisis para dichas reconstrucciones, lo cual ha llevado a un mayor entendimiento del metabolismo de distintos organismos y al diseño de organismos modificados o de biorreactores con condiciones específicas para optimizar la producción de compuestos de interés [1]. A pesar de que con estas herramientas se pueden obtener GEMs, existen distintos repositorios de modelos ya construidos, como lo es por ejemplo BiGG Models [5], que facilita la obtención de estos modelos. En cualquier caso, construido *de novo* o recuperado de un repositorio, los GEMs pueden presentar patologías, es decir, reacciones que no lograron ser conectadas apropiadamente en el contexto metabólico del genoma seleccionado debido a información faltante o errónea de la anotación. Estas patologías o "gaps", pueden ser clasificados en dos grupos grandes: los metabolitos de no producción/consumo de raíz, que son aquellos metabolitos para los cuales no existe una reacción de entrada (o producción) o salida (o consumo) del sistema, y los metabolitos de no producción/consumo corriente abajo, que son consecuencia de estar involucrados en la ruta de un metabolito de no producción de raíz. Para identificar y tratar de solucionar estas patologías, el equipo de Costas Maranas ha desarrollado algoritmos de curación automática para GEMs conocidos como GapFind, que identifica patologías en el sistema, y GapFill, que intenta resolver dichas patologías mediante la adición de reacciones reversibles para reacciones ya existentes en el modelo, la adición de nuevas reacciones reportadas en bases de datos y otros modelos, o la adición de reacciones de transporte con el medio externo a la célula [6].

Un aspecto importante en la producción de cualquier producto de valor agregado es la optimización del proceso de obtención de dicho producto mientras se minimizan costos. En la producción de un compuesto utilizando sistemas biológicos, esto se logra maximizando la tasa de producción del compuesto en cuestión sin descuidar el aumento neto de biomasa del organismo que se esté utilizando. Nuevamente, el equipo de Costas Maranas desarrolló un algoritmo orientado en la delección de genes para llevar a cabo esta tarea basándose en un problema de optimización binivel donde las funciones objetivo son el flux del metabolito de interés y la biomasa del organismo seleccionado conocido como OptKnock [7], que se implementará en este proyecto.

La treonina es un aminoácido esencial, es decir, un aminoácido que los seres humanos no producen en cantidades suficientes para suplir sus necesidades metabólicas [8]. Normalmente, los humanos obtenemos este aminoácido mediante el alimento que consumimos o como un producto de la microbiota intestinal que poseemos. Entre los microorganismos que hacen parte de la microbiota intestinal de los humanos (y otros animales) que producen treonina se encuentra la Enterobacteria *Escherichia coli*, que es una anaerobia facultativa y fermentadora de azúcares [2]. Es probablemente el microorganismo mejor estudiado de todos y organismo modelo por excelencia en biología molecular y biotecnología debido a su facilidad de crecer en el laboratorio [2], por esta razón, se ha utilizado ampliamente como "chasis" para la producción de metabolitos de interés biomédico e industrial.

En este proyecto, primero se valida a la treonina como un candidato idóneo para optimizar su producción en la cepa K-12 de *E. coli* utilizando el modelo iAF1260 [9]. Luego, se implementa OptKnock [7] variando los parámetros

relacionados al número de genes máximo a delecionar, el mínimo de biomasa requerido en el modelo y el flujo del sustrato de entrada del modelo para determinar el efecto que tiene cada parámetro en la optimización de la cepa para la producción de treonina y de igual manera determinar cuales son los parámetros óptimos para esta tarea. Finalmente, se corrió GapFind para detectar patologías en el modelo inicial (iAF1260) y se discutieron posibles reacciones que podrías solucionar dichas patologías y si estas poseían un efecto significativo en los resultados de la optimización de la cepa.

