



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

***PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE ÁCIDOS
GRASOS EN CULTIVOS AERÓBICOS DE ESCHERICHIA
COLI K12, UTILIZANDO INGENIERÍA GENÉTICA Y
HERRAMIENTAS DE INGENIERÍA METABÓLICA.***

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA, MENCIÓN QUÍMICA

DANIELA CONSTANZA DE LOURDES SANDOVAL HERNÁNDEZ

PROFESOR GUÍA
JUAN ALFONSO ASENJO DE LEUZE

PROFESOR GUÍA
BARBARA ANDREWS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM
RAFAEL VICUÑA ERRAZURIZ

SANTIAGO, CHILE

2014

i

Resumen

Los ácidos grasos son un subproducto de bajo costo, abundante y cuyo producto de degradación puede ser fácilmente convertido en etanol, sin embargo no han sido debidamente considerados en la búsqueda de substitutos para combustibles fósiles. El principal inconveniente de la producción de bioetanol a partir de ácidos grasos en *Escherichia coli*, es que la síntesis de este alcohol es inactivada en presencia de oxígeno y la degradación de los ácidos grasos es más eficiente en presencia de este. Por ello, el primer paso fue realizar una modificación en el gen *adhE* que permitiera la codificación de un alcohol deshidrogenasa aerotolerante. A continuación y para optimizar la producción de etanol fue necesario considerar factores como el equilibrio redox y la alta conectividad del acetyl-CoA, mediante herramientas de modelamiento matemático como el análisis de modos elementales. Como resultado de estos análisis se logró la predicción de la delección de los genes *fdnG (f)*, *pflB (p)*, *nuoG(n)*, *ldhA(l)* y *ackA-pta (ap)*, y mediante técnicas basadas en PCR se generaron 3 cepas en *E. coli* K12 MG1655: *fnfp**, *fnfpl** y *fnfplap**. Al realizar cultivos *batch* de estas cepas fue posible validar la tendencia predicha por la simulación *in silico* de un aumento significativo y sostenido en el flujo de etanol a medida que aumenta el número de delecciones, siendo clave la delección del gen *nuoG*. Con respecto al crecimiento de las cepas en ácidos grasos, la cepa *fnfplap** presentó una tasa de crecimiento y una producción de biomasa significativamente superior a la cepa silvestre de *E. coli* y a la mutante Δ *fadR atoC**, e incluso fue capaz de crecer en desechos industriales del refinamiento de aceites vegetales. En estos cultivos, la tasa de producción de etanol también fue significativamente mayor al valor en ácido palmítico purificado, lo que muestra tanto el potencial de la cepa para ser utilizada a nivel industrial como el efecto del medio de cultivo en la producción de etanol. A pesar de estos resultados, los valores experimentales de producción de etanol no coincidieron con los obtenidos en la simulación, por lo que se realizaron simulaciones con un modelo genómico de *E. coli*. Estos análisis permitieron, por una parte, obtener información sobre posibles genes para eliminar, de modo de permitir la optimización de la producción de etanol a partir de ácido palmítico en condiciones de cultivo aeróbico, pero sin afectar complejos enzimáticos tan importantes como el de la NADH deshidrogenasa; y por otra, corroborar la hipótesis de que la presencia de oxígeno es indispensable para la degradación de los ácidos grasos. Los resultados de este trabajo de tesis muestran que fue posible producir etanol en un sistema de cultivo aeróbico usando como sustrato ácidos grasos, incluso en aquellos provenientes de desechos industriales, obteniéndose una cepa especializada en consumo de ácidos grasos. Adicionalmente, se mostró que el contenido del medio y la estrategia de cultivo pueden afectar directamente la producción de etanol y de biomasa, hasta el punto de obtenerse niveles atractivos para la industria y el tratamiento de desechos ricos en estos ácidos orgánicos.

Abstract

Fatty acids are a substrate that is low cost, abundant in industries like edible oil and whose degradation product can be easily transformed to ethanol, but have not been considered or exploited for bioethanol production. The major inconvenient is that in *Escherichia coli*, enzymes responsible for ethanol production are not tolerant to oxygen, and the pathway for fatty acids degradation are more efficient in presence of it, therefore a variant of the *adhE* gene (Glu568Lys) was constructed. In order to optimize ethanol production it was necessary to consider factors such as redox equilibrium and the high connectivity of acetyl-CoA. For this, Elementary Mode Analysis (EMA) was used. This analysis predicted 5 gene knockouts: *fdnG* (*f*), *pflB* (*p*), *nuoG* (*n*), *ldhA* (*l*) y *ackA-pta* (*ap*). These genes were deleted by PCR based methods and 3 strains were generated: *fnfp*, *fnfpl** and *fnfplap**. Batch cultures of these strains allowed validation of the predicted trend of the *in silico* simulations of a significant increase in ethanol flux as the number of knockouts increased, where *nuoG* plays an essential role. Also, the growth rate in fatty acids for *fnfplap** was significantly greater than in the wild type strain or the Δ *fadR atoC**, and was even capable of growing in media derived from industrial waste. In these cultures, the ethanol production rate was significantly greater than purified palmitic acid, showing not only the strain potential for its use in waste treatment, but also the effect of the medium content in ethanol production. Even though the predicted trend was validated, the experimental values of ethanol production rate were lower than those simulated *in silico*. For this reason, simulations of a genomic model of *E. coli* were performed with the Toolbox of MATLAB, Cobra. On one hand, these analyses allowed a new list of gene knockouts for the optimization of ethanol production from fatty acids in aerobic culture conditions; and in the other hand, corroborated the experimental design and literature data by showing that aerobic culture is necessary for the complete degradation of fatty acids. All these results showed that it is possible to produce ethanol in an aerobic culture setup, using fatty acids as sole carbon source and that it was possible to validate the *in silico* predicted trend, even in industrial waste rich in fatty acids. It was also shown that is possible to generate specialized strains in fatty acid consumption and that the media content and the culture strategy can affect directly not only ethanol, but also biomass production, even in amounts that can be attractive as a tool for waste treatment of this polymer.

Al amor de mi vida, a mi familia y a los amigos que hicieron que esto fuera posible

Agradecimientos

Voy a partir por el que ha sido mi compañero en este largo camino, quien me acompañó desde el principio, no importando si era fin de semana, si eran las 11pm, quien incluso aprendió a pipetear y a hacer minipreps, gracias por tu apoyo, por tus infinitas formas de hacerme reír y por estar siempre ahí para mí. Los siguientes son mis padres y mis hermanos, quienes a pesar de que no entendían mucho, siempre me apoyaron y se mostraron muy orgullosos.

También quiero agradecer a mis tutores, el Dr. Juan Asenjo y la Dra. Barbara Andrews por haberme acogido en su laboratorio y por haberme brindado el apoyo que necesité para cada paso del camino. Me gustaría agradecer a los miembros de mi comisión, al Dr. Rafael Vicuña, a la Dra. Ziomara Gerdtzen, y a la Dra. Oriana Salazar, quien se transformó en un apoyo fundamental y en una verdadera amiga.

En el laboratorio muchos se transformaron en pilares fundamentales para mí, pero debo destacar a ciertas personas. La primera, mi Gianni, gracias por tu dulzura y comprensión, por superar tus miedos y seguir tus sueños. Sigo con Juan, muchas gracias por todo tu ayuda, tus comentarios buenos y malos, por las risas, por las conversaciones eternas, por tu compañía on-line y en vivo, por tus cepas, tus contactos, tus mañas y por tus chocolates. Sigo con Cynthia, muchas gracias por las risas sin sentido, por escucharme, por tus favores, tu disposición, tu dulzura, hasta por tus mañas!, gracias por quedarte hasta “infinitas” horas acompañándome y por estar ahí siempre, eso nunca se me va a olvidar. Muchas gracias Javi, por la buena onda, las risas y las onces. Muchas gracias a Matías, Cami, Panky, Vida, Icha, Anitamaría, Anita Luz, Alexis, Alicia, Dani Vaisman, Jose, Nati, Gabi, Negro, Gonzalo, Javier, Camilo, Lore Trini, Allison, Jean, Vale, Carlos, Diana, Medardo, Jorge (Lascani y Meza), Juan Calamares, Emilie, Cristina, Carolina, Miguel, Pati Lozada, Contreras y Martínez, Pablo y profe MEL. Una especial mención al Epaps group, al profesor Papoutsakis, a Alan, Mohab, Sergios, Stefan, Brian, Dan, Sean, Rick, George y al dulce JinLin. A mis amigos de siempre, Lee, Lelo y Pancho. Muchas gracias por todo el apoyo, sin ustedes este trabajo no se habría realizado. Finalmente, quisiera hacer un especial agradecimiento a Nancy, muchas gracias por tu cariño y paciencia, no tan solo por tu ayuda experimental, sino también por escucharme, apoyarme, aconsejarme y animarme. ¡¡Gracias a todos!! y si me olvido de alguien, no es porque no sea importante sino porque ya después de una tesis de doctorado, no se puede esperar mucho! =)

Tesis financiada por CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/año 2009 y por BECAS CHILE para Pasantías Doctorales año 2011.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
1.1 Combustibles	1
1.1.1 Combustibles fósiles.....	1
1.1.2 Biocombustibles	1
1.2 Ácidos grasos.....	3
1.2.1 Ácidos grasos en desechos industriales	3
1.2.2 Potencial de los ácidos grasos en la producción de etanol	3
1.2.3 <i>Escherichia coli</i> y ácidos grasos	4
1.2.4 β -oxidación de los ácidos grasos	5
1.3 Producción de etanol en <i>Escherichia coli</i>	6
1.3.1 Tolerancia de <i>Escherichia coli</i> a altas concentraciones de etanol	8
1.4 Metabolismo aeróbico versus anaeróbico.....	8
1.5 Conectividad de acetyl-CoA y uso de herramientas de modelamiento matemático.....	9
1.5.1 Análisis de modos elementales	9
1.5.2 Modelamiento estequiométrico.....	11
2. Antecedentes.....	14
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivo General.....	15
3.1.1 Objetivos Específicos	15
4. Materiales y Métodos.....	16
4.1 Materiales	16
4.1.1 Reactivos generales.....	16
4.1.2 Biología molecular.....	16
4.1.3 Cepas	16
4.1.4 Vectores.....	17
4.1.5 Equipamiento.....	17
4.2 Métodos.....	17

4.2.1 Medios de cultivo.....	17
4.2.3 Métodos generales de biología molecular	23
4.2.4 Amplificación y clonamiento de ADN cromosomal	23
4.2.5 Mutagénesis sitio dirigida.....	24
4.2.6 Construcción de sistemas de expresión.....	24
4.2.7 Deleción de Genes	26
4.2.8 Verificaciones de PCR	28
4.2.9 Eliminación del gen de resistencia a los antibióticos	28
4.2.10 Mutación espontánea en el gen <i>atoC</i>	28
4.2.11 Métodos analíticos.....	29
4.2.13 FBA.....	31
5. Resultados y Discusión.....	34
5.1 Generación de variantes genéticas de <i>E. coli</i> capaces de usar ácidos grasos en la producción de etanol en condiciones aeróbicas.....	34
5.1.1 Obtención de una alcohol deshidrogenasa con actividad en condiciones de cultivo aeróbico mediante mutación sitio dirigida	34
5.1.2 Identificación de las modificaciones genéticas necesarias para optimizar la producción de etanol a partir de ácidos grasos, mediante simulaciones <i>in silico</i>	35
5.1.3 Generación de cepas de <i>E. coli</i> con mejoramiento de la producción de etanol a partir de ácidos grasos	38
5.2 Análisis de medios de cultivo y de variantes génicas relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos en producción de biomasa y etanol.....	40
5.2.1 Evaluación de medios de cultivo definidos en el crecimiento de <i>E. coli</i> en ácidos grasos.....	40
5.2.2 Efecto de <i>knockouts fadR</i> y <i>arcA</i> en la producción de biomasa y en la producción de etanol en variantes que expresan una versión aerotolerante de AdhE	43
5.2.3 Efecto de la deleción del gen que codifica para la NADH deshidrogenasa I y formas de cultivo en la producción de etanol.....	44
5.2.4 Evaluación de distintas formas de fermentación para minimizar producción de metabolitos secundarios y evaporación de etanol en cultivos con ácidos grasos en condiciones de cultivo aeróbico	48

5.3 Validación experimental de la predicción realizada mediante simulaciones <i>in silico</i> en cultivos con ácido palmítico purificado comercial y en medios con desechos industriales ricos en ácidos grasos.....	51
5.3.1 Tasas de producción en las cepas modificadas genéticamente para producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico a partir de ácidos grasos.....	53
5.4 Simulaciones y nuevo diseño de cepas utilizando un modelo genómico de <i>Escherichia coli</i> para la producción de etanol a partir de ácidos grasos en condiciones de cultivo aeróbico.....	54
5.4.1 Simulación del efecto de la concentración de oxígeno en el consumo de ácidos grasos y la producción de etanol.	56
5.4.2 Diseño de cepa optimizada en la producción de etanol a partir de ácidos grasos en condiciones de cultivo aeróbico utilizando un modelo genómico.	56
6. Conclusiones	65
7. Bibliografía.....	67
Anexo1. Oligonucleotidos	74
Anexo2. Scripts Matlab.....	76
A2.1 Efecto de la concentración de oxígeno en el consumo de ácidos grasos y la producción de etanol.....	76
A2.2 Reducción del modelo genómico iJO1366	79
A2.3 Diseño de cepa optimizada para la producción de etanol a partir de ácidos grasos-Optknock.....	81
A2.4 Diseño de cepa optimizada para la producción de etanol a partir de ácidos grasos-OpGene.	83
Anexo 3. Vectores	85
Anexo 4. Abreviaciones.....	87

Índice de tablas

Tabla 1. Detalle de los genes predichos por el EMA.....	36
Tabla 2. Variantes generadas durante el desarrollo de este trabajo de tesis en base a la cepa.....	41

Tabla 3. Comparación entre el contenido de dos medios definidos utilizados, R/2 y MOPS.....	42
Tabla 4. Deleciones predichas por <i>Optknock</i> (30).....	60
Tabla 5. Deleciones predichas por <i>Optknock</i> (10).....	61
Tabla 6. Deleciones predichas por <i>OptGene</i> , luego de <i>OptKnock</i> 30 y <i>OptKnock</i> 10.....	61
Tabla 7. Resultado <i>OptKnock</i> 10 (segunda iteración).....	61
Tabla 8. Resultado <i>OptGene</i> 10 (segunda interación).....	61

Índice de ilustraciones

Figura 1. Diagrama de la β -oxidación y la biosíntesis de ácidos grasos en <i>Escherichia coli</i>	7
Figura 2. Conectividad de metabolitos en un modelo a escala genómica de <i>Escherichia coli</i>	10
Figura 3. Fotografía del reactor Biostat B al utilizar medio R/2 con ácidos grasos.....	21
Figura 4. Esquema de sistemas utilizados para cultivo en condiciones aeróbicas de <i>E. coli</i> en medios con ácidos grasos	21
Figura 5. Fotografías de los mini-fermentadores.....	22
Figura 6. Fotografías cultivo en matraces con salida inferior.....	22
Figura 7. Esquema del proceso de deleción de genes.....	27
Figura 8. Comparación de parte de las secuencias de la versión silvestre y mutada del gen <i>adhE</i>	35
Figura 9. Resultado del análisis de modos elementales.....	36
Figura 10. Esquema de algunas de las vías metabólicas del metabolismo central de <i>E. coli</i>	37
Figura 11. Ejemplo de la verificación por PCR de cepas con deleción cromosómica.....	41

Figura 12. Curva de crecimiento de la cepa <i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 en medios mínimos.	43
Figura 13: Efecto de la delección de <i>fadR</i> y <i>arcA</i> en el crecimiento de cepas en ácidos palmítico a 37°C en medio R/2.....	45
Figura 14. Producción de metabolitos en K12 $\Delta fadR$ expresando la versión silvestre y mutada del gen <i>adhE</i>	46
Figura 15. Producción de etanol a dos temperaturas de cultivo en la variante con la delección en el gen <i>nuoG</i>	46
Figura 16: Producción de etanol, acetato y butirato en variantes de <i>E. coli</i>	47
Figura 17. Comparación de la producción de etanol en variantes de <i>E. coli</i> en cultivos de alta y baja densidad.....	49
Figura 18. Producción de biomasa (DW) y etanol en fermentador Biostat B.....	52
Figura 19: Cultivos en minifermentadores en LB y ácido palmítico.....	52
Figura 20. Tasas de producción de etanol en variantes de <i>E. coli</i> y el efecto de la temperatura en esta.....	55
Figura 21. Rendimiento en la producción de etanol para variantes de <i>E. coli</i> y comparación en tasa de producción con ácidos grasos provenientes de desechos industriales.....	55
Figura 22. Simulación de la producción de etanol y el consumo de ácido palmítico bajo diferentes condiciones de cultivo aeróbico.....	57
Figura 23. Resultado simulación OptGene, luego de realizar la primera iteración OptKnock30 y OptGene10.....	62
Figura 24. Resultado simulación OptGene, luego de realizar la primera iteración de OptKnock10 y OptGene10.....	63
Figura 25. Resultado simulación OptGene, luego de realizar la segunda iteración de OptKnock10 y OptGene10.....	64

1. Introducción

1.1 Combustibles

1.1.1 Combustibles fósiles

El petróleo crudo, la gasolina, el gas licuado, el gas natural y el carbón son todavía los principales recursos utilizados para sustentar la demanda de energía mundial, estimada en 11.295 millones de toneladas (mtoe) y dónde el 88% del consumo corresponde a combustibles de origen fósil (British Petroleum 2009). Esto evidencia el rol crucial de éstos combustibles en el mercado de la energía mundial, el que en 2006 fue valorado en 1.5 trillones de dólares (Goldemberg 2006). Sin embargo, al ser un recurso no renovable, las reservas de petróleo y de los otros combustibles fósiles cada vez se ven más escasas. De hecho, se estima que para el 2042 el único combustible fósil disponible será el carbón, el que será completamente explotado para el 2112 (Shafiee & Topal 2009). Éste recurso es uno de los combustibles más utilizados en actividades domésticas en sectores rurales de China y es responsable de más de 420.000 muertes prematuras al año, más del estimado de muertes atribuidas a la contaminación del aire en todo el país, que asciende a 300.000 muertes al año (Zhang & Smith 2007). Por su parte, otros desechos de combustibles fósiles cómo óxidos de azufre y de nitrógeno generan lluvia ácida, conocida por su daño a plantas y edificios, la acidificación de suelos, lagos y ríos (Gustavsson et al. 1995); mientras que los denominados “gases de efecto invernadero” (entre los cuales se encuentran el dióxido de carbono, el metano y el óxido nitroso), se creen responsables de cambios en el nivel del mar, el tamaño de zonas de vegetación y del cambio climático actual (Montzka et al. 2011; Gustavsson et al. 1995).

Por lo tanto, a medida que las reservas se agotan y que la conciencia ambiental mundial aumenta, la búsqueda de nuevos combustibles amigables con el medio ambiente se convierte en una necesidad de carácter global.

1.1.2 Biocombustibles

Los principales beneficios de utilizar biocombustibles por sobre las formas más tradicionales de energía son mayor seguridad energética y menor impacto

ambiental, lo que no solo es relevante países industrializados, sino también en países en desarrollo como el nuestro (Demirbas 2011). Es relevante indicar que la directiva de biocombustibles de la comisión de la Unión Europea, solicitó el uso de un 5.75% de biocombustibles para el 2010 y un 20% para el 2020 (Stöcker 2008). Todo esto indica fuertemente que el uso de los biocombustibles no es sólo una idea sino que eventualmente se transformarán en nuestra única fuente de energía.

Actualmente, los tres principales biocombustibles son: el biodiesel (bio-esteres del aceite vegetal utilizado), el bioetanol y el biogás. El biodiesel, es utilizado como sustituto del petróleo diésel y es producido debido a la transesterificación de aceites vegetales, aceites residuales y grasas. El bioetanol es utilizado como sustituto parcial de la gasolina, y como sustituto completo en vehículos con ciertas modificaciones; es producido desde azúcares mediante fermentación anaeróbica y puede ser utilizado como materia prima para la producción de ETBE (*ethyl tertiary butyl ether*) el cual se mezcla mucho más fácil con la gasolina. Por su parte, el biogás o biometano, es un combustible que puede ser usado en vehículos que funcionan en base a gasolina luego de realizar modificaciones leves y es producido mediante degradación anaeróbica de estiércol u otras materias primas relacionadas. Los tres son caracterizados por aspectos cómo su habilidad para mezclarse con combustibles basados en petróleo, por su capacidad de combustionar en motores de combustión interna, por no necesitar nuevos medios de distribución y por su uso en vehículos que son capaces de utilizar combustibles alternativos, como los vehículos a gas natural (Naik et al. 2010). Éstos además ofrecen beneficios a nivel de reducción de emanación de CO₂, ya que las mismas plantas utilizadas para su producción son capaces de utilizar el CO₂ para su crecimiento (Gustavsson et al. 1995).

A pesar de la gama de biocombustibles presentados en este documento, en 2011 se estableció que del total de combustibles alternativos en uso en Estados Unidos, el 72.3% corresponde a una mezcla de etanol al 85% con gasolina (Farrell et al. 2006; Davis and Diegel 2004), lo que se condijo en 2009 con una producción de 10.6 billones de galones de etanol proveniente de maíz en el mismo país (Hughes et al. 2014). Por esta razón, este trabajo se centró en la producción de etanol como sustituto para combustibles fósiles.

De acuerdo a la materia prima utilizada para la producción de bioetanol, podemos definir los combustibles de primera generación (desde materias primas utilizadas en la industria alimentaria, tales como el azúcar de maíz, la caña de azúcar, entre otros), de segunda generación (a partir de materiales lignocelulósicos) y de tercera

generación (a partir de materiales algales, tanto de micro como de macroalgas). Sin embargo, materiales ricos en ácidos grasos, provenientes de la industria alimentaria (lácteos y aceites principalmente) no han sido evaluados hasta el momento.

1.2 Ácidos grasos

1.2.1 Ácidos grasos en desechos industriales

Los lípidos son uno de los mayores componentes de la materia orgánica en aguas residuales. Mataderos, industrias de producción y refinamiento de aceite comestible e industrias de productos lácteos son importantes contribuyentes de la emisión de estos lípidos totales (Alves et al. 2001). En el caso de la refinería del aceite, procesos como la centrifugación y deodorización de estos generan hidrólisis de los lípidos, convirtiéndolos en ácidos grasos de cadena larga y glicerol. De hecho se ha informado que cerca del 60% de los desechos industriales del proceso se encuentran compuestos por ácidos grasos (Goodrum JW., 2002, Zambiasi et al. 2007), tales como el ácido palmítico y el oleico (de 16 y 18 carbonos respectivamente), dependiendo de la procedencia del aceite sin refinamiento.

Con respecto a los tratamientos de aguas residuales, estos pueden ser fisicoquímicos y/o biológicos (aeróbicos y/o anaeróbicos) (Radick 1992). Sin embargo, desde hace un tiempo que los tratamientos biológicos de riles, en especial el anaeróbico, son preferidos por sobre el tratamiento fisicoquímico (Vidal & Carvalho 2000). Sin embargo estos presentan inconvenientes frente a un alto contenido de lípidos debido a dos fenómenos: la adsorción de una capa de lípidos alrededor de partículas de biomasa, lo que causa flotación y lavado de esta; y la alta toxicidad de ácidos grasos de cadena larga, en especial los insaturados, tanto para bacterias metanogénicas como acetogénicas, los principales grupos tróficos encargados de la degradación de material orgánico (Saatci et al. 2003). Por esto, un pretratamiento con bacterias capaces de degradar ácidos grasos de manera eficiente es altamente deseado.

1.2.2 Potencial de los ácidos grasos en la producción de etanol

El rendimiento teórico de la producción de etanol a partir de ácidos grasos, como el ácido palmítico, genera un rendimiento 2.7 veces (en p/p) mayor al de la glucosa (Dellomonaco et al. 2010), esto debido a que en el proceso de degradación de los ácidos grasos se forma una molécula de acetil-CoA por cada vuelta del ciclo de β -oxidación, el que a su vez puede ser convertido en etanol mediante 2 pasos enzimáticos. A pesar de su alta abundancia en desechos de industrias alimentarias como el refinamiento de aceites. Su menor costo comparado con otros sustratos para la producción de bioetanol (Dellomonaco et al. 2010) y los antecedentes de rendimiento teórico, éste sustrato ha sido mayormente estudiado por su potencial de producción de PHA en *Escherichia coli* (Park SJ et al., 2005) y muy poco por su contribución a la producción de biocombustibles. El único trabajo que ha mostrado el potencial de los ácidos grasos en la producción de etanol es el de Dellomonaco y col. en 2010, sin embargo este trabajo muestra la producción de etanol a muy baja escala y en condiciones microaeróbicas (con constantes de transferencia de oxígeno (kLa) menores a $15h^{-1}$ (Domínguez et al. 2000)).

1.2.3 *Escherichia coli* y ácidos grasos

Escherichia coli es una bacteria aeróbica facultativa Gram negativa, y es el microorganismo más comúnmente usado en investigación y a nivel industrial en la producción de metabolitos de interés. Una de sus cualidades más atractivas es su capacidad de crecer en medios relativamente sencillos, en los cuales la única fuente de carbono puede ser glucosa, acetato o ácidos grasos (Nunn 1986).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadena alifática que puede o no presentar saturaciones. Una vez que ingresan a la célula, pueden ser catabolizados o incorporados directamente en lípidos de variable complejidad. En términos generales, la catálisis de este compuesto ocurre por la β -oxidación cíclica y la ruptura tiólica de los ácidos grasos, generando varios moles de acetil-coenzima A (acetil-CoA) (Nunn 1986). El acetil-coenzima A generado es luego metabolizado en reacciones destinadas tanto a la producción de energía como de precursores de la biosíntesis, tal como el ciclo del TCA (Chang y col., 1999). Por su naturaleza química, el acetil-CoA es un precursor interesante en la producción de etanol, ya que este último es el alcohol derivado de la reducción del enlace carboxilo de este intermediario asociado a coenzima A.

Por su parte, *Escherichia coli* utiliza ácidos grasos como fuente de carbono de bajo estatus, ya que prefiere la utilización de sustratos más simples como glucosa antes de utilizar el ácido graso para su crecimiento (Iram & Cronan 2006).

Diversos estudios han demostrado que *Escherichia coli* es capaz de crecer en ácidos grasos de cadena larga como única fuente de carbono (Maloy et al. 1981), luego de una fase de adaptación o *lag*. Sin embargo, células pre-adaptadas con ácidos grasos de cadena larga crecen inmediatamente en esta fuente de carbono, indicando que la oxidación de los ácidos grasos es un sistema inducible (Weeks et al. 1969). No obstante, se ha demostrado que se necesitan ácidos grasos con una cadena mayor o igual a 12 carbonos para inducir este sistema (Campbell et al. 2003).

1.2.4 β -oxidación de los ácidos grasos

El sistema de degradación aeróbica de los ácidos grasos (Fad, por sus siglas en inglés) se denomina β -oxidación cíclica. Una representación gráfica de este proceso en *E. coli* se muestra en la figura 1. Los ácidos grasos de cadena larga (de 12 a 18 carbonos) atraviesan la membrana celular a través de un mecanismo de acil activación que involucra a dos proteínas, una de membrana externa llamada FadL (gen *fadL*) y una de membrana interna llamada acil-CoA sintasa o FadD (gen *fadD*). El primer paso de la vía de β -oxidación es la conversión de este acil-CoA en un enoil-CoA a través de la acil-CoA deshidrogenasa o FadE (gen *fadE*). Luego, actúa la enoil-CoA hidratasa/3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa o FadB (gen *fadB*), que realiza la hidratación y oxidación del enoil-CoA. El último paso es catalizado por la 3-cetoacil-CoA tiolasa (acetil-CoA C-aciltransferasa) o FadA (gen *fadA*), que rompe el 3-cetoacil-CoA resultando el acortamiento del ácido graso entrante y la liberación de una molécula de acetil-CoA (Fujita et al. 2007). Ésta molécula intermediaria puede ser utilizada en los ciclos de TCA y glioxilato, en presencia de un aceptor de electrones como oxígeno, nitrato o fumarato (Clark 1989). Debido a esto último, se ha demostrado que la degradación de ácidos grasos se puede realizar tanto aeróbica como anaeróbicamente (Campbell et al. 2003).

Para ácidos grasos que presentan insaturaciones, la 2-4 dioenoil-CoA reductasa o FadH (gen *fadH*) transforma el 2,4-dienoil-CoA derivado desde ácidos grasos insaturados en enoil-CoA, el que ingresa al ciclo de la β -oxidación para su posterior degradación (Fujita et al. 2007).

En aerobiosis, la expresión de estas enzimas se encuentra regulada en dos niveles: el sistema de represión de catabolito AMP cíclico y a través del factor de transcripción FadR. Éste último, ejerce un rol dual en el metabolismo de los ácidos grasos (figura 1), ya que reprime la transcripción de los genes esenciales para el transporte, activación y β -oxidación de los ácidos grasos, incluyendo a *fadL*, *fadD*, *fadE*, *fadB*, *fadA* y *fadH*; y actúa como activador de la expresión de los genes *fabA* y *fabB*, los cuales codifican para enzimas claves de la biosíntesis de ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, FadR regula tanto la conversión de los ácidos grasos en acetil-CoA como su utilización como producto final en la biosíntesis de lípidos y el ciclo del TCA (Iram & Cronan 2006; Fujita et al. 2007). Adicionalmente, FadR regula indirectamente el operón de los genes que codifican para la vía glioxilato (Campbell et al. 2003).

Se ha demostrado que la eficiencia del proceso de β -oxidación también es comandado por FadR, ya que mutantes incapaces de expresar este factor de transcripción, expresan constitutivamente los genes *fad*, lo que genera un efecto directo en la eficiencia de esta vía cíclica (Iram & Cronan 2006). Esto puede explicarse al observar la figura 1, donde se muestran los genes que reprime (en cajas verdes) y los que activa FadR (en cajas azules).

En anaerobiosis, el sistema de dos componentes ArcBA reprime la expresión del genes *fadB* y en un menor nivel la del gen *fadE* (Iuchi & Lin 1988), reprimiendo así parte crucial de la β -oxidación. Campbell y col. mostró en 2003 que existe una vía alternativa a FadBA, denominada YfcYX, la que permite la degradación de ácidos grasos de cadena larga en ausencia de oxígeno, pero en presencia de nitrato como aceptor de electrones. Sin embargo, así como ocurre con otros sustratos, en condiciones anaeróbicas se necesitó más del doble de tiempo para alcanzar el crecimiento mostrado en condiciones aeróbicas utilizando ácidos grasos como única fuente de carbono (Campbell et al. 2003)

1.3 Producción de etanol en *Escherichia coli*

Como se mencionó anteriormente, *E. coli* es un organismo aerobio facultativo, es decir, puede respirar utilizando oxígeno como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa o puede crecer en ausencia de aceptores de electrones externos, acoplado la reducción de metabolitos intermediarios a la oxidación del cofactor NADH, proceso conocido como fermentación (Clark 1989). En condiciones

anaeróbicas, el piruvato puede ser reducido a una mezcla de productos de la fermentación, tales como el lactato, succinato, acetato y etanol. La vía de producción de etanol a partir de acetyl-Coa se encuentra a cargo de la enzima AdhE, la que es capaz de convertir el acetyl-Coa en acetaldehído (con su actividad acetaldehído-CoA deshidrogenasa) y luego en etanol (con su actividad alcohol deshidrogenasa). Esto trae consigo la oxidación de 2 moléculas de NADH. Además, AdhE posee una tercera actividad enzimática, piruvato formato liasa (PFL) deactivasa, con la cual regula negativamente una de las transformaciones de piruvato a acetyl-CoA (Piruvato \rightarrow Acetyl-CoA + Formato) (Echave et al. 2003).

