



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

**BIOCONVERSIÓN DE CARBOHIDRATOS DE MACROALGAS
PARDAS EN ÁCIDO HIALURÓNICO UTILIZANDO UNA CEPA
DE *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE**

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

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA

JORGE IGNACIO MEZA TRUJILLO

PROFESOR GUÍA:

JUAN ASENJO DE LEUZE

PROFESOR CO-GUÍA:

ÁLVARO MARÍA OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

BÁRBARA ANDREWS FARROW

MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE

2017

Para todos los presentes...
...y a los que no alcanzaron a estar.

RESUMEN

En la actualidad, se realizan grandes esfuerzos en aplicar nuevos métodos de producción de compuestos novedosos de alto valor agregado. Un ejemplo de esto es el ácido hialurónico, que tiene importantes y nuevos usos, especialmente en el área de la salud, y su demanda se encuentra en alza.

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo generar una nueva cepa recombinante de *Escherichia coli* que sea capaz de producir ácido hialurónico a partir de fuentes de carbono novedosos, como es el caso de los carbohidratos de algas pardas. Esto se debe a que estas algas presentan varias ventajas, como su gran abundancia y relativa facilidad de obtención de los azúcares presentes. Este trabajo se enfoca en el uso de los carbohidratos alginato y manitol, principales azúcares presentes en estas macroalgas.

Como punto de partida se utilizó la cepa recombinante BAL 1611. Esta cepa tiene incorporados los genes necesarios para el transporte y degradación del alginato, además de estar optimizado para la producción anaeróbica de etanol. A esta cepa se le realizó modificaciones para disminuir la producción de etanol y se le incorporó los genes necesarios para producir ácido hialurónico. En la primera etapa del trabajo se obtuvo una cepa con resistencia al antibiótico cloranfenicol y con la producción de etanol disminuida. Luego, la cepa se transformó con un plasmidio que contiene los genes necesarios para la síntesis de ácido hialurónico. La síntesis de las proteínas codificadas en el vector recombinante se indujo con L-arabinosa para iniciar la producción. Además, en este proyecto se diseñó un método para cuantificar la concentración de ácido hialurónico utilizando la enzima hialuronidasa. Se logró obtener un microorganismo recombinante que produce ácido hialurónico a partir de alginato y manitol con una concentración de 20 [g/l] de azúcares totales, con una proporción de 2:1 en peso. El rendimiento obtenido fue de 3,67 [mg AH/l/gDW]. Finalmente, se introdujo modificaciones a un modelo matemático del metabolismo de *E. coli*, para introducir las reacciones correspondientes a la degradación de alginato y de la síntesis de ácido hialurónico. Se realizó un análisis de balance de flujo a partir de los datos generados de un cultivo con un medio definido, aplicando variaciones en las condiciones *in silico*. A partir de este análisis se concluyó que es necesario controlar la cantidad de oxígeno presente en el cultivo. Por otro lado, la presencia de los genes de *Z. mobilis* no presenta impacto en la producción de biomasa ni de ácido hialurónico. Además, debido al alto costo energético de producir ácido hialurónico y el desbalance de óxido-reducción que produce la metabolización de alginato hace que los rendimientos de AH sean bajos. Esto da pie a implementar nuevas estrategias para optimizar la producción de AH a partir de este carbohidrato.

ABSTRACT

Currently, big efforts have been made to use new methods of production for novel high value compounds. An example of this is hyaluronic acid. As time passes by, new applications are discovered, especially in healthcare, and the demand for hyaluronic acid based products will grow.

The present thesis project has the objective of developing a new recombinant *Escherichia coli* strain that can produce hyaluronic acid from novel carbon sources, such as brown algae. Brown seaweed has many advantages including the abundance of the resource and the relative simplicity to obtain its sugars. This thesis work focuses on two carbohydrates: alginate and mannitol, which are the main sugars found in brown algae.

The modifications were done from the starting strain BAL 1611. This strain has incorporated all the necessary genes for the transportation and degradation of alginate. But, it is also optimized for ethanol production in anaerobic fermentation. The modification done to this strain includes the reduction of ethanol production and the incorporation of the necessary genes for hyaluronic acid production.

In the first phase of this Project, a new strain with reduced ethanol production and chloramphenicol resistance has been developed. Then, a transformation has been done with a plasmid that contains the necessary genes for hyaluronic acid synthesis which has to be induced by L-arabinose to start production. Also, a method for hyaluronic acid quantification has been designed, using the enzyme hyaluronidase. With this method and the modifications done to the strain, a novel strain has been developed that produces hyaluronic acid from a medium with alginate and mannitol at 2 [%] total sugars and a 2:1 proportion (w/w). The hyaluronic acid yield is 3,67 [mg HA/l/gDW]. Finally, a mathematical model of *E. coli* has been modified to be used in this novel strain. Modifications include the addition of alginate degradation and hyaluronic acid synthesis reactions. An FBA has been done with data of defined minimum medium fermentation and different initial conditions were analyzed *in silico*. From the analysis, it is necessary to control the amount of oxygen gas present in the medium. The presence of the genes from *Z. mobilis* doesn't affect either biomass or hyaluronic acid production. Also, because of the high energetic costs for hyaluronic acid production and the oxidation-reduction imbalance generated from alginate, the hyaluronic acid yields are low. New strategies can be implemented to improve production and to optimize the process from alginate degradation to hyaluronic acid synthesis.

AGRADECIMIENTOS

El autor quiere agradecer a todas las personas que aportaron de una manera u otra en todo el proceso que termina con esta escritura, como también en la posterior defensa de este trabajo. En un aporte tanto en el área académica, en conocimientos, ideas, planificación, información, datos, con algún material o técnica de laboratorio como también en lo personal, en lo emocional, en la maduración interna como persona. Es un agradecimiento por el convivir del día a día, en buenos y malos ratos, en los consejos y colaboración. El autor quiere aclarar que está la posibilidad de no alcanzar a nombrar a todas las personas por una u otra razón.

En primer lugar, a los profesores guía y co-guía, Juan Asenjo y Álvaro Olivera Nappa, respectivamente. Luego, sin orden en particular, a Daniela Sandoval, Daniela Vaisman, Nancy, Juan Morgado, Allison, Javiera Soto-Aguilar, Diego Lagos, Cynthia, Cristina, Carmen, Medardo, Diana, Jean Franco, Vida, Emilie, José Duguett, Juancho, María Isabel, Noemí, Paz, Gina, Irene, Ximena, Juan Canales, Oriana Salazar, María Elena Lienqueo, Barbara Andrews, Carolina Contador, Javier Gimpel, Carlos Cortes, Anamaría Sánchez, Carlos Gómez, Franco, Nicole, Roberto, Felipe Missene, Paula, Matías Tapia, Ricardo Schlatter, Felipe Díaz, Miriam, Daniela Adán, Andrea, Daniela Ponce, Bayron, Eliza, Ignacio Zapata, Guillermo, Jorge Miranda, Jorge Sánchez, Javier Devia, Pamela, Carla, Emiliano, Gabriel, Valeria, Vanessa, Ignacio Moscoso, Matías Silva, Marcelo, Fernandos, Nicolás, Cristóbal, Camila Castro, Giovanni, Diego Concha, Tania, Camila Villarroel, Ignacio López, Fabián, Gonzalo Carvajal, José Luis Huepe, Fernanda Godoy, Claudia Aravena, Daniel Morales, Madelaine, Moisés, Simón y Rodrigo Valenzuela.

Finalmente agradece a sus padres, Jorge y Orella, y a su hermano Esteban. Una mención especial a su abuelo Aquiles QEPD, a toda la tribu familiar de generaciones anteriores y por último a las mascotas, Bruno, que ya no está, y a Humberto y Anastasia.

TABLA DE CONTENIDO

Índice de Tablas.....	ix	
Índice de Figuras.....	xi	
1	Introducción.....	1
1.1	Ácido Hialurónico	2
1.1.1	Estructura.....	2
1.1.2	Aplicaciones y Mercado	3
1.1.3	Producción de Ácido Hialurónico	4
1.1.4	Ácido Hialurónico Sintasa.....	6
1.1.5	Otras Consideraciones y Desafíos	8
1.2	Macroalgas y Algas Pardas.....	9
1.2.1	Polisacáridos Para Almacenamiento.....	10
1.2.2	Polisacáridos de la Pared Celular y Extracelular	11
1.2.3	Algas Pardas en Chile.....	14
1.2.4	Ruta de Degradación de Alginato.....	15
1.2.5	Alginato Liasas	16
1.3	Cepa BAL 1611	18
2	Objetivos.....	20
2.1	Objetivo General.....	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	Metodología.....	22
3.1	Plan de Trabajo	23
3.2	Materiales	23
3.3	Equipos	23
3.4	Metodología Experimental	23
3.4.1	Knock-Out de genes	24
3.4.2	Células de E. coli electrocompetentes	24
3.4.3	Electroporación con plásmido pkD46	25
3.4.4	Transformación con fragmento (producto de la amplificación con plásmido pkD3)	25