2 | MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 | Obtención del modelo metabólico a escala genómica de la cepa K-12 de *E. coli* y selección del ácido orgánico de interés

Primero, se descargó el genoma anotado de la cepa K-12 de *E. coli* (NCBI ID: NC_000913.3) y se realizó la reconstrucción de la red metabólica utilizando el servidor de KAAS [10]. Luego se buscaron reacciones implicadas en el metabolismo de la treonina dentro de esta reconstrucción.

Posteriormente, se recuperó el GEM iAF1260 de la cepa K-12 de *E. coli* del repositorio BiGG Models [5] y los códigos necesarios para correr OptKnock [7] para el modelo iAF1260 de la página web del grupo de Costas Maranas en el lenguaje de programación para modelamiento matemático y optimización GAMS. Entre estos código se encuentra el código `Bounds.gms`, que se corrió para encontrar los límites iniciales para la red metabólica dado un nivel de biomasa y flujo de entrada de un sustrato especificados al sistema. Se validaron los límites inferiores y superiores del flux de treonina para verificar que se estuviera produciendo y que hubiese intercambio (tanto de entrada como de salida) con el medio externo.

Adicionalmente, se corrieron los códigos `MaxBiomass.gms` y `MaxThreonine.gms` (también obtenidos y adaptados de la página de Maranas) que corren un FBA con la función objetivo siendo la biomasa y la producción de treonina respectivamente para determinar un nivel basal de estos flujos (basal entendiéndose como un nivel de referencia para la cepa original). Todos los códigos fueron corridos utilizando el solver OSIGUROBI.

2.2 | Optimización de la cepa de *E. coli* para la producción de treonina mediante la delección de genes

Se corrió el código `OptKnock.gms` (obtenido de la página de Maranas) especificando la optimización de la producción de treonina, indicada como la reacción THRS (treonina sintasa). Se realizaron varias tandas de corrida de este código, primero variando el parámetro `allowknock` (que indica número máximo de genes +1 permitidos para delecionar) de 2 a 9 y dejando fijo el parámetro `minbiomass` (que establece la biomasa mínima requerida) en 5, luego dejando fijo el parámetro `allowknock` en 3 y variando el parámetro `minbiomass` de 3 a 9 (en estos dos primeros casos utilizando un valor por defecto de entrada de glucosa de -100), y finalmente fijando el parámetro `allowknock` en 3 y el `minbiomass` en 5 y variando el flujo de glucosa (el sustrato) desde el paso de correr el código `Bounds.gms`. Todos los códigos fueron corridos utilizando el solver OSIGUROBI.

2.3 | Rastreo de posibles patologías del modelo iAF1260 de la cepa K-12 de *E. coli* y formulación de soluciones de las patologías

Se recuperó el código para correr GapFind [6] para el modelo iAF1260 de la página web del grupo de Costas Maranas en el lenguaje de programación para modelamiento matemático y optimización GAMS. Se corrió GapFind para identificar las posibles patologías del modelo utilizando el solver OSIGUROBI. Posteriormente, se corrió <https://opencobra.github.io/cobratoolbox/latest/tutorials/tutorialFastGapFill.html> utilizando el COBRA Toolbox en MatLab [3] y se buscaron las reacciones de los metabolitos de no producción/consumo en la base de datos BiGG Models para hallar soluciones a estas patologías.

3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 | *E. coli* produce treonina eficientemente y la secreta al ambiente

La reconstrucción metabólica obtenida con KAAS [10] indica que todos los pasos de la ruta implicada en el metabolismo de la treonina están presentes en la cepa K-12 de *E. coli* (Figura 1). De igual manera, los resultados de la definición inicial de los límites inferiores y superiores del flux de la reacción THRS fueron de 2.644 mmol/hr y 283.605 mmol/hr respectivamente. A partir de estos resultados podemos concluir que en efecto la cepa K-12 de *E. coli* puede producir treonina y es un buen objetivo de optimización para su producción ya que se puede ver que ocurre intercambio con el medio externo de la célula, lo que permitirá su posterior extracción.