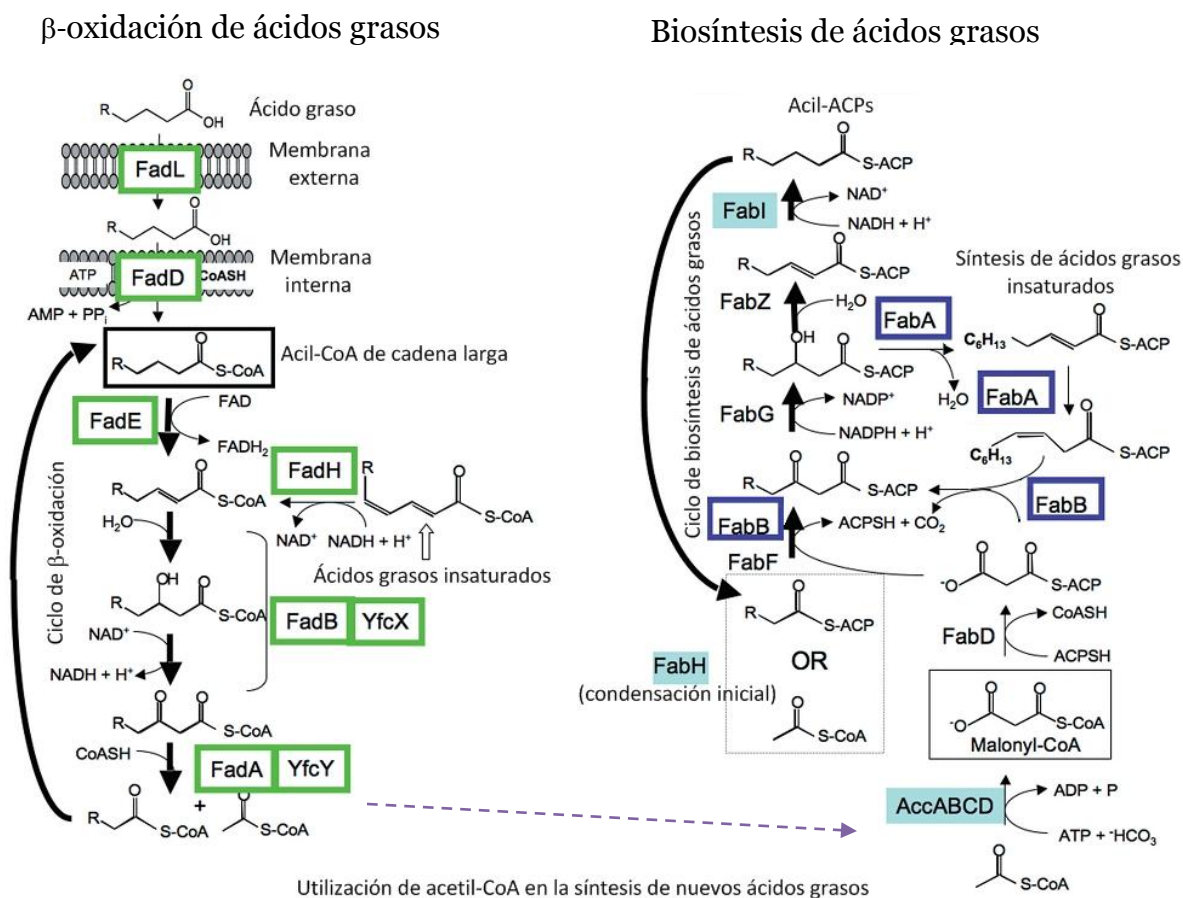


Figura 1. Diagrama de la β -oxidación y la biosíntesis de ácidos grasos en *Escherichia coli*. En las cajas verdes se encuentran los genes regulados negativamente por FadR y en las cajas azules los genes regulados positivamente por este factor de transcripción. Como se puede observar en la figura, en presencia de FadR se regula negativamente la expresión de los genes relacionados con el transporte, activación y de la β -oxidación de los ácidos grasos y se activan aquellos que codifican para proteínas relacionadas con la utilización del acetyl-CoA en la biosíntesis de nuevos ácidos grasos. *Modificado de Fujita y col., 2007.*

Se ha mostrado que AdhE presenta regulación a nivel transcripcional y traduccional (Holland-Staley et al. 2000), ya que la transcripción solo es inducida bajo condiciones de cultivo anaeróbicas, en respuesta a altos niveles de NADH y que el transcrito requiere ser procesado por RNAsa III para poder ser traducido (Aristarkhov et al. 1996). No obstante lo anterior, al realizar una sustitución del ácido glutámico 568 por cualquier otro aminoácido no-ácido, se obtiene una proteína AdhE con actividad en cultivos aeróbicos (Holland-Staley et al. 2000). Esto es de gran relevancia para este trabajo, porque sustenta la estrategia propuesta en esta tesis para generar un microorganismo productor de etanol a partir de ácidos grasos, en un cultivo aeróbico.

Es necesario indicar que, además de la proteína AdhE existen otras enzimas capaces de metabolizar el paso de acetyl-CoA a acetaldehído y la conversión de este último en etanol en la bacteria en estudio, como las proteínas MhpF y AdhP, respectivamente. Sin embargo, se ha demostrado que bacterias con un *knockout* del gen *adhE* son incapaces de vivir en condiciones fermentativas, evidenciando el rol crucial de esta enzima (Clark, 1989). Por esta razón en este trabajo se considerará a AdhE como la proteína encargada de catalizar la producción de etanol a partir de acetyl-CoA.

1.3.1 Tolerancia de *Escherichia coli* a altas concentraciones de etanol

El etanol, como muchos otros productos, puede generar inhibición del crecimiento bacteriano. Sin embargo, cultivos seriados del microorganismo en concentraciones crecientes de este alcohol, han logrado un mantenimiento en la viabilidad celular a concentraciones de etanol de más de 7,5% p/v (Yomano et al. 1998; Trinh et al. 2010).

1.4 Metabolismo aeróbico versus anaeróbico

En *Escherichia coli* la producción de etanol se lleva a cabo tradicionalmente en condiciones de cultivo anaeróbico. Sin embargo la fermentación anaeróbica tiene desventajas inherentes que son difíciles de mejorar, tales como lento crecimiento celular, bajo rendimiento en la utilización de diversas fuentes de carbono y por lo tanto bajos rendimientos de producción (Lin et al. 2005). Adicionalmente y a pesar de que en condiciones anaeróbicas, *E. coli* también puede utilizar los ácidos grasos como fuente de carbono, en condiciones aeróbicas se requiere menos de la mitad del

tiempo requerido en anaerobiosis para lograr el mismo tamaño de cultivo (Campbell et al. 2003). Adicionalmente Cho en 2006, mostró que en condiciones de cultivo anaeróbico, la expresión de genes esenciales para la degradación de los ácidos y que forman parte del operón *fad* (*fadA*, *fadB*, *fadE* y *fadH*) disminuye hasta 40 veces al compararlo con el metabolismo en presencia de oxígeno. Todo esto, sumado a la posibilidad de generar una enzima AdhE aerotolerante, hace muy atractiva la posibilidad de producción aeróbica de etanol a partir de ácidos grasos.

1.5 Conectividad de acetil-CoA y uso de herramientas de modelamiento matemático

Hasta el momento se ha establecido en este documento los beneficios de utilizar los ácidos grasos como sustrato para la producción de etanol, debido a la eficiente producción de acetil-CoA a partir de la degradación de éstos ácidos orgánicos. Sin embargo, el acetil-CoA es un metabolito altamente conectado en la célula, ya que participa en un gran número de reacciones metabólicas (Palsson, 2006). Una representación de la conectividad de los metabolitos en un matriz a nivel genómico se muestra en la figura 2. En ella, se puede observar que el acetil-CoA es uno de los metabolitos más conectados, luego de las moléculas de intercambio energético (ATP y ADP) y las de poder reductor (NADH, NAD⁺, NADPH y NADP⁺). Esto demuestra que para la utilización de acetil-CoA en la producción de un metabolito de interés, es necesario un análisis complejo basado en modelamiento matemático que nos permita realizar una optimización del proceso, pero considerando todos los procesos en los cuales este metabolito se encuentra involucrado.

1.5.1 Análisis de modos elementales

El análisis de modos elementales (EMA por sus siglas en inglés, *Elementary Mode Analysis*) es una herramienta bastante útil para la caracterización metabólica de un modelo bajo determinadas condiciones de cultivo. Este algoritmo permite identificar la estructura de una red metabólica capaz de relacionar un determinado fenotipo celular a su respectivo genotipo. Este procedimiento se lleva a cabo al descomponer intrincadas redes metabólicas y generar vías organizadas únicas que cumplan con las restricciones dadas de consumo y producción de los metabolitos de interés. El EMA tiene diversos usos, dentro de los cuales se encuentran el diseño de “células mínimas” pero eficientes en aplicaciones específicas. Cabe destacar que

debido a que este análisis no incluye parámetros cinéticos, solo puede predecir estados discretos del metabolismo celular (Trinh et al. 2009).

En 2008 esta técnica ya fue utilizada exitosamente en la producción de etanol a partir de hexosas y pentosas en condiciones de cultivo anaeróbico en *Escherichia coli* MG1665. En este trabajo, se identificaron inicialmente 5.010 modos elementales capaces de utilizar glucosa anaerómicamente y 4.913 capaces de producir etanol en estas mismas condiciones, número que se redujo a 12 luego de realizar 7 deleciones génicas (Δndh , Δzwf , $\Delta frdA$, $\Delta sfcA$, $\Delta maeB$, $\Delta ldhA$, $\Delta poxB$ y Δpta). En este análisis, vías de bajo rendimiento fueron descartadas y el rendimiento de etanol fue llevado al límite superior del rango predicho (0.51g etanol/g glucosa). Lo más relevante de este trabajo es que experimentalmente, en cultivos con glucosa y en condiciones anaeróbicas, se obtuvo una concentración de etanol de 38.77 ± 0.18 g/L, valor muy similar al predicho por la publicación de 39.20 ± 0.34 g/L (Trinh et al. 2008).

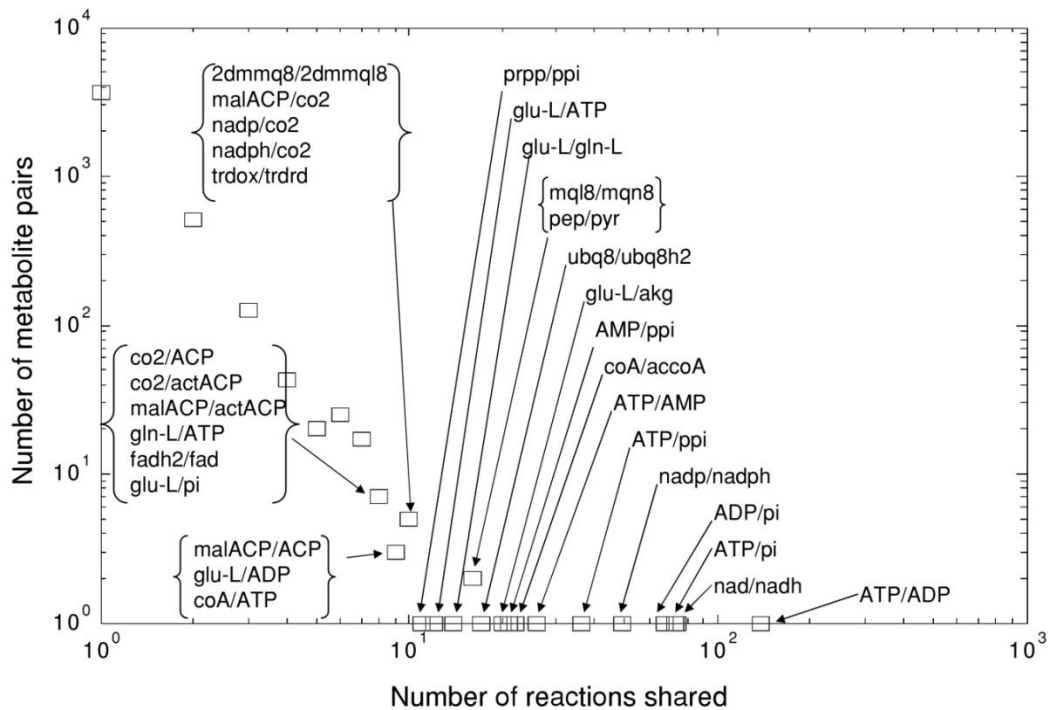


Figura 2. Conectividad de metabolitos en un modelo a escala genómica de *Escherichia coli*. Se encuentra graficado el número pares de metabolitos que comparte un número dado de reacciones, de un red metabólica de *E. coli* Palsson., 2006.

1.5.2 Modelamiento estequiométrico

En la actualidad existen varias metodologías matemáticas capaces de representar el metabolismo de una célula determinada. Estos métodos consideran que las funciones celulares se basan en la interacción de sus constituyentes químicos, lo que puede ser representado mediante ecuaciones químicas que contienen información sobre la estequiometría del sistema (Palsson, 2006).

Las metodologías que se basan en estas suposiciones, se pueden considerar como métodos de modelamiento estequiométrico y comparten dos características: el uso de redes metabólicas y la suposición de un estado estacionario (Llaneras & Picó 2008). En nuestro laboratorio se han desarrollado diversos trabajos relacionados con modelamiento estequiométrico, lo que sienta un buen precedente para este trabajo de tesis (Merino et al. 2010; Hold et al. 2009; Díaz et al. 2009)

Una red metabólica puede ser definida por un set de metabolitos y un set de reacciones que conectan dichos compuestos. La información estequiométrica que contiene la red metabólica, puede ser representada en forma de una matriz de m metabolitos (filas) y n reacciones (columnas), llamada matriz estequiométrica, y representa una traducción del conocimiento biológico en términos matemáticos (Palsson, 2006). La matriz estequiométrica se puede definir de la siguiente forma:

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot v - b \quad (1)$$

Donde S representa la matriz estequiométrica de dimensiones $m \times n$, donde m representa el número de metabolitos y n el número de reacciones; x es el vector de la concentración de los metabolitos; v es el vector de los flujos de las reacciones y b es el vector que representa el transporte neto dentro y fuera del sistema metabólico definido (Edwards & Palsson 1998). Ésta es una ecuación de balance de masa dinámico, ya que describe el comportamiento de los metabolitos a través del tiempo.

Sin embargo, las reacciones intracelulares son difíciles de seguir, hasta el momento no son del todo entendidas y se requeriría de expresiones cinéticas para representar este tipo de reacciones. Por esto, en el modelamiento estequiométrico el

comportamiento dinámico intracelular no es considerado, en base a la suposición de un estado estacionario donde la concentración de los metabolitos no cambia en el tiempo. Bajo esta suposición, el balance de masa de cada metabolito puede describirse como un sistema de ecuaciones lineales homogéneo de la forma:

$$S \cdot v - b = 0 \quad (2)$$

En esta expresión, un set de flujos medidos (extracelulares, definidos en el vector b) es usado en combinación con el conocimiento del metabolismo celular, descrito en la matriz estequiométrica (S), para determinar aquellos flujos que no pueden ser medidos (intracelulares, definidos en el vector v , que tiene unidades de $\text{mmoles/gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$). Esta ecuación es usualmente indeterminada, ya que el número de flujos (o vías metabólicas) normalmente excede el número de metabolitos, por lo que la solución no será única. A pesar de esto, una solución particular puede ser encontrada mediante optimización lineal, con la definición de un objetivo particular y la búsqueda del valor máximo dentro del dominio definido por la estequiometría. A esta metodología se le denomina Análisis de Flujos metabólicos o FBA (por sus siglas en inglés, *Flux Balance Analysis*) (Varma & Palsson 1994).

En términos sencillos, el FBA busca maximizar o minimizar una determinada función objetivo (Z), que puede ser una combinación lineal cualquiera de flujos:

$$Z = c^T v \quad (3)$$

Donde c es un vector que indica la contribución de cada una de las reacciones en la función objetivo. En la práctica, cuando solo una reacción es necesaria para la maximización o minimización de una función, c es un vector de ceros con un 1 en la posición de la reacción de interés (Orth et al. 2010). FBA usa programación lineal para resolver (3), y el resultado de dicho procedimiento, v , es una distribución de flujos que minimiza o maximiza la función objetivo.

Hoy en día existe una gran gama de herramientas de programación lineal para la resolución de este tipo de problemas, capaces de rápidamente identificar soluciones óptimas de extensas redes metabólicas como modelos genómicos de *Escherichia coli*. La herramienta de Matlab, COBRA, es una de ellas.

COBRA fue creada en 2007 (Becker et al. 2007), y desde entonces una versión 2.0 fue liberada. Esta versión tiene una serie de funciones, dentro las que destacan optimización de tasas de crecimiento, algoritmos para predicción de delección de genes (OptGene y OptKnock por ejemplo), análisis de robustez, entre otras, y todas son basadas en FBA (Schellenberger et al. 2011).

Por su parte, OptKnock es implementado al formular un problema de optimización lineal de 2 niveles (con 2 funciones objetivo, en este caso biomasa y producción de etanol), usando programación lineal integrada mixta (MILP, por sus siglas en inglés: *Mixed Integer Linear Programming*) (Burgard et al. 2003), lo que garantiza una solución óptima global (Patil et al. 2005). Por otro lado, OptGene, es una extensión de OptKnock y formula el problema *in silico* mediante un algoritmo genético, que usa el principio darwiniano en su búsqueda (al evolucionar mediante mutaciones y reproducción) de la solución global óptima (que serían individuos con un puntaje máximo de *fitness*) (Patil et al. 2005). Ambas estrategias, implementadas en COBRA 2.0, han sido exitosamente utilizadas en la literatura y por esta razón una combinación de ellas será implementada en este trabajo (Feist et al. 2010).

En la literatura se han descrito un gran número de modelos matemáticos que buscan simular el genoma de *Escherichia coli* y uno de los más completos es el descrito por Orth y compañía en 2011, denominado iJO1366. Este modelo contiene 1.366 genes, 2.251 reacciones y 1.136 metabolitos (Orth et al. 2011); e incluye reacciones de transporte orgánico e inorgánico, metabolismo de lípidos y ácidos grasos, de carbohidratos, de membrana y pared celular, de cofactores y grupos prostéticos, de aminoácidos, de nucleótidos y de conversión y producción de energía. Este modelo es una actualización del modelo iAF1260 (Feist et al. 2007). Dichas actualizaciones incluyen (1) datos experimentales provenientes de cepas con delecciones en 1.075 genes, lo que permitió conocer vías alternativas e isoenzimas que hasta el momento no habían sido descubiertas; (2) confirmación que el modelo realiza predicciones fenotípicas precisas de crecimiento en diferentes sustratos, tanto de la cepa silvestre como de cepas *knockout* y (3) mapeo del genoma de todas las cepas de *E. coli* secuenciadas hasta el momento. Esta reconstrucción del genoma de *E. coli* ha sido ampliamente utilizada en la literatura (Chen et al. 2014; Chung et al. 2013; Kim et al. 2014) y es el modelo genómico a utilizar en este trabajo de tesis.

2. Antecedentes

A continuación se resumen los antecedentes más importantes presentados hasta el momento:

(1) el potencial de los ácidos grasos como atractivo candidato para la producción de bioetanol, al ser subproducto de desechos industriales de la industria alimentaria;

(2) la generación de una molécula de acetyl-CoA por cada vuelta del ciclo de β -oxidación (Weeks et al. 1969), la que puede ser convertida en etanol mediante dos reacciones enzimáticas y con la acción del complejo enzimático acetaldehído-CoA deshidrogenasa, hierro dependiente alcohol deshidrogenasa, piruvato-formato liasa deactivasa o AdhE (Kessler et al. 1991);

(3) la actividad en condiciones de cultivo aeróbico, comparables a aquella en anerobiosis de AdhE, tras la sustitución de un solo aminoácido (Holland-Staley et al. 2000);

(4) el mejor rendimiento metabólico general en presencia de oxígeno (Lin et al. 2005; Cho et al. 2006);

(5) y la disponibilidad de herramientas de modelamiento matemático para la optimización de la producción de etanol a partir de ácidos grasos, a pesar de la alta conectividad del acetyl-CoA;

Sobre estos antecedentes se sostiene la hipótesis de este trabajo de tesis, la que consiste en que es posible optimizar la producción de bioetanol a partir de ácidos grasos en cultivos aeróbicos de *Escherichia coli* K12.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Generación de una cepa de *Escherichia coli* K12 MG1655 capaz de producir etanol a partir de ácidos grasos en condiciones aeróbicas, mediante modelamiento matemático e ingeniería genética.

3.1.1 Objetivos Específicos

1. Generación de cepas de *Escherichia coli* K12 MG1655 modificadas genéticamente para la producción de etanol a partir de ácidos grasos y utilización de simulaciones de modelamiento matemático en condiciones de cultivo aeróbico, en cepas que expresan una alcohol deshidrogenasa aerotolerante.
2. Evaluación de diferentes formas de cultivo para el crecimiento de *Escherichia coli* K12 MG1655 en medios mínimos con ácidos grasos y para la producción de etanol en cultivos aeróbicos.
3. Validación experimental de la predicción realizada mediante herramientas de modelamiento matemático en cultivos con ácido palmítico purificado comercial y en medios con desechos industriales ricos en ácidos grasos.
4. Nuevo diseño de cepas optimizadas en la producción de etanol a partir de ácidos grasos en condiciones de cultivo aeróbico utilizando un modelo genómico de *Escherichia coli* y herramientas basadas en FBA.

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos generales

Cloruro de amonio (NH_4Cl), fosfato de amonio di básico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), ácido bórico (H_3BO_3), cloruro de calcio dihidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), cloruro de cobalto (CoCl_2), sulfato cúprico pentahidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), fosfato di potásico (K_2HPO_4), EDTA, etanol, sulfato férrico heptahidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), hexaamonio heptamolibdato tetrahidrato ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), HCl, isopropanol, KCl, cloruro de magnesio (MgCl_2), cloruro de manganeso (MnCl_2), sulfato de magnesio heptahidrato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de manganeso pentahidrato ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), fosfato de monopotasio (KH_2PO_4), MOPS, NaCl, NaOH, potassium sulfate (K_2SO_4), tetraborato de sodio decahidrato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), sulfato de zinc heptahidrato ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Agar, ampicilina, bacto-triptona, brij58, cloranfenicol, extracto de levadura, glicerol, glucosa, kanamicina, ácido palmítico y tritón X-100.

4.1.2 Biología molecular

ADN Polimerasa Phusion (Finnzymes), ADN Polimerasa ampliTaQ Gold, ADN Polimerasa KOD hot start (Merck), arabinosa, buffer GC 5X Phusion (Finnzymes), buffer HF 5X Phusion (Finnzymes), buffer 10X PCR gold (amplitaq), buffer 10X KOD (Merck), agarosa (Bioaxis), BamHI (NEB), bromuro de etidio, Mix dNTP (NEB), *DpnI*, Marcador DNA 2-Log (NEB), NEBuffer4 (NEB), MgSO_4 (Merck), *NdeI* (NEB), *ScaI* (NEB), T4 DNA Ligase (Invitrogen), Tris.

4.1.3 Cepas

Escherichia coli DH5 α (F- *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169, hsdR17(rK- mK+), λ -) y *Escherichia coli* K12 MG1655 (F- λ - *ilvG- rfb-50 rph-1*), con diferentes combinaciones de los

siguientes genes: *ackA* (ID 946775), *arcA*(ID 948874), *fadR* (ID 948652), *fdnG* (ID 946035), *ldhA* (ID 946315), *ndh* (ID 946792), *nuoG* (ID 946762), *pflB* (ID 945514) y *pta* (ID 946778).

4.1.4 Vectores

pGEM®-T Easy (Promega), pET22b (Novagen), pETDuet-1 (Novagen), pMal-c2x (NEB), pTac (Pmut) (this work), pET_TacPromoter_AdhEwt(pTac_wt) (este trabajo), pET_TacPromoter_AdhEmut (pTac_mut) (este trabajo), pET_fadBAPromoter_AdhEwt (pfadBA_wt) (este trabajo) y pET_fadBAPromoter_AdhEmut (pfadBA_mut) (este trabajo).

4.1.5 Equipamiento

Cámara de electroforesis, centrífuga (Sorval), espectrofotómetro UV-Vis, incubador, microcentrífuga, microscopio, termociclador, bomba peristáltica multicanal (LongerPump, LabTec), cromatógrafo de gases Agilent 6890N y espectrofotómetro de masa Agilent 5973, HPLC Agilent y bioreactor Biostat.

4.2 Métodos

4.2.1 Medios de cultivo

Escherichia coli DH5 α fue crecida en medio LB para cultivos líquidos y en LB-agar 1.5%, 1PTG 0.5mM and Xgal 80 μ g/mL para cultivos sólidos; ambos suplementados con ampicilina 100 μ g/mL cuando fue necesario.

Escherichia coli K12 MG1655 y sus derivados, fueron crecidas con medios no definidos como LB o con medios definidos: M9, MOPS y medio R/2 (Han et al. 2008), el que contiene la mitad de la concentración de sales del medio R (Lee and Chang, 1993), todos suplementados con 5g/L de ácido palmítico (Sigma), Tritón X-100 o Brij 58, y ampicilina y/o IPTG cuando fue necesario (a 100 μ g/mL y 0,2mM respectivamente).

Composición medio MOPS por litro: 0.132M K_2HPO_4 y 100mL de MOPS 10X. La solución MOPS 10X contiene por litro: MOPS, 83.72g; tricina, 7.17g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.028g; 95mM NH_4Cl ; 2.76mM K_2SO_4 ; 5 μ M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 5.25mM $MgCl_2$; 0.5 M $NaCl$; y 0.2mL de una mezcla de micronutrientes, que contiene por 50mL: $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0.009g; H_3BO_3 , 0.062g; $CoCl_2$, 0.018g; $CuSO_4$, 0.006g; $MnCl_2$, 0.040 y $ZnSO_4$, 0.007g.

A su vez, el medio R/2 contiene por litro: $(NH_4)_2HPO_4$, 2g; KH_2PO_4 , 6.75g; $C_6H_8O_7$, 0.85; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.7g; y 5mL de una solución de elementos trazas, la que tiene la siguiente composición (por litro): 5M HCl o 2M HCl según lo indicado; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.25g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1g; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5g; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0.23g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2g; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0.1g.

Para los cultivos hechos con medios provenientes de desechos industriales, el medio se preparó de la siguiente forma: los desechos provenientes del refinamiento del aceite (donados por la empresa Watt's, San Bernardo, Chile) fueron lavados 3 veces con agua destilada para eliminar trazas de ácido sulfúrico o fosfórico. Luego, este medio fue diluido con agua suplementada con las sales del medio R/2 y Tritón X-100 y su pH fue ajustado alrededor de 7.0; finalmente el medio fue esterilizado mediante autoclave de la misma forma que con los otros medios y antes de ser utilizado, suplementado con metales trazas a una concentración de 5mL/L de medio, ampicilina a 100 μ g/ μ L e IPTG a 0,2mM final (al momento de la inducción).

4.2.1.1 Métodos de cultivo: Densidad celular inicial

Para *Escherichia coli* K12 MG1655 y sus derivados, se implementaron dos tipos de cultivos a baja escala: Baja y alta densidad celular. Este último fue implementado debido a trabajos que mostraban un alto rendimiento de estos cultivos en la producción de etanol (Dellomonaco et al. 2010).

Los cultivos de baja densidad se utilizaron principalmente con el sistema de expresión inducible por IPTG y se implementaron de la siguiente forma: se creció un cultivo a 37°C y 250rpm desde una colonia aislada de la cepa requerida durante el día en medio LB suplementado con el antibiótico de interés, hasta llegar a una OD_{600} cercana a 1.5-2 (fase exponencial tardía). Luego las células fueron colectadas por centrifugación a 5000rpm y a 4°C por 5 minutos, lavadas con medio R/2 sin

fuentes de carbono o con glicerol 10%, y resuspendidas en medio R/2 con ácido palmítico como fuente de carbono, 0,4% Triton X-100 y 100µg/mL ampicilina en caso de ser necesario. La suspensión celular resultante fue incubada a 30°C y 200rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ cercana a 1.5-2, tras lo cual las células fueron inducidas con IPTG a una concentración final de 0,2mM. Se probaron diferentes temperaturas de inducción. Esta estrategia fue implementada tanto en el fermentador Biostat (figura 3) y en los minifermentadores (figura 4A y 5), como en matraces Erlenmeyer normales y matraces con salida inferior (figura 4B y 6).

Para los cultivos de alta densidad celular inicial el procedimiento descrito es el siguiente: desde una colonia aislada de la cepa a cultivar, se inició un cultivo en medio LB a 37°C y 250rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0,7. Este cultivo fue usado para inocular un matraz de 500mL con 150mL de medio LB hasta que una OD₆₀₀ de 0,7 fue alcanzada. Luego, las células fueron colectadas por centrifugación a 8000rpm y 4°C por 20 minutos y resuspendidas en medio MOPS, suplementado con 5g/L de ácido palmítico, 0,4% Triton X-100 y 100µg/mL ampicilina, a una OD₆₀₀ final inicial de 10 en un volumen de 10mL. Esta suspensión celular fue cultivada ya sea a 37°C o a 28°C, a 250rpm. Para el medio R/2, se utilizó una OD₆₀₀ inicial de 5, debido al rápido crecimiento celular del cultivo con una OD₆₀₀ inicial de 10.

Adicionalmente y de acuerdo al trabajo descrito, se realizó una alimentación mediante el sistema *fed-batch* (Korz et al. 1995). En ella, cada 21-24 horas se le agregó una alimentación que permitió que la concentración final del cultivo fuera 5g/L de ácido palmítico.

4.2.1.2 Métodos de cultivo

Con el objetivo de aumentar la producción de biomasa y disminuir la volatilidad del etanol, varios sistemas fueron implementados, entre ellos destaca el uso de un fermentador de 2L (Biostat B, B. Braun, Germany) (figura 3), un sistema de mini fermentadores (figura 4A) y matraces con salida inferior (figura 4B y 6).

Debido a que para un cultivo de 1L de alta densidad en el reactor Biostat, se necesitan más de 7L de cultivo en fase exponencial, en este fermentador se implementó un cultivo de baja densidad inicial. Las condiciones de cultivo fueron

mantenidas a 37°C, 300rpm y aireación de 1l/min. Las cepas fueron crecidas en medio R/2 con 9,37g/L de glucosa (equivalente en cantidad de carbonos a 5g/L de ácido palmítico), tritón X-100 y ampicilina. Debido a la naturaleza de la fuente de carbono y a su inhibición del sistema de inducción mediado por IPTG, el sistema de expresión constitutivo *pfadBA_wt/mut* fue utilizado.