3.4.5	Preparación de gel para electroforesis	25
3.4.6	Electroforesis	26
3.4.7	Reacción de PCR	26
3.4.8	Verificación de inserción de fragmento por PCR de Colonia	28
3.4.9	Reacción de PCR de Colonia.....	28
3.4.10	Incorporación de genes para la síntesis de ácido hialurónico.....	30
3.4.11	Preparación de medio LB líquido.....	31
3.4.12	Cultivo en medio LB líquido	31
3.4.13	Preparación de medio líquido M9 con alginato al 1 [%]	31
3.4.14	Condiciones de cultivo para la producción de ácido hialurónico	32
3.4.15	Concentración de Ácido Hialurónico producido en E. coli.....	33
3.4.16	Obtención de muestras y medición de las concentraciones de carbohidratos, etanol y ácido hialurónico en muestras de cultivo.....	33
3.4.17	Cuantificación de la concentración de ácido hialurónico utilizando un método turbidimétrico	34
3.4.18	Cultivos para FBA	35
3.4.19	FBA (Flux Balance Analysis).....	36
4	Resultados y Discusión.....	37
4.1	Knock-out de genes para síntesis de etanol desde la cepa BAL 1611	38
4.1.1	Diseño y síntesis de fragmento de ADN para el knock-out.....	38
4.1.2	Transformación de cepas con pkD46 y fragmento	39
4.1.3	Comprobación de knock-out por genotipo	39
4.1.4	Comprobación de knock-out por Fenotipo	42
4.2	Incorporación de genes de producción de ácido hialurónico.....	45
4.3	Producción de Ácido Hialurónico	46
4.3.1	Cuantificación por HPLC	47
4.3.2	Cuantificación por turbidimetría.....	49
4.4	Análisis de Flujo Metabólico en Nueva Cepa Recombinante	53
4.4.1	Construcción de modelo a escala genómica	54
4.4.2	Obtención de datos para el modelo.....	56
4.4.3	Análisis de balance de flujo.....	71

4.4.4	Otros análisis y discusiones	76
5	Conclusiones	79
	Bibliografía	81
A	Anexos	I
A.1	Ruta Metabólica Cepa BAL 1611.....	II
A.2	Tecnologías de manufactura de Ácido Hialurónico	III
A.3	Tablas y Gráficos Fermentaciones.....	IV
A.3.1	Datos comprobación de la producción de etanol.....	IV
A.3.2	Datos para cuantificación de AH.....	V
A.3.3	Datos recopilados para FBA.....	VI
A.4	Tablas Comparativas FBA.....	XVI
A.5	Cálculo de producción de ATP para diferentes carbohidratos	XXVII
A.6	Ladder GeneRuler 1 kb Plus.....	XXVII
A.7	Código MATLAB-COBRA.....	XXVIII

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I APLICACIONES DE AH EN LAS ÁREAS BIOMÉDICA Y FARMACOLÓGICA (BOERIU ET AL., 2013).	3
TABLA II PARTIDORES UTILIZADOS PARA LA GENERACIÓN DEL FRAGMENTO PARA EL KNOCK-OUT.	27
TABLA III REACTIVOS Y CANTIDADES UTILIZADAS EN LAS REACCIONES CON POLIMERASA PHUSION PARA CADA TUBO, PARA EL CASO CON UNA TEMPERATURA Y UN GRADIENTE DE TEMPERATURAS.	27
TABLA IV PROGRAMA UTILIZADO PARA LA POLIMERASA PHUSION.	27
TABLA V PARTIDORES DISEÑADOS PARA LA COMPROBACIÓN DE LA ELIMINACIÓN DE GENES DE Z. MOBILIS.	28
TABLA VI PARTIDORES DISEÑADOS PARA LA PRESENCIA DE GENES QUE FLANQUEAN LOS DE INTERES.	29
TABLA VII REACTIVOS UTILIZADOS EN UNA REACCIÓN CON GoTAQ.	29
TABLA VIII PROGRAMA UTILIZADO PARA LA POLIMERASA GoTAQ.	30
TABLA IX COMPUESTOS PARA PREPARAR MEDIO MÍNIMO M9.	32
TABLA X COMPUESTOS PARA PREPARAR UNA FERMENTACIÓN DE MEDIO MINIMO CON ALGINATO COMO UNICA FUENTE DE CARBONO.	32
TABLA XI RANGO DE LOS ESTÁNDARES PREPARADOS.	34
TABLA XII COMPOSICIÓN DE CADA MUESTRA PARA CURVA DE CALIBRACIÓN.	35
TABLA XIII COMPOSICIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	35
TABLA XIV CONDICIONES UTILIZADAS PARA LA FERMENTACIÓN DE COMPROBACIÓN DE KNOCK-OUT POR FENOTIPO.	42
TABLA XV CONDICIONES DE CULTIVO.	47
TABLA XVI CONDICIONES DE CULTIVO PARA LAS DIFERENTES CEPAS.	50
TABLA XVII RENDIMIENTOS DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	53
TABLA XVIII CONDICIONES DE CULTIVO.	56
TABLA XIX RESULTADOS DE GENERACIÓN Y CONSUMO DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS MEDIDOS.	70
TABLA XX CONDICIONES INICIALES DE LAS SIMULACIONES PARA ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJO.	71
TABLA XXI FLUX Y TASA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA MODIFICADA DE E.COLI. INCLUYE LOS RESULTADOS DEL FBA QUE ESTÁN SUBRAYADOS.	72
TABLA XXII REACCIONES CON LOS FLUJOS PARA CADA SIMULACIÓN, CON SU NÚMERO ASOCIADO.	75
TABLA XXIII PRODUCCIÓN ENERGÉTICA EN ATP DE DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS.	76
TABLA XXIV PRODUCCIÓN ENERGÉTICA EN ATP DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO, DÓNDE SE INCLUYE PRODUCIR UN DÍMERO DE AH.	77
TABLA XXV TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO. (BOERIU ET AL., 2013)	III
TABLA XXVI CONCENTRACIONES DE ETANOL DE DIFERENTES CULTIVOS PARTE 1.	IV
TABLA XXVII CONCENTRACIONES DE ETANOL DE DIFERENTES CULTIVOS PARTE 2.	IV
TABLA XXVIII CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE ETANOL DE DIFERENTES CULTIVOS PARTE 1.	IV
TABLA XXIX CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE ETANOL DE DIFERENTES CULTIVOS PARTE 2.	V
TABLA XXX CONCENTRACIONES FINALES DE DIFERENTES CULTIVOS.	V
TABLA XXXI DENSIDAD ÓPTICA PARA EL SEGUIMIENTO DEL CULTIVO.	VI
TABLA XXXII RECOPIACIÓN DE PESOS PARA EL CÁLCULO DE PESO SECO DE CÉLULAS.	VI
TABLA XXXIII DENSIDAD ÓPTICA PARA EL CÁLCULO DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	VIII
TABLA XXXIV TIEMPO DE RETENCIÓN DE DIFERENTES COMPUESTOS PRESENTES EN LOS MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES DETECTORES.	IX
TABLA XXXV CONCENTRACIONES DE ACETATO EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XI
TABLA XXXVI CONCENTRACIONES DE ALGINATO EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XII
TABLA XXXVII CONCENTRACIONES DE ARABINOSA EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XIII
TABLA XXXVIII CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XIV

TABLA XXXIX CONCENTRACIONES DE MANITOL EN EL TIEMPO PRESENTES EN LAS FERMENTACIONES.	XV
TABLA XL CONCENTRACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALGINATO PRESENTES EN EL TIEMPO EN LAS FERMENTACIONES.....	XVI
TABLA XLI FLUJOS DE LAS SIMULACIONES CON MÁS REACCIONES.	XVI
TABLA XLII TABLA COMPARATIVA CON LA SIMULACIÓN DE LA PRUEBA EXPERIMENTAL SIN PIRUVATO DESCARBOXILASA COMO BASE PARA LA COMPARACIÓN.	XX
TABLA XLIII TABLA COMPARATIVA CON LA SIMULACIÓN DE LA PRUEBA EXPERIMENTAL CON PIRUVATO DESCARBOXILASA COMO BASE PARA LA COMPARACIÓN.	XXIII