Adicionalmente, los resultados del FBA optimizando biomasa y producción de treonina dieron resultados de 9.626 hr⁻¹ y 186.319 mmol/hr, lo que indica que para la cepa silvestre que se está evaluando, la producción de treonina y el crecimiento de la bacteria son buenos en condiciones estándar, lo que reafirma a este metabolito como un buen objetivo de optimización.

3.2 | Los parámetros óptimos para la optimización de producción de treonina fueron: máximo 3 genes por deletar con un mínimo de biomasa requerido de 5

Se puede observar que el flux de la producción de treonina en función al número de genes máximos a deletar no presentó una tendencia monótonica, es decir, a medida que se permiten deletar más genes (para un mismo nivel de biomasa mínimo requerido) no se incrementa necesariamente la producción de treonina (tampoco se observa el fenómeno contrario, es decir, entre menos son los genes permitidos para deletar tampoco se aumenta necesariamente el flux de THRS) (Figura 2A), barras azules). Otro aspecto interesante es que a medida de que el número de genes permitidos por deletar varía, los genes que son deletados también pueden cambiar por completo y no sencillamente se adicionan otros genes a los que ya se habían predicho por deletar. Los resultados completos con los genes que fueron deletados para cada corrida de OptKnock variando el número de genes permitido por deletar (manteniendo los demás parámetros fijos) se puede encontrar en la Información suplementaria - A Cuadro 2. Por otro lado, se puede ver que en general el flux de biomasa no varía mucho con respecto al valor obtenido para la cepa silvestre (Figura 2A), barras rojas), con excepción de cuando se permiten deletar 3 genes, en donde el valor del flux bajó hasta 5.022 hr⁻¹ (Información suplementaria - A Cuadro 2).

A pesar de que el flux para la biomasa fue relativamente menor que para todos los demás casos, se determinó que los parámetros óptimos resultantes del proceso de exploraciónj variando el número de genes permitidos para delecio-