Con respecto a la utilización de minifermentadores en el cultivo de las cepas de *E. coli*, este sistema fue desarrollado Maciek Antoniewicz en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Delaware (Leighty & Antoniewicz 2012; Leighty & Antoniewicz 2013) (figura 5A y 6), y bajo su supervisión fue implementada en el laboratorio. Este sistema consta de un tubo de vidrio de 125mm de largo y 16mm de radio (Chemglass, CLS-4208) que contiene una septa capaz de sellar el sistema luego de su ruptura; esta septa es atravesada por 1 aguja con punta desviada de calibre 22 y 15.24 cm de largo (de muestreo, asociada a una jeringa de 1mL) y por 2 segmentos de una aguja de calibre 18, destinadas para intercambio de gases (una de entrada, con una longitud tal que permita la aireación y agitación del medio; y una de salida, con una longitud de 3-4cm, que solo permita la salida de gases del sistema, principalmente el CO₂ producido por el cultivo). El flujo de aire de entrada es debido a una bomba peristáltica multicanal (que permite el cultivo paralelo de hasta 12 minifermentaciones) la que permite una aireación con un flujo de 15.01mL/mins de aire al usar 46 RPM. Tanto la entrada como la salida de aire, tienen conectores especiales y filtros de aire, para asegurar la esterilidad del sistema. Para evitar complicaciones con la generación de burbujas, manualmente fue agregado un anillo de antiespumante en la sección superior del tubo de vidrio, por encima del nivel del medio. Para evaluar el sistema inicial, se crecieron células wild-type de *E. coli* a diferentes RPM a 37°C en medio LB y se comparó con el crecimiento en un matraz de 250mL con 50mL de cultivo a 200rpm y 37°C. También fueron realizados cultivos de la cepa wild-type de *E. coli* en ácidos grasos a una concentración de 5g/L, 37°C y 46RPM.

Finalmente, el último sistema fueron matraces con salida inferior, hechos a medida para minimizar la formación de espuma en los cultivos. Un esquema de estos matraces se encuentra en la figura 5B. Para evaluar la evaporación del etanol en las condiciones de cultivo, se estudió el efecto de usar *alusa foil* o una membrana respirable (BF-400-S, Axygen) para cerrar el sistema. Las condiciones de cultivo fueron una agitación de 200rpm y 28 o 37°C de temperatura de cultivo.



Figura 3. Fotografía del reactor Biostat B al utilizar medio R/2 con ácidos grasos. El medio fue suplementado con triton X-100, una aireación de 1L/min, 300rpm y 37°C.

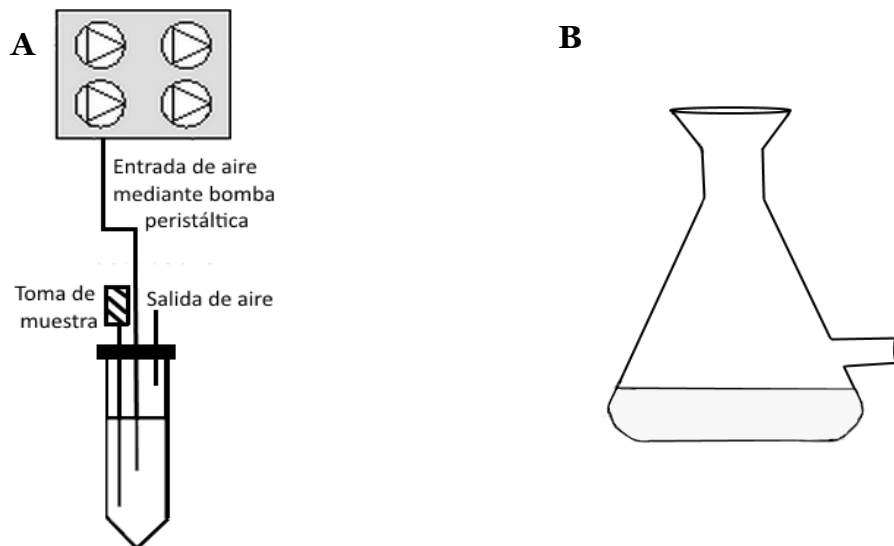


Figura 4. Esquema de sistemas utilizados para cultivo en condiciones aeróbicas de *E. coli* en medios con ácidos grasos. A: Esquema sistema mini fermentadores desarrollado por Maciek Antoniewicz del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Chile e implementado en el laboratorio. Debido a que la bomba peristáltica utilizada tiene hasta para 12 canales, 12 fermentaciones paralelas podrían ser realizadas potencialmente. B: Esquema del matraz con salida inferior utilizado para cultivo de células en ácidos grasos

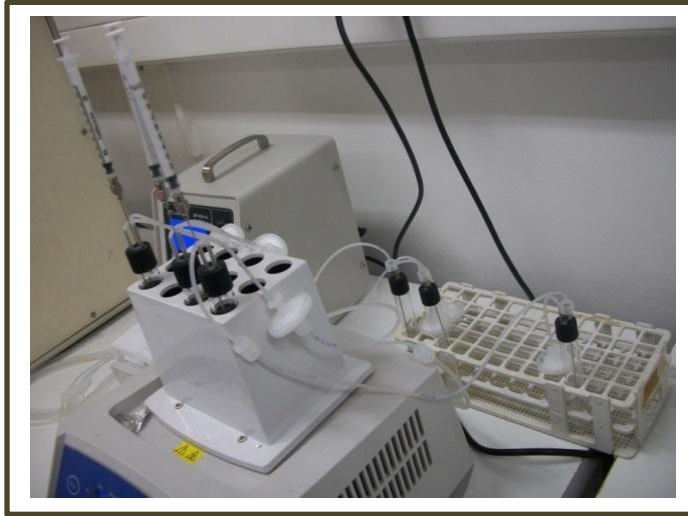


Figura 5. Fotografías de los mini-fermentadores con ácidos grasos y tritón X-100 para cultivo de cepas de *E. coli* a 46RPM y 37°C.

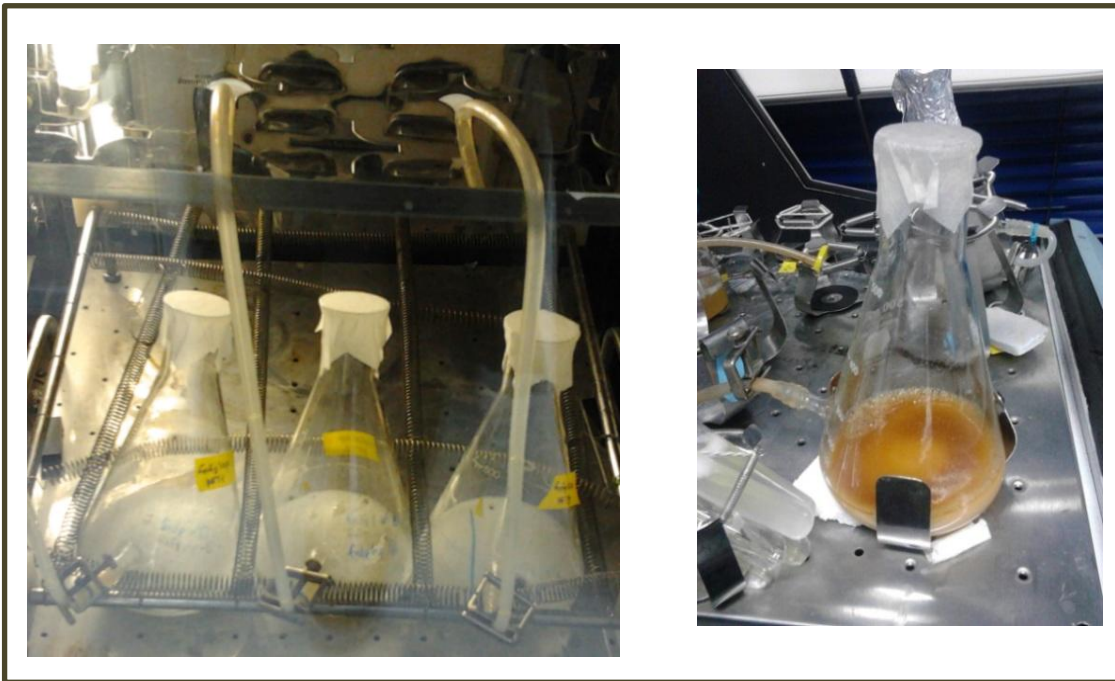


Figura 6. Fotografías cultivo en matraces con salida inferior. Al usar la membrana respirable, este sistema evita la evaporación de etanol al punto de poder realizar curvas lineales de producción en cultivos a 37 y 28°C. A la izquierda se muestra un cultivo con ácido palmítico Sigma y a la derecha un cultivo con desechos industriales ricos en ácido palmítico proveniente de aceite de palma.

4.2.3 Métodos generales de biología molecular

El ADN cromosomal usado como templado para la amplificación de los genes de *Escherichia coli* K12 MG1655 fue preparado de la siguiente forma: 10mL de cultivo de noche de *E. coli* fue centrifugado a 20.000g por 5 minutos. Luego de la remoción del sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 1mL de buffer TE. Esta suspensión fue transferida a un tubo eppendorf y centrifugado a 13.000rpm por 1 min. El sobrenadante fue descartado nuevamente y el pellet fue resuspendido en 0.2mL de un buffer Tritón X-100/SDS. Luego de esto, se realizó una extracción fenol-cloroformo al agregar 0.2mL de la mezcla, resuspender mediante vortex durante 2min y enfriar en hielo por 5 minutos. A continuación, 0.2mL de buffer TE fue agregado a la mezcla y resuspendido mediante vortex brevemente. La solución fue centrifugada por 5 minutos a 13.000rpm y la solución acuosa resultante fue transferida a un tubo eppendorf estéril. El protocolo de extracción fue repetido una vez más, pero esta vez usando sólo cloroformo. A continuación, 1mL de etanol puro frío fue agregado, y la solución final fue mezclada mediante inversión e incubada a -20°C por 30 minutos. Finalizado este período, el tubo fue centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue descartado.

El *pellet* resultante fue lavado con etanol 70% y centrifugado una vez más. Nuevamente, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado ya sea a temperatura ambiente o cerca de la llama del mechero. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 0.2mL de buffer TE con RNasa A e incubado a 30 minutos a 37°C.

4.2.4 Amplificación y clonamiento de ADN cromosomal

El primer paso a seguir fue la amplificación del gen 16S desde ADN cromosomal de *Escherichia coli* K12 MG1655, clonado en pGEM®-T Easy (Anexo 3), y secuenciado para corroborar el origen filogenético de la cepa. Los partidores utilizados en este procedimiento son los 16SF y 16SR (Anexo 1). El protocolo de PCR consistió en la denaturación inicial a 95°C por 6 min, seguido por 30 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 seg a 50°C, y 2 min a 72°C; y un ciclo final de 5 min a 72°C. La ADN polimerasa utilizada en este procedimiento fue Taq Polimerasa. El producto de PCR fue corrido y posteriormente purificado desde un gel de agarosa y ligado en pGEM®-T Easy. Posteriormente el producto de ligación fue electroporado en *E. coli* DH5α y una miniprep de ADN plasmidial de esta cepa fue mandado a secuenciar. El resultado de la secuenciación fue estudiado mediante BLAST.

Para la amplificación del gen *adhE*, 2 partidores fueron utilizados AdhF y AdhR (Anexo 1). Cada uno de estos partidores, produce un sitio de restricción en el producto de PCR. AdhF es complementario a la secuencia entre los nucleótidos -12 a +18 de la región 5' del gen *adhE*, y produce un sitio de restricción para NdeI. Por su parte AdhR es complementario a una secuencia 18pb río arriba y 12pb río abajo del codón de stop del gen, generando un sitio de corte para la enzima de restricción BamHI. El protocolo de PCR consiste en una denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 1.5 minutos a 68°C, con una extensión final de 2 minutos a 72°C. La ADN polimerasa usada en este procedimiento es la KOD Hot Start polimerasa, para así asegurar fidelidad en la amplificación. El producto de PCR fue digerido con las enzimas NdeI y BamHI, purificado mediante gel y ligado en pGEM ®-T Easy. Luego, este producto de ligación fue clonada en cepas de *E. coli* DH5α y mandado a secuenciar para eliminar posibles mutaciones espontáneas.

4.2.5 Mutagénesis sitio dirigida

Con el objetivo de reemplazar el aminoácido 568 de la proteína AdhE, un ácido glutámico por una lisina, se realizó mutagénesis sitio dirigida en el gen *adhE* clonado en el vector pGEM®-T Easy (Anexo 3). Para cumplir este propósito, dos partidores específicos fueron utilizados, Adh_mutF y Adh_mutR (Anexo 1). Ambos partidores, son complementarios para los nucleótidos +1693 a +1721 del gen *adhE*, excepto por el nucleótido +1702, donde una guanina fue usada para reemplazar una alanina y así generar el intercambio entre los aminoácidos mencionados.

Para asegurarse de la fidelidad del producto de PCR, se utilizó la enzima ADN polimerasa KOD Hot Start en la amplificación. El protocolo de PCR es similar al mencionado anteriormente para esta enzima, pero con 26 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 60°C y 9 minutos a 72°C, con una extensión final de 15 minutos a 70°C. La concentración del producto de PCR final fue cuantificada mediante espectrofotometría y digerida con DpnI, para así degradar el ADN metilado. Este nuevo plasmidio, con la mutación sitio dirigida fue enviado a secuenciación para verificar el procedimiento y descartar otras mutaciones espontáneas.

4.2.6 Construcción de sistemas de expresión.

Se utilizaron dos sistemas de expresión en este trabajo, uno inducible por IPTG y uno constitutivo. Para el constitutivo, el promotor del operón *fadBA* fue usado, ya que se expresa constitutivamente en ausencia del factor de transcripción FadR. Para el sistema inducible, el promotor dependiente de IPTG fue usado. En el sistema de expresión constitutivo, para la amplificación del promotor del operón *fadBA*, dos partidores flanqueantes fueron utilizados (*pfadF* y *pfadR*); los que también producen sitios de restricción en el producto de PCR resultante. *pfadF* hibrida con los nucleótidos -330 a -300 río arriba del codón de inicio del operón *fadBA*, y produce un sitio de restricción *XbaI*. Por su parte, *pfadR* hibrida con los nucleótidos -17pb a 14 río abajo del codón de inicio del operón *fadBA*, y produce un sitio de restricción *NdeI*, el que va a permitir la ligación con el gen *adhE* amplificado. El protocolo de PCR es esencialmente el mismo que para la amplificación del gen *adhE*, pero utilizando una T_m de 55°C. Después de que el producto de PCR fue purificado, se realizó una digestión con *XbaI* y *NdeI*. Luego, el producto resultante se ligó con T4 ADN ligasa, T4 ADN Ligasa Buffer, el vector pET22b (Anexo 3) digerido con *XbaI* y *BamHI* y el gen *adhE* digerido con *NdeI* y *BamHI*, e incubando a 4°C durante la noche o 15 minutos a temperatura ambiente utilizando Quick Ligase Buffer. A continuación, la mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* electrocompetentes y se incubó durante la noche en placas de LB agar, suplementado con ampicilina. Las colonias resultantes se incubaron en LB líquido y se realizó un miniprep de ADN plasmidial. Este ADN se secuenció para corroborar la ausencia de cualquier mutación al azar. El producto resultante es un vector con el *backbone* del pET22b, y el gen *adhE* bajo el promotor *fadBA* (pET-*fadBA*-*AdhEwt* / mut).

Para el sistema inducible, inicialmente fue utilizada una versión modificada del plásmido pMAL-c2X (Anexo 3) con el fin de colocar el gen *adhE* bajo el control del promotor Tac, presente en este vector de expresión. Sin embargo, y a pesar de que tanto pMAL-c2x y los vectores pET tienen el mismo origen de replicación, el primero presenta alrededor de 20 copias en lugar de las 40 copias de los vectores pET. Por ello, el primer vector que se generó tenía el *backbone* del vector pMAL-c2x, y a partir de este se generó un segundo vector, pero con el *backbone* de un vector pET.

Para la construcción del primer vector (con el *backbone* pMAL-c2x), el gen *malE* fue eliminado y sustituido con la forma silvestre o mutada del gen *adhE*, al cortar con *NdeI* y *BamHI*; y posteriormente ligar con la ADN ligasa T4. De esta forma el gen *adhE* quedó bajo el control del promotor Tac. Luego, dos partidores fueron utilizados para agregar sitios de restricción al promotor tac, *SphI* en el extremo 5' y

NdeI en el extremo 3'. El producto de PCR fue digerido mediante estas enzimas y ligado con el gen *adhE* anteriormente digerido con las enzimas *NdeI* y *XhoI*; y con el vector pETDuet-1 (Anexo 3) anteriormente digerido con *SphI* y *XhoI*. Como resultado, el gen *adhE* (*wild type* o mutado) se encuentra ahora bajo el control del promotor Tac pero con el *backbone* del vector pET, formando el vector pETacP-wt/mut.

4.2.7 Delección de Genes

En este trabajo la delección de 8 genes se llevaron a cabo utilizando el método de Datsenko y Wanner, mediante técnicas de PCR (Datsenko y Wanner, 2000). Un esquema con el detalle del procedimiento se encuentra en la figura 7.

El primer paso de este procedimiento es diseñar partidores con una secuencia de 20nt homóloga a los extremos del gen de resistencia (P1 y P2, en figura 7) presente en el plásmido pKD3 (resistencia a cloranfenicol, Cm) o pKD4 (resistencia a kanamicina, Kn), y otra de 40nt con la secuencia homóloga del gen para interrumpir (H1 y H2 en figura 7) (Anexo 1). El protocolo de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 98°C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 10 segundos a 98°C, 10 segundos a la Temperatura de hibridación determinada para cada pareja de partidores, y 40 segundos a 72°C; con una extensión final de 2 min a 72°C. La enzima utilizada en este procedimiento fue *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, para así asegurar la fidelidad de la amplificación. Este producto de PCR se purificó usando un kit de extracción de gel (Fermentas) y transformado en la *E. coli* deseada mediante electroporación.

Con el fin de interrumpir el gen blanco en las células, éstas tienen que haber sido transformada con anterioridad con el plásmido termosensible pKD46, el que expresa la λ Red recombinasa en presencia de arabinosa. Para ello, células que expresan el plásmido pKD46, fueron cultivadas en 10 ml de medio líquido LB con ampicilina 100µg / ml, y 10 mM de L-arabinosa a 30 ° C y 250 rpm hasta una OD₆₀₀ de ~ 0,6. Después de esto, las células se hicieron electrocompetentes al concentrarlas de 50 a 100 veces en tres ciclos de lavado con 10% de glicerol helado y centrifugación a 3000g por 10 minutos a 4 °C. Después de esto, las células fueron transformadas con el producto de PCR purificado descrito anteriormente, utilizando 25 µl de células y 10-100ng de producto de PCR. Una vez electroporadas, las células fueron cultivadas en 1 ml de medio LB y se incubaron 1h a 37 ° C. Después de este

período, las células se centrifugaron 6 min a 5000g, se resuspendieron en 100 μ L de sobrenadante y se plaquearon en LB-agar 1,5% con Cm o Kn y se incubaron toda la noche a 37°C. La correcta inserción de la casete en el cromosoma se verificó mediante PCR.

Cabe destacar que cuando se intentó realizaron más de 2 deleciones génicas en un mismo microorganismo, el número de falsos positivos superó la capacidad de *screening*. Por esta razón, se realizó una variación al protocolo, que consistió en realizar deleciones individuales en cepas de *Escherichia coli* K12, y sintetizar partidores que amplificaran aproximadamente 500pb río arriba y 500pb río abajo del gen de resistencia de cloranfenicol o kanamicina, denominados pKD-*genF/R* (Anexo 1). Luego se realizó el mismo protocolo de PCR descrito anteriormente con *Phusion High Fidelity DNA Polimerasa* de NEB, pero con distintas temperaturas de hibridación; se purificó la banda y se procedió a electroporar el fragmento de ADN lineal en cepas ya transformadas con el vector pKD46. Este procedimiento aumentó la eficiencia de la deleción génica y redujo prácticamente a cero el número de falsos positivos.

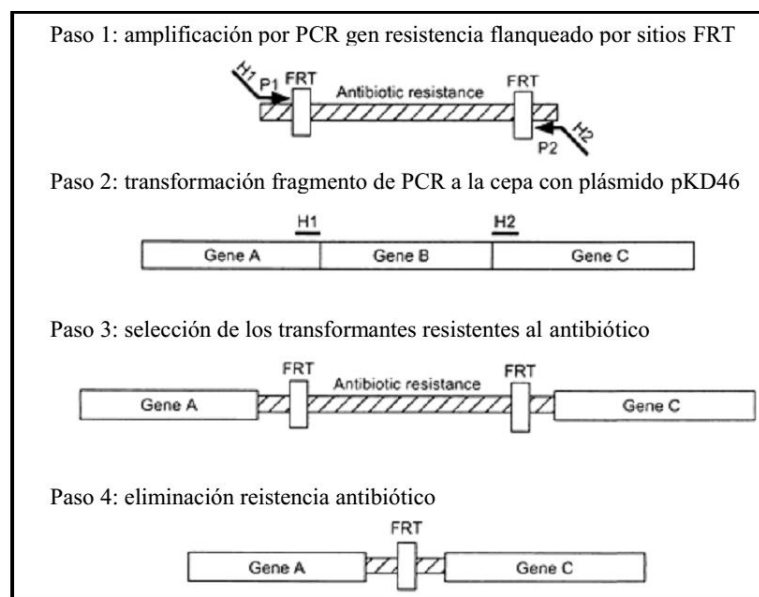


Figura 7. Esquema del proceso de deleción de genes. Obtenido del trabajo de Datsenko y Wanner en el 2000 H1 y H2 son las regiones homólogas al gen blanco (río arriba y río abajo), y P1 y P2 son las regiones de homología con el plásmido pKD3 o pKD4 para la amplificación de los sitios FRT y de la resistencia a antibióticos (Paso 1).

4.2.8 Verificaciones de PCR

Dos pares de partidores diferentes fueron utilizados para demostrar si la eliminación del gen blanco fue eficaz, un par de partidores para la verificación de la presencia del *cassette* en el cromosoma bacteriano (c1 y c2 para la verificación de la resistencia Cm^R, y k2 y kt para el *cassette* Kn^R), y un par de partidores externos específicos para cada gen, llamados “Test” (Anexo 1). Mezclas de estos partidores, permiten verificar tanto el cambio en el tamaño del gen (por la inserción de la resistencia), como que la inserción de la resistencia fue realizada en el lugar correcto. Todas estas verificaciones fueron llevadas a cabo mediante PCR de colonias, al mezclar dicha colonia con 30-50 µl de agua estéril, y utilizar 1µL de esta solución en una reacción de PCR de 20µL-50µL. Un protocolo habitual de verificación de PCR consistía en: 95 °C durante 6 min, seguido por 30 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a la temperatura de hibridación, determinada para cada par de partidores, y 1-3 min a 72°C (dependiendo del tamaño del gen); y un ciclo final de 7 min a 72°C. La ADN polimerasa utilizada para este procedimiento fue de AmpliTaq Gold o GoTaq (Promega). En todas las amplificaciones, se realizó un control con la cepa silvestre.

4.2.9 Eliminación del gen de resistencia a los antibióticos

Con el fin de eliminar el gen de resistencia a antibióticos ubicado en lugar de los genes blanco, se utilizó el plásmido pCP20. Este es un vector con resistencia a ampicilina y cloranfenicol, con replicación sensible a la temperatura. Frente a un alza térmica se genera inducción de la síntesis de una flipasa, la que escinde la resistencia y deja una cicatriz en el lugar del gen interrumpido. El protocolo es el siguiente, cepas con resistencias para Cm^R o Kn^R fueron transformadas con pCP20 y se incubó a 30°C durante la noche en placas de LB suplementadas con ampicilina. Los transformantes resistentes se incubaron en medio LB líquido sin antibiótico a 43°C durante 8 horas y después se colocaron en placas en medio LB agar sin antibiótico a 43°C durante la noche. Las colonias aisladas fueron analizadas para verificar la pérdida de la resistencia a antibióticos utilizando PCR.

4.2.10 Mutación espontánea en el gen *atoC*

La mutación en el gen *atoC* (ID 947444), que permite la expresión constitutiva del operón *ato*, se obtuvo de la siguiente manera. Una colonia aislada de *E. coli* K12 MG1665 Δ *fadR* Δ *nuoG* se sembró en placas de M9, suplementado con 1% de butirato y fueron incubadas a 37°C. Mutantes espontáneas, capaces de utilizar butirato como única fuente de carbono, fueron seleccionadas y purificadas (Clark y Rod, 1987).

4.2.11 Métodos analíticos

Para la medición de crecimiento celular, se utilizaron dos estrategias: conteo total de células usando una cámara de Neubauer, conteo de células viables utilizando el método de conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) y medición de densidad celular. Las primeras dos estrategias fueron tomadas debido a que el medio con ácidos grasos genera interferencia en la medida de absorbancia y cuando se trata de separar mediante centrifugación diferencial, estos precipitan en conjunto con el pellet celular.

El método de conteo de CFU se hizo mediante la aplicación de “spots” de 15-20 μ L de diluciones seriadas del cultivo celular que fueron dispuestas separadamente en placas de LB agar suplementadas con ampicilina 100 μ g/L. En el caso de medición de densidad óptica en cultivos con ácidos grasos y a pesar de los problemas mencionados anteriormente, al final del proyecto de tesis, se descubrió que al centrifugar el cultivo celular a 13.000 rpm por 2 minutos y luego lavar el pellet con glicerol 10% a una velocidad de 5000rpm por 5 minutos 2 veces, los ácidos grasos quedan suspendidos en el sobrenadante y es posible medir densidad óptica al resuspender el pellet celular “limpio” en agua destilada o el mismo glicerol 10%.

Cabe destacar que todos los resultados que muestran producción de biomasa están expresados en gramos de peso seco por litro o *dried weight* por litro (gDW/L). Esto se logró al realizar una curva de calibración entre CFU/L y OD con gDW/L.

Para el análisis de la concentración de metabolitos extracelulares, un volumen que varió de 0,2 a 1mL de cultivo (dependiendo la forma de cultivo) fue centrifugado a 13.000 g durante 2 min; posteriormente, el sobrenadante fue filtrado en un filtro de jeringa de 0.22 μ m, y analizado mediante HPLC, GC y GC-MS.

Para el análisis de HPLC, se utilizó el siguiente protocolo. El flujo de la fase móvil (0,005M H₂SO₄) fue mantenido a 0.5mL/min. Luego 10μL de cada muestra fue inyectado en la columna y la corrida total fue de 50 minutos. La columna usada fue Aminex 87H de Biorad y la temperatura fue controlada a 16°C. Los *peaks* fueron detectados mediante RID (Refractive Index Detector) y se utilizó una curva estándar para determinar concentración de los metabolitos.

Para el análisis de GC-MS, se utilizó un Agilent 6890N GC equipado con una columna capilar de sílica fundida HP-5ms (5% metilpolisiloxano-fenil) (30m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm de espesor de película) y acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973, operando bajo ionización por impacto de electrones (EI) a 70eV. El espectrómetro de masa fue utilizado bajo la configuración "Autotune".

Para medición de metabolitos extracelulares, 3 protocolos fueron diseñados y ejecutados: Uno para medición de etanol, otro para medición de acetato y un tercero para medición de ácidos orgánicos desde formato hasta el ácido hexanoico. En todas las mediciones el volumen de muestra inyectado fue de 0,2 μL y se utilizó una curva estándar para determinar concentración de los metabolitos.

Para medición de etanol, las muestras fueron purgadas en modo *split*, con un ratio de 1:10 y un flujo *split* de 9mL/min. La temperatura del *inlet* se mantuvo a 250°C, la presión en 6.22psi y un flujo total de 12.5mL/min. 2 rampas simultáneas fueron hechas, una de temperatura del horno y otra del flujo de helio. La rampa de temperatura fue la siguiente: durante 1.8 minutos el horno fue mantenido a 45°C, luego la temperatura fue aumentada a una tasa de 70°C/minutos hasta alcanzar los 260°C y mantenido en esa temperatura por 1.5 minutos. Con respecto a la rampa de flujo, este partió en 0.9mL/min durante 1.8 minutos, y luego aumentó a una tasa de 1mL/min hasta un flujo de 1.1mL/min y mantenido en ese valor por 3.37 minutos. El espectro de masa fue obtenido en modo SIM, donde sólo los iones m/z 29, 31, 45 y 46 fueron analizados.

Para medición de acetato, las muestras fueron purgadas en modo *splitless*, con un tiempo de activación de la purga de 1 minuto a 20mL/min. La temperatura del *inlet* se mantuvo a 250°C, la presión en 15psi y un flujo total de 24.3mL/min. El flujo se mantuvo constante a 1.8mL/minutos y el protocolo de la temperatura del horno fue la siguiente: durante 2 minutos el horno fue mantenido a 50°C, luego la temperatura fue aumentada a una tasa de 70°C/minutos hasta alcanzar los 260°C y

mantenido en esa temperatura por 3 minutos. El espectro de masa fue obtenido en modo SIM, donde sólo los iones m/z 42, 43, 45 y 60 fueron analizados.

Para medición de ácidos orgánicos, las muestras fueron purgadas en modo *split*, con un ratio de *split* de 1:10. La temperatura del *inlet* se mantuvo a 250°C, la presión en 6.31psi y un flujo total de 12.5mL/min. 2 rampas simultáneas fueron hechas, una de temperatura del horno y otra del flujo de helio. La rampa de temperatura fue la siguiente: durante 1.8 minutos el horno fue mantenido a 45°C, luego la temperatura fue aumentada a una tasa de 70°C/minutos hasta alcanzar los 260°C y mantenido en esa temperatura por 2 minutos. Con respecto a la rampa de flujo, este partió en 0.9mL/min durante 1.8 minutos, y luego aumentó a una tasa de 1mL/min hasta un flujo de 1.1mL/min y mantenido en ese valor por 3.37 minutos. El espectro de masa fue obtenido en modo SIM, donde se hicieron grupos de mediciones para determinar separadamente: Etanol (m/z 31, 45 y 46), formiato (m/z 28, 29, 45 y 46), acetato (m/z 42, 43, 45 y 60), acetol (m/z 31, 43 y 74), propionato (m/z 28, 29, 45, 73 y 74), ácido isobutírico (m/z 41, 43, 73 y 88), ácido butírico (m/z 42, 45, 60 y 73), ácido isovalérico (m/z 41, 43, 45, 60 y 87), ácido valérico (m/z 41, 45, 60 y 73) y ácido isocaproico (m/z 41, 43, 57, 73 y 74), ácido hexanoico (m/z 41, 60, 73 y 87) y ácido heptanoico (m/z 43, 55, 60 y 73).

4.2.12 Métodos estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando la herramienta de análisis de datos del programa Excel de Microsoft, 64 bit para Windows. Se utilizaron los test *Anova: Two-Factor with replication* y el t-test: *Two-Sample Assuming Equal Variances*. Los valores experimentales se expresan como el promedio de las mediciones \pm desviación estándar y para todos los experimentos un mínimo de 3 determinaciones independientes fueron realizadas. Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)

4.2.13 FBA

Para realizar FBA se utilizó la versión de MATLAB 7.9.0 R2009b y la versión 2.0 de la *Toolbox* Cobra. Cobra soporta modelos en el formato SBML (por sus siglas en inglés, System biology markup language), los que pueden ser importados en MATLAB si es que se cuenta con la librería de programación “*libSBML*”

(<http://sbml.org/Software/libSBML>) y la herramienta “*SBMLToolbox*” (<http://sbml.org/Software/SBMLToolbox>). Adicionalmente, dos *solvers* de programación lineal fueron necesarios: Gurobi (Gurobi Optimization, <http://www.gurobi.com>) a través de Gurobi Mex (http://www.convexoptimization.com/wikimization/index.php/Gurobi_mex) y Cplex, a través de Tomalab (Tomlab Optimization, <http://tomopt.com>). En este último, una licencia demo extendida fue gentilmente cedida por la compañía.