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA DE LA CADENA DE ÁCIDO HIALURÓNICO	2
FIGURA 2 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO. ADAPTADO DE (BOERIU ET AL., 2013).	4
FIGURA 3 RUTA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN E.COLI. ADAPTADO DE (YU Y STEPHANOPOULOS, 2008).....	6
FIGURA 4 MODELO ESQUEMÁTICO DE LAS CLASES I Y II DE HAS. MODIFICADO DE (WEIGEL Y DEANGELIS, 2007).	7
FIGURA 5 DETALLE DE HAS CLASE I. ADAPTADO DE (WEIGEL, 1998).	8
FIGURA 6 FISIOLÓGÍA DE MACROALGAS PARDAS.	9
FIGURA 7 ESTRUCTURA DE MANITOL.	10
FIGURA 8 ESTRUCTURA DE LAMINARINA. LA ESTRUCTURA ES PRINCIPALMENTE GLUCANOS NO RAMIFICADOS UNIDOS POR ENLACES BETA(1' A 3'). EN (A) EL MANITOL SE ENCUENTRA UNIDO AL TERMINAL REDUCIDO (CADENA M). EN (B) LA GLUCOSA SE ENLAZA AL TERMINAL REDUCIDO (CADENA G). ADAPTADO DE (DAVIS ET AL., 2003).....	11
FIGURA 9 ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE ALGAS PARDAS. ADAPTADO DE (DAVIS ET AL., 2003).....	12
FIGURA 10 MODELO CON DETALLE DE LA PARED INTERNA DE ALGAS PARDAS. (DENIAUD-BOUËT ET AL., 2014).....	12
FIGURA 11 ALGINATO ESTRUCTURAL. EN (A) MONOMEROS DE ALGINATO. EN (B) POLIMERO DE ALGINATO. EN (C) SECUENCIAS DE LA CADENA DEL POLIMERO DE ALGINATO. ADAPTADO DE (DAVIS ET AL., 2003; KIM ET AL., 2011).	13
FIGURA 12 PRODUCCIÓN ANUAL (BIOMASA HÚMEDA) DE PESCA DE ALGAS PARDAS ENTRE 1984 Y 2006 (VÁSQUEZ, 2009).15	
FIGURA 13 RUTA ENTNER-DOUDOROFF. ADAPTADO DE (PEEKHAUS Y CONWAY, 1998).....	16
FIGURA 14 ALGINATO LIASAS. LA DEGRADACIÓN DE ALGINATO SE REALIZA POR BETA ELIMINACIÓN DE FORMA ENDOLITICA (A) Y EXOLITICA (B). MONOSACARIDOS INSATURADOS SON LIBERADOS DEL ALGINATO O OLIGOSACARIDOS POR LAS ALGINATO LIASAS EXOLITICAS. LOS MONOSACARIDOS SON CONVERTIDOS NO ENZIMATICAMENTE EN ÁCIDO URÓNICO 4-DEOXI-L-ERITRO-5-HEXOCEULOSA (DEHU) (C) (KIM ET AL., 2011).....	17
FIGURA 15 VÍAS METABÓLICAS EN BAL 1611. ADAPTADO DE (LENGELER Y LIN, 1972; SAIER Y REIZER, 1992; WARGACKI ET AL., 2012).....	18
FIGURA 16 GENES ELIMINADOS DEL GENOMA DE BAL 1611 (WARGACKI ET AL., 2012).	19
FIGURA 17 DIAGRAMA QUE DESCRIBE EL MÉTODO UTILIZADO POR (DATSENKO Y WANNER, 2000), APLICADO AL TRABAJO DE TESIS.	24
FIGURA 18 DIAGRAMA QUE REPRESENTA LA ZONA DE INTERÉS EN EL GENOMA DE BAL 1611.....	28
FIGURA 19 ESQUEMA DEL PLÁSMIDO PMBAD-SSEAB.(VAISMAN, 2014)	31
FIGURA 20 GELES DE ELECTROFORESIS CON LOS FRAGMENTOS PARA EL KNOCK-OUT.	38
FIGURA 21 CULTIVOS EN TUBOS DE ENSAYO DE E. COLI TRANSFORMADA (IZQUIERDA) Y NO TRANSFORMADA (DERECHA) EN MEDIO LB CON CLORANFENICOL.	39
FIGURA 22 DIAGRAMA DE LOS FRAGMENTOS DE INTERES A AMPLIFICAR.	40
FIGURA 23 GELES CON RESULTADOS DE LA PCR DE COLONIAS DE CEPAS DE BAL 1611 MODIFICADAS Y NO MODIFICADAS. ...	41
FIGURA 24 GEL CON RESULTADOS DE LA PCR DE COLONIA.	41
FIGURA 25 GEL DE ELECTROFORESIS CON RESULTADOS DE UNA PCR DE COLONIAS DE CEPAS DE E. COLI.	42
FIGURA 26 PRODUCCIÓN DE ETANOL CLONES DE CEPA BAL 1611 MODIFICADA.	43
FIGURA 27 DETALLE DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL DE DIFERENTES CLONES DE CEPA BAL 1611 MODIFICADA.	44
FIGURA 28 CONCENTRACIÓN DE ETANOL DE DIFERENTES VARIANTES RECOMBINANTES.	44
FIGURA 29 GEL DE ELECTROFORESIS CORRESPONDIENTE A LA EXTRACCIÓN DE PLASMIDIO DE DOS CEPAS TOP 10.	46
FIGURA 30 PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL ESTÁNDAR DE AH A DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	47
FIGURA 31 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA CEPA MODIFICADA.....	48
FIGURA 32 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ÁCIDOS HIALURÓNICOS DE DIFERENTES FUENTES. (SHODEX, 2016).....	49
FIGURA 33 RESULTADOS UTILIZANDO EL ESTÁNDAR DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	50

FIGURA 34 CULTIVOS CON VAR. 10 EN MEDIO LB CON GLUCOSA Y AMPICILINA	51
FIGURA 35 CULTIVOS CON VAR. 10 EN MEDIO M9 CON AMPICILINA.....	51
FIGURA 36 CULTIVOS CON VAR. 10 EN MEDIO LB CON CON ALGINATO, MANITOL Y AMPICILINA.....	52
FIGURA 37 CONCENTRACIONES FINALES DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	53
FIGURA 38 DIAGRAMA DE LA RED METABÓLICA DE LA CEPA MODIFICADA DE E. COLI.....	55
FIGURA 39 MATRACES AL FINAL DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS.	56
FIGURA 40 MATRAZ CON SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS A TRAVÉS DE UNA MANGUERA Y JERINGA.	57
FIGURA 41 ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA MODIFICADA EN EL MEDIO DE CULTIVO.	58
FIGURA 42 TASA DE CRECIMIENTO.....	58
FIGURA 43 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ACETATO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	59
FIGURA 44 ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE ACETATO EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.	60
FIGURA 45 RESULTADOS DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR TURBIDIMETRÍA.	61
FIGURA 46 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.	62
FIGURA 47 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE ALGINATO EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	63
FIGURA 48 ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DE ALGINATO EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.....	63
FIGURA 49 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARABINOSA EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	64
FIGURA 50 ANÁLISIS DEL CONSUMO DE ARABINOSA EN EL MEDIO DE CULTIVO, DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.....	65
FIGURA 51 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN EL MEDIO DE CULTIVO.	66
FIGURA 52 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN EL MEDIO DE CULTIVO, DETALLE DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.....	66
FIGURA 53 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE MANITOL EN EL MEDIO DE CULTIVO.	67
FIGURA 54 ANÁLISIS DEL CONSUMO DE MANITOL DURANTE LA FASE EXPONENCIAL.....	67
FIGURA 55 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALGINATO EN EL MEDIO DE CULTIVO.	68
FIGURA 56 PRODUCCIÓN DE OLIGÓMEROS DE ALGINATO EN LA FERMENTACIÓN.....	68
FIGURA 57 CONCENTRACIONES DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS DEL CULTIVO.....	69
FIGURA 58 DETALLE DE LAS CONCENTRACIONES DE LOS COMPUESTOS CON LAS MENORES MAGNITUDES.....	70
FIGURA 59 DIAGRAMA DE FLUJOS METABÓLICOS EN E.COLI UTILIZADA EN ESTE ESTUDIO. SE MUESTRA LOS VALORES DE LOS FLUJOS EN LOS CÍRCULOS AMARILLOS.	74
FIGURA 60 DIAGRAMA DE RUTAS METABÓLICAS EN LA CEPA BAL 1611. TAMBIÉN SE INCLUYE LA SECCIÓN DE LA RUTA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO.....	II
FIGURA 61 CURVA ESTÁNDAR PARA EL CÁLCULO DE PESO SECO.	VII
FIGURA 62 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCETRACIÓN STOCK DE ÁCIDO HIALURÓNICO.	VII
FIGURA 63 RESULTADOS DEL MÉTODO DE CUANTIFICACION POR TURBIDIMETRÍA, ANTES DE LAS 10 HORAS DE CULTIVO.....	VIII
FIGURA 64 RESULTADOS DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR TURBIDIMETRÍA DESPUÉS DE LAS 8 HORAS DE CULTIVO.....	IX
FIGURA 65 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE ACETATO CON UN DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN.	X
FIGURA 66 RESULTADOS UTILIZANDO UNA COCENTRACIÓN STOCK DE ACETATO CON UN DETECTOR DE LUZ ULTRA VIOLETA.	X
FIGURA 67 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE ALGINATO.	XI
FIGURA 68 RESULTADOS URILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE ARABINOSA.	XII
FIGURA 69 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE ETANOL.	XIII
FIGURA 70 RESULTADOS UTILIZANDO UNA CONCENTRACIÓN STOCK DE MANITOL.	XIV
FIGURA 71 CURVA OLIGÓMEROS, BASADO EN ALGINATO DEGRADADO POR HIDRÓXIDO DE SODIO.	XV
FIGURA 72 LADDER GENE RULER 1 KB PLUS.....	XXVII

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

1.1 Ácido Hialurónico

En esta sección se analiza en detalle la estructura de la molécula de ácido hialurónico, su importancia a nivel mundial, sus aplicaciones, el mercado en que se encuentra, cómo se produce y otros aspectos de interés.