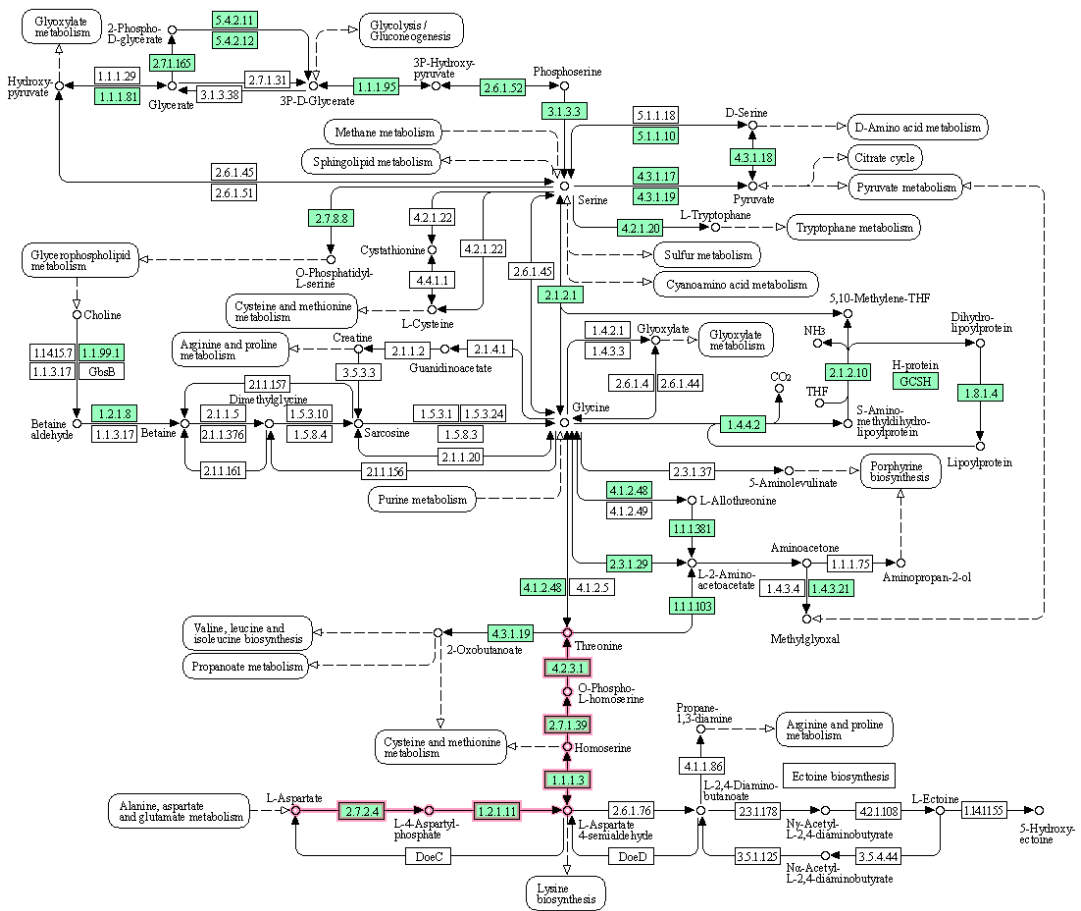


FIGURA 1 Reconstrucción metabólica obtenida por KAAS [10] de las rutas de la glicina, lisina y treonina del genoma anotado de la cepa K-12 de *E. coli* (NCBI ID: NC_000913.3). En verde están señalados los genes hallados en el genoma. Resaltada con rojo está la ruta de síntesis de la treonina.

nar, manteniendo un nivel mínimo de biomasa requerido de 5, es de 3 (+1) genes, donde se deleccionaron las reacciones EDA y MGSA, correspondientes a la “-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase” y “Methylglyoxal synthase”, y se obtuvo un flux para la treonina sintasa de 282.383 mmol/hr.

Similar a lo que se observó para la exploración de distinto valores del número de genes permitidos para ser deleccionados, al fijar este parámetro en 3 (+1) genes (que fue determinado como el parámetro óptimo para la producción de treonina) y variar el nivel de biomasa mínimo requerido, también se observa que no hay una tendencia positiva o negativa definida en cuanto al incremento o reducción de este parámetro (Figura 2B), barras azules). Lo que si se puede observar, es que el impacto de este parámetro en el flux de treonina es mucho más pronunciado que el número de genes permitidos para deleccionar, ya que se alcanzan fluxes tan bajos como 5.096 mmol/hr (para una valor mínimo de biomasa de 6) y tan altos como 282.383 mmol/hr (para una valor mínimo de biomasa de 6) (Información suplementaria - A Cuadro 3). Además, nuevamente se puede observar que los genes seleccionados para deleccionar varían,