Como se mencionó en la introducción, el modelo genómico de *Escherichia coli* K12 MG1655 que se utilizó en este trabajo es el iJO1366 (Orth et al. 2011), el que cuenta con 1.366 genes, 2.251 reacciones metabólicas y 1.136 metabolitos.

Debido a que tanto el consumo de los ácidos grasos, como la producción de etanol ya se encuentran incluidos en el modelo, no se realizó ninguna modificación en esta materia. Sin embargo, ciertas consideraciones tuvieron que ser hechas, dentro de las que se encuentran la determinación de la función “*core*” de biomasa como la función objetivo y la limitación a cero de ciertas reacciones, con el objetivo de evitar comportamientos poco realistas. Según la publicación de Orth en 2011, estas consideraciones se encuentran por defecto en el modelo, sin embargo problemas en las simulaciones fueron evitados al limitar estas reacciones en nuestro *script* (Anexo 2). Estas reacciones son: CAT, SPODM y SPODMpp: reacciones que consumen y producen peróxido de hidrogeno, y que pueden llevar a *loops* poco realistas; DHPTDNR y DHPTDNRN: que forman un *loop* cerrado que puede llevar a flujos arbitrarios muy altos; SUCASPTpp, SUCFUMtpp, SUCMALtpp y SUCTARTtpp: que pueden formar *loops* no realistas con otros transportadores como el de aspartato, fumarato, malato y tartrato; y por último, FHL (por sus siglas en inglés *Formate hydrogen lyase*), que se encuentra limitada a cero para evitar producción de hidrógeno aeróbico con valores poco realistas (Orth et al. 2011).

La concentración de las fuentes de carbono que fueron simuladas fue de 20 mmol/gDWh, tanto para ácido palmítico como para glucosa, en cambio la concentración de oxígeno fue variable, desde 2mmol a 1000mmol/gDWh. Cabe destacar que en los *scripts* (Anexo 2) las tasas de ingreso de nutrientes y de oxígeno, se encuentran marcadas con un signo negativo y las tasas de producción de biomasa y metabolitos secundarios con un signo positivo. Para algunas simulaciones, la tasa de producción de biomasa fue limitada a $0,01h^{-1}$ y el requerimiento de ATP a 3.15 mmol/gDWh (Orth et al. 2011).

Para el diseño de cepas optimizadas en la producción de etanol en las condiciones descritas anteriormente, otras herramientas que forman parte de Cobra fueron utilizadas. Sin embargo, estas no fueron utilizadas en el modelo iJO1366 completo, ya que este contiene un gran número de reacciones y metabolitos. Por esto y con el objetivo de disminuir el tiempo de procesamiento computacional, se realizó un análisis previo para determinar el grupo de reacciones candidatas a ser eliminadas mediante herramientas de diseño de cepas. Para esto fue necesario descartar reacciones esenciales como producción de biomasa o mantenimiento de ATP, reacciones de transporte, de intercambio, entre otras. Para este propósito se utilizó la función pFBA (Lewis et al. 2010), una variante del FBA y que en inglés se denomina como *Parsimonious enzyme usage FBA*. Esta función permite una clasificación de los genes involucrados en el metabolismo de acuerdo a su participación en la optimización de la función objetivo. Así y bajo las condiciones de cultivo establecidas se pueden diferenciar 5 tipos de genes: (1) genes esenciales; (2) genes óptimos pFBA, que son genes no esenciales que participarían del crecimiento óptimo *in silico* y que contribuirían de la minimización del flujo asociado a genes; (3) ELE (por sus siglas en inglés, *Enzymatically less efficient*), son genes que pueden incrementar el flujo metabólico celular si es que son considerados; (4) MLE (por sus siglas en inglés, *Metabolically less efficient*), son genes que disminuirían la tasa de crecimiento celular si es que son usados y (5) pFBA sin flujo, que son genes que no presentan flujo y por lo tanto no deberían ser considerados en las condiciones de cultivo establecidas. Una vez hecha la clasificación, los genes (2) y (3) son agrupados y analizados en búsqueda de aquellos relacionados con transporte e intercambio, los que son descartados del grupo para análisis posteriores.

Una vez hecha la reducción de las reacciones a considerar para el diseño de la cepa optimizada, se realizó un análisis integrado de diseño de cepas que involucró las herramientas Optknock (Burgard et al. 2003) y OptGene (Patil et al. 2005). Ambas estrategias fueron diseñadas para sugerir delección de genes que permitirían lograr la sobreproducción de metabolitos de interés en el microorganismo en estudio, considerando una producción asociada al crecimiento celular.

Cabe destacar que estas dos estrategias de diseño de cepas optimizadas fueron utilizadas en conjunto, donde la solución (ya sea final o intermedia) obtenida mediante OptKnock fue utilizada como población inicial de la simulación por OptGene, aumentando de esta manera la eficiencia del algoritmo al partir de una población que ya presenta un cierto refinamiento (Feist et al. 2010).

5. Resultados y Discusión

5.1 Generación de variantes genéticas de *E. coli* capaces de usar ácidos grasos en la producción de etanol en condiciones aeróbicas.

Para cumplir el objetivo de generar cepas de *E. coli* capaces de producir etanol en condiciones de cultivo aeróbico en *E. coli*, fue necesario realizar modificaciones sitio dirigidas del gen *adhE*, diseñar y clonar vectores de expresión (uno inducido por IPTG y otro constitutivo), predecir delecciones génicas mediante modelamiento matemático (por análisis de modos elementales) y eliminar, mutar o reemplazar por genes de resistencia a antibióticos los genes predichos por estos análisis (mediante técnicas basadas en PCR). Los resultados de dichas actividades se detallan a continuación:

5.1.1 Obtención de una alcohol deshidrogenasa con actividad en condiciones de cultivo aeróbico mediante mutación sitio dirigida

El primer paso a seguir fue generar una enzima alcohol deshidrogenasa con actividad bajo condiciones de cultivo aeróbico. Para ello, el gen *adhE* fue clonado desde ADN genómico de *E. coli*, y mediante técnicas de mutación sitio dirigida basada en PCR se realizó la sustitución Glu568Lys en la enzima AdhE (figura 8). La versión wild-type (*adhE wt*) y la mutada (*adhE mut*) fueron a su vez clonadas en un vector con el *backbone* del plásmido pETDuet-1 con el promotor inducible por IPTG, Tac proveniente del vector pMAL-c2; y en un vector con el promotor del operón *fadBA* y el *backbone* del vector pET22b, el que es constitutivo bajo condiciones de cultivo en ácidos grasos o en cepas *knockout* para el factor de transcripción FadR (Dirusso et al. 1992). De esta forma, se cuenta con las versiones silvestre y mutada del gen *adhE* en un vector inducible por IPTG (pTac_wt/mut) y en otro con expresión constitutiva en presencia de ácidos grasos (pfadBA_wt/mut o en su nomenclatura reducida: Pwt/Pmut).

A pesar de la expresión de una alcohol deshidrogenasa aerotolerante, cultivos de cepas de *E. coli* que expresaban esta enzima no produjeron etanol en condiciones de cultivo aeróbico (figura 13A). Esto podría deberse a una concentración insuficiente de NADH en presencia de oxígeno, condiciones que sí se presentan en condiciones de cultivo anaeróbico (Leonardo et al. 1993).

<i>adhE</i> wt	GCCGCGAAGATCATGTGGGTTATGTACGAACATCCGGAAACTCACTTCGA	1700
<i>adhE</i> mut	GCCGCGAAGATCATGTGGGTTATGTACGAACATCCGGAAACTCACTTCGA	1700

<i>adhE</i> wt	AGAGCTGGCGCTGCGCTTTATGGATATCCGTAAACGTATCTACAAGTTCC	1750
<i>adhE</i> mut	AAAGCTGGCGCTGCGCTTTATGGATATCCGTAAACGTATCTACAAGTTCC	1750

Figura 8. Comparación de parte de las secuencias de la versión silvestre y mutada del gen *adhE*. En la figura se muestra el alineamiento de la secuencia del gen silvestre de *adhE* obtenido desde la base de datos de ncbi (*adhE* wt), con el resultado de la secuenciación del vector pGEM T- *Easy-adhE** (*adhE* mut), con la versión mutada del mismo gen. Este alineamiento se realizó mediante la herramienta ClustalW (Thompson et al. 2002) disponible en el sitio www.ebi.ac.uk/clustalw. En gris se encuentra demarcada la posición de los partidores *AdhmutF* y *AdhmutR*.

Estos resultados muestran que la sola expresión de la variante aerotolerante de AdhE no fue suficiente para producir etanol en condiciones de cultivo aeróbico. Por esto, a continuación, se utilizaron herramientas de modelamiento matemático y simulaciones *in silico* del proceso, para predecir modificaciones a nivel genético que permitan la producción de etanol en las condiciones de cultivo estudiadas.

5.1.2 Identificación de las modificaciones genéticas necesarias para optimizar la producción de etanol a partir de ácidos grasos, mediante simulaciones *in silico*.

Debido a los buenos resultados mostrados en la literatura (Trinh et al. 2008), el primer análisis realizado fue mediante análisis de modos elementales (EMA) (Trinh et al. 2009). Este análisis fue realizado en un modelo simple de *E. coli*, basado en el trabajo del 2002 de Chassagnole y col., el que tiene 117 reacciones que incluyen glicólisis, vía de las pentosas fosfato, el metabolismo de nucleótidos, la biosíntesis de aminoácidos, el ciclo del TCA, el metabolismo de los ácidos grasos y la cadena transportadora de electrones; 28 reacciones de transporte; 7 reacciones de polimerización y 168 compuestos. Este análisis dio como resultado la predicción de 6 deleciones génicas que permitirían reducir el número de modos elementales posibles a solo 1 (figura 9A). Estas deleciones se encuentran detalladas en la tabla 1 y son parte del trabajo sin publicar de Miguel Ángel Campodónico. Adicionalmente, en la figura 10 se encuentra un esquema de las principales vías del metabolismo central de *E. coli*, y algunas de las vías a eliminar mediante la deleción génica predicha por la simulación *in silico*.

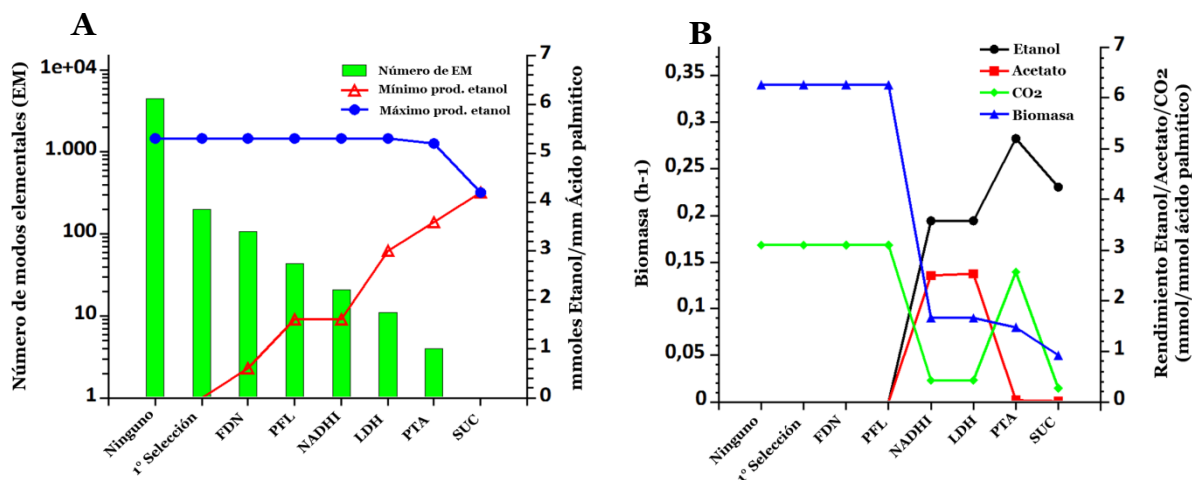


Figura 9. Resultado del análisis de modos elementales. En A se muestra la evolución del número de modos elementales y la máxima y mínima producción de etanol luego de cada una de las deleciones predichas por el EMA. En B se muestra la evolución de la producción de etanol, acetato, CO₂ y Biomasa luego de cada una de las deleciones predichas por el EMA, para distintas tasas de crecimiento (h-1).

Tabla 1: Detalle de los genes predichos por el EMA. En ella se describe la proteína que codifica cada gen y la reacción enzimática en la que participa. Datos obtenidos de la base de datos Ecocyc y KEGG.

Gen	Proteína que codifica	Reacción enzimática
<i>fdn</i>	Formato deshidrogenasa	formato + NAD ⁺ = CO ₂ + NADH + H ⁺
<i>pfl</i>	Piruvato formato Liasa	acetil-CoA + formato = CoA + piruvato
<i>nuo</i>	NADH deshidrogenasa I	NADH + 5 H ⁺ /in = NAD ⁺ + 4 H ⁺ /out
<i>pta</i>	Fosfato acetiltransferasa	acetil-CoA + Pi = CoA + acetil fosfato
<i>ldh</i>	D-Lactato deshidrogenasa	D-lactato + NAD ⁺ = piruvato + NADH + H ⁺
<i>suc</i>	Succinil-CoA sintetasa	ATP + succinato + CoA = ADP + Pi + succinil-CoA

En la figura 9A se puede ver el resultado del EMA, en la que se observa el mínimo y máximo teórico de la producción de etanol, el que es cercano a 4 mM de etanol producido/mM de ácido graso consumido para la cepa con las 6 modificaciones y entre 3.5 y 5.2mM para la cepa con 5 modificaciones. Estas fluctuaciones se deben a que mientras exista un número de modos elementales posibles mayor a 1, la predicción de la producción de los distintos metabolitos no va a ser única. Por su parte, en la figura 9B se puede observar la simulación de los flujos de etanol, acetato, CO₂ y biomasa para las distintas cepas. Cabe notar que estas simulaciones predicen que la generación de una cepa con 5 modificaciones (sin la deleción de *sucCD*) tendría mejor rendimiento en la producción de etanol y biomasa que la cepa

con todas las modificaciones predichas, por lo que no se consideró la delección en *sucCD*.

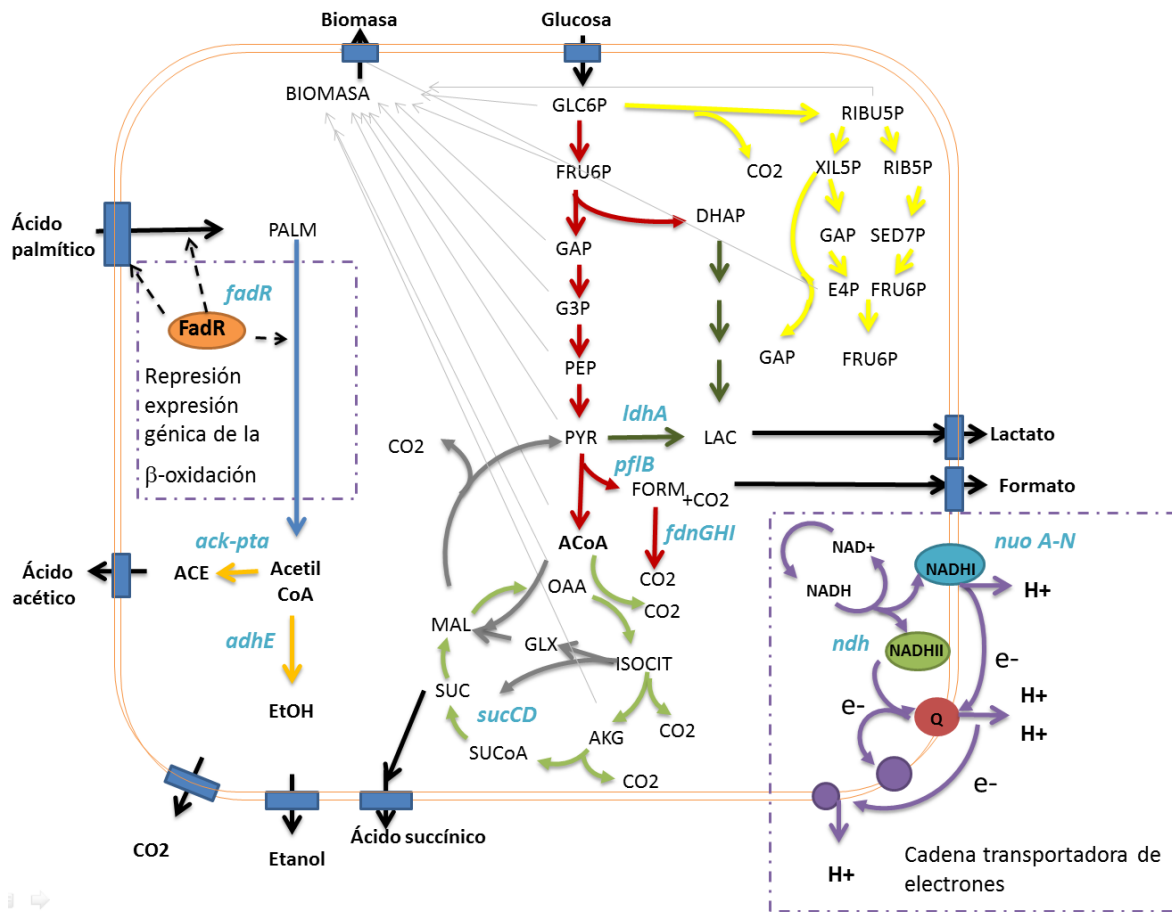


Figura 10. Esquema de algunas de las vías metabólicas del metabolismo central de *E. coli*. En rojo se muestra la glicólisis, en amarillo la vía de las pentosas fosfato, en verde el ciclo de Krebs, en gris se encuentra las vías anapleróticas y el ciclo del glioxilato, en azul la β-oxidación de los ácidos grasos, en naranja la producción de acetato, en verde oscuro la producción de lactato, en morado una representación de la cadena transportadora de electrones y en negro las reacciones de transporte. Por último, escrito en celeste se encuentran algunos de los genes que codifican para las proteínas encargadas de la vía metabólica correspondiente y que son los blancos predichos por el análisis de modos elementales. En el anexo se encuentra el significado de cada una de las abreviaciones.

Tal como se esperaba, la delección que suscita la producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico es la que genera un aumento en la razón NADH/NAD⁺ (Falk-Krzesinski & Wolfe 1998). Éste aumento se genera al eliminar total o parcialmente la producción de la enzima NADH: ubiquitina oxidoreductoasa o NADH deshidrogenasa I (Eiteman et al. 2006), favoreciendo la producción de etanol. Cabe mencionar que otra delección capaz de generar este cambio en la razón NADH/NAD⁺, es la del gen *ndh* el que codifica para la proteína NADH deshidrogenasa II (Eiteman et al. 2006), sin embargo cultivos de cepas con esta delección génica no mostraron producción de etanol en las condiciones de estudio (datos no mostrados), lo que evidencia el potencial rol clave del gen *nuoG* en el proceso.

Con respecto a los otros genes predichos por EMA, como los que codifican para enzimas responsables de la producción de lactato y acetato respectivamente, esta elección no es sorprendente, ya que ambos metabolitos son uno de los productos secundarios más abundantes de los cultivos en condiciones aeróbicas (De Mey et al. 2007; Clomburg & Gonzalez 2011). Adicionalmente, para la producción de lactato se necesita el consumo de un mol de NADH (Keseler et al. 2005), por lo que hay una clara competencia por el *pool* de NADH y una razón lógica de porqué la eliminación del gen que expresa la lactato deshidrogenasa tendría un efecto positivo en la producción de etanol. Sin embargo, y contrario a lo anterior, la identificación de la delección de genes que codifican para las enzimas formato deshidrogenasa (Fdh-N) y piruvato formato liasa (Pfl) resultan inesperadas, ya que ambas presentan actividad en condiciones de cultivo anaeróbico. Adicionalmente, una de las actividades reportadas para la proteína AdhE, es la de piruvato formato liasa deactivasa (Kessler et al. 1991), por lo que delecciones en el operón *fdnGHI* o en el gen *pflB* no debieran tener efectos significativos en la producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico. Sin embargo, sí tuvieron un efecto, tanto en la producción de etanol como de biomasa y por eso fueron considerados (datos no mostrados).

5.1.3 Generación de cepas de *E. coli* con mejoramiento de la producción de etanol a partir de ácidos grasos

Las delecciones génicas predichas por el EMA, fueron realizadas mediante la técnica desarrollada por Datsenko y Wanner en 2010, pero con modificaciones. Estas fueron llevadas a cabo cuando el número de *knockouts* acumulados fue mayor a 2, debido a que el número de falsos positivos aumentó considerablemente superando la capacidad de *screening*.

Con respecto a las deleciones en las cepas *knockouts*, en la mayoría de los casos las resistencias a antibiótico fueron eliminadas, mediante el vector pCP20 (dejando una cicatriz cercana a los 100pb), sin embargo cuando no fue necesario este procedimiento, los genes se mantuvieron con las resistencias a los antibióticos kanamicina y cloranfenicol (tabla 2 y figura 11).

Debido a que el resultado de EMA es la predicción de reacciones involucradas y no un gen en particular, se realizó un análisis que permitió definir los genes esenciales para la actividad de la proteína que codifican (en el caso de un operón o un complejo multienzimático). El resultado es el siguiente: para eliminar la expresión de la proteína formato deshidrogenasa, se deletionó el gen *fdnG* (Maeda et al. 2007); para abolir la expresión de la proteína piruvato formato liasa, el gen escogido fue *pflB* (Eiteman & Altman 2006). La siguiente modificación predicha por el EMA, fue la deleción del operón *nuoABCEFGHIJKLMN*; según la literatura, deleciones en cualquiera de los genes que forman parte del operón tienen efecto en la actividad de la enzima NADH deshidrogenasa I (Erhardt et al. 2012), sin embargo otra publicación muestra que la sub-unidad G juega un rol importante en la regulación de la expresión de todo el operón y que es esencial para el funcionamiento del complejo I (Falk-Krzesinski & Wolfe 1998); por esta razón, el gen *nuoG* fue escogido como blanco para deleción génica; adicionalmente y con el objetivo de observar el efecto de la eliminación de la expresión de la NADH deshidrogenasa I en la producción de etanol, también se realizó un *knockout* en el gen *ndh*. A continuación, con el fin de eliminar la expresión de la enzima lactato deshidrogenasa, se realizó la deleción en el gen *ldhA*. Y por último y para asegurarse de eliminar toda la vía de producción de acetato mediada por la enzima fosfato acetiltransferasa, se realizó la eliminación del operón *ackA-pta*.

Como se mencionó anteriormente, el metabolismo de los ácidos grasos se encuentra altamente regulado, tanto en condiciones de cultivo aeróbico como anaeróbico (Peng & Shimizu 2006; Campbell et al. 2003; Jenkins & Nunn 1987; Cho et al. 2006). Por esto, y en adición a las modificaciones genéticas mencionadas anteriormente, se realizó la deleción de los factores de transcripción FadR y ArcA, ya que se ha mostrado que la eliminación de estos genes aumenta significativamente la expresión de genes relacionados con el transporte y degradación de los ácidos grasos (Cho et al. 2006), sin embargo se consideró necesario corroborar esta afirmación ya que en el mencionado trabajo, los microorganismos fueron crecidos en medio Luria Broth y no en ácidos grasos como única fuente de carbono. Por otra parte, se realizó una modificación del operón *ato*, mediante mutación espontánea

del gen *atoC* para permitir la degradación constitutiva de ácidos grasos de cadena corta (Clark et al. 1987).

Las cepas generadas en este estudio se encuentran descritas en la tabla 2. Y a modo de ejemplo, en la figura 11 se muestra una fotografía de la amplificación de las bandas para los genes *fadR*, *nuoG*, *pflB* y *fdnG* en la cepas *K12 ΔfadR ΔnuoG fdnG::Kn^R atoC** y *K12 ΔfadR ΔnuoG ack-pta::Cm^R*.

5.2 Análisis de medios de cultivo y de variantes génicas relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos en producción de biomasa y etanol.

Con el objetivo de analizar las capacidades de las distintas variantes genéticas obtenidas en el capítulo anterior, tanto en la capacidad de producir etanol como biomasa, es necesario comenzar con la búsqueda del medio de cultivo adecuado para dicho propósito. Debido a que este trabajo de tesis mezcla el análisis computacional con el experimental, es necesario conocer el contenido exacto de cada uno de los componentes del medio de cultivo y así poder hacer un balance de carbonos correcto, sabiendo qué metabolitos entran y salen de la célula, a estos medios se les denomina medios mínimos o definidos.

En este capítulo también se muestra el efecto en la producción de biomasa y etanol de las deleciones en los genes que codifican para los factores de transcripción FadR y ArcA (parte del complejo ArcBA), y el gen *nuoG* que codifica para la subunidad G del complejo NADH deshidrogenasa I.

Finalmente, en esta parte del trabajo de tesis se muestra el efecto de distintas estrategias de crecimiento de las variantes de *E. coli* en ácido palmítico purificado.

5.2.1 Evaluación de medios de cultivo definidos en el crecimiento de *E. coli* en ácidos grasos.

En la literatura se han descrito una gran variedad de medios de cultivo mínimo para *Escherichia coli* K12 MG1655 (Neidhardt et al. 1974; Choi et al. 2006; Nunn et al.

1979; Overath et al. 1969). Sin embargo, al utilizar ácidos grasos como única fuente de carbono, no todos los medios generan la misma producción de biomasa.

Tabla 2. Variantes generadas durante el desarrollo de este trabajo de tesis en base a *Escherichia coli* K12 MG1655

Nombre	Genotipo <i>Escherichia coli</i>
$\Delta fadR$	<i>K12</i> $\Delta fadR$
$\Delta fadR^*$	<i>K12</i> $\Delta fadR$ <i>atoC</i> *
$\Delta fadR \Delta arcA^*$	<i>K12</i> $\Delta fadR$ <i>arcA::Kn^R</i> <i>atoC</i> *
Δfn	<i>K12</i> $\Delta fadR$ $\Delta nuoG$
Δfn^*	<i>K12</i> $\Delta fadR$ $\Delta nuoG$ <i>atoC</i> *
$\Delta fndh^*$	<i>K12</i> $\Delta fadR$ Δndh <i>atoC</i> *
$\Delta fn \Delta arcA^*$	<i>K12</i> $\Delta fadR$ $\Delta nuoG$ <i>arcA::Kn^R</i> <i>atoC</i> *
$\Delta fndh \Delta arcA^*$	<i>K12</i> $\Delta fadR$ Δndh <i>arcA::Kn^R</i> <i>atoC</i> *
$\Delta fnfp^*$	<i>K12</i> $\Delta fadR$ $\Delta nuoG$ <i>fdnG::Kn^R</i> $\Delta pflB$ <i>atoC</i> *
$\Delta fnfpl^*$	<i>K12</i> $\Delta fadR$ $\Delta nuoG$ $\Delta fdnG$ $\Delta pflB$ <i>ldhA::Cm^R</i> <i>atoC</i> *
$\Delta fnfplap^*$	<i>K12</i> $\Delta fadR$ $\Delta nuoG$ $\Delta fdnG$ $\Delta pflB$ $\Delta ldhA$ <i>ackA-pta::Cm^R</i> <i>atoC</i> *

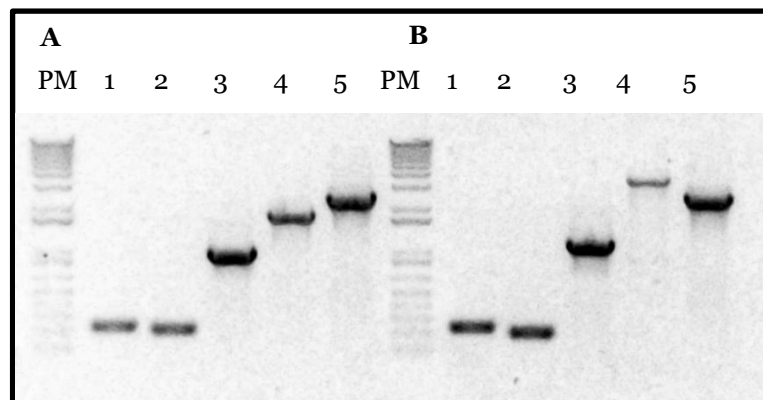


Figura 11. Ejemplo de la verificación por PCR de cepas con delección cromosómica. A: cepa *E. coli* K12 $\Delta fadR$ $\Delta nuoG$ *fdnG::Kn^R* *atoC** y B: cepa *E. coli* K12 $\Delta fadR$ $\Delta nuoG$ *ack-pta::Cm^R* *atoC**. Carril PM: Marcador de peso molecular, carril 1: amplificación del gen *fadR*, carril 2: amplificación del gen *nuoG*, carril 3: amplificación del operón *ackpta*, carril 4: amplificación del gen *fdnG* y carril 5: amplificación del gen *pflB*. Todos los productos de PCR fueron amplificados utilizando los partidores “test” correspondientes a cada gen.

A pesar de que existe una gran cantidad de publicaciones sobre el metabolismo de los ácidos grasos, no existen muchas publicaciones que muestren la evolución del crecimiento bacteriano en este tipo de sustratos, probablemente por la turbidez de los medios y el problema que esto conlleva en la medición de biomasa. Por esto, se realizaron cultivos con el objetivo de comparar la diferencia en el crecimiento bacteriano de los medios mínimos: M9 (Kumar & Black 1993), y medio R/2 (Han et al. 2008). Debido a la dificultad en la medición de biomasa en medios con ácidos grasos, y como una aproximación, en este experimento se utilizó glucosa para crecer la cepa *E. coli* K12 MG1655 a 37°C en estos dos medios mínimos (figura 12).

Debido a que el medio R/2 resultó ser el que mostró el mejor crecimiento celular al compararlo con el medio M9, fue el escogido para futuros experimentos. En experimentos no mostrados, se comparó la producción de biomasa entre el medio MOPS y el medio R/2 y se mostró que éste último es el medio con los mejores resultados en la producción de biomasa. Al comparar el contenido de sales de estos medios (tabla 3), se observó que el medio R/2 (con la mitad de la concentración de sales que el medio R descrito por Lee y Chang en 1993) tiene una mayor proporción de la mayoría de los compuestos que ambos medios contienen, en especial: calcio (136 veces más), cobre (1331 veces más), fósforo (49 veces más) y zinc (2255 veces más); adicionalmente, el contenido de hierro (cofactor para la actividad de AdhE) es 18 veces más en R/2 que en el medio MOPS. Todo esto puede explicar por qué el medio R/2 presenta mejor rendimiento que el medio MOPS y el M9.

Tabla 3. Comparación de dos medios definidos utilizados, R/2 y MOPS.