1.1.1 Estructura

El ácido hialurónico (AH) es un polisacárido lineal, sin ramificaciones, que contiene monómeros alternados de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. (Figura 1) Estos disacáridos se encuentran unidos por uniones glucosídicas β -1,3 y β -1,4 y se repiten entre 2 mil y 25 mil veces en la cadena molecular, con pesos que se encuentran en un rango de entre 5 [KDa] a 10 [MDa]. Esta molécula tiene varias funciones importantes en el cuerpo humano, entre ellas la de proveer amortiguación a las articulaciones y de mantener la piel suave y elástica. Estas propiedades hacen que este ácido tenga varias aplicaciones en el área de la salud, en la clínica y en la cosmética (Jeong et al., 2014; Kogan et al., 2007; Vigetti et al., 2014a; Yu y Stephanopoulos, 2008).

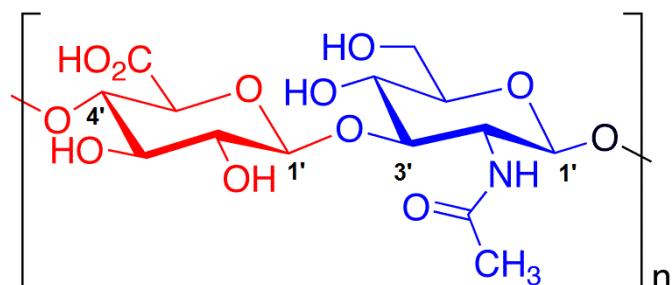


Figura 1 Estructura de la cadena de Ácido Hialurónico. En rojo se muestra el monómero ácido glucurónico y en azul el monómero N-acetilglucosamina.

El ácido hialurónico muestra rigidez conformacional debido a estas uniones beta-glucosídicas, a los puentes de hidrógeno internos y las interacciones con el solvente. Esto, además de su alto peso molecular, produce que las soluciones con AH se comporten de una manera no newtoniana. Las propiedades reológicas dependen tanto del peso molecular como de la concentración (Chong et al., 2005). El ácido con alto peso molecular (mayor a 10 [KDa]) presenta una buena viscoelasticidad, retención de humedad y mucoadhesión. Estas cualidades son deseadas en las áreas oftalmológicas, ortopédicas, curación de heridas y cosmética. Por otro lado, el ácido hialurónico con una relativa baja densidad (2 - 3,5 [KDa]) y oligosacáridos (10 - 20 azúcares de largo) han mostrado promover angiogénesis, inducir la expresión de mediadores inflamatorios e inhibir el crecimiento tumoral (Liu et al., 2011; Sheng et al., 2009).

El AH se puede encontrar en la mayor parte del cuerpo humano, en especial en el cuerpo vítreo del ojo, en el fluido sinovial de las articulaciones y en el espacio intercelular

de la epidermis. Cuantitativamente, más del 50 [%] del ácido se encuentra en la piel y alrededor de un 35 [%] en los músculos y esqueleto. En un principio, el ácido era considerado solo como material de relleno de espacio inerte. Al contrario, esta molécula tiene capacidad de regular el balance osmótico y la resistencia al flujo, también como lubricante y estabilizador de estructuras. Además, el ácido hialurónico cumple un rol importante en la organización de complejos proteoglicanos, como también en la proliferación y migración, cicatrización de tejidos y morfogénesis (Chong et al., 2005; Liu et al., 2011; Vigetti et al., 2014a).

1.1.2 Aplicaciones y Mercado

Debido a las características antes mencionadas que tiene el AH, existe un extenso número de aplicaciones. En la Tabla I se muestra algunas de estas aplicaciones (Boeriu et al., 2013).

Tabla I Aplicaciones de AH en las Áreas Biomédica y Farmacológica (Boeriu et al., 2013).

Área	Aplicación	Ejemplo
Biomédica	Cirugía Ortopédica	Artritis
	Reumatología	Osteoartritis
	Oftalmología	Cirugía de Ojo
	Otorrinolaringología	Tratamiento de las Cuerdas Vocales
	Cirugía Plástica y Dermatología	Relleno Dermal
	Cicatrización y Vendaje de heridas	Ulcera Diabética, Quemaduras de Piel
Farmacológica	Administración de Fármacos	

Entre la gran variedad de aplicaciones que tiene el ácido hialurónico, esta molécula se ha utilizado como ayudante quirúrgico en más de 60 millones de cirugías desde 1979. En término de costos, actualmente, el mercado de AH para ayudante quirúrgico representa un estimado de USD\$ 140 millones alrededor del mundo y que crece lentamente a medida que la población envejece. Otra aplicación común de esta molécula es en la viscosuplementación en articulaciones artríticas. Para el año 2004, el mercado mundial de AH para uso en esta aplicación se estimó en USD \$300 millones en Japón, similar en Estados Unidos y cerca de USD \$100 millones en Europa. Por otro lado, el ácido hialurónico puede reemplazar al colágeno y otros rellenos de tejido en cirugía cosmética y reconstructiva (Chong et al., 2005). Actualmente, existen alrededor de 100 diferentes rellenos dérmicos, de los cuales aproximadamente la mitad son en base a el ácido hialurónico (ASAPS, 2015).

Para el año 2010, el mercado global de ácido hialurónico se estimó en sobre los USD\$ 1.4 mil millones (Liu et al., 2011). Por otro lado, durante el año 2014, tomando en cuenta solamente al mercado estadounidense, se realizaron alrededor de 1,7 millones de

procedimientos con un gasto total sobre USD\$ 1 mil millones en AH (ASAPS, 2015). Estos datos muestran un aumento en el tiempo de la demanda de esta molécula.

Durante el año 2004, el mercado de ácido hialurónico apto para uso médico no sobrepasa la tonelada. Sin embargo, el AH de grado médico se vende por alrededor de los USD\$ 40 mil hasta los USD\$ 100 mil por kilogramo. En el caso del AH que se usa en gotas para los ojos, cosméticos y productos alimenticios, se tiene un mercado 10 a 20 veces mayor pero el precio se encuentra en un rango de entre USD\$ 1000 y USD\$ 2000 por kilogramo, dependiendo de la calidad (ASAPS, 2015; Boeriu et al., 2013; Chong et al., 2005).

1.1.3 Producción de Ácido Hialurónico

Existen varios métodos para producir AH que se resume en la Figura 2. Aunque exista una gran variedad de métodos de producción, en esta introducción se va a concentrar en las principales en la producción industrial. En la sección A.2 se encuentra una tabla comparativa de los diferentes métodos que se mencionan en la Figura 2.

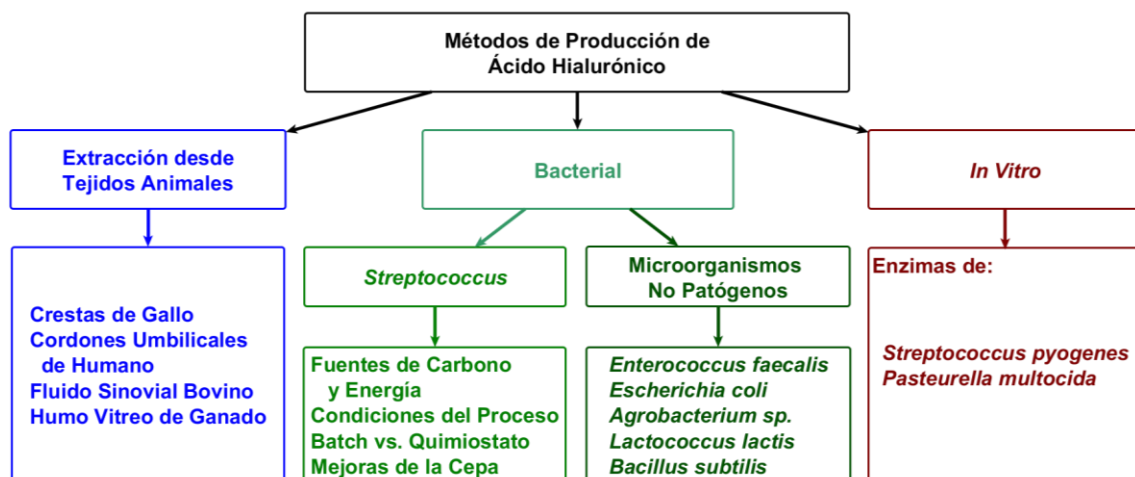


Figura 2 Métodos de producción de ácido hialurónico. Adaptado de (Boeriu et al., 2013).