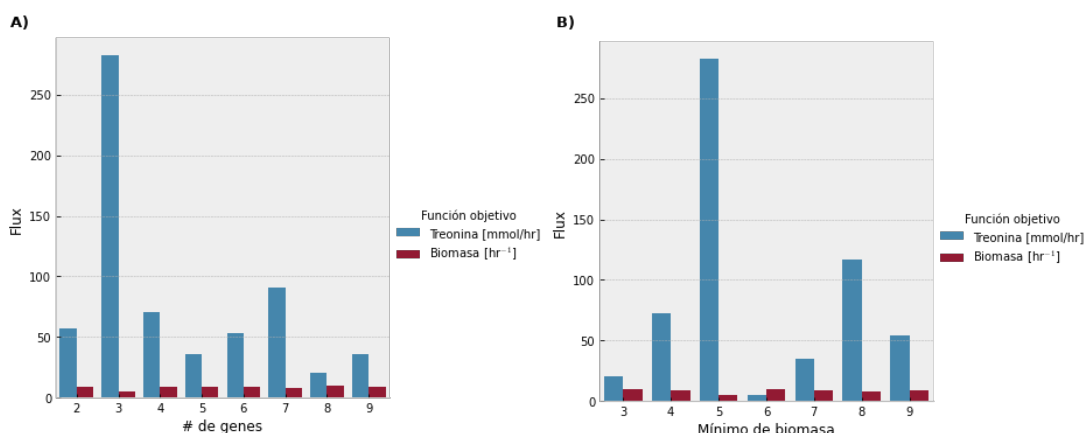


FIGURA 2 Resultados de las optimización de fluxes para la treonina (Azul) y la biomasa (rojo) utilizando OptKnock [7] para **A)** distintos valores de *allowknock* (número máximo de genes +1 permitidos para deleccionar) utilizando un valor fijo de *minbiomass* (biomasa mínima requerida) de 5, y **B)** distintos valores de *minbiomass* utilizando un valor fijo de *allowknock* de 3.

inclusive en algunos casos el número de genes a deleccionar, según el nivel mínimo de biomasa especificado. Finalmente, se puede observar que el flux de biomasa vuelve a no variar tanto con respecto al valor de la cepa silvestre (Figura 2B), barras rojas), y los mismos parámetros obtenidos de la exploración anterior vuelven a ser los parámetros óptimos para la producción de treonina a pesar de que el flux de biomasa es menor con respecto a las demás corridas.

La variación en cuanto a los genes seleccionados para deleccionar según los parámetros escogidos puede deberse a la sinergia de distintas reacciones implicadas en alguna ruta metabólica que acumule algún metabolito que consuma energía o sustrato que podría ser necesario para la producción de treonina, aunque también puede deberse al hecho a que la implementación utilizada es basada en métodos de Monte Carlo, por lo tanto parte de la exploración del espacio de optimización es estocástica y por ende se pueden llegar a mínimos locales y no siempre a los mínimos globales del sistema.

Por último, se fijaron los parámetros del OptKnock en 3 y 5 para el número de genes permitidos para deleccionar (+1) y el nivel mínimo de biomasa requerido respectivamente y se varió el flujo de entrada del sustrato, en este caso glucosa que poseía un valor de -100 mmol/hr en el modelo original, sin embargo se encontró que para valores de entrada superiores a este valor (como por ejemplo -90 mmol/hr), estableciendo un menor flujo de entrada, el modelo resultaba no ser viable; mientras que, si se utilizaban valores inferiores al original (como por ejemplo -110 mmol/hr), estableciendo un flujo mayor de entrada, los resultados no cambiaban.

3.3 | Se hallaron 112 metabolitos de no producción en el modelo iAF1260 de la cepa K-12 de *E. coli* y varias reacciones asociadas a estos metabolitos para resolver sus patologías

GapFind [6] detectó 112 reacciones de metabolitos de no producción/consumo para el modelo iAF1260 de la cepa K-12 de *E. coli*, de las cuales 100 están situadas en el citoplasma y 12 en el periplasma (Cuadro 1). De las patologías encontradas, ninguna está directamente relacionada con la ruta de síntesis de treonina (Figura 1) ni con alguno de los

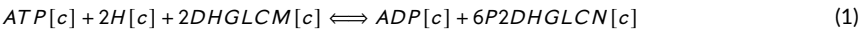
CUADRO 1 Metabolitos de no producción/consumo detectados por GapFind [6] en el modelo iAF1260 de la cepa K-12 de *E. coli*.