Elementos o Compuestos	Medio R/2 (mM)	Medio MOPS (mM)	Razón R/2: MOPS
Boro	1,2E-02	4,0E-04	30,07
Carbono	2,7E+01	3,0E+02	0,09
Calcio	6,8E-02	5,0E-04	136,04
Cloro	2,5E+01	6,1E+01	0,42
Cobre	2,0E-02	1,5E-05	1331,75
Hierro	1,8E-01	1,0E-02	17,85
Potasio	5,0E+01	3,2E+00	15,54
Magnesio	3,2E+00	5,3E-01	6,11
Manganeso	1,0E-02	1,3E-04	81,56
Molibdeno	3,0E-03	2,2E-05	138,89
Sodio	6,0E-03	5,0E+01	0,00
Amonio (NH₄)	3,0E+01	9,5E+00	3,19
Fosfato (PO₄)	6,5E+01	1,3E+00	49,05
Sulfato (SO₄)	3,5E+00	2,9E-01	12,09
Zinc	3,9E-02	1,7E-05	2254,85

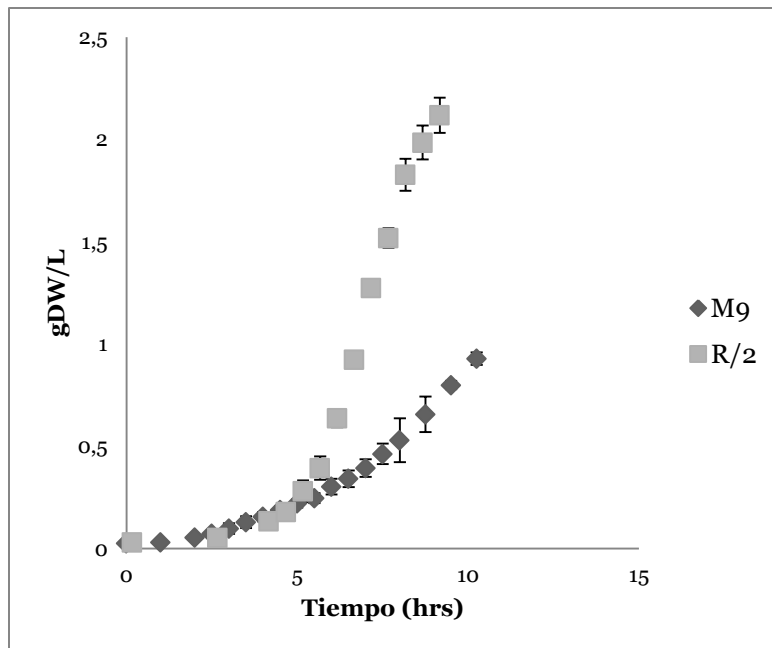


Figura 12. Curva de crecimiento de la cepa *Escherichia coli* K12 MG1655 en medios mínimos. Crecimiento de la cepa silvestre en dos medios suplementado con glucosa, crecido a 37°C y 200rpm.

5.2.2 Efecto de *knockouts fadR* y *arcA* en la producción de biomasa y en la producción de etanol en variantes que expresan una versión aerotolerante de AdhE

El comportamiento de las cepas $\Delta fadR$, $\Delta fadR$ *atoC** y $\Delta fadR$ *arcA* *atoC** en el cultivo con ácidos grasos como única fuente de carbono a 37°C, se muestra en la figura 13B. Aquí se observa el efecto positivo que tienen las deleciones de los genes *fadR* y *arcA* en la producción de biomasa a partir de ácido palmítico. Sin embargo, al evaluar la producción de etanol en las cepas *E. coli* $\Delta fadR$ con el vector que expresa constitutivamente la versión *wild-type* y la versión mutada del gen *adhE*, se observó que ésta no es capaz de producir etanol (incluso en cultivos de alta densidad), pero sí butirato (figura 14). La falta de producción de etanol puede deberse a que la concentración de NADH en condiciones de cultivo aeróbico no es suficiente para generar la producción de etanol. La alta producción de butirato puede ser explicada por una degradación incompleta del ácido palmítico en la cepa sin modificaciones en el gen *atoC*, ya que se requiere de la expresión del gen *atoB* para convertir el butiril-CoA (de 4 carbonos) en dos moléculas de acetil CoA (figura 1).

5.2.3 Efecto de la delección del gen que codifica para la NADH deshidrogenasa I y formas de cultivo en la producción de etanol.

Con el objetivo de producir etanol y para validar la predicción hecha por el EMA, se realizó la delección del gen *nuoG*. Corroborando la simulación *in silico*, ésta delección génica permitió a la cepa *E. coli* $\Delta nuoG$, la producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico, siempre y cuando la cepa expresara la versión mutada del gen *adhE* (figura 15). Considerando los buenos resultados en la producción de biomasa en las cepas con delecciones en los genes *fadR* y *arcA*, se generaron variantes de *E. coli* $\Delta fadR$ y $\Delta arcA \Delta nuoG$. Sin embargo, solo en la primera cepa se produjo producción de biomasa asociada a producción de etanol, al utilizar cualquiera de los sistemas de expresión de AdhE aerotolerante (figura 15 y 16); la cepa K12 $\Delta arcA \Delta nuoG$ fue estudiada con los dos sistemas de expresión de *adhE* (constitutivo e inducible), con distintos medios de cultivo y en distintas condiciones, sin embargo al expresarse la versión mutada del gen *adhE*, esta cepa fue incapaz de crecer en ácidos grasos como única fuente de carbono. Esto es particularmente extraño debido a que la cepa K12 $\Delta arcA \Delta ndh$ (que también tiene truncada una NADH deshidrogenasa) sí fue capaz de crecer en ácidos grasos, pero como se ha mencionado anteriormente, no fue capaz de producir etanol. La delección de *arcA* mostraba gran potencial debido al trabajo de Iuchi y Lin de 1998 que mostró que bajo condiciones de anaerobiosis (o alta concentración de NADH, como en el knockout para *nuoG*) el sistema de dos componentes ArcBA reprimía la expresión de enzimas muy importantes para el metabolismo de los ácidos grasos, y podría haber sido la causa de la diferencia entre los niveles experimentales de producción de etanol y aquellos simulados por el EMA. Sin embargo, debido a estos resultados, la delección de *arcA* fue descartada de experimentos posteriores.

Estos resultados también mostraron que mutaciones en el complejo multienzimático NADH: ubiquitin oxidoreductoasa o NADH deshidrogenasa I, y no en la NADH deshidrogenasa II, son esenciales para la producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico al utilizar ácido palmítico como única fuente de carbono, tal como lo anticipó el EMA.

A continuación se evaluó el efecto de la temperatura, el medio y el tipo de cultivo (alta o baja densidad inicial). Uno de los primeros factores que se estudió fue el efecto de la temperatura en la producción de etanol, debido a la alta volatilidad de este compuesto, en especial si se trabaja en condiciones de cultivo aeróbico. Como se observa en la figura 15, a 28°C la producción de etanol es casi 7 veces mayor que a

37°C, lo que puede explicarse debido a la pérdida por muestreo y a la utilización de sistemas de cerrados permeables al etanol, que permiten la aireación del cultivo en matraces. Por esta razón, la mayoría de los estudios fueron realizados a 28°C.

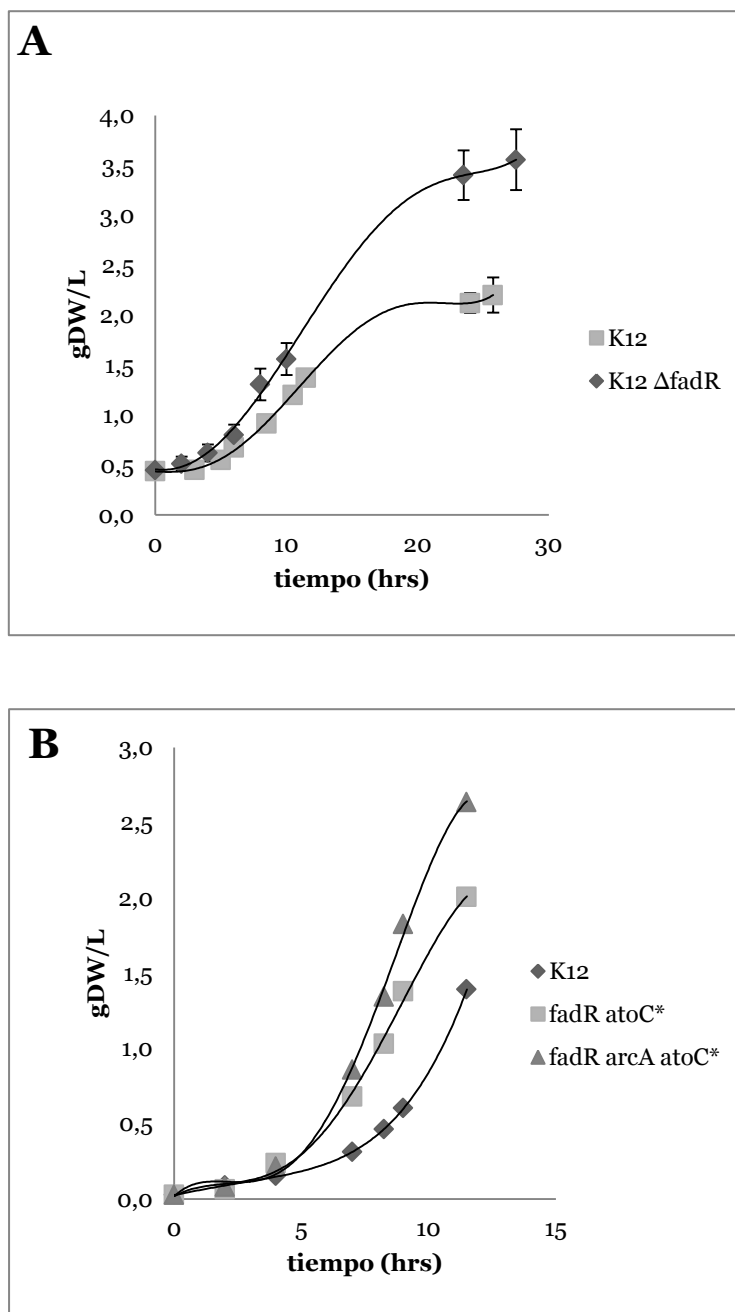


Figura 13: Efecto de la delección de *fadR* y *arcA* en el crecimiento de cepas en ácidos palmítico a 37°C en medio R/2. Como se puede observar, las delecciones en los genes *fadR*, *arcA* permitieron una mayor producción de biomasa en comparación con la cepa silvestre de *E. coli*

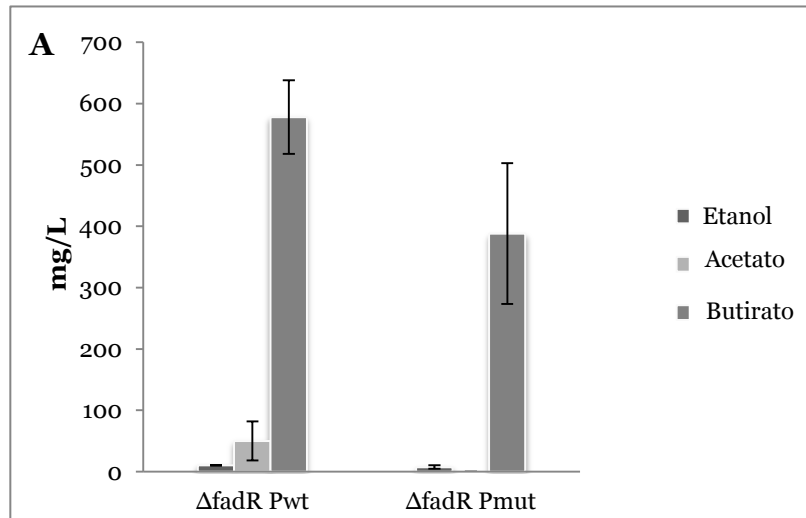


Figura 14. Producción de metabolitos en K12 $\Delta fadR$ expresando la versión silvestre y mutada del gen *adhE*. Producción de etanol, acetato y butirato en cultivos de alta densidad inicial de cepas K12 $\Delta fadR$ con la versión silvestre (Pwt) y mutada (Pmut) del gen *adhE* en el vector con expresión constitutiva en 24 horas a 28°C y 250rpm. *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$

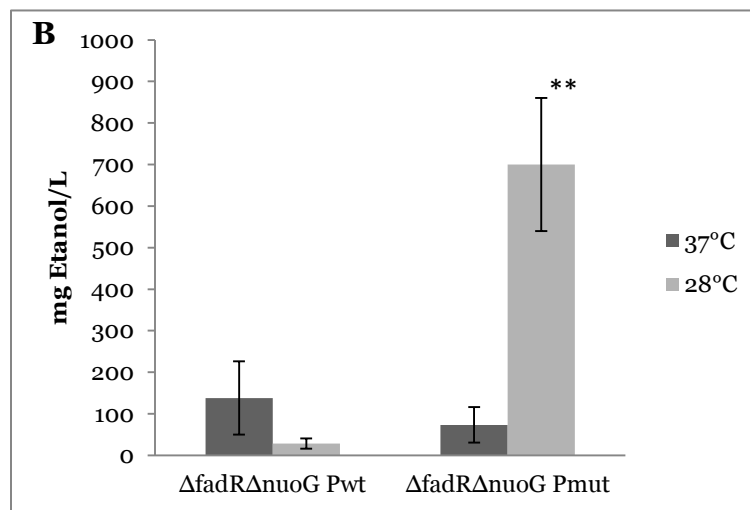


Figura 15. Producción de etanol a dos temperaturas de cultivo en la variante con la delección en el gen *nuoG*. Cultivos de alta densidad inicial de cepas K12 $\Delta fadR\Delta nuoG$ con el vector de expresión constitutiva de *adhE* (pET-fadBA-AdhE) en condiciones de alta densidad inicial a distintas temperaturas. *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$

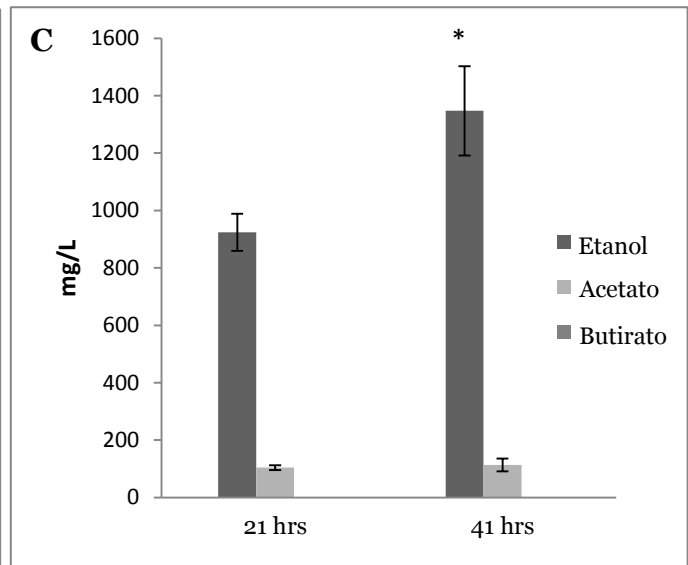
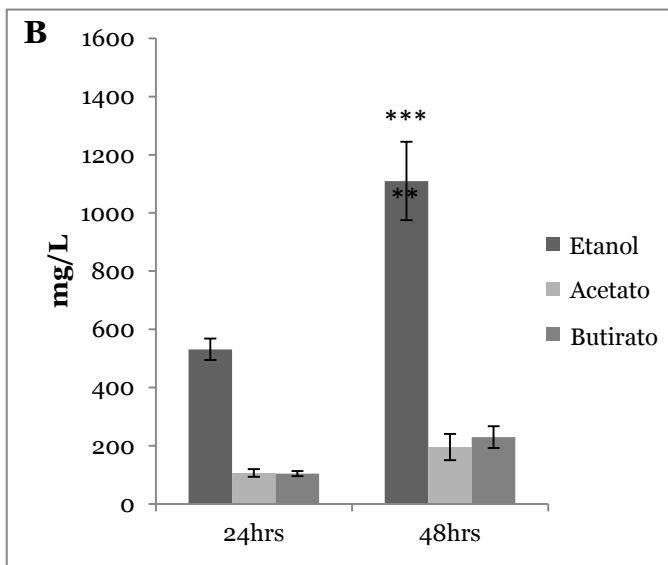
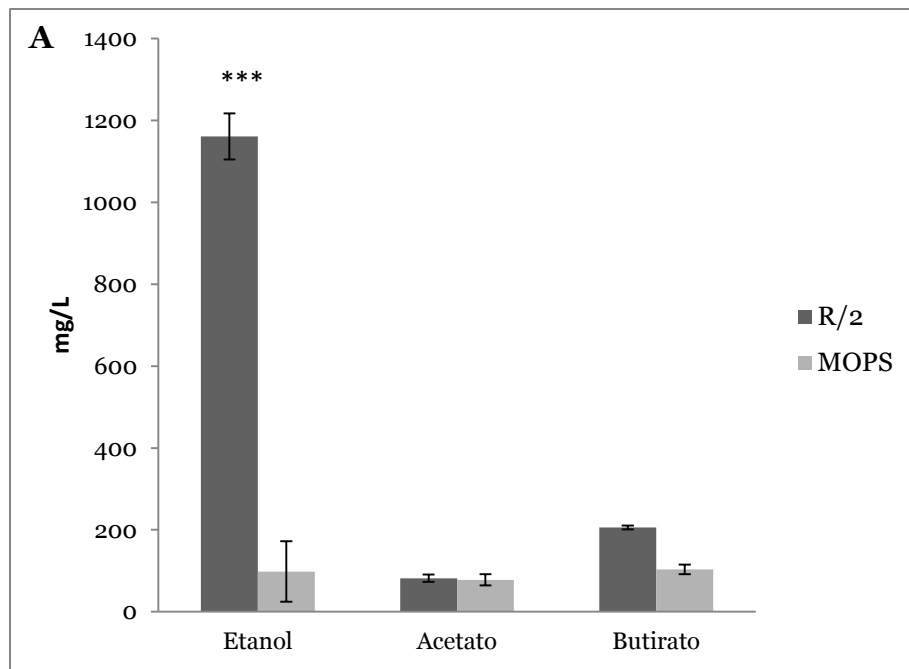


Figura 16: Producción de etanol, acetato y butirato en variantes de *E. coli*. A. Producción en la cepa *K12 ΔfadR ΔnuoG* pET-fadBA-AdhE_mut a 28°C y 48 horas de cultivo alta densidad inicial. B y C: Producción de etanol, acetato y butirato en cepas *K12 ΔfadR ΔnuoG* pET-fadBA-AdhE_mut y cepa *K12 ΔfadR ΔnuoG atoC** pET-fadBA-AdhE_mut, respectivamente. Ambos en cultivos de alta densidad inicial a 28°C en medio R/2. *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$

Para evaluar el efecto del medio de cultivo en la producción de etanol y otros metabolitos secundarios en esta cepa, se utilizaron los medios MOPS y R/2 (Figura 16A). Como se puede observar, nuevamente el medio R/2 es el que muestra los mejores resultados, esta vez en la producción de etanol, ya que como se discutió anteriormente este medio contiene mayor concentración de compuestos claves para el metabolismo celular y la producción de etanol (como fosfato y hierro).

Con respecto al efecto de la mutación espontánea del gen *atoC*, y tal como se observa en la figura 16B-C, la gran producción de butirato observada en la figura 14 es eliminada en las cepas con la mutación espontánea de dicho gen (*atoC*^{*}), el que comanda la expresión del operón *ato* y por ende del gen *atoB*, que codifica para la enzima que transforma butiril-CoA en acetyl-CoA, lo que naturalmente disminuiría la producción de butirato.

Finalmente, se comparó el efecto de la densidad inicial en la producción de etanol (figura 17A), y se mostró que cultivos de alta densidad muestran los mejores resultados en la producción neta de etanol. No obstante al realizar alimentaciones periódicas (*fedbatch*) la producción de etanol se vio estancada (figura 17B). Esto puede deberse a la alta osmolaridad del medio luego de cada alimentación, ya que el gen que codifica para el transportador de entrada de ácidos grasos FadL, presenta 4 sitios de unión para el complejo EnvZ-OmpR el que a su vez, reprime la expresión del gen *fadL* cuando la osmolaridad del medio es alta (Cai & Inouye 2002).

A pesar de los resultados en el cultivo de alta densidad, efectos adversos como la disminución de la difusión de oxígeno en los cultivos, el alto costo de realizar un cultivo de alta densidad en volúmenes superiores a 10mL (ya que para 1L de cultivo con densidad inicial de 5, son necesarios más de 7L de cultivo bacteriano a una OD de 0.7) y por ende la no aplicabilidad del sistema si es que se quiere escalar a nivel industrial, hizo que nuevas estrategias fueran probadas para mejorar la producción de etanol en condiciones de cultivo con baja densidad celular inicial y que los cultivos de alta densidad fueran descartados para los siguientes estudios.

5.2.4 Evaluación de distintas formas de fermentación para minimizar producción de metabolitos secundarios y evaporación de etanol en cultivos con ácidos grasos en condiciones de cultivo aeróbico

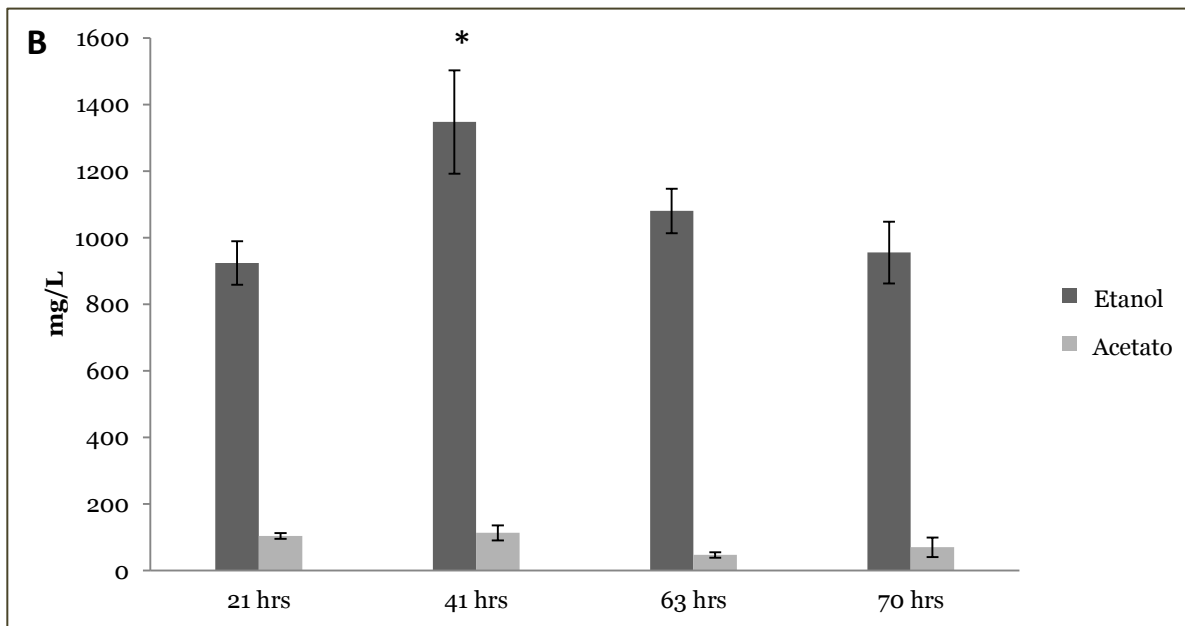
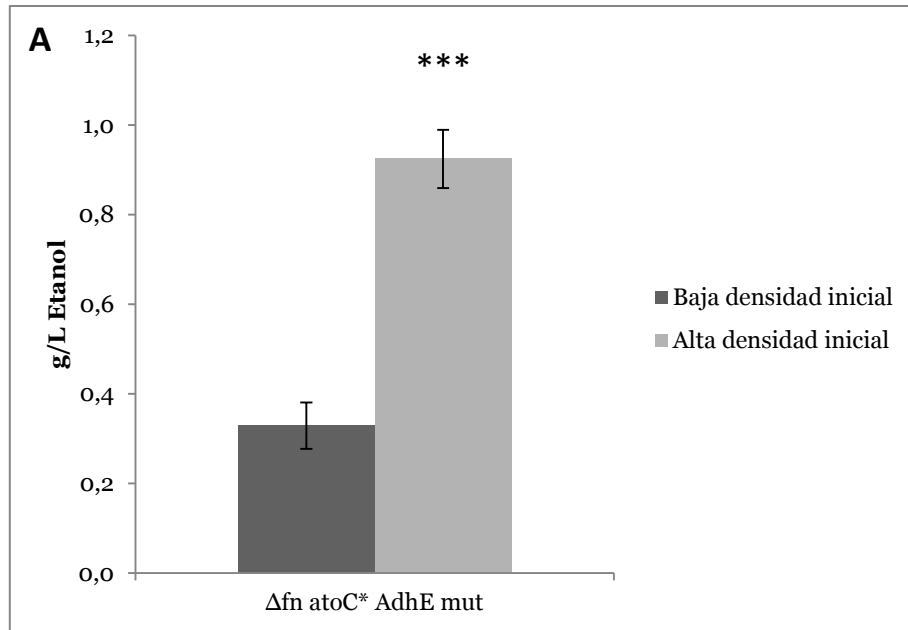


Figura 17: Comparación de la producción de etanol en cultivos de variante de *E. coli* en cultivos de alta y baja densidad. A, Comparación de la producción de etanol en cultivos de la cepa K12 $\Delta fadR \Delta nuoG$ pET-fadBA-AdhE_mut en cultivos de alta y baja densidad a 28°C y 21 horas de cultivo. B: Producción de etanol y acetato en cepas K12 $\Delta fadR \Delta nuoG$ pET-fadBA-AdhE_mut a 28°C realizando una alimentación de ácido palmítico en cada uno de los tiempos señalados a una concentración final de 5g/L. ***P≤0,001, *P≤0,05

El inconveniente más recurrente encontrado en los cultivos, además de la medición de biomasa por la turbidez de estos, fue la dificultad para medir flujos de producción de etanol. Esto inicialmente fue atribuido a la evaporación de este metabolito en condiciones de cultivo aeróbico, sin embargo resultados del análisis de sobrenadantes de cultivos por HPLC mostraron una constante inconsistencia entre diferentes tiempos de medición, ya que en vez de mostrarse flujos ascendentes o descendentes, al azar aparecía un *peak* desconocido que luego por GC-MS, se identificó como hidroxiacetona o acetol, el que proviene del metabolismo de la glicina y el metilglioxal y que se encontraría compitiendo con el etanol por el *pool* de NADH.

Cultivos de la cepa *K12 ΔfadR ΔnuoG atoC** en glucosa en un bioreactor con condensador (para evitar el efecto de la evaporación), mostraron que este compuesto se produce en la fase temprana del crecimiento exponencial y desaparece justo antes del último tercio de esa fase (figura 18). Adicionalmente, estos cultivos mostraron que el aumento en la producción de etanol fue directamente proporcional a la disminución de la producción de acetol, lo que sustenta la hipótesis de la competencia por el *pool* de NADH. Sin embargo, debido a que el acetol es consumido antes del máximo de producción de etanol, se concluyó que no es necesario realizar modificaciones a nivel genético para alterar la producción de este compuesto, sino que sólo modificaciones de las condiciones de cultivo serían suficientes. Dentro de estas se encuentran la inducción de la expresión de la AdhE tolerante en el último tercio de la fase exponencial, lo que permitiría favorecer la producción de etanol cuando el acetol ya no se encuentra en el medio. Con este experimento se mostró además producción de etanol a partir de glucosa en condiciones de cultivo aeróbico, hallazgo que no había sido reportado a nivel experimental en la literatura.

A pesar de que fue posible producir etanol mediante el uso del bioreactor Biostat B, esto no fue efectivo para el cultivo con ácidos grasos ya que factores como la presencia de burbujas en el medio (producto de la aireación y el detergente usado para solubilizar los ácidos grasos) o la extracción de los ácidos grasos desde el medio hacia la espuma hizo imposible este experimento (figura 3). Esto ocurrió a pesar del uso de diferentes detergentes (Tritón X-100 y Brij 58) y a diferentes concentraciones (desde 0,00025% a 0,1%), e incluso al realizar lavados del medio con R/2 sin fuente de carbono, mediante precipitación de los ácidos grasos a altas velocidades.

Como alternativa se utilizó un sistema de minifermentadores (figura 4A y 5). Este sistema permite el crecimiento simultáneo de hasta 12 cultivos y a diferentes temperaturas (dadas por la placa calefactora) y con diferentes grados de agitación (dado por el flujo de aire programado en la bomba peristáltica). En la figura 19A se puede observar el efecto de este último factor en la producción de biomasa en cultivos en LB y la comparación con un cultivo en un matraz de 250mL con agitación de 250rpm y 37°C. Tal como se observa en dicha figura, el crecimiento es más lento en las cepas crecidas en los mini-fermentadores que en el matraz, sin embargo su fácil implementación y la posibilidad de realizar cultivos simultáneos le da un gran potencial para diversos estudios, tanto a nivel de flujos metabólicos, como de adaptación a sustratos no convencionales.

En la figura 19B se observa el crecimiento de la cepa en ácidos grasos en los mini-fermentadores. Es importante destacar que a pesar de que fue posible realizar cultivos de *E. coli* con ácidos grasos en este sistema, no fue posible obtener curvas lineales de producción de etanol, lo que puede deberse a la ausencia de un condensador en esta configuración.

Finalmente se estudió el efecto de utilizar matraces con salida inferior (figura 4B y 6) en la evaporación de etanol producto del muestreo. Para evaluar el efecto del material de sellado del matraz en la evaporación del etanol, se estudió la capacidad de retención de 1g/L de etanol Merck a 37°C y 200rpm, al usar *alusa foil* o una membrana respirable para cultivo de microorganismos en placas de 96 pocillos. Los resultados mostraron que la membrana fue capaz de retener el 92,3±6% del etanol contenido en el matraz, mientras que el *alusa foil* fue capaz de retener solo el 57,3±3,51% del alcohol. De acuerdo a estos resultados, este sistema fue el escogido para realizar los estudios de validación de la predicción hecha por el EMA (figura 9).

5.3 Validación experimental de la predicción realizada mediante simulaciones *in silico* en cultivos con ácido palmítico purificado comercial y en medios con desechos industriales ricos en ácidos grasos.

Cabe destacar que para la validación del modelo se generaron cepas con todos los *knockouts* predichos excepto el del operón *sucCD*, ya que según la predicción la deleción, este gen no generaría un aumento en la producción de etanol o biomasa, en las condiciones de cultivo estudiadas (figura 9).