Actualmente, la producción industrial de AH se realiza a través de la extracción química de cordones umbilicales de gallos o por la fermentación de *Streptococcus* del grupo C o A. El primer método tiene la desventaja de que se encuentra limitado por la disponibilidad del recurso (Jeong et al., 2014; Yu y Stephanopoulos, 2008). Además, el AH se encuentra en un complejo con proteoglicanos lo que genera que la extracción de alta pureza y de alto peso molecular sea costosa. Incluso, se encuentra con mayor oposición el uso de bioquímicos derivados de animales para terapia humana. Esto se debe al riesgo por infecciones cruzadas entre especies. En el segundo método se encuentra limitado por alto costo del medio para cultivo, por preocupaciones por la patogenicidad del producto al presentar endotoxinas y por la calidad del ácido. El peso molecular

producido por cepas del género *streptococcus* se encuentran entre 0,8 [MDa] y 1,5 [MDa], en comparación al extraído de animales que supera los 3 [MDa] (Jeong et al., 2014; Kogan et al., 2007; Liu et al., 2011; Widner et al., 2005). Utilizando cepas recombinantes, se busca evitar los problemas de patogenicidad y la expresión de hialuronidasas (Jeong et al., 2014; Widner et al., 2005). Por estas razones, se busca una estrategia para producir ésta molécula de manera más económica y segura (Kim et al., 1996).

Existen investigaciones donde se realizan modificaciones en organismos para que tengan la capacidad de sintetizar esta molécula de interés, obteniéndose en el microorganismo *E. coli*, ácido hialurónico con peso molecular de entre $3.5 \cdot 10^5$ [Da] y $1.5 \cdot 10^6$ [Da], bajo diferentes condiciones (Yu et al., 2008; Liu et al., 2011). Comparativamente, en cultivos de *Streptococcus* (Armstrong and Johns, 1995), es posible producir ácido hialurónico de un peso molecular de hasta $4 \cdot 10^6$ [Da]. Las cepas recombinantes utilizadas para estos estudios emplean medios que contienen glucosa y sorbitol. En la Figura 3 se muestra las vías metabólicas de este microorganismo recombinante para producir ácido hialurónico. En *E. coli* existen varias enzimas con funciones similares a las presentes en las cepas de género *Streptococcus* a excepción de la enzima ácido hialurónico sintasa (*hasA*). Se ha descubierto que los genes *ugd* y *galF*, que codifican las enzimas que sintetizan los precursores de UDP-GlcA, son esenciales para una mayor acumulación de ácido hialurónico en *E. coli*. Por un lado, *ugd* es necesario para suministrar a la célula con ácidos nucleicos necesarios para el metabolismo. Mientras que *galF* es un factor importante en sustentar una gran cantidad de síntesis de ácido hialurónico. No obstante, no es requerido adicionar enzima específica para la síntesis de UDP-GlcNAc, codificada por *glmU*.

La síntesis de la cadena de ácido hialurónico contiene miles de monómeros de azúcares lo que se traduce en un alto requerimiento de energía. Esto es en el orden de 5 equivalentes de ATP, dos cofactores NAD, un grupo acetyl-CoA, además de los monosacáridos glucosa y glucosamina que son utilizados para producir una unidad de disacárido (DeAngelis, 1999).

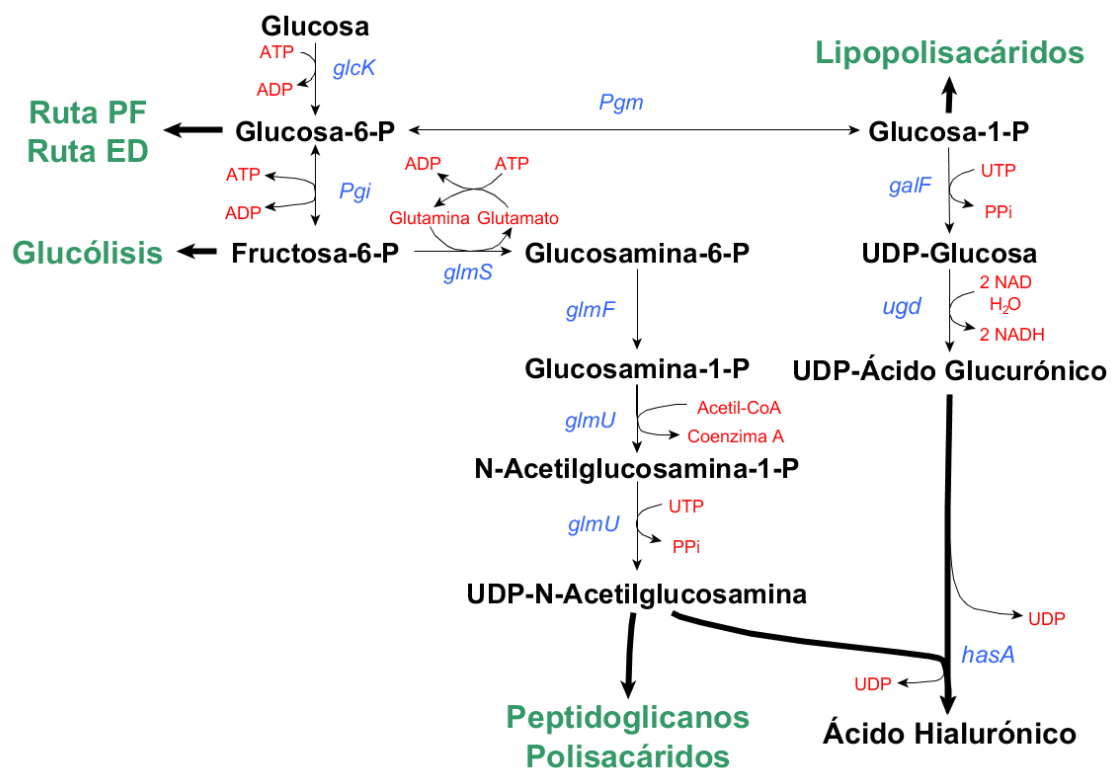


Figura 3 Ruta Metabólica para la producción de ácido hialurónico en *E.coli*. Adaptado de (Yu y Stephanopoulos, 2008).

1.1.4 Ácido Hialurónico Sintasa

Las Ácido hialurónico sintasas (HAS- *Hyaluronic Acid Synthase*), antiguamente nombradas AH sintetetas, son glicosiltransferasas que polimerizan ácido hialurónico. Todas las HAS utilizan como sustrato azúcares-UDP en presencia de Mg²⁺ o Mn²⁺. La generación de la repetición de disacáridos en la estructura del AH se debe a la fidelidad intrínseca de las dos glicosiltransferasas presentes en HAS. En comparación a otros glicoconjugados, AH se produce de forma libre, no se encuentra ligado a una proteína o lípido. Además, HAS no necesita de una secuencia partidora para iniciar la síntesis. Para la síntesis, sólo necesita de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), UDP-Ácido glucurónico (UDP-GlcA) y Mg²⁺. Los azúcares con UDP se encuentran unidos por enlaces alfa mientras que las HAS sintetizan con uniones beta. Esto significa que las HAS son enzimas que invierten, sin retener, los enlaces. Los azuceres con UDP son polimerizados desde el citoplasma por HAS y la creciente cadena es extruido al exterior (Hoshi et al., 2004; Weigel, 1998; Weigel y DeAngelis, 2007).

Pruebas funcionales de proteínas recombinantes revelan que las HAS son las primeras glicotransferasas en dónde una proteína cataliza la transferencia de dos monosacáridos diferentes. En síntesis, las HAS tienen varias funciones que consisten en

enlazar dos azúcares con UDP diferentes, enlazar dos especies de AH aceptores o donadores distintos, transferencia de dos azúcares diferentes en dos enlaces distintos, polimerización repetitiva de azúcares y la transferencia de AH a través de la membrana (Weigel y DeAngelis, 2007).

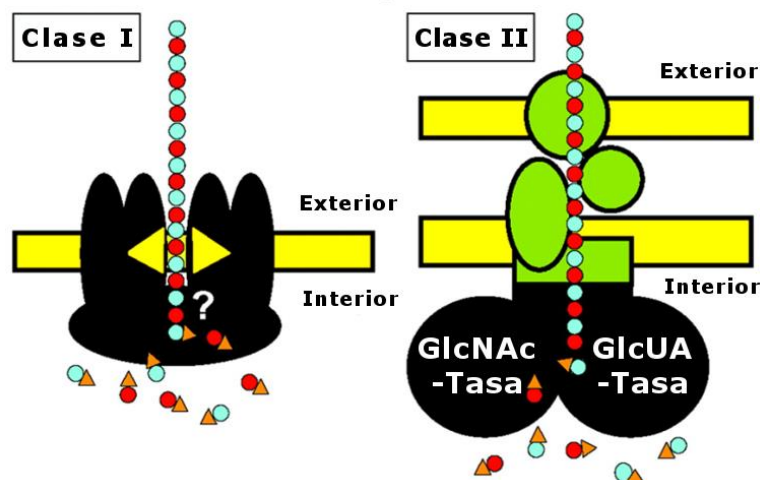


Figura 4 Modelo esquemático de las clases I y II de HAS. Modificado de (Weigel y DeAngelis, 2007).