2dhgulin[c]	aragund[c]	cystrna[c]	garagund[c]	mercppyr[c]	sectrna[c]	trnahis[c]
2pglyc[c]	arbt6p[c]	dann[c]	gbbtn[c]	mettrna[c]	seln[c]	trnaile[c]
3dhgulin[c]	argtrna[c]	dmbzid[c]	gbbtn[p]	mi1p-D[c]	selnp[c]	trnaleu[c]
3sala[c]	asnrna[c]	dms[c]	gfgaragund[c]	o16a2und[p]	sertrna(sec)[c]	trnals[c]
4ahmmp[c]	aso3[c]	dmsc[c]	gltrna[c]	o16a3und[p]	sertrna[c]	trnamet[c]
4mhetz[c]	aso3[p]	dsbaox[p]	glytrna[c]	o16a4colipa[p]	tcynt[c]	trnaphe[c]
5prdbmbz[c]	aso4[c]	dsbard[p]	gp4g[c]	o16a4und[p]	thrttrna[c]	trnapro[c]
8aonn[c]	asptrna[c]	dsbcx[p]	gthox[p]	o16aund[c]	tma[c]	trnasecys[c]
Nmtrp[c]	bbtcoa[c]	dsbcdp[p]	hg2[c]	o16aund[p]	tmao[c]	trnaser[c]
ag[c]	betald[c]	dsbdx[c]	hg2[p]	phetrna[c]	trnaala[c]	trnathr[c]
alatrna[c]	btn[c]	dsbdrd[c]	histrna[c]	pmcoa[c]	trnaarg[c]	trnatrp[c]
alpp[p]	btnso[c]	dsbgx[p]	hqnc[c]	protrna[c]	trnaasn[c]	trnatyr[c]
amob[c]	cenchddd[c]	dsbgdrd[p]	iletrna[c]	ragund[c]	trnaasp[c]	trnaval[c]
ap4a[c]	cinnm[c]	dtbt[c]	leutrna[c]	rdmbzi[c]	trnacys[c]	trptrna[c]
ap5a[c]	cu[c]	dxyl[c]	lpp[p]	s[c]	trnagln[c]	tyrtrna[c]
apoACP[c]	cyan[c]	fmettrna[c]	lystrna[c]	sarcs[c]	trnagly[c]	valtrna[c]

[c]: Citoplasma, [p]: Periplasma.

genes delecionados en cualquiera de las corridas que se realizaron con OptKnock [7] (**Información suplementaria - A**), por lo que se puede concluir que los resultados obtenidos del proceso de la optimización de la cepa para la producción de treonina son confiables. No obstante, igual estas patologías podrían llegar a tener un efecto en el sistema que afecten los resultados del proceso de optimización al tener un efecto global sobre el metabolismo de la cepa (algo que solamente es posible verificar corrigiendo las patologías), razón por lo cual es importante corregir todas las patologías que sean posibles para obtener el modelo mejor curado.

FastGapFill arrojó varias reacciones tentativas para solucionar las patologías del modelo, la liosta de reacciones obtenidas se puede encontrar en el repositorio del proyecto. Entre las reacciones que se encontraron, están por ejemplo incluir la reacción 1 para solucionar la patología del metabolito de no producción *2dhgulin*[c] y agregar una reacción de intercambio con el medio externo para solucionar la patología del metabolito de no producción *16aund*[c].



4 | CONCLUSIONES

En este proyecto se logró verificar que la treonina es un buen objetivo para optimizar su producción en la cepa K-12 de *E. coli* mediante una aproximación de deleción de genes. Se determinó que los parámetro óptimos para este proceso es la deleción de los genes EDA y MSGA correspondientes a la “-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase” y “Methylglyoxal synthase” estableciendo un nivel mínimo de biomasa de 5, para lo que se obtuvieron fluxes de

producción de treonina de biomasa de 282.282 mmol/hr y 5.022 l/hr. También se encontraron 112 patologías en el modelo iAF1260 de la cepa K-12 de *E.coli*, de las cuales 100 ocurren en el citoplasma y 12 en el periplasma, sin embargo, probablemente estas patologías no afecten los resultados de la optimización de la cepa obtenidos. Finalmente, se encontraron varios mecanismos para solucionar estas patologías para obtener resultados más confiables.