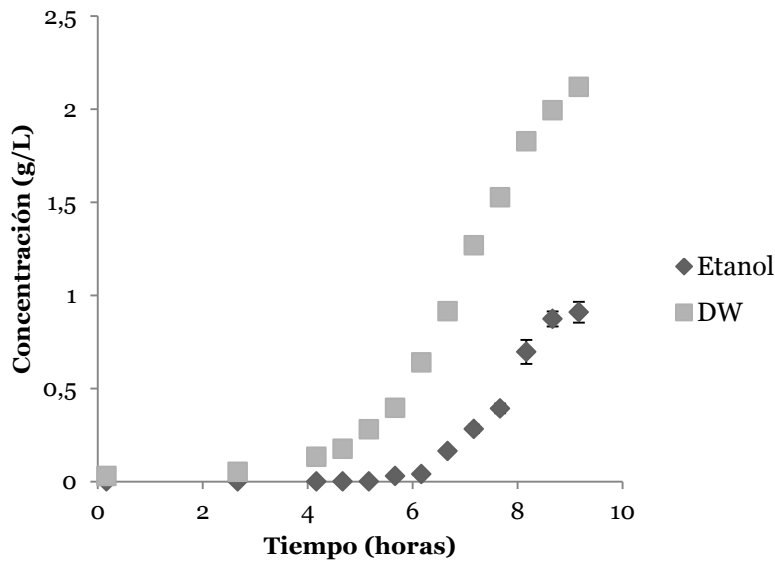


Figura 18. Producción de biomasa (DW) y etanol en fermentador Biostat B. En este cultivo se utilizó el medio R/2 suplementado con glucosa

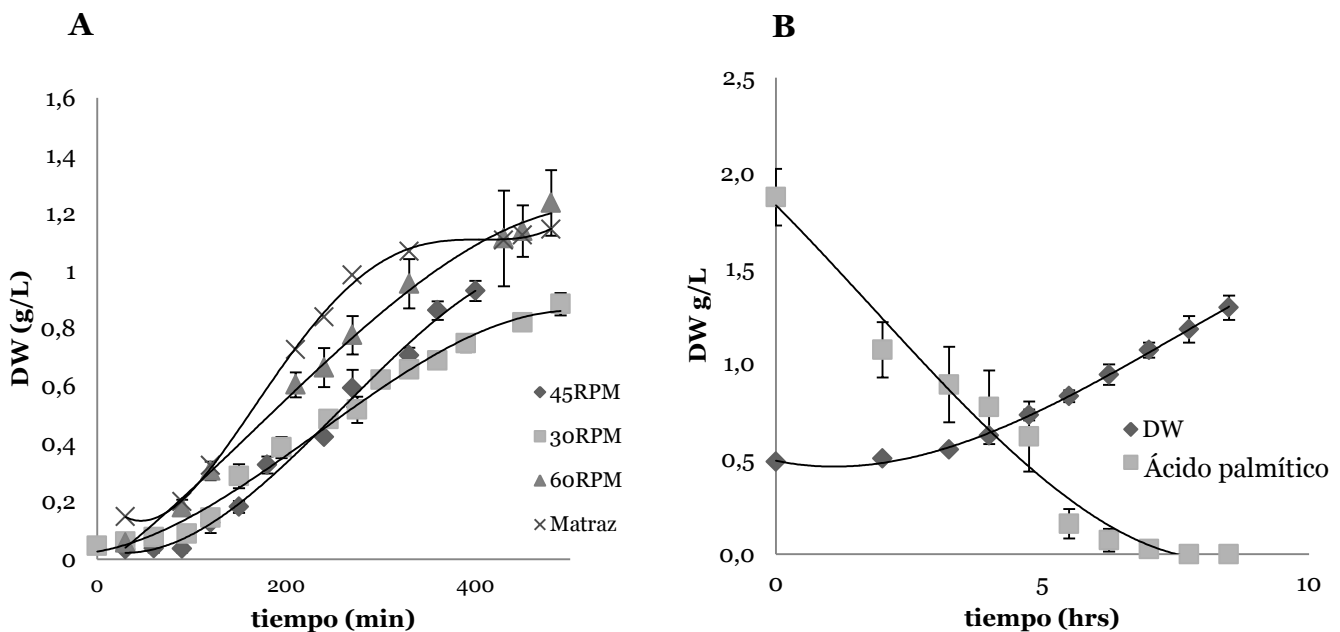


Figura 19: Cultivos en mini fermentadores en LB y ácido palmítico. A, Comparación de la producción de biomasa en cultivos de la cepa K12 $\Delta fadR \Delta nuoG atoC^*$ en los mini fermentadores a 37°C a distintas RPM y en medio LB. B: Producción de biomasa y consumo de ácidos grasos en la cepa K12 $\Delta fadR \Delta nuoG atoC^*$ a 37°C con medio R/2 y ácido palmítico 5g/L.

5.3.1 Tasas de producción en las cepas modificadas genéticamente para producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico a partir de ácidos grasos

Con el objetivo de validar la predicción realizada mediante EMA, las cepas fnfp*, fnfpl* y fnfplap*, fueron cultivadas en condiciones de baja densidad inicial, utilizando el sistema de expresión inducido por IPTG pTacAdhE y el sistema de matraces con salida inferior.

Las tasas específicas de crecimiento de las cepas en ácido palmítico a 37°C fueron $0,133 \pm 0,004$ para la cepa fnfp*; $0,149 \pm 0,003$ para fnfpl* y $0,198 \pm 0,026$ para fnfplap*. Con respecto a la diferencia en el crecimiento al cultivar las cepas a 37°C o a 28°C, el μ de la cepa fnfplap a ésta última temperatura fue de $0,145 \pm 0,010$; valor significativamente menor que el de 37°C (* $P \leq 0,1$). A pesar de esta diferencia, el flujo de producción de etanol (mmoles/gDW⁻¹h⁻¹) no varió significativamente con la temperatura (figura 20B), lo que muestra que la pérdida de etanol por evaporación es evitada en este sistema de cultivo. Sin embargo, e independiente de la temperatura de cultivo, se puede observar una diferencia significativa al comparar las distintas cepas tanto en el flujo de producción de etanol (figura 20A), como en el rendimiento de producción de etanol (figura 21A). Este resultado valida la tendencia predicha por el análisis de modos elementales (figura 9), aunque no los valores que fueron anticipados por dicho análisis.

Para estudiar si la cepa fnfplap*, mejorada en el consumo de ácidos grasos y producción de etanol, era capaz de crecer en desechos de origen industrial ricos en ácidos grasos, cultivos de ésta cepa fueron crecidos en un medio que contenía 1/10 del desecho industrial proveniente del refinamiento del aceite de palma (concentración inicial de 5g/L) a 28°C y 200rpm. Al evaluar la tasa específica de crecimiento, esta fue de $0,233 \pm 0,019$, significativamente mayor que la del mismo cultivo en ácido palmítico purificado Sigma, lo que también se tradujo en un aumento significativo en la tasa de producción de etanol (figura 21B). Esto puede deberse a que los ácidos grasos en el medio proveniente de la industria del refinamiento del aceite, ya se encuentran en estado líquido lo que puede mejorar su biodisponibilidad al compararlos con los ácidos grasos purificados que son adquiridos en estado sólido. Otra explicación puede ser que, debido a que son productos extraídos de la fruta de la palma, pueden ser más ricos en compuestos importantes para el crecimiento de *E. coli* y la producción de etanol. Esta mejora en la producción de biomasa, también puede explicar la diferencia en la producción de

etanol al dejar los cultivos por un período mayor a 20 horas post-inducción, en donde los cultivos con ácidos grasos purificados no produjeron más que 600mg/L, en cambio los cultivos en los ácidos grasos industriales alcanzaron los 1,3g/L, valor similar al obtenido en cultivos de alta densidad (figura 18).

Estos resultados muestran que el contenido del medio de cultivo afecta directamente el rendimiento de las cepas en la producción tanto de biomasa como de etanol. De hecho, en base a estos resultados, sería interesante estudiar los niveles de producción de etanol en cultivos continuos, ya que cultivos fedbatch de las cepas (datos no mostrados) resultaron poco exitosos en el estudio de la máxima producción de etanol.

Con respecto a la producción de acetato, el flujo de producción fue de 0,473, 0,286 y 0,082mmoles/gDW⁻¹h⁻¹ para las cepas fnfp*, fnfpl* y fnfplap* respectivamente. Cabe destacar que en el caso de la cepa fnfplap*, en un inicio la producción de acetato se mantuvo a un mínimo, sin embargo en la etapa de crecimiento exponencial tardío o inicio de la fase estacionaria, la cepa comenzó a producir concentraciones de acetato similares a las otras cepas estudiadas. De hecho, mientras que en las cepas fnfp* y fnfpl* la producción de acetato se mantuvo en el orden de los 5mM desde antes de la inducción, en la cepa fnfplap*, la producción de acetato se retrasó hasta 8 horas después de la inducción, coincidentemente en algunos casos con la máxima producción de etanol. Esto puede explicar el hecho de que a pesar de evaluarse distintas estrategias de cultivo, temperatura, medios, entre otras, la concentración neta de etanol (g/L), no superó los 600mg/L para el cultivo de esta cepa mejorada, utilizando la estrategia de baja densidad celular inicial en medios con ácidos grasos purificados.

5.4 Simulaciones y nuevo diseño de cepas utilizando un modelo genómico de *Escherichia coli* para la producción de etanol a partir de ácidos grasos en condiciones de cultivo aeróbico.

A pesar de que se logró la validación de la tendencia predicha por el EMA, los niveles de etanol producidos no fueron satisfactorios. Por esto se decidió realizar un análisis computacional de un modelo genómico de *Escherichia coli* (iJO1366), capaz de simular de mejor manera el comportamiento de este microorganismo en las condiciones de cultivo utilizadas, mediante la herramienta Cobra 2.0 del programa de modelamiento matemático Matlab 2009R.

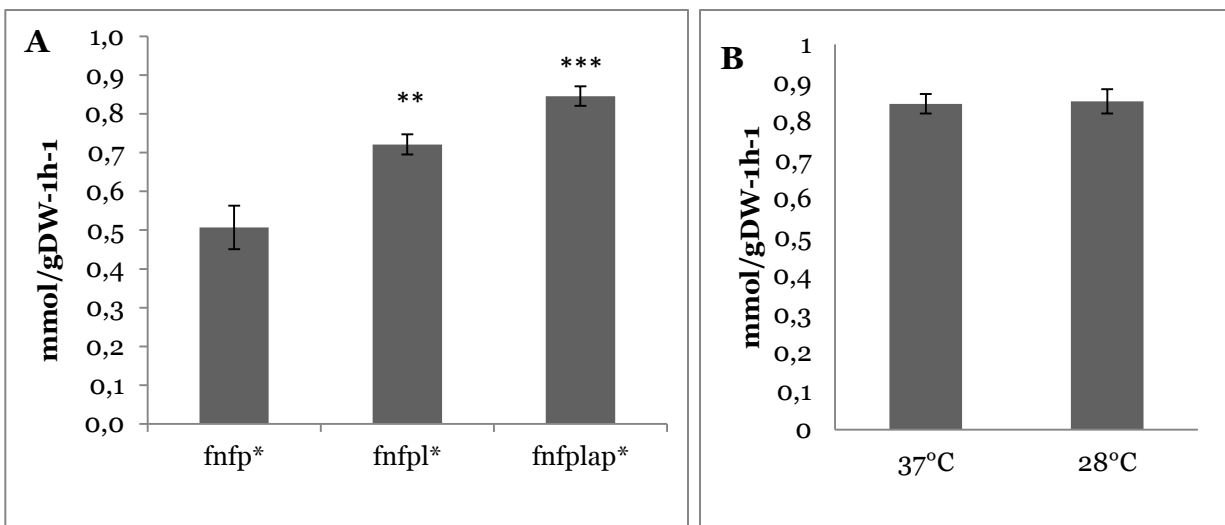


Figura 20. Tasas de producción de etanol en variantes de *E. coli* y el efecto de la temperatura en esta. A. Aumento progresivo y significativo del flujo de etanol (mmoles/gDW⁻¹h⁻¹) en cepas fnfp*, fnfpl* y fnfplap* con el vector pTac-AdhE_mut a 37°C, en medio R/2 con 5g/L ácido palmítico Sigma. B. Efecto de la temperatura en el flujo de etanol para la cepa fnfplap* con el vector pTac-AdhE_mut a 37 y 28°C. ***P≤0,001, **P≤0,01

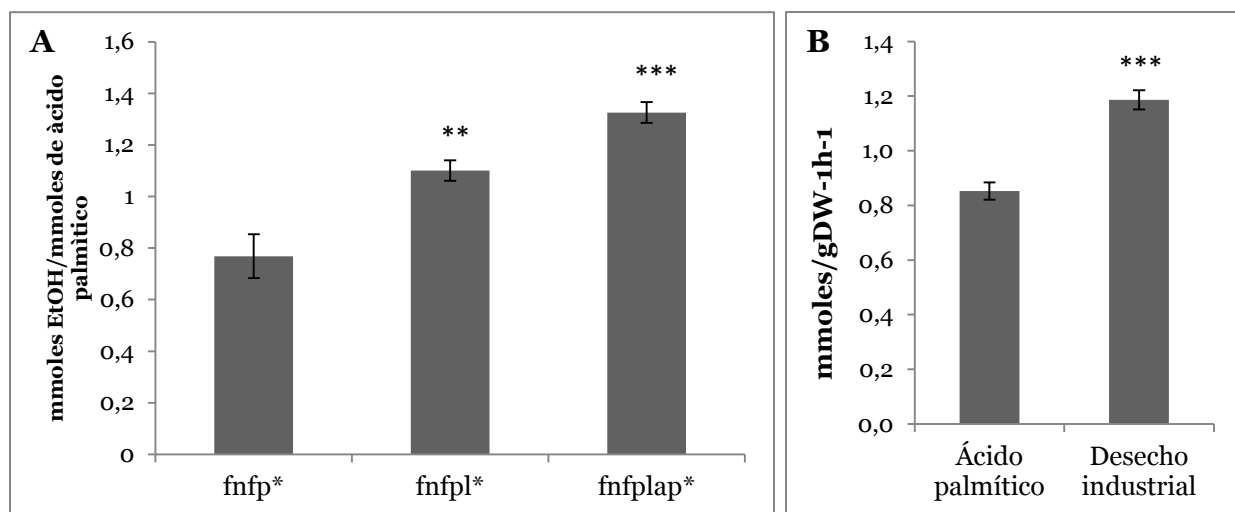


Figura 21. Rendimiento en la producción de etanol para variantes de *E. coli* y comparación en tasa de producción con ácidos grasos provenientes de desechos industriales. A. Se muestra un aumento progresivo y significativo del rendimiento de la producción de etanol en cultivos con 5g/L de ácido palmítico Sigma a medida que aumenta el número de deleciones en las cepas fnfp*, fnfpl* y fnfplap*. B. Efecto del medio de cultivo en el flujo de producción de etanol de la cepa fnfplap* al crecerla en ácido palmítico Sigma y en desecho industrial rico en ácidos grasos, proveniente del refinamiento de aceite de palma a 28°C. ** P≤0,01 y *** P≤0,001

5.4.1 Simulación del efecto de la concentración de oxígeno en el consumo de ácidos grasos y la producción de etanol.

El primer análisis que se realizó fue comparar la producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico al utilizar glucosa y ácido palmítico (en el modelo denominado como EX_glc y EX_hdca, respectivamente), como única fuente de carbonos. En esta simulación, todos los componentes del medio R/2 fueron considerados como nutrientes ilimitados, excepto el ácido cítrico, debido a que este puede ser usado por el modelo como fuente de carbono y por lo tanto puede generar una producción de biomasa y de etanol no asociada a los sustratos mencionados.

Como resultado de estas simulaciones, se mostró que mientras que la concentración de oxígeno no es limitante del consumo de glucosa, sí lo es para el consumo de ácidos grasos (figura 22); y solo cuando el consumo de oxígeno es situado por sobre los 140 mmoles/gDWh, el total de ácido palmítico es consumido, lo que se condice con un aumento sostenido de la producción de etanol desde 1,4 (con 2mmoles O₂/gDWh) a 107,8 mmoles etanol/gDWh (con 140mmoles O₂/gDWh). Para glucosa, en cambio, la concentración de etanol se mantuvo estable en 46,1 mmoles/gDWh durante toda la simulación, independiente de la concentración de oxígeno en el medio. Esto corrobora los resultados de Cho y col en 2006 que muestran que la degradación de los ácidos grasos es más eficiente en presencia de oxígeno y nuevamente justifica nuestra elección de trabajar en condiciones de cultivo aeróbico.

Producto de estas simulaciones utilizando ácido palmítico como única fuente de carbono, se descubrieron 2 reacciones que se encontraban formando parte de un *loop* similar a los mencionados en la sección 4.2.12, y que eran responsables de un alto flujo en el vector solución: FESR y FESD1s. Ambas reacciones se encuentran relacionadas con la reparación de *clusters* hierro-azufre y sólo generan un *loop* de intercambio entre los clusters 4Fe-4S y 3Fe-4S, compuestos que no son utilizados nuevamente en el modelo. Por esta razón fueron limitadas a cero para las siguientes simulaciones.

5.4.2 Diseño de cepa optimizada en la producción de etanol a partir de ácidos grasos en condiciones de cultivo aeróbico utilizando un modelo genómico.

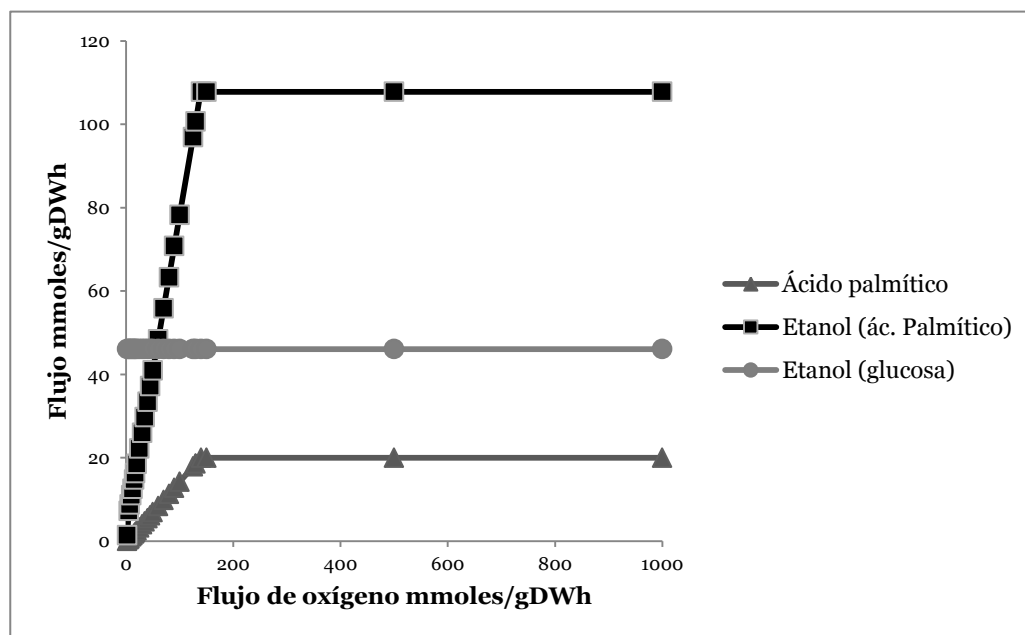


Figura 22. Simulación de la producción de etanol y el consumo de ácido palmítico bajo diferentes condiciones de cultivo aeróbico. Como se puede observar, por sobre los 140mmoles de O₂/gDWh, tanto la producción de etanol como el consumo de ácido palmítico se estabilizan. Por otra parte, la producción de etanol desde glucosa no se ve afectada por la concentración de oxígeno en el medio.

La primera etapa de este análisis consistió en realizar una reducción del universo de posibles genes a deletar con el objetivo de reducir tiempos de procesamiento computacional. Esto se llevó a cabo mediante la herramienta pFBA, producto del cual genes y reacciones que componen el modelo iJO1366, en las condiciones deseadas, fueron clasificados como: esenciales (210 genes y 290 reacciones), pFBA óptimos (235 genes y 170 reacciones), ELE (64 genes y 90 reacciones), MLE (493 genes y 1.143 reacciones), sin flujo o cero flujo (250 genes y 661 reacciones) y bloqueados (115 genes y 229 reacciones). Para los siguientes análisis las reacciones que componen las clasificaciones pFBA óptima y ELE, fueron seleccionadas y sobre estos se realizó una depuración en búsqueda de reacciones relacionadas con el transporte, intercambio, producción de biomasa y mantención de ATP. Tras este procedimiento 180 reacciones fueron seleccionadas para los siguientes análisis. Cabe destacar que los genes relacionados con el operón *nuo* o el gen *ndh*, no son considerados dentro de los genes a deletar ya que son considerados como esenciales en el metabolismo celular.

Estas 180 reacciones fueron utilizadas como población inicial para el análisis de deleciones mediante OptKnock, con dos valores máximos de deleciones de genes: (1) 10, denominado OptKnock10 y (2) 30, denominado OptKnock30. En las tablas 4 y 5 se encuentran los resultados de estos procedimientos y en ellas se puede ver que para el OptKnock 30 una gran diversidad de genes fueron predichos, algunos relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos, otros con el consumo de NADH, metabolismo del glicerol, ciclo del TCA e incluso genes relacionados con el metabolismo anaeróbico (similar a lo ocurrido en el EMA). En ambas simulaciones el valor alcanzado de la función objetivo (producción de etanol, EX_etoH) fue 1000 mMoles/gDWh⁻¹ y la tasa de producción de biomasa fue 2.9873.

Posteriormente, esta nueva población (164 reacciones en el OptKnock30 y 177 en el OptKnock10) fueron considerados como la población inicial de la herramienta OptGene. Cabe destacar que el aumento en la restricción de consumo de oxígeno (a -140mmoles de O₂/gDWh) afectó mucho la capacidad de encontrar soluciones de esta herramienta en el computador personal que se utilizó para llevar a cabo las simulaciones, y la única forma en que se estas se pudieron llevar a cabo fue al restringir a cero todos los flujos de los genes predichos anteriormente por OptKnock. Para el OptGene, en todos los casos un máximo de 10 deleciones y un número de 2.500 generaciones, para limitar el tiempo de cálculo computacional.

En las figuras 23 y 24 se muestra una fotografía del resultado del OptGene luego del OptKnock 30 y del OptKnock 10. En A, de ambas figuras, se puede observar la evolución de los individuos con el pasar de las generaciones y en B se puede observar la producción de diversos metabolitos, como parte del metabolismo celular. Las grandes diferencias se encuentran en la cantidad de metabolitos secundarios predichos a secretarse en cada una de las simulaciones y por supuesto, el valor de la función objetivo, el que fue considerablemente mayor en la segunda estrategia (46,2 mmoles etanol/gDWh, versus 5,7mmoles etanol/gDWh cuando la tasa de crecimiento celular también se encuentra optimizada; figuras 24 y 23, respectivamente)

En la figura 23B se puede observar la producción de un alto número de metabolitos secundarios, donde el metabolito con mayor producción fue acetato y solo el quinto con mayor producción fue etanol. En cambio, al disminuir el número de deleciones posibles en OptKnock10, el número de metabolitos secundarios también disminuyó, de 29 a 6 (figura 24B). No obstante la producción de acetato (línea azul) siguió siendo la de mayor producción. La producción de etanol (línea roja) también

aumentó su valor, desde un valor aproximado de 42 a 120mmoles/gDWh para tasas de crecimiento cercanas a $0,1h^{-1}$ (figuras 23 y 24B).

En el caso de las deleciones predichas, OptGene predijo 2 deleciones extras para la población OptKnock30: “ENO” y “GARFT”, y 2 también para OptKnock10: “FLDR2” y “PSERT” (tabla 6).

Debido a la alta producción de acetato, se decidió realizar una nueva iteración de la estrategia OptKnock 10 y OptGene 10 (figura 25). Luego de la segunda iteración de OptKnock, las reacciones ‘NDPK1’, ‘R15BPK’ y ‘TKT1’ (tabla 7) fueron predichas, sin embargo y a pesar de que la producción de etanol se mantuvo en un valor arbitrario de 1000 mMoles/gDWh⁻¹, la producción de biomasa bajo a 0.4588. Al simular con un número menor de deleciones (OptKnock5), el algoritmo dio como resultado la deleción única en ‘R15BPK’ (tabla 7), una producción maximizada de etanol de 1000 mMoles/gDWh⁻¹ y una producción de biomasa muy similar (0.4673). Luego de la segunda iteración de OptGene10, 4 nuevas reacciones fueron predichas (tabla 8), lo que significó un aumento a 53,5mmoles/gDWh en la producción de etanol cuando la tasa de crecimiento de biomasa se encuentra en su valor máximo, y una mantención en el valor de flujo de etanol máximo cuando el valor de la tasa de crecimiento es cercano a $0,1h^{-1}$. Con respecto a la tasa de producción de acetato, esta se mantuvo por sobre la del etanol (con un máximo por sobre los 180mmoles de acetato/gDWh). Este mismo análisis se realizó con un máximo de 5.000 generaciones, obteniéndose resultados similares. Esto muestra que nuevas iteraciones del proceso no resultan en una mejora significativa desde la cepa con las 5 deleciones iniciales (resultado de OptKnock10 y OptGene 10).

La elección de estos 5 genes es particularmente interesante debido a que a pesar de la alta producción de acetato, ninguno de los genes predichos en ninguno de los análisis fue alguno de los genes el operón *ackA-pta* (que codifican para las proteínas encargadas de la producción de acetato a partir de acetyl-CoA). Esto puede ser explicado debido a la necesidad de mantención del requerimiento de ATP, ya que en la reacción mediada por las enzimas acetato kinasa (Ack) y fosfato acetyl-transferasa (Pta), se produce un mol de ATP por mol de acetato. Esto también podría explicar la producción de acetato en la etapa tardía de la fase exponencial en la cepa *fnfplap**, probablemente por vías alternativas. Cabe destacar que en experimentos no mostrados, se estudió el efecto de deleccionar otros genes relacionados con el metabolismo del acetato, como *poxB*, sin embargo la producción de acetato se mantuvo inalterada en estas cepas. Esto parece indicar que aun cuando es posible

optimizar la producción de etanol desde ácidos grasos en condiciones de cultivo aeróbico, esto no quiere decir que este metabolito de interés va a ser el único compuesto producido por el metabolismo celular.

De todas maneras, si se piensa en una posible utilización de la cepa diseñada en el tratamiento de desechos industriales con presencia de cantidades variadas de ácidos grasos, se podría pensar en una estrategia donde la cepa *fnfplap** realice solo el pretratamiento de los ácidos grasos para producir etanol y acetato en condiciones aeróbicas, y que luego el medio de cultivo resultante, sea el sustrato para bacterias anaeróbicas, que ven inhibido su crecimiento en presencia de ácidos grasos y que necesitan como sustrato compuestos como el acetato para degradar el resto de la materia orgánica presente en los desechos.

Tabla 4. Deleciones predichas por Optknoock (30)

Nombre de la reacción en el modelo	Genes u Operones asociados	Proteína o complejo proteico que codifica	Observaciones
ACPPAT160	<i>acpP</i> y <i>plsX</i>	Acil-(proteína acil-carrier):fosfato acetiltransferasa (C16:0)	Biosíntesis de ácidos grasos
ACPPAT161	<i>acpP</i> y <i>plsX</i>	Acil-(proteína acil-carrier):fosfato acetiltransferasa (C16:1)	Biosíntesis de ácidos grasos
CYTK1	<i>cmk</i>	Citidilato kinasa (CMP)	Gen no esencial ligado en el metabolism de ácidos nucleicos
F6PA	<i>fsaAB</i>	Fructosa 6-fosfato aldolase	Gen que codifica para una enzima que convierte fructose 6 fosfato en DHA y G3P
FLDR2	<i>fldAB</i> y <i>fpr</i>	Flavodoxina reductasa (NADPH)	Relacionado con la activación de enzimas durante el metabolismo anaeróbico
FUM	<i>fumABC</i>	Fumarasa	Participa en el ciclo del TCA y su expresión es activada en condiciones de cultivo anaeróbico
G3PT	<i>ybiV</i>	Glicerol-3-fosfatasa	Metabolismo de glycerol
GLYCDx	<i>gldA</i>	Glicerol deshidrogenasa	Esencial en el metabolismo del glicerol, consume NADH para producir 1,2-propanediol desde acetol.
GTHOr	<i>gor</i>	Glutation oxidoreductasa	Flavoproteína, capaz de reducir glutatión.
ICL	<i>aceA</i>	Isocitrato liasa	Metabolismo del glioxilato, producción de succinato
MOX	<i>mgo</i>	Malato oxidase	Ciclo del TCA. Cataliza la oxidación de malato en oxaloacetate.
NDPK1	<i>adk</i> y <i>ndk</i>	Nucleosid-difosfato kinasa (ATP:GDP)	Biosíntesis de ribonucleotidos, uso de ATP
PPCSCT	<i>scpC</i>	Propanoil-CoA: succinato CoA-transferasa	Parte de la vía de decarboxilación de succinato para formar succinil-CoA
PPS	<i>ppsA</i>	Fosfoenolpiruvato sintasa	Esencial para crecimiento en piruvato, lactate o alanine como única fuente de carbono.
PRPPS	<i>prs</i>	Fosforibosilpirofosfato sintetasa	Metabolismo de PRPP, el que es un metabolito pivote del metabolismo
PTA2	<i>pta</i>	Fosfato acetiltransferasa	Conversión de propionil-CoA en n-propionil-p-aminofenol (PPAP)

Tabla 5. Deleciones predichas por Optknock (10)

Nombre de la reacción en el modelo	Genes u Operones asociados	Proteína o complejo proteico que codifica	Observaciones
G3PT	<i>ybiV</i>	Glicerol-3-fosfatasa	Metabolismo de glicerol
ICL	<i>aceA</i>	Isocitrato liasa	Metabolismo del glioxilato, producción de succinato
TRDR	<i>trxABC</i>	Tioredoxina reductasa (NADPH)	Consumo de NADHP

Tabla 6. Deleciones predichas por OptGene, luego de OptKnock 30 y OptKnock10

Nombre de la reacción en el modelo	Genes u Operones asociados	Proteína o complejo proteico que codifica	Observaciones
OpKnock 30 + OptGene 10			
ENO	<i>eno</i>	Enolasa	Metabolismo fosfoenolpiruvato
GARFT	<i>purN</i>	Foforibosil glicinamida formiltransferasa	Síntesis de purina
OptKnock10 + OptGene 10			
FLDR2	<i>fldAB, rplQ y fpr</i>	Flavodoxina reductasa (NADPH)	Flavodoxina que consume NADPH
PSERT	<i>serC</i>	Fosfoserina transaminase	Metabolismo de serina

Tabla 7. Resultado OptKnock10 (segunda iteración)

Nombre de la reacción en el modelo	Genes u Operones asociados	Proteína o complejo proteico que codifica	Observaciones
NDPK1	<i>adk y ndk</i>	Nucleoside-diphosphate kinase (ATP:GDP)	Metabolismo biosíntesis de ribonucleotidos (purina). Consumo de ATP
R15BPK	<i>phnN</i>	ribose-1,5-bisphosphokinase	Metabolismo PRPP. Involucra consumo de ATP
TKT1	<i>tktAB</i>	Transketolase	Link entre la glicólisis y la vía de las pentosas fosfato

Tabla 8. Resultado OptGene 10 (segunda interacción)

Nombre de la reacción en el modelo	Genes u Operones asociados	Proteína o complejo proteico que codifica	Observaciones
MTHFC	<i>folD</i>	Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	
RNTR1c2	<i>fldA fpr, nrdDG y ybeU</i>	Ribonucleoside-triphosphate reductase (ATP) (flavodoxin)	Flavodoxina que cataliza el consume de ATP
RNTR3c2	<i>fldA fpr, nrdDG y ybeU</i>	Ribonucleoside-triphosphate reductase (CTP) (flavodoxin)	Flavodoxina que cataliza el consume de ATP
GLCS1	<i>glgA</i>	Glycogen synthase (ADPGlc)	Responde a estímulo de daño en el DNA

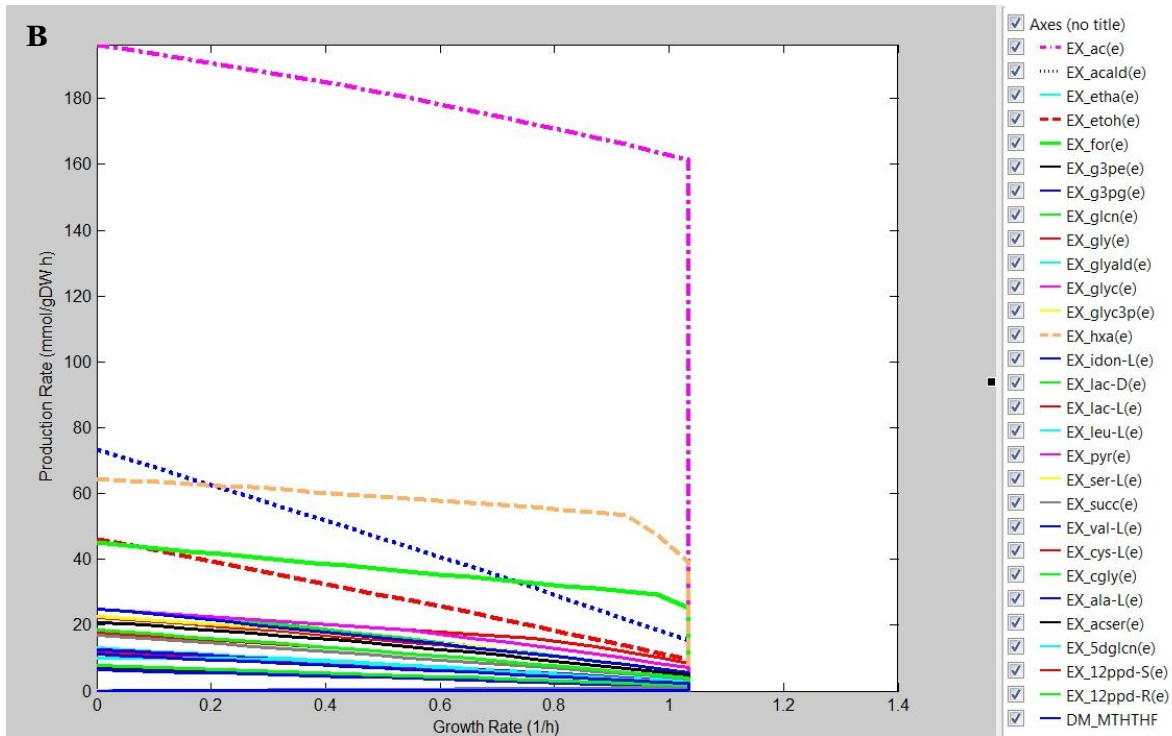
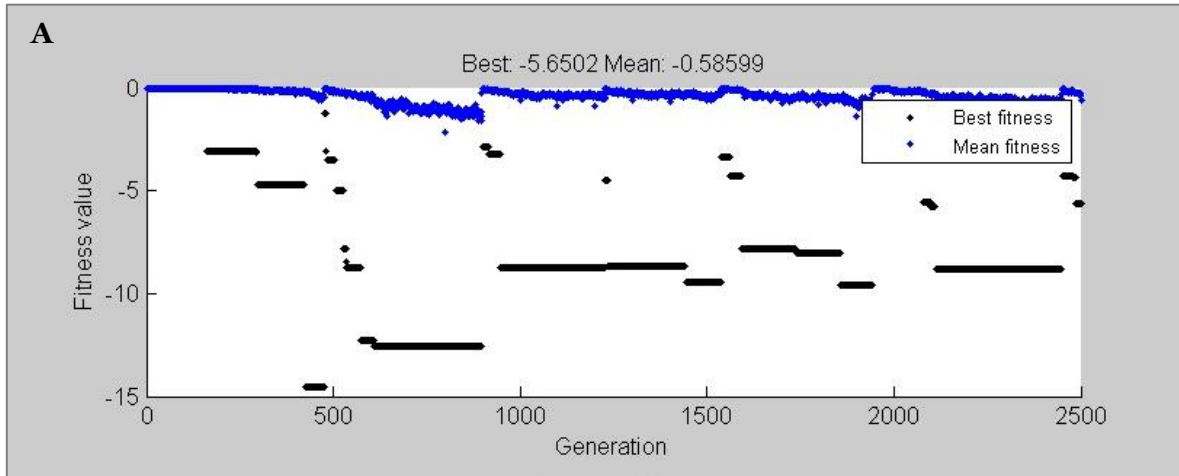


Figura 23. Resultado simulación OptGene, luego de realizar OptKnock30. En A, se puede observar la evolución del valor de *fitness* de los individuos con el paso de las generaciones, además del valor de *fitness* del individuo con la solución óptima y el promedio, En B se puede observar la tasa de producción de distintos compuestos para distintas tasas de crecimiento celular, como parte del metabolismo celular.