En la Figura 4 se muestra los esquemas de las dos clases diferentes de HAS. En círculos rojos y azules se muestran los monómeros de N-Acetilglucosamina y Ácido glucurónico respectivamente, enlazadas al azúcar UDP que se representa en triángulos naranjos. Las HA synthases clase I son proteínas de membrana integrales dependientes de lípidos con varios dominios de membrana incrustados en la bicapa lipídica. Ésta proteína cataliza la adición de azúcares y puede transportar el polímero de AH a través de la membrana de eucariontes y bacterias Gram positivas. Para las enzimas clase I-R, el crecimiento de la cadena de AH se realiza por el terminal reducido y ocurre dentro de la célula enlazado a UDP (cómo se muestra en el esquema anterior). Para las enzimas clase I-N, el crecimiento de la cadena ocurre en el terminal no reducido adentro de la célula (no se muestra). Las enzimas de clase II, en el que se encuentran las bacterias Gram negativas (en particular *Pasteurella multocida*), catalizan la reacción de adición de azúcares y probablemente se acopla a un aparato transportador de polisacáridos compuesto de múltiples proteínas para traslocar el AH a través de las dos membranas de la bacteria. La enzima es una fusión de dos glicosiltransferasas que agregan N-acetilglucosamina (dominio A1) y ácido glucurónico (dominio A2) en el terminal no reducido de la cadena (DeAngelis, 2002, 1996; DeAngelis y White, 1998; Weigel y DeAngelis, 2007).

En la Figura 5 se presenta un esquema más detallado de la HAS clase I, dónde se mencionan seis actividades independientes requeridas para que se sintetice un disacárido de la cadena polimérica. Cada número representa una función. La función 1 corresponde al sitio de unión a UDP-GlcNAc, la función 2 corresponde al sitio de unión a UDP-GlcA,

la función 3 corresponde a $\beta(1,4)$ GlcNAc transferasa, la función 4 corresponde a $\beta(1,3)$ GlcNAc transferasa, la función 5 corresponde a un sitio de unión aceptor de AH y la función 6 corresponde al transporte o translocación del AH (Weigel, 1998).

En el presente trabajo se utiliza un plasmidio con los genes de *streptococcus equi* (Gram positivo) que ha sido utilizado en otros trabajos como (Vaisman, 2014; Yu y Stephanopoulos, 2008).

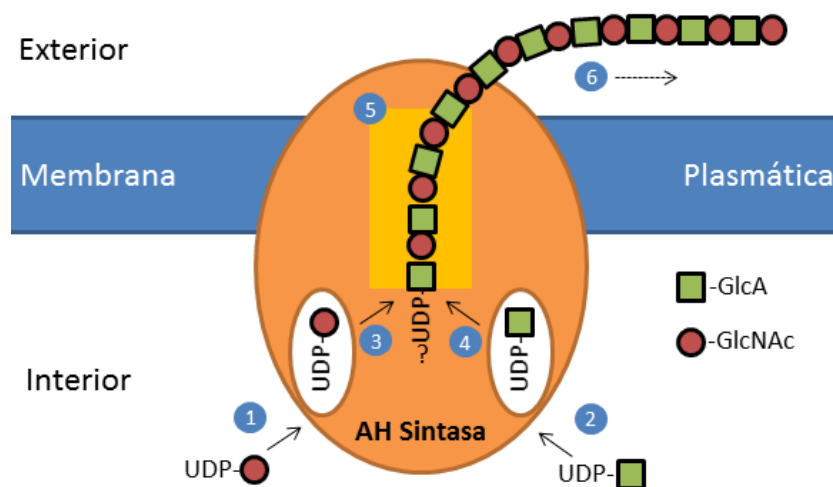


Figura 5 detalle de HAS clase I. Adaptado de (Weigel, 1998).

1.1.5 Otras Consideraciones y Desafíos

A partir de la información de la sección 1.1.3 y con respecto al metabolismo de la célula, se puede deducir que para producir AH, se tiene una inhibición en el crecimiento celular. Esto se debe a que la expresión de HAS necesita de una gran cantidad de amino ácidos, de otros elementos y energía. Entre estos elementos se encuentran los cofactores Mg^{2+} y cardiolipina. Además, estas vías abastecen de constituyentes estructurales de la pared celular específicamente, peptidoglicanos, polisacáridos y lipopolisacáridos. En el caso de *Streptococcus*, (que produce polisacáridos, ácidos teicoicos y peptidoglicanos) éstos constituyen el 20 % (p/p) del peso seco de la célula y representan una cantidad importante de recursos que no se utilizan para sintetizar AH (Fong et al., 2005; Yu and Stephanopoulos, 2008; Stephanopoulos, 2007; Roesijadi et al., 2010). Por ello, es necesario regular el crecimiento celular de la cepa para la producción de AH.

Las condiciones ideales para maximizar el peso molecular se ven con alta concentración de azúcar de UDP y bajas concentraciones de UDP libre (en otras palabras, aumentar la expresión de *HasB* en *streptococcus*) presentes en la célula (Chong et al., 2005; Sheng et al., 2009).

Además, existen otros desafíos dentro de la producción de AH, como también en los sistemas de producción recombinante. Entre ellos se encuentra el continuo aumento del costo de la materia prima, razón por la que es necesario reemplazarla por sustratos más baratos para reducir costos. Otro desafío es el clarificar los factores limitantes de la síntesis del ácido hialurónico. Por último, es necesario tener una escala de producción uniforme de AH para extender sus aplicaciones y mejorar la calidad de los productos médicos que lo contengan (Liu et al., 2011).

Para éste trabajo se utiliza carbohidratos de algas pardas (alginato y manitol) como fuentes de carbono novedosos para producir ácido hialurónico.

1.2 Macroalgas y Algas Pardas

Las macroalgas pueden describir como estructuras fotosintéticas, plantas vasculares que contienen clorofila y que tienen sistemas reproductivos simples. Las macroalgas son organismos fotosintéticos que poseen características similares a las plantas. Generalmente en su estructura contiene una brizna o lámina, el estipe y el rizoide. Este último permite al organismo apegarse a un sustrato sólido. En la Figura 6 se muestra las partes anteriormente mencionadas. Las macroalgas se clasifican como *Phaeophyta* o algas pardas, *Rhodophyta* o algas rojas y *Chlorophyta* o algas verdes en base a la composición de pigmentos fotosintéticos (Dawes, 1998).

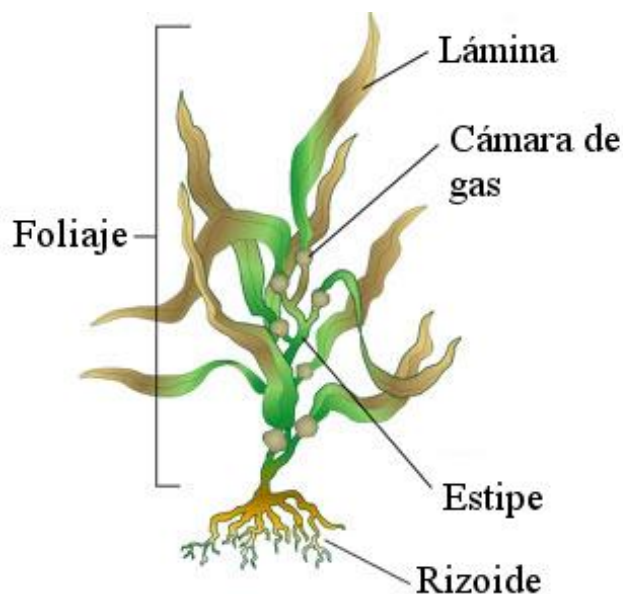


Figura 6 Fisiología de macroalgas pardas.

Las algas pardas se clasifican en aproximadamente 265 géneros con más de 1500 especies. Su color pardo se debe al contenido del carotenoide fucoxantina, contenido en los cloroplastos de la célula, y a la presencia de varios taninos. Estas algas crecen desde

regiones con climas templados hasta subpolares, donde se exhiben la mayor diversidad de especies y de expresiones morfológicas (Davis et al., 2003; Dawes, 1998). Estas macroalgas están compuestas por una variedad de carbohidratos que se describen a continuación.

1.2.1 Polisacáridos Para Almacenamiento

El carbono puede ser almacenado en forma de compuestos monoméricos (como manitol) o en un estado polimérico (Davis et al., 2003).

1.2.1.1 Manitol

Manitol (Figura 7) constituye hasta un 30 [%] del peso seco. Manitol es el primer producto de acumulación de la fotosíntesis y tiene propiedades osmoregulatorias (Davis et al., 2003).

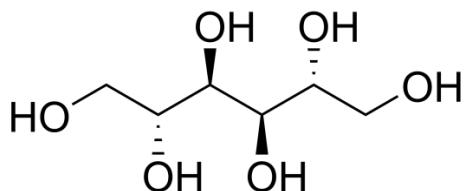


Figura 7 Estructura de Manitol.