Referencias

- [1] Maranas CD, Zomorodi AR. Optimization methods in metabolic networks. John Wiley & Sons; 2016.
- [2] Klipp E, Liebermeister W, Wierling C, Kowald A. Systems biology: a textbook. 2., completely revised and enlarged edition ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2016.
- [3] Heirendt L, Arreckx S, Pfau T, Mendoza SN, Richelle A, Heinken A, et al. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0. *Nature protocols* 2019;14(3):639–702.
- [4] Wang H, Marcišauskas S, Sánchez BJ, Domenzain I, Hermansson D, Agren R, et al. RAVEN 2.0: A versatile toolbox for metabolic network reconstruction and a case study on *Streptomyces coelicolor*. *PLoS computational biology* 2018;14(10):e1006541.
- [5] King ZA, Lu J, Dräger A, Miller P, Federowicz S, Lerman JA, et al. BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic acids research* 2016;44(D1):D515–D522.
- [6] Satish Kumar V, Dasika MS, Maranas CD. Optimization based automated curation of metabolic reconstructions. *BMC bioinformatics* 2007;8(1):1–16.
- [7] Burgard AP, Pharkya P, Maranas CD. Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnology and bioengineering* 2003;84(6):647–657.
- [8] Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. Lehninger principles of biochemistry. Seventh edition ed. New York, NY : Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education; 2017. OCLC: ocn986827885.
- [9] Feist AM, Henry CS, Reed JL, Krummenacker M, Joyce AR, Karp PD, et al. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Molecular systems biology* 2007;3(1):121.
- [10] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Kanehisa M. KAAS: KEGG automatic annotation server. *Genome Informatics* 2005;5:2005.

CUADRO 2 Resultados de OptKnock [7] para **A)** distintos valores de `allowknock` (número máximo de genes +1 permitidos para deleccionar) utilizando un valor fijo de `minbiomass` (biomasa mínima requerida) de 5.

allowknock	Flux Treonina [mmol/hr]	Flux Biomasa [hr ⁻¹]	Genes deleccionados
2	56.964638	8.951377	{MGSA}
3	282.383901	5.022422	{EDA, MGSA}
4	70.446175	8.740188	{AACPS3, ABUTD, PTRCTA}
5	36.177105	9.277016	{EDTXS4, GART, GLYCK2, PSERT}
6	52.98183	9.013768	{ADPT, CBPS, DMPPS, LDH_F_f, LIPAHT2ex}
7	91.031548	8.384398	{5DGLCNR_f, EDD, G6PP, ICHORS_f, MTHFC_f, THRAi}
8	20.423029	9.45385	{ACALD_F, DHAPT, DRPA, NTPP2, PGCD, PGCD, PPM2_f, PSERT, UGLCURPpp}
9	36.093731	9.278048	{ABTA, ACALD_f, AGDC, FACOAE180, PFL, PGCD, PSERT, PSP_L, Ec_biomass}

Información suplementaria

| **A: Resultados de OptKnock**

CUADRO 3 Resultados de OptKnock [7] para distintos valores de minbiomass (biomasa mínima requerida) utilizando un valor fijo de allowknock (número máximo de genes +1 permitidos para deleccionar) de 3.

minbiomass	Flux Treonina [mmol/hr]	Flux Biomasa [hr ⁻¹]	Genes deleccionados
3	20.423029	9.45385	{PPA, PPS, PSERT}
4	72.605074	8.706369	{GLYCLTDy, NADPHQR2}
5	282.383901	5.022422	{EDA, MGSA}
6	5.095394	9.635768	{3HAD140, EAR60x, GLUSy}
7	35.346883	9.287294	{CITL, PPCK}
8	117.285926	8.000	{EAR161y, PPS} {EDA, GRXR, GTHOr_f} {GLCP2, LALGP, PSERT, VPAMT}
9	53.860749	9.000	{MDH2, PUNP3_f} {AACTOOR, ASNNpp, MGSA} {ACALD_f, EDA, ETHAAL, PSP_L}