Simbología relevante: producción de acetato: EX_ac, línea -.-.- y producción de etanol: EX_etoh, línea - - -

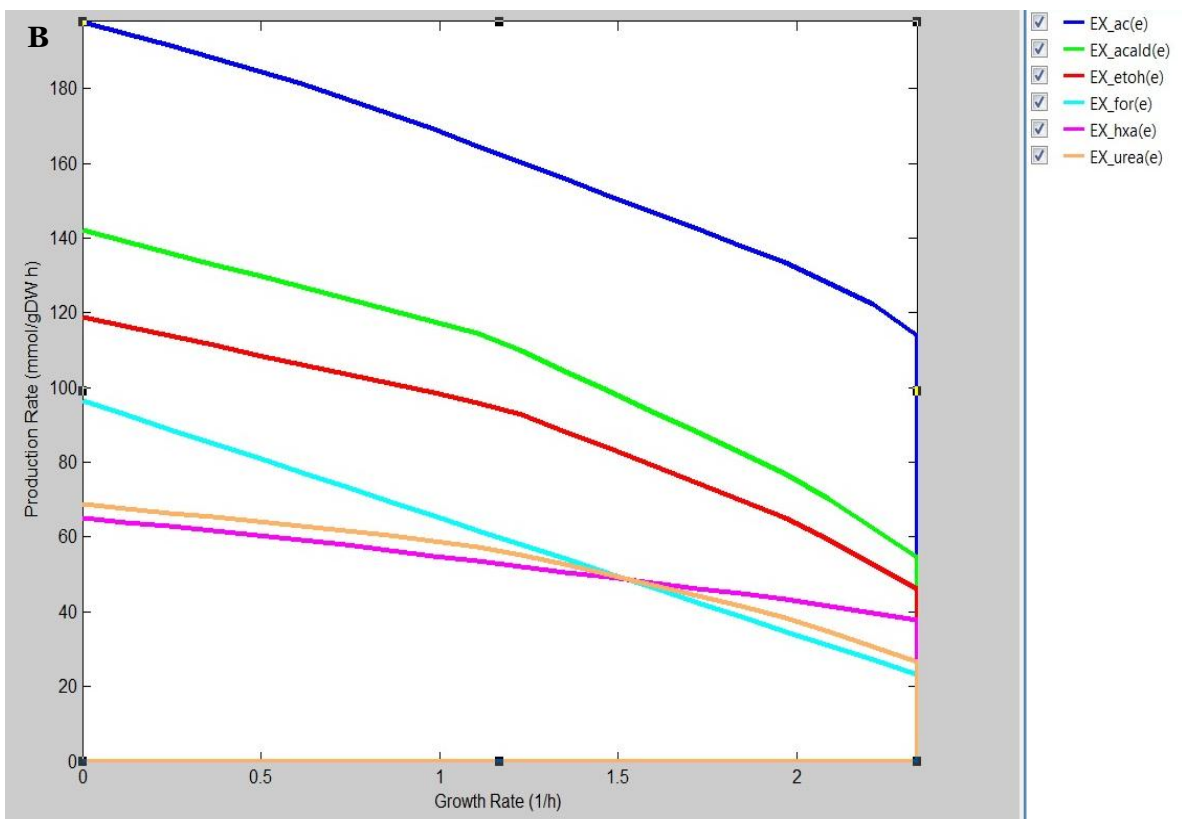
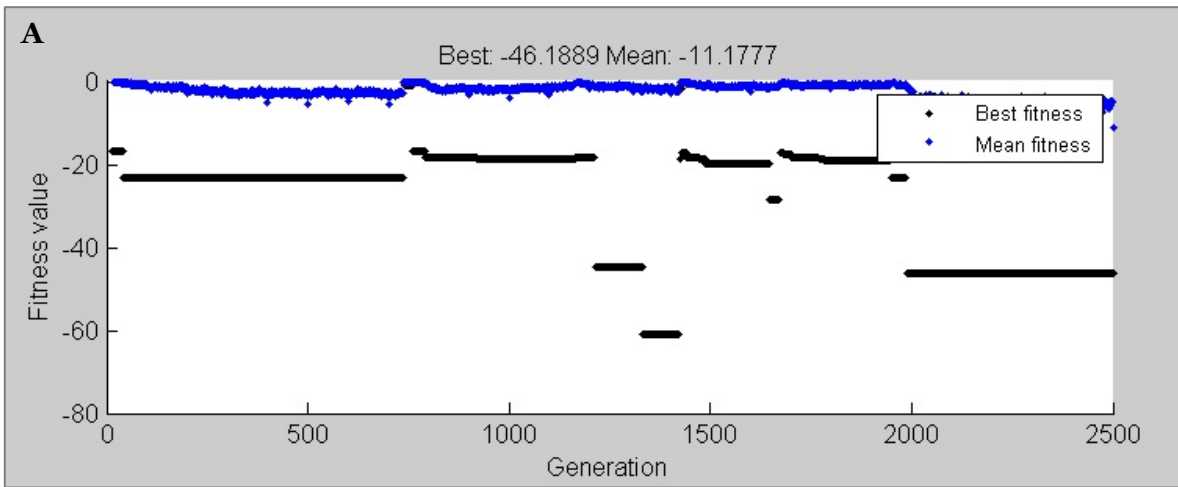


Figura 24. Resultado simulación OptGene, luego de realizar OptKnock10. En A, se puede observar la evolución del valor de *fitness* de los individuos con el paso de las generaciones, además del valor de *fitness* del individuo con la solución óptima y el promedio, En B se puede observar la tasa de producción de distintos compuestos para distintas tasas de crecimiento celular, como parte del metabolismo celular.

Simbología relevante: producción de acetato: EX_ac, línea azul y producción de etanol: EX_etoh, línea roja.

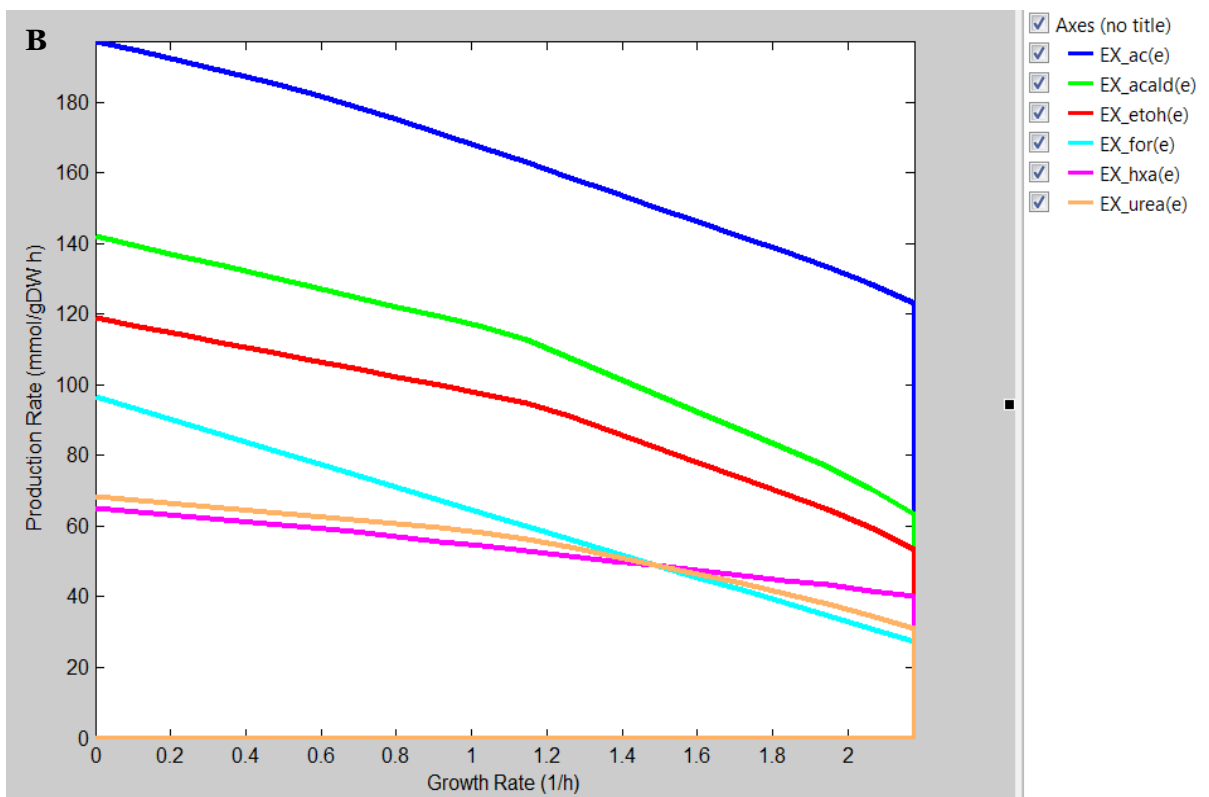
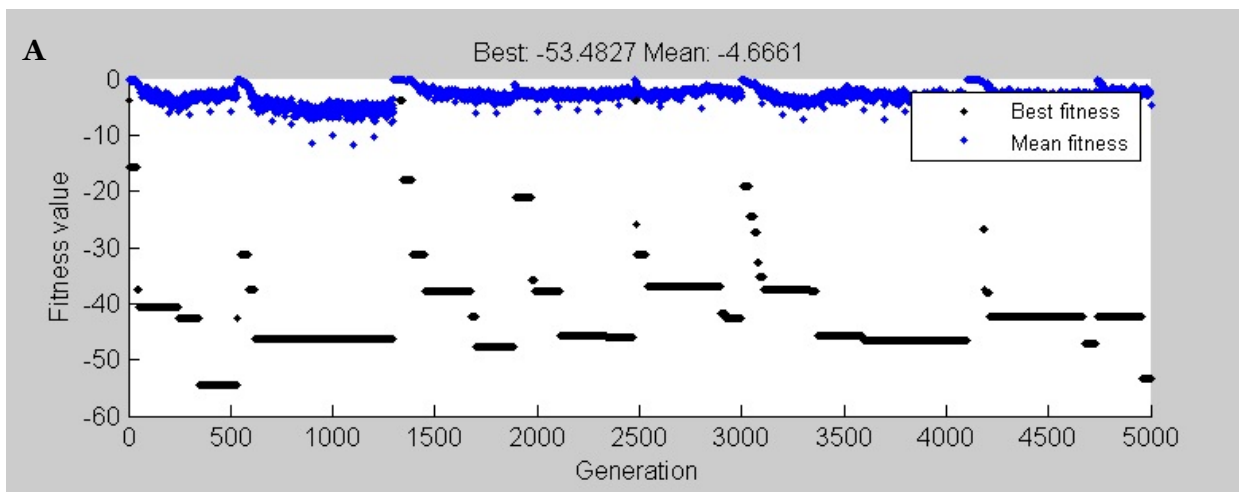


Figura 25. Resultado simulación OptGene, luego de realizar la segunda iteración de OptKnock10 y OptGene10. En A, se puede observar la evolución del valor de *fitness* de los individuos con el paso de las generaciones, además del valor de *fitness* del individuo con la solución óptima y el promedio, En B se puede observar la tasa de producción de distintos compuestos para distintas tasas de crecimiento celular, como parte del metabolismo celular

Simbología relevante: producción de acetato: EX_ac, línea azul y producción de etanol: EX_etoh, línea roja.

6. Conclusiones

En este trabajo de tesis se buscó realizar una estrategia integrada de ingeniería genética, técnicas de cultivo y modelamiento matemático para obtener una cepa optimizada en la producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico y utilizando como fuente de carbono un sustrato no convencional como los ácidos grasos.

Este trabajo es el primero en mostrar producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico a partir de ácidos grasos, ya que trabajos disponibles en la literatura son solo para cultivos microaeróbicos; y en especial, desde ácidos grasos provenientes de desechos industriales. Esto presenta un gran potencial, ya que la única modificación en el medio de cultivo fue la adición de sales y metales trazas. Otra ventaja de esta estrategia es que medios con desechos industriales no presentan el inconveniente de la gran producción de burbujas que sí se presentan en cultivos con ácido palmítico purificado comercial, por lo que la degradación de estos desechos puede ser llevado a cabo en bioreactores industriales encargados del tratamiento de riles.

Las simulaciones con el modelo simplificado de *Escherichia coli* y con el modelo genómico, mostraron que tanto un alto nivel de oxígeno como de NADH son esenciales tanto para la degradación de los ácidos grasos, como para la producción de etanol. Experimentalmente se mostró que la delección en el gen *nuoG*, y no en *ndh*, es esencial para generar la producción de etanol en las condiciones de estudio. Sin embargo, en el modelamiento genómico se mostró que no es necesario deleccionar genes esenciales como los que codifican para las NADH deshidrogenasas, sino que con la modificación de genes responsables de la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo del glioxilato, el glicerol o el succinato, serían suficientes para la optimización de la producción de etanol; sin embargo, esta predicción requiere validación experimental. Adicionalmente, tanto *in silico* como experimentalmente, se mostró que la producción de acetato parece ser una pérdida de carbonos inevitable en este modelo de estudio.

Al evaluar diferentes estrategias de cultivo, se pudo concluir que para cultivos batch de ácidos grasos purificados, los matraces con salida inferior son los que mostraron mejores resultados, ya que limitan la formación de burbujas y la evaporación del etanol. Sin embargo, los resultados con ácidos grasos industriales mostraron que estrategias como cultivo continuo y el uso de bioreactores con condensador

asociado, podría ser una estrategia muy exitosa en la producción de cantidades de etanol atractivas para la industria de los biocombustibles.

Cabe destacar que producto de este trabajo de tesis, el sistema de cultivo con mini-fermentadores de Maciek Antoniewicz (Laboratorio Antoniewicz, 2014) fue implementado en el laboratorio, en cultivos con glucosa, LB y ácidos grasos. También fueron desarrollados e implementados distintos protocolos para detección de metabolitos por GC-MS y modificaciones de técnicas de eliminación de genes basadas en PCR. Por último una gran variedad de cepas y plasmidios fueron generados, los que podrían ser utilizados en futuros trabajos.

Finalmente, se puede concluir que fue posible obtener una cepa mejorada, tanto en el consumo de ácidos grasos como en la producción de etanol en condiciones de cultivo aeróbico. A pesar de que no se alcanzaron altas concentraciones de etanol, sí fue posible validar tanto la tendencia predicha por el análisis de modos elementales y comportamientos predichos por FBA en el modelo genómico.

7. Bibliografia

- Alves, M.M. et al., 2001. Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part I: Biofilm growth and activity. *Water research*, 35:255–63.
- Aristarkhov, A. et al., 1996. Translation of the *adhE* transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III leavage in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 178:4327–4332.
- Becker, S. A et al., 2007. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. *Nature protocols*, 2:727–38.
- British Petroleum, 2009. BP statistical review of world energy 2008. British: BP Plc.
- Burgard, A.P., Pharkya, P. & Maranas, C.D., 2003. Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnology and bioengineering*, 84:647–57.
- Cai, S.J. & Inouye, M., 2002. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 277:24155–61.
- Campbell, J.W., Morgan-Kiss, R.M. & Cronan, J.E., 2003. A new *Escherichia coli* metabolic competency: growth on fatty acids by a novel anaerobic beta-oxidation pathway. *Molecular microbiology*, 47:793–805.
- Chassagnole, C., Noisommit - Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K., & Reuss, M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 79, 53-73.
- Chen, X., Li, S., & Liu, L. (2014). Engineering redox balance through cofactor systems. *Trends in biotechnology*, 32, 337-343.
- Cho, B.-K., Knight, E.M. & Palsson, B.Ø., 2006. Transcriptional regulation of the *fad* regulon genes of *Escherichia coli* by ArcA. *Microbiology (Reading, England)*, 152:2207–19.
- Choi, J.H., Keum, K.C. & Lee, S.Y., 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61:876–885.
- Chung, B. K. S., Lakshmanan, M., Klement, M., Mohanty, B., & Lee, D. Y. (2013). Genome-scale *in silico* modeling and analysis for designing synthetic terpenoid-producing microbial cell factories. *Chemical Engineering Science*, 103, 100-108.

- Clark, D., 1989. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 63:223–234.
- Clomburg, J.M. & Gonzalez, R., 2011. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. *Biotechnology and bioengineering*, 108:867–79.
- Thompson, J. D., Gibson, T., & Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics*, 2-3.
- Dellomonaco, C. et al., 2010. Engineered respiro-fermentative metabolism for the production of biofuels and biochemicals from fatty acid-rich feedstocks. *Applied and environmental microbiology*, 76:5067–78.
- Demirbas, M.F., 2011. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, 88:3473–3480. Díaz, H. et al., 2009. Global gene expression in recombinant and non-recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* in three different metabolic states. *Biotechnology advances*, 27:1092–117.
- Dirusso, C.C., Heimert, T.L. & Metzger, A.K., 1992. Characterization of FadR , a Global Transcriptional Regulator of Fatty Acid Metabolism in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 267:8685–8691.
- Domínguez, J.M. et al., 2000. Ethanol production from xylose with the yeast *Pichia stipitis* and simultaneous product recovery by gas stripping using a gas-lift loop fermentor with attached side-arm (GLSA). *Biotechnology and bioengineering*, 67:336–43.
- Echave, P. et al., 2003. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 278:30193–8.
- Ecocyc. <http://ecocyc.org/pwy-search.shtml> [Última consulta 04 de septiembre de 2014].
- Edwards, J.S. & Palsson, B.O., 1998. How will bioinformatics influence Metabolic Engineering ? *Biotechnology and bioengineering*, 58:162–169.
- Eiteman, M. a & Altman, E., 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in biotechnology*, 24:530–6.
- Eiteman, M.A. et al., 2006. Overflow Metabolism in *Escherichia coli* during Steady-State Growth: Transcriptional Regulation and Effect of the Redox Ratio. *Applied and environmental microbiology*, 72:3653–3661.
- Erhardt, H. et al., 2012. Disruption of individual nuo-genes leads to the formation of partially assembled NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 1817:863–71.

- Falk-Krzesinski, H.J. & Wolfe, a J., 1998. Genetic analysis of the *nuo* locus, which encodes the proton-translocating NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180:1174–84.
- Farrell, A.E. et al., 2006. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science (New York, N.Y.)*, 311:506–8.
- Feist, A.M. et al., 2007. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Molecular systems biology*, 3, p.121.
- Feist, A.M. et al., 2010. Model-driven evaluation of the production potential for growth-coupled products of *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 12:173–186.
- Fujita, Y., Matsuoka, H. & Hirooka, K., 2007. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular microbiology*, 66:829–39.
- Goldemberg, J., 2006. The promise of clean energy. *Energy Policy*, 34(15):2185–2190.
- Goodrum, J., 2002. Volatility and boiling points of biodiesel from vegetable oils and tallow. *Biomass and Bioenergy*, 22:205–211.
- Gustavsson, L., Johansson, B. & Svenningsson, P.E.R., 1995. REDUCING CO₂ EMISSIONS BY SUBSTITUTING BIOMASS FOR FOSSIL FUELS. *Energy*, 20:1097–1113.
- Han, M.-J. et al., 2008. Proteome-level responses of *Escherichia coli* to long-chain fatty acids and use of fatty acid inducible promoter in protein production. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2008, p.735101.
- Heshiki Yoshitaro, 2013. Optimization of Polyhydroxybutyrate Production in Recombinant *Escherichia Coli* Through Metabolic Modeling and Simulation. Utah State University.
- Hold, C., Andrews, B. a & Asenjo, J. a, 2009. A stoichiometric model of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 for metabolic flux analysis. *Biotechnology and bioengineering*, 102:1448–59.
- Holland-Staley, C. A et al., 2000. Aerobic activity of *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase is determined by a single amino acid. *Journal of bacteriology*, 182:6049–54.
- Hughes, S. R., Moser, B. R., & Gibbons, W. R. (2014). Moving toward energy security and sustainability in 2050 by reconfiguring biofuel production.

InConvergence of Food Security, Energy Security and Sustainable Agriculture. Springer Berlin Heidelberg, 15-29

- Iram, S.H. & Cronan, J.E., 2006. The β -Oxidation Systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Are Not Functionally Equivalent. *Journal of bacteriology*, 188:599–608.
- Iuchi, S. & Lin, E.C.C., 1988. *areA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(March):1888–1892.
- Jenkins, L.S. & Nunn, W.D., 1987. Regulation of the *ato* operon by the *atoC* gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 169:2096–102.
- KEGG. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism [Última consulta 04 de septiembre de 2014].
- Keseler, I.M. et al., 2005. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 33:334–337.
- Kessler, D., Leibrecht, I. & Nappe, J., 1991. Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*. *FEBS*, 281:59–63.
- Kim, B., Kim, W. J., Kim, D. I., & Lee, S. Y. (2014). Applications of genome-scale metabolic network model in metabolic engineering. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 1-10.
- Korz, D.J. et al., 1995. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 39:59–65.
- Kumar, G.B. & Black, P.N., 1993. Bacterial Long-chain Fatty Acid Transport. *The Journal of biological chemistry*, 268(21):15469–15476.
- Laboratorio Antoniewicz, 2014. Microflow Bioreactors to Study Solvent Tolerance <http://www.che.udel.edu/mranton/microreactors.html> [Última consulta 16 de diciembre de 2014].
- Lee, S. Y., & Chang, H. N. 1993. High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source. *Biotechnology letters*, 15, 971-974.
- Leighty, R.W. & Antoniewicz, M.R., 2013. COMPLETE-MFA: complementary parallel labeling experiments technique for metabolic flux analysis. *Metabolic engineering*, 20:49–55.

- Leighty, R.W. & Antoniewicz, M.R., 2012. Parallel labeling experiments with [U-¹³C]glucose validate *E. coli* metabolic network model for ¹³C metabolic flux analysis. *Metabolic engineering*, 14:533–41.
- Leonardo, M.R., Cunningham, P.R. & Clark, D.P., 1993. Anaerobic regulation of the *adhE* gene, encoding the fermentative alcohol dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 175:870–8.
- Lewis, N.E. et al., 2010. Omic data from evolved *E. coli* are consistent with computed optimal growth from genome-scale models. *Molecular systems biology*, 6:390.
- Lin, H., Bennett, G.N. & San, K.-Y., 2005. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metabolic engineering*, 7:116–27.
- Llaneras, F. & Picó, J., 2008. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105:1–11.
- Maeda, T., Sanchez-Torres, V. & Wood, T.K., 2007. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 77:879–90.
- Maloy, S.R. et al., 1981. Transport of long and medium chain fatty acids by *Escherichia coli* K12. *The Journal of biological chemistry*, 256:3735–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7012142>.
- Merino, M.P., Andrews, B. a & Asenjo, J. a, 2010. Stoichiometric model and metabolic flux analysis for *Leptospirillum ferrooxidans*. *Biotechnology and bioengineering*, 107:696–706.
- De Mey, M. et al., 2007. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34:689–700.
- Naik, S.N. et al., 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:578–597.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L. & Smith, D.F., 1974. Culture Medium for Enterobacteria. *Journal of bacteriology*, 119:736–747.
- Nunn, D. et al., 1979. Kinetics Mutant of the Utilization of Medium of *Escherichia coli* Defective and Long Chain Fatty in the *fadL* Gene. *The Journal of biological chemistry*, 254:9130–9134.

- Nunn, W.D., 1986. A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 50:179–92.
- Orth, J.D. et al., 2011. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism--2011. *Molecular systems biology*, 7: 535.
- Orth, J.D., Thiele, I. & Palsson, B.Ø., 2010. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 28:245–8.
- Overath, P., Pauli, G. & Schairer, H., 1969. Fatty Acid Degradation in *Escherichia coli*. An inducible Acyl-CoA Synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants. *European Journal of Biochemistry*, 7:559–574.
- Palsson, B. O. 2006. *Systems biology*. Cambridge university press.
- Patil, K.R. et al., 2005. Evolutionary programming as a platform for in silico metabolic engineering. *BMC bioinformatics*, 6: 308.
- Peng, L. & Shimizu, K., 2006. Effect of *fadR* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* based on analyses of protein expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3-4):512–520.
- Saatci, Y., Arslan, E.I. & Konar, V., 2003. Removal of total lipids and fatty acids from sunflower oil factory effluent by UASB reactor. *Bioresource technology*, 87:269–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507866>.
- Schellenberger, J. et al., 2011. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature protocols*, 6:1290–307.
- Shafiee, S. & Topal, E., 2009. When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy*, 37:181–189.
- Stöcker, M., 2008. Biofuels and biomass-to-liquid fuels in the biorefinery: catalytic conversion of lignocellulosic biomass using porous materials. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 4:9200–11.
- Trinh, C.T. et al., 2010. Elucidating mechanisms of solvent toxicity in ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 106:721–30. Trinh, C.T., Unrean, P. & Srienc, F., 2008. Minimal *Escherichia coli* cell for the most efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. *Applied and environmental microbiology*, 74:3634–43.
- Trinh, C.T., Wlaschin, A. & Srienc, F., 2009. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 81:813–26.

- Varma, A. & Palsson, B., 1994. Stoichiometric Flux Balance Models Quantitatively Predict Growth and Metabolic By-Product Secretion in Wild-Type *Escherichia coli* W3110. *Applied and environmental microbiology*, 60:3724–3731.
- Vidal, G. & Carvalho, A., 2000. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource technology*, 74:231–239.
- Weeks, G. et al., 1969. Control of fatty acid metabolism. I. Induction of the enzymes of fatty acid oxidation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 97:827–36.
- Yomano, L.P., York, S.W. & Ingram, L.O., 1998. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 20:132–8.
- Zhang, J.J. & Smith, K.R., 2007. Household air pollution from coal and biomass fuels in China: measurements, health impacts, and interventions. *Environmental health perspectives*, 115:848–55.