1.2.1.2 Laminarina

El segundo producto que más se utiliza como compuesto de almacenamiento es la laminarina. Este glucano está compuesto de una mezcla de polisacáridos, que se conectan primordialmente por uniones β (1-3) y, en menor cantidad en las ramificaciones, por uniones β (1-6). Existen dos tipos de cadenas de laminarina, con manitol (M) unido al terminal reducido y con glucosa (G) unido al terminal reducido, que se muestran en la Figura 8. Las cantidades relativas y absolutas de almacenamiento de estos compuestos varían, dependiendo del crecimiento, tejido y condiciones de reproducción (Davis et al., 2003). El peso molecular es de aproximadamente 5000 [Da], dependiendo del grado de polimerización. La solubilidad depende de la cantidad de ramificaciones. Mientras mayor sea la cantidad, mayor será la solubilidad, incluso en agua fría. Por el contrario, si la cantidad de ramificaciones es pequeña, se logra solubilizar a mayores temperaturas (Rioux et al., 2007).

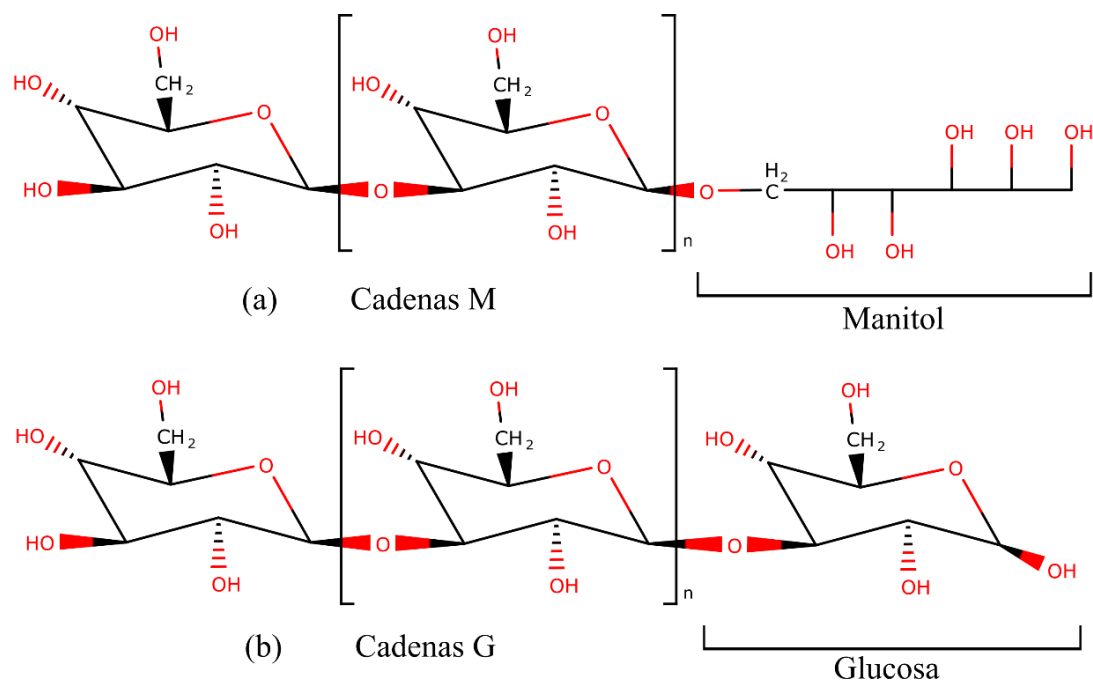


Figura 8 Estructura de laminarina. La estructura es principalmente glucanos no ramificados unidos por enlaces beta(1' a 3'). En (a) el manitol se encuentra unido al terminal reducido (cadena M). En (b) la glucosa se enlaza al terminal reducido (cadena G). Adaptado de (Davis et al., 2003).

1.2.2 Polisacáridos de la Pared Celular y Extracelular

La pared celular está formada por al menos dos capas diferentes, en la Figura 9 se muestra un esquema de esto. La capa más interna consiste de un esqueleto de microfibrillas, generalmente compuestas de celulosa, que aporta rigidez a la pared. Esta capa se adhiere a la capa externa por puentes de hidrogeno. La capa externa está compuesta por una matriz de incrustaciones amorfas, primordialmente alginato o ácido algínico. El alginato contribuye a la resistencia de la pared celular de las algas pardas, además de proveer de flexibilidad a la estructura. Otro compuesto presente es el fucoidán que se encuentra tanto en la matriz como en la pared celular interna (Davis et al., 2003). Un modelo de la pared celular se muestra en la Figura 10. Las microfibrillas de celulosa se encuentran esparcidas y con forma de cinta. Los polisacáridos sulfatados que contienen fucoidán se enlazan entre las microfibrillas de celulosa (Deniaud-Bouët et al., 2014).

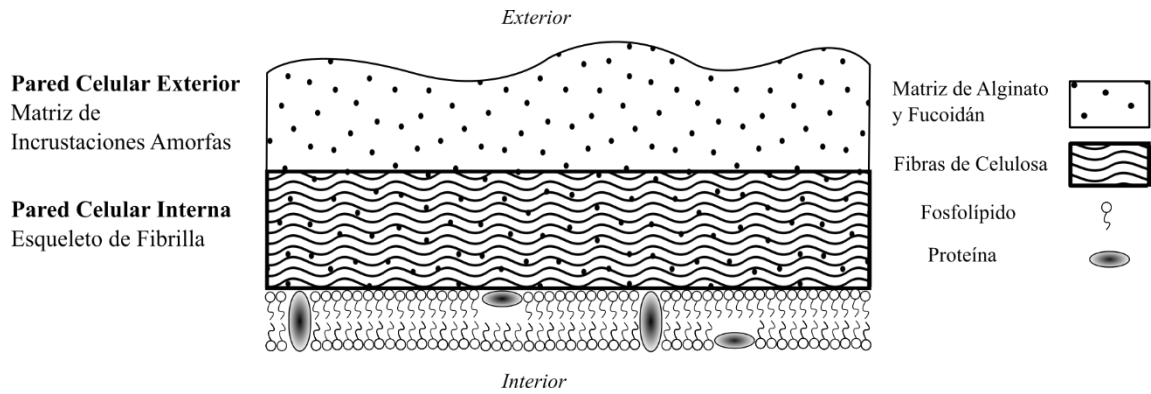


Figura 9 Estructura de la pared celular de algas pardas. Adaptado de (Davis et al., 2003).

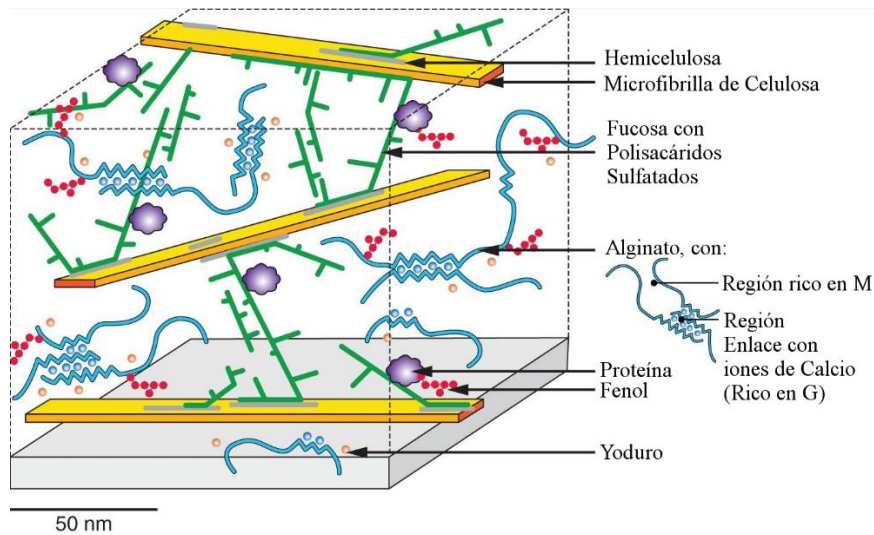


Figura 10 Modelo con detalle de la pared interna de algas pardas. (Deniaud-Bouët et al., 2014)

1.2.2.1 Alginato

El ácido alginico o alginato es el polisacárido que se encuentra en mayor proporción en las algas pardas (Wargacki et al., 2012). Es un polisacárido que consiste en cadenas no ramificadas de bloques de dos tipos de monómeros. Estos monómeros son el β -D-manuronato y el α -L-guluronato (epímero C5 de manuronato) (Wong et al., 2000). El alginato se encuentra presente en regiones intracelulares como también en la pared celular, en la forma de sales de diferentes metales, primordialmente sodio y calcio. Las proporciones de estos dos monómeros varía entre especie, incluso entre las diferentes partes de una misma planta (Kim et al., 2011; Percival, 1979). La función biológica del alginato es de proveer de soporte estructural a las algas (Kim et al., 2011). La solubilidad del alginato depende del pH, de la concentración, de los iones en solución, de la presencia de iones divalentes y de la fuerza iónica (Rioux et al., 2007).

El alginato se encuentra presente en todas las algas pardas. Puede constituir entre el 10 [%] y el 40 [%] del peso seco. La abundancia de este compuesto dependerá de la

profundidad en que crecen las algas, como también la época del año en que se extrae (Davis et al., 2003; Percival, 1979).