Anexo1. Oligonucleotidos

Nombre partidior	Secuencia 5' a 3'
16SF	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16SR	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
AdhF	TCAGGAGAGCCATATGGCTGTTACTAATGTCGCTGA
AdhR	CAGCGCGGATCCTTAAGCGGATTTTTTCGC
AdhE_mutF	CACTTCGAAAAGCTGGCGCTGCGCTTTA
AdhE_mutR	TAAAGCGCAGCGCCAGCTTTTCGAAAGTG
pfadF	GGGATGATCGTCTAGAAAAACATTGAACAGC'
pfadR	GGATTCAGGAGACTGACATGCTTTACAAAG G
Ptac-PMaIF	GTTAGCTCACTCATTAGGCATGCAATTCTCATG
Ptac-PMaIR	GACATTAGTAACAGCCATATGCTATGGTCCTTG
pKD-fadRF	TGAGTCCAACCTTTGTTTTGCTGTGTTATGGAAATCTCACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-fadRR	AACCCCTCGTTTGAGGGGTTTGCTCTTTAAACGGAAGGGAATGGGAATTAGCCATGGTCC
fadRTestF	CAGCGTAGTTAGCCCTCTG
fadRTestR	CGCCAAGAATGGGAAATCTG
pKD-nuoGF	AACGCTCAGTCTCTGACTGAGAAAAGCTGGAAGCATGCTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-nuoGR	ATGGTCAGCAGGATCTCAATCAGTTCGGGTGATATCCAACATGGGAATTAGCCATGGTCC
nuoGTestF	GCGCTGGTAACCGAATTTCTGA
nuoGTestR	GGATCACCACCGCTTTGAGG
pKD-ackptaF	CTGCCGCTATGTTGAAGACAACACTACGCGACGAAAGAAGACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-ackptaR	GCCCTGAGACATAACGAAGACGATTTCCGCATTACAGCGTTATGGGAATTAGCCATGGTCC
ackpta TestF	GCGTTGACGCAATCAACAAACTGC
ackpta TestR	AACGCCGGTGATGTTGGTGTTC
pkD-ldhAF	AGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAAGTCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-ldhAR	CTGAATCAGCTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGAATGGGAATTAGCCATGGTCC
ldhATestF	CAATATCGCCATAGCTTTCA
ldhATestR	GAGGATGAAAGGTCATTGG
ldhAF	GGCAATTTGCCAGACAAGCAGAA
ldhAR	CATTACCCAACGGCAAACGCTGTA
pKD-pflBF	GCAGTAAATAAAAAATCCACTTAAGAAGGTAGGTGTTACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-pflBR	TATTGTACGCTTTTTACTGTACGATTTCAAGTCAAATCTAAATGGGAATTAGCCATGGTCC
pflBTestF	CTGGGTCATTTACCTGCGTG
pflBTestR	GCTGACAAAAAAGGCTCTCGC
pflBF	TCCGGCGAGTATATGACCGCAAAT
pflBR	AAACCGTTGGTGTCCAGACAGGTA
pKD-fdnGF	CCTCGCGCAGTAATACCCCTGAAAAAAGAGGAAAGCAATGGGAATTAGCCATGGTCC
pKD-fdnGR	AATGTCTGCGTTTTCCATAGCCATCTGTTCCGCCCCGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
fdnGtestF	GTAGGTCAATTTGCGAAGGCGGAT
fdnGtestR	ACAGGCTTTACAGCCGATACAGGT
fdnGF	ACTCCCGCGAGTAAATAGCCTTT
fdnGR	TCCTTCTTGGTGCCGAAGTGGATA
pKD-arcAF	ATGCAGACCCCGCACATTCCTATCGTTGAAGACGAGTTGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD-arcAR	ATCTTCCAGATCACCGCAGAAGCGATAACCTTCACCGTGAATGGGAATTAGCCATGGTCC

arcATestF	TCATGTTACGCCGATCATGTTA
arcATestR	CCCGTAATATCGACTGGTATGC
arcAF	TTATTACGCGGTGCGAATTTAC
arcAR	CCAGCCGATCAATACCAATTAAC

Anexo2. Scripts Matlab

Scripts fueron escritos mediante adaptación de publicaciones encontradas en la literatura (Schellenberger et al. 2011; Heshiki 2013)

A2.1 Efecto de la concentración de oxígeno en el consumo de ácidos grasos y la producción de etanol.

```
%clear all
clear
clc
%initCobraToolbox;
model=readCbModel('iJO1366.xml');

%% Set optimization objective to EX_etoh(e)

model = changeObjective(model,'EX_etoh(e)');
model = changeRxnBounds(model,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',0.1,'l');

% Make an array of external substrate
EX_sub = {'EX_glc(e)' 'EX_hdca(e)'};

% Aerobic condition
model = changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',-135,'l');

% Orth et al., 2011
model = changeRxnBounds(model,'CAT',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'DHPTDNR',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'DHPTDNRN',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'FHL',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SPODM',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SPODMpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SUCASPtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SUCFUMtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SUCMALtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SUCTARTtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'FESR',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'FESD1s',0,'b');

% Compounds
model = changeRxnBounds(model,'EX_nh4(e)',-1000,'l'); %Amonio (NH4)
model = changeRxnBounds(model,'EX_so4(e)',-1000,'l'); %Sulfato (SO4)
model = changeRxnBounds(model,'EX_k(e)',-1000,'l'); %Potasio (K+)
model = changeRxnBounds(model,'EX_pi(e)',-1000,'l'); %Fosfato (PO4)
model = changeRxnBounds(model,'EX_fe2(e)',-1000,'l'); % Hierro fe2+
model = changeRxnBounds(model,'EX_na1(e)',-1000,'l'); % Sodio (Na+)
model = changeRxnBounds(model,'EX_ca2(e)',-1000,'l'); % calcio (Ca2+)
model = changeRxnBounds(model,'EX_cl(e)',-1000,'l'); % cloro (Cl-)
model = changeRxnBounds(model,'EX_cu2(e)',-1000,'l'); % cobre (Cu2+)
```

```

model = changeRxnBounds(model, 'EX_mg2(e)', -1000, '1'); % Magnesio (Mg2+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_mn2(e)', -1000, '1'); % Manganeso (Mn)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_mobd(e)', -1000, '1'); % Molibdeno (Mb)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_zn2(e)', -1000, '1'); % Zinc (Zn)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_cit(e)', -5, '1'); % citric acid

[tmp, BiomassNumber] =
ismember('Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M', model.rxns); % Identify Biomass
reaction number
%BiomassNumber = 8;

% Optimization of if each carbon source was sole
for i = 1:length(EX_sub);
% set 0 for initial glucose
model = changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)', 0, '1');
% set -20 for initial EX_sub(i)
model = changeRxnBounds(model, EX_sub(i), -20, '1');
% optimize
FBAsolution = optimizeCbModel(model, 'max', 0, false);
% acquire the value of growth rate, given by FBAsolution.f
EtOHrate(i) = FBAsolution.f;
% acquire the value of Ethanol production rate
fluxVector = FBAsolution.x;
GrowthRate(i) = fluxVector(BiomassNumber);
% initialize EX_sub(i)
model = changeRxnBounds(model, EX_sub(i), 0, '1');
end

% Bubble sort
for i = 1:length(EX_sub);
for j = 1:length(EX_sub)-i;
if EtOHrate(j) < EtOHrate(j+1) || EtOHrate(j) > EtOHrate(j+1)
if EtOHrate(j) < EtOHrate(j+1)
tempEtOH = EtOHrate(j);
EtOHrate(j) = EtOHrate(j + 1);
EtOHrate(j + 1) = tempEtOH;
tempGR = GrowthRate(j);
GrowthRate(j) = GrowthRate(j + 1);
GrowthRate(j + 1) = tempGR;
tempSub = EX_sub(j);
EX_sub(j) = EX_sub(j + 1);
EX_sub(j + 1) = tempSub;
end
else % if PHB synthesis rates are the same through every carbon
source
if GrowthRate(j) < GrowthRate(j+1)
tempGR = GrowthRate(j);
GrowthRate(j) = GrowthRate(j + 1);
GrowthRate(j + 1) = tempGR;

tempSub = EX_sub(j);
EX_sub(j) = EX_sub(j + 1);
EX_sub(j + 1) = tempSub;

tempEtOH = EtOHrate(j);

```

```

        EtOHrate(j) = EtOHrate(j + 1);
        EtOHrate(j + 1) = tempEtOH;
    end
end
end

% calculate product yield
productYield = EtOHrate / 20;

% calculate substrate specific productivity
SSP = productYield .* GrowthRate;

% display the results
disp(' Substrate |GrowthRate |EtOH(mmol/DW/h) |Yield |SSP');

% set display format to output
format shortG;
for i = 1:length(EX_sub);
    data = [EX_sub(i), GrowthRate(i), EtOHrate(i), productYield(i), SSP(i)];
    disp(data);
end

% hdca consumption
hdca=fluxVector(192)

```


A2.2 Reducción del modelo genómico iJO1366

```
clear all
clc
initCobraToolbox;
model=readCbModel('iJO1366.xml');

model=changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)',0,'b');
model=changeRxnBounds(model, 'EX_hdca(e)',-20,'l');
model=changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)',-140,'l');

% Orth et al., 2011
model = changeRxnBounds(model, 'CAT',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'DHPTDNR',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'DHPTDNRN',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'FHL',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SPODM',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SPODMpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SUCASPtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SUCFUMtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SUCMALtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SUCTARTtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'FESR',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'FESD1s',0,'b');

% Compounds
model = changeRxnBounds(model, 'EX_nh4(e)',-1000,'l'); %Amonio (NH4)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_so4(e)',-1000,'l'); %Sulfato (SO4)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_k(e)',-1000,'l'); %Potasio (K+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_pi(e)',-1000,'l'); %Fosfato (PO4)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_fe2(e)',-1000,'l'); % Hierro fe2+
model = changeRxnBounds(model, 'EX_na1(e)',-1000,'l'); % Sodio (Na+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_ca2(e)',-1000,'l'); % calcio (Ca2+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_cl(e)',-1000,'l'); % cloro (Cl-)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_cu2(e)',-1000,'l'); % cobre (Cu2+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_mg2(e)',-1000,'l'); % Magnesio (Mg2+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_mn2(e)',-1000,'l'); % Manganeso (Mn)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_mobd(e)',-1000,'l'); % Molibdeno (Mb)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_zn2(e)',-1000,'l'); % Zinc (Zn)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_cit(e)',-5,'l'); % citric acid

model = changeObjective(model, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');

[GeneClasses RxnClasses modelIrrevFM] = pFBA(model, 'geneoption', 0,
'tol', 1e-7);
pFBArxns = [RxnClasses.pFBAOpt_Rxns; RxnClasses.ELE_Rxns];
[transRxns,nonTransRxns] = findTransRxns(model,true); % Identify
nontransport/exchange reactions

i = 1;
while i < length(pFBArxns)
    for j = 1:length(transRxns)
        if strcmp(pFBArxns(i), transRxns(j)) == 1
```

```

        pFBArxns(i) = [];
    end
end
i = i + 1;
end

[excRxns, uptRxns] = findExcRxns(model);

i = 1;
k = 1;
while i < length(excRxns)
    if excRxns(i) == 1
        excRxnNames(k) = model.rxns(i);
        k = k + 1;
    end
    i = i + 1;
end
i = 1;
while i < length(pFBArxns)
    for j = 1:length(excRxnNames)
        if strcmp(pFBArxns(i), excRxnNames(j)) == 1
            pFBArxns(i) = [];
        end
    end
end

    i = i+1;
end

[tmp, ATPMnumber] = ismember('ATPM',pFBArxns); % Identify ATPM reaction
number
pFBArxns(ATPMnumber) = []; % remove ATPM from nonTransRxns

selectedRxns = pFBArxns;

```

A2.3 Diseño de cepa optimizada para la producción de etanol a partir de ácidos grasos-Optknock.

```
clear all;
%clear
clc
initCobraToolbox;
%Input the E.coli core model
model=readCbModel('iJO1366.xml');

%% Add Reaction

%% Set optimization objective to biomass
model = changeObjective(model,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');

model=changeRxnBounds(model, 'EX_glc(e)',0,'b');
model=changeRxnBounds(model, 'EX_hdca(e)',-20,'l');
model=changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)',-140,'l');
%model=changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)',-120,'l');
%model=changeRxnBounds(model, 'EX_gthrd(e)',-20,'l');

% Compounds
model = changeRxnBounds(model,'EX_nh4(e)',-1000,'l'); %Amonio (NH4)
model = changeRxnBounds(model,'EX_so4(e)',-1000,'l'); %Sulfato (SO4)
model = changeRxnBounds(model,'EX_k(e)',-1000,'l'); %Potasio (K+)
model = changeRxnBounds(model,'EX_pi(e)',-1000,'l'); %Fosfato (PO4)
model = changeRxnBounds(model,'EX_fe2(e)',-1000,'l'); % Hierro fe2+
model = changeRxnBounds(model,'EX_na1(e)',-1000,'l'); % Sodio (Na+)
model = changeRxnBounds(model,'EX_ca2(e)',-1000,'l'); % calcio (Ca2+)
model = changeRxnBounds(model,'EX_cl(e)',-1000,'l'); % cloro (Cl-)
model = changeRxnBounds(model,'EX_cu2(e)',-1000,'l'); % cobre (Cu2+)
model = changeRxnBounds(model,'EX_mg2(e)',-1000,'l'); % Magnesio (Mg2+)
model = changeRxnBounds(model,'EX_mn2(e)',-1000,'l'); % Manganeseo (Mn)
model = changeRxnBounds(model,'EX_mobd(e)',-1000,'l'); % Molibdeno (Mb)
model = changeRxnBounds(model,'EX_zn2(e)',-1000,'l'); % Zinc (Zn)
model = changeRxnBounds(model,'EX_cit(e)',-5,'l'); % citric acid

% Orth et al., 2011
model = changeRxnBounds(model,'CAT',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'DHPTDNR',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'DHPTDNRN',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'FHL',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SPODM',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SPODMpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SUCASPTpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SUCFUMtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SUCMALtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'SUCTARTtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'FESR',0,'b');
model = changeRxnBounds(model,'FESD1s',0,'b');
```

%02-11-14

```

reducedRxns = {'AACPS3', 'AACPS4', 'AACPS7', 'ACACT1r', 'ACACT2r',
'ACACT3r', 'ACACT4r', 'ACACT5r', 'ACACT6r', 'ACACT7r', 'ACKr', 'ACOAD1f',
'ACOAD2f', 'ACOAD3f', 'ACOAD4f', 'ACOAD5f', 'ACOAD6f', 'ACOAD7f', 'ADK1',
'ADNK1', 'AKGDH', 'ALATA_L', 'ASNS2', 'ASPO6', 'CBMKr', 'CPPPGO', 'CS',
'CTECOAI7', 'CYTK1', 'DHÖRD2', 'DMPPS', 'DUTPDP', 'ECOAH1', 'ECOAH2',
'ECOAH3', 'ECOAH4', 'ECOAH5', 'ECOAH6', 'ECOAH7', 'ENO', 'FACOAEL120',
'FACOAEL160', 'FACOAEL161', 'FBA', 'FBP', 'FE3Ri', 'FLDR2', 'FUM',
'G3PAT160', 'G3PAT161', 'G5SD', 'GARFT', 'GART', 'GHMT2r', 'GLU5K',
'GLUDy', 'GLYCTO2', 'HACD1', 'HACD2', 'HACD3', 'HACD4', 'HACD5', 'HACD6',
'HACD7', 'I2FE2SR', 'I2FE2SS', 'I2FE2SS2', 'I2FE2ST', 'I4FE4SR',
'I4FE4ST', 'ICL', 'IMPD', 'IPDPS', 'MALS', 'MDH', 'MOX', 'MTHFC', 'MTHFD',
'NADTRHD', 'NDPK1', 'NDPK3', 'NDPK5', 'NDPK6', 'NDPK7', 'OPHHX', 'PAPSR',
'PDX5PO2', 'PFL', 'PGCD', 'PGM', 'POR5', 'PPCK', 'PPKkr', 'PPM', 'PPPPO3',
'PRPPS', 'PSERT', 'PSP_L', 'PTAr', 'PUNP1', 'RNDR2', 'RNDR3', 'RNDR4',
'RNTR1c2', 'RNTR2c2', 'RNTR3c2', 'RNTR4c2', 'RPE', 'RPI', 'SUCDi',
'SUCOAS', 'TALA', 'TKT1', 'TKT2', 'TRDR', 'TRPAS2', 'TRPS3', 'VALTA',
'ABUTt2pp', 'ACCOAL', 'ACPPAT160', 'ACPPAT161', 'ACS', 'ADK3', 'ADPT',
'ALATA_D2', 'ALATA_L2', 'APG3PAT160', 'APG3PAT161', 'ASPT', 'ATHRDHr',
'DHORD5', 'DHORDfum', 'F6PA', 'FOMETRi', 'FRD2', 'FRD3', 'FTHFLi', 'G3PT',
'GLBRAN2', 'GLCP', 'GLCP2', 'GLCS1', 'GLDBRAN2', 'GLGC', 'GLYAT',
'GLYCDx', 'GLYCTO3', 'GLYCTO4', 'GRXR', 'GTHOr', 'HPYRI', 'HPYRRx',
'ICHORS', 'ICHORSi', 'IDOND', 'IDOND2', 'IPDDI', 'NDPK8', 'PAPSR2', 'PDH',
'PDX5Poi', 'PPAKr', 'PPCSCT', 'PPS', 'PTA2', 'PYAM5PO', 'R15BPK', 'R1PK',
'RNDR1', 'RNDR1b', 'RNDR2b', 'RNDR3b', 'RNDR4b', 'THFAT', 'TRSARr',
'VPAMTr'};

```

```

% Optknock analysis for ethanol production

```

```

options.targetRxn = 'ALCD2x';
options.vMax = 1000;
options.numDel = 10;
options.numDelSense = 'L';
constrOpt.rxnList = {'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M', 'ATPM'};
constrOpt.values = [0.01, 3.15];
constrOpt.sense = 'GE';

```

```

%[optKnockSol,bilevelMILPproblem] = OptKnock(model,reducedRxns, options,
constrOpt, {}, false);
optKnockSol = OptKnock(model, reducedRxns, options, constrOpt);

```

```

%[growthRate,minProd,maxProd] =
testOptKnockSol(model, 'EX_etoH(e)', optKnockSol.rxnList);
for i = 1:length(optKnockSol.rxnList)
    modelKO = changeRxnBounds(model, optKnockSol.rxnList(i), 0, 'b');
end

```

```

FBAsolution = optimizeCbModel(modelKO, 'max', 0, false);
disp('rxns to KO');
disp([optKnockSol.rxnList]);
disp(' Biomass');
disp(FBAsolution.f);
disp(' Production');
disp(optKnockSol.obj);

```

A2.4 Diseño de cepa optimizada para la producción de etanol a partir de ácidos grasos-OpGene.

```
%clear all;
clear;
clc;
%nitCobraToolbox;
% Input the E.coli core model
model = readCbModel('iJO1366');

%% Set optimization objective to EX_etoH(e)
model=changeRxnBounds(model, 'EX_hdca(e)',-20,'l');
model=changeRxnBounds(model, 'EX_o2(e)',-140,'l');

% Orth et al., 2011
model = changeRxnBounds(model, 'CAT',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'DHPTDNR',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'DHPTDNRN',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'FHL',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SPODM',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SPODMpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SUCASPTpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SUCFUMtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SUCMALtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'SUCTARTtpp',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'FESR',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'FESD1s',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'ACPPAT160',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'ACPPAT161',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'CYTK1',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'F6PA',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'FLDR2',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'FUM',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'G3PT',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'GLYCDx',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'GTHOr',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'ICL',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'MOX',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'NDPK1',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'PPCSCT',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'PPS',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'PRPPS',0,'b');
%model = changeRxnBounds(model, 'PTA2',0,'b');

model = changeRxnBounds(model, 'G3PT',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'ICL',0,'b');
model = changeRxnBounds(model, 'TRDR',0,'b');

% Compounds
model = changeRxnBounds(model, 'EX_nh4(e)',-1000,'l'); %Amonio (NH4)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_so4(e)',-1000,'l'); %Sulfato (SO4)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_k(e)',-1000,'l'); %Potasio (K+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_pi(e)',-1000,'l'); %Fosfato (PO4)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_fe2(e)',-1000,'l'); % Hierro fe2+
```

```

model = changeRxnBounds(model, 'EX_na1(e)', -1000, 'l'); % Sodio (Na+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_ca2(e)', -1000, 'l'); % calcio (Ca2+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_cl(e)', -1000, 'l'); % cloro (Cl-)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_cu2(e)', -1000, 'l'); % cobre (Cu2+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_mg2(e)', -1000, 'l'); % Magnesio (Mg2+)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_mn2(e)', -1000, 'l'); % Manganeseo (Mn)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_mobd(e)', -1000, 'l'); % Molibdeno (Mb)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_zn2(e)', -1000, 'l'); % Zinc (Zn)
model = changeRxnBounds(model, 'EX_cit(e)', -5, 'l'); % citric acid

%Set optimization objective
model = changeObjective(model, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
targetRxn={'EX_etoh(e)'};
substrateRxn={'EX_hdca(e)'};

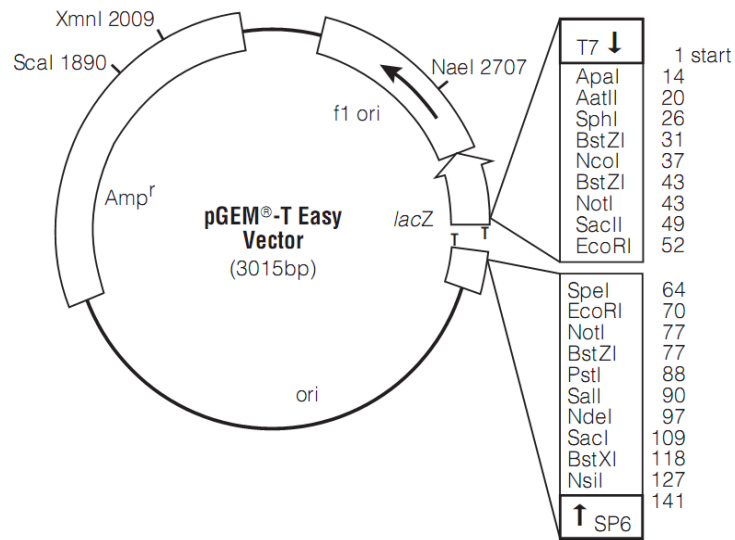
%OPTKNOCK(10)
generxnList = {'AACPS3', 'AACPS4', 'AACPS7', 'ACACT1r', 'ACACT2r',
'ACACT3r', 'ACACT4r', 'ACACT5r', 'ACACT6r', 'ACACT7r', 'ACKr', 'ACOAD1f',
'ACOAD2f', 'ACOAD3f', 'ACOAD4f', 'ACOAD5f', 'ACOAD6f', 'ACOAD7f', 'ADK1',
'ADNK1', 'AKGDH', 'ALATA_L', 'ASNS2', 'ASPO6', 'CBMKr', 'CPPPGO', 'CS',
'CTECOAI7', 'CYTK1', 'DHORD2', 'DMPPS', 'DUTPDP', 'ECOAH1', 'ECOAH2',
'ECOAH3', 'ECOAH4', 'ECOAH5', 'ECOAH6', 'ECOAH7', 'ENO', 'FACOAEL20',
'FACOAEL60', 'FACOAEL61', 'FBA', 'FBP', 'FE3Ri', 'FLDR2', 'FUM',
'G3PAT160', 'G3PAT161', 'G5SD', 'GARFT', 'GART', 'GHMT2r', 'GLU5K',
'GLUDy', 'GLYCTO2', 'HACD1', 'HACD2', 'HACD3', 'HACD4', 'HACD5', 'HACD6',
'HACD7', 'I2FE2SR', 'I2FE2SS', 'I2FE2SS2', 'I2FE2ST', 'I4FE4SR',
'I4FE4ST', 'IMPd', 'IPDPS', 'MALS', 'MDH', 'MOX', 'MTHFC', 'MTHFD',
'NADTRHD', 'NDPK1', 'NDPK3', 'NDPK5', 'NDPK6', 'NDPK7', 'OPHHX', 'PAPSR',
'PDX5PO2', 'PFL', 'PGCD', 'PGM', 'POR5', 'PPCK', 'PPK', 'PPM', 'PPPGO3',
'PRPPS', 'PSERT', 'PSP_L', 'PTAr', 'PUNP1', 'RNDR2', 'RNDR3', 'RNDR4',
'RNTR1c2', 'RNTR2c2', 'RNTR3c2', 'RNTR4c2', 'RPE', 'RPI', 'SUCDi',
'SUCOAS', 'TALA', 'TKT1', 'TKT2', 'TRPAS2', 'TRPS3', 'VALTA', 'ABUTt2pp',
'ACCOAL', 'ACPPAT160', 'ACPPAT161', 'ACS', 'ADK3', 'ADPT', 'ALATA_D2',
'ALATA_L2', 'APG3PAT160', 'APG3PAT161', 'ASPT', 'ATHRDHr', 'DHORD5',
'DHORDfum', 'F6PA', 'FOMETRi', 'FRD2', 'FRD3', 'FTHFLi', 'GLBRAN2',
'GLCP', 'GLCP2', 'GLCS1', 'GLDBRAN2', 'GLGC', 'GLYAT', 'GLYCDx',
'GLYCTO3', 'GLYCTO4', 'GRXR', 'GTHOr', 'HPYRI', 'HPYRRx', 'ICHORS',
'ICHORSi', 'IDOND', 'IDOND2', 'IPDDI', 'NDPK8', 'PAPSR2', 'PDH',
'PDX5Poi', 'PPAKr', 'PPCSCT', 'PPS', 'PTA2', 'PYAM5PO', 'R15BPK', 'R1PK',
'RNDR1', 'RNDR1b', 'RNDR2b', 'RNDR3b', 'RNDR4b', 'THFAT', 'TRSARr',
'VPAMTr'};

%% OptGene
[x, population, scores, optGeneSol] = optGene(model, targetRxn,
substrateRxn, generxnList, 10);

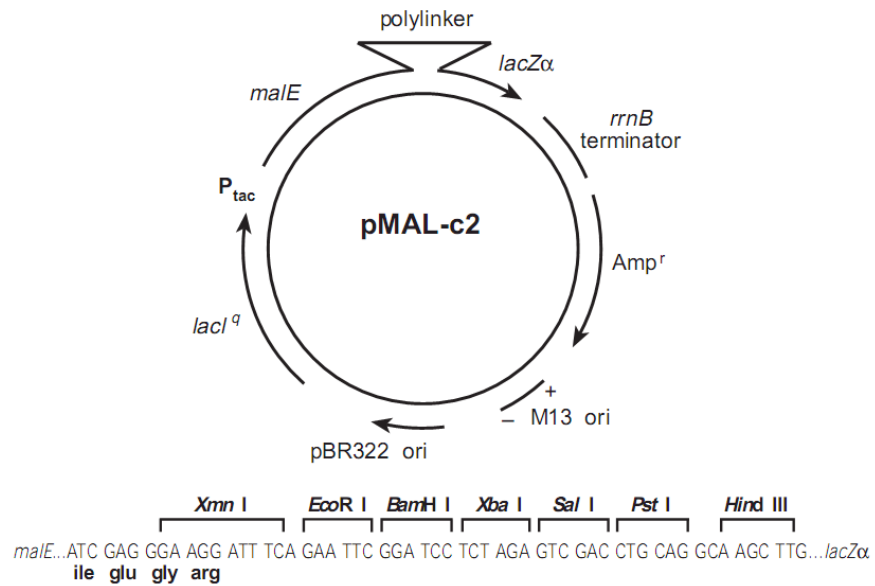
% show the production envelope of the etoh production
biomassRxn = {'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M'};
deletions = optGeneSol.rxnList;
figure(2), clf;
[biomassValues, targetValues] =
multiProductionEnvelope(model, deletions, biomassRxn);

```

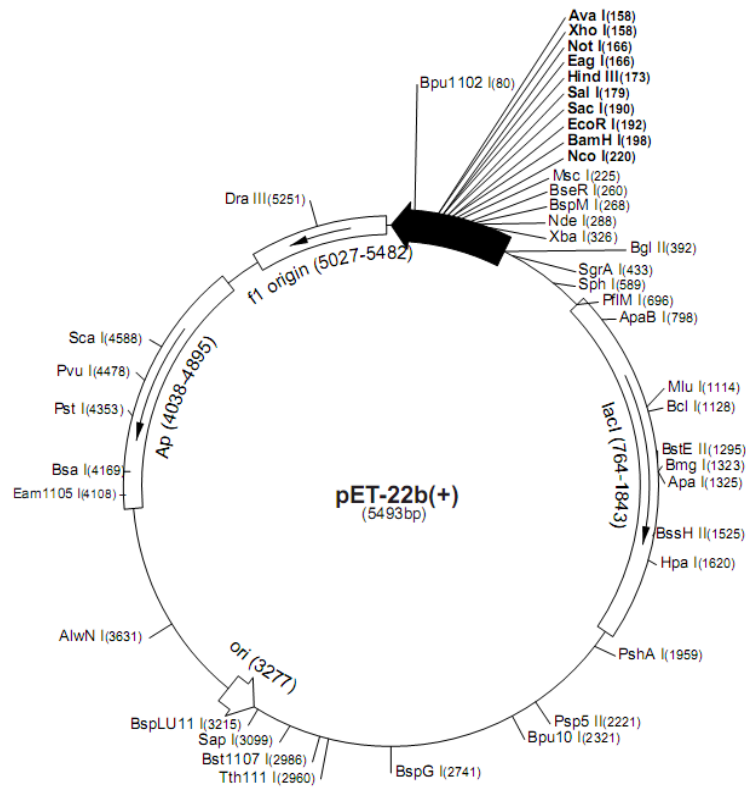
Anexo 3. Vectores



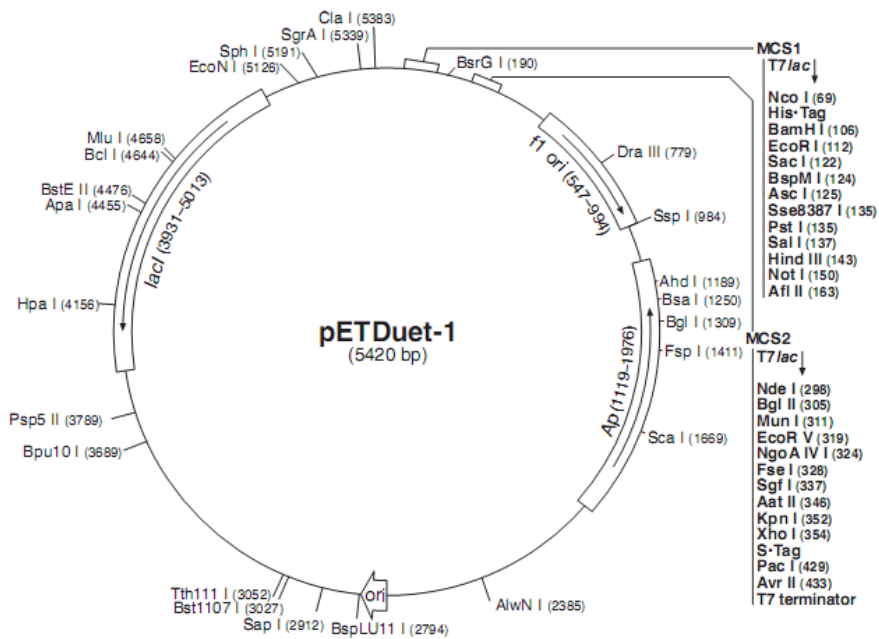
Vector de clonamiento pGEM- T Easy



Vector de expresión pMAL-c2. En la parte inferior se muestra la secuencia del *polylinker*



Vector de expresión pET22b



Vector de expresión pETDuet-1

Anexo 4. Abreviaciones

ACE: Acetato
ACE_ext: Acetato externo
AceA: Acetoacetyl-CoA
ACoA: Acetyl-CoA
AKG: 2-oxoglutarato
BIOMASS: Biomasa
BIOMASS_ext: Biomasa externa
BUT: Ácido butanoico
CO₂: Dióxido de Carbono
CO₂_ext: Dióxido de Carbono externo
DEC: Ácido decanoico
DHAP: Dihidroxiacetona fosfato
E4P: Eritrosa 4 fosfato
ETOH: Etanol
ETOH_ext: Etanol externo
FA: Ácidos grasos
FA_ext: Ácidos grasos externos
FORM: Formato
FORM_ext: Formato externo
FRU6P: Fructosa 6 fosfato
G3P: Glicerato 3 fosfato
GAP: Gliceraldehido 3 fosfato
GLC_ext: Glucosa externa
GLC6P: Glucosa 6 fosfato
GLX: Glioxato
ISOCIT: Isocitrato
LAC: Lactato
LAC_ext: Lactato externo
LAU: Ácido láurico
MAL: Malato
MYR: Ácido miriático
OAA: Oxaloacetato
PALM: Ácido palmítico
PALM_ext: Ácido palmítico externo
PEP: Fosfoenol piruvato
PYR: Piruvato
RIB5P: Ribosa 5 fosfato
RIBU5P: Ribulosa 5 fosfato
SED7P: Sedoheptulosa 7 fosfato
SUC: Succinato
SUC_ext: Succinato externo
XIL5P: Xilulosa 5 fosfato