Las sales de ácido algínico con iones monovalentes son solubles, pero aquellos con iones metálicos divalentes o polivalentes (excepto Mg^{+2}) son insolubles.

Los monómeros que componen el alginato se unen para formar bloques de polimanuronato (poliM), poliguluronato (poliG) y copolimeros aleatorios (poliMG) (Figura 11). Los bloques de secuencias de M y G muestran diferentes estructuras y sus proporciones en el alginato determinan las propiedades físicas como también la reactividad del polisacárido. La rigidez y flexibilidad mecánica es controlado por el contenido de monómeros de ácido gulurónico. Mientras mayor sea el contenido de este monómero, mayor será la resistencia del gel. Un menor contenido de ácido gulurónico provee de una mayor flexibilidad al alginato. El ácido polimanurónico es una cadena plana con forma parecida a una cinta. Esta cadena contiene dos uniones diecuatoriales (1e, 4e) en su conformación silla. Por otro lado, las cadenas de ácido poligulurónico contienen dos uniones diaxiales (1a, 4a) a los residuos de ácido α -L-gulurónico en la conformación silla lo que produce polímeros tipo varilla. Se cree que esta diferencia conformacional es responsable de la variabilidad en la afinidad del alginato por metales pesados (Davis et al., 2003; Kim et al., 2011; Percival, 1979).

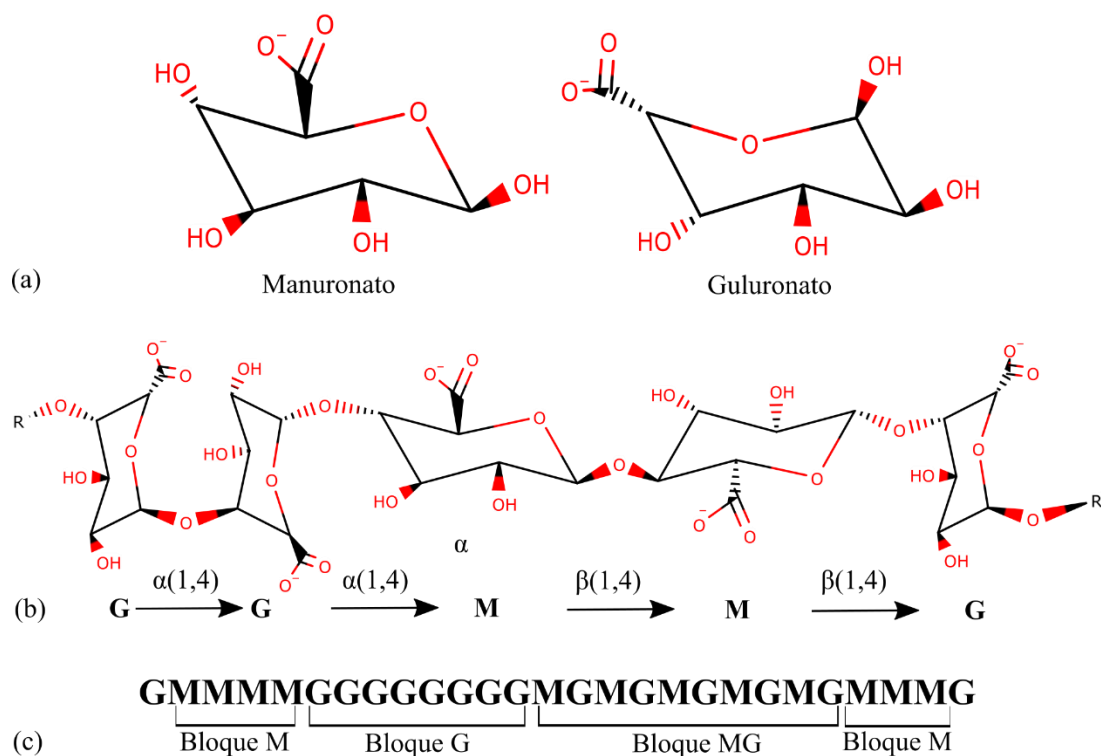


Figura 11 Alginato estructural. En (a) monómeros de alginato. En (b) polímero de alginato. En (c) secuencias de la cadena del polímero de alginato. Adaptado de (Davis et al., 2003; Kim et al., 2011).

El interés que existe por utilizar algas como materia prima se debe a que son una alternativa al uso de maíz o caña de azúcar. Por otro lado, el cultivo de algas tiene varias ventajas, en comparación a otros cultivos, entre las que se cuentan el que no requiere de tierra arable, fertilizantes o fuentes de agua dulce (Wargacki et al., 2012). Además, particularmente para las algas pardas, su composición no contiene lignina y los azúcares que contiene pueden ser extraídos a través de operaciones simples como molienda. Los azúcares más abundantes en estas algas son alginato, manitol y glucano (Lewis y Yamamoto, 1990; Roesijadi y Jones, 2010; Wargacki et al., 2012).

1.2.3 Algas Pardas en Chile

La investigación y uso de las macroalgas en Chile se encuentra en una etapa que se caracteriza por la capacidad industrial de producir y procesar algas y la capacidad científica para estudiar macroalgas (Avila y Seguel, 1993; Buschmann, 2008; Norambuena, 1996; Vásquez, 2009). Chile es un productor importante de algas pardas, representando el 10 [%] del suministro mundial. La producción ha variado desde 40 mil [t/año] a principios de los 80's a 250 mil [t/año] a fines de los 2010's. El alga comercializada proviene de poblaciones naturales y no se ha establecido cultivos masivos de estas especies. Son cinco las principales especies de algas que se recolectan y comercializan en Chile: *Lessonia trabeculata*, *L. nigrescens*, *Macrocystis pyrifera*, *M. integrifolia* y *Durvillaea antarctica*. Desde el año 2000, la demanda por fuentes de alginato y de alimento para abalones se ha elevado dramáticamente, lo que provoco un aumento en la recolección de algas pardas, como se muestra en la Figura 12 (Buschmann, 2008; McHugh, 2003; Vásquez, 2009). También existe una demanda por estas algas para el desarrollo de nuevos productos como fertilizantes orgánicos y el uso como alimento humano. Esta información debe ser analizada con precaución debido a que los datos de recolección en zonas remotas puede contener errores (Buschmann, 2008).

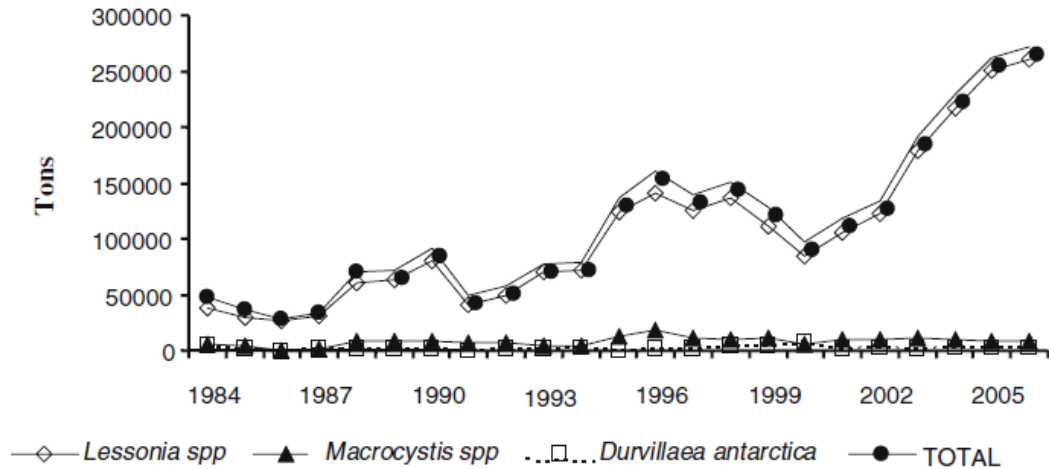


Figura 12 Producción anual (biomasa húmeda) de pesca de algas pardas entre 1984 y 2006 (Vásquez, 2009).

1.2.4 Ruta de Degradación de Alginato

Las alginato liasas son enzimas, miembros de la familia de las polisacárido liasas. Las alginato liasas pueden degradar alginato al romper la unión glicosídica a través de una reacción de β -eliminación, generando oligómeros con 4-desoxi-L-eritro-hex-4-enepiranosiluronato en el terminal no reductor. El polímero de alginato es degradado en oligómeros con un monómero de ácido urónico no reducidos por la acción de alginato liasas del tipo endo-. Luego, estos polímeros son depolimerizados en monosacáridos no saturados por las alginato liasas del tipo exo-. Este monosacárido se convierte de manera no enzimática en ácido urónico 4-Desoxi-L-Eritro-Hexoseulosa (DEHU) (Kim et al., 2011; J Preiss y Ashwell, 1962) para luego convertirse en ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glucónico (KDG) por la DEHU reductasa, dependiente de NADPH (Kim et al., 2011; Jack Preiss y Ashwell, 1962; Wargacki et al., 2012). Luego esta molécula se convierte en el ácido 2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconico (KDPG). Esta última molécula puede entrar en la ruta de Entner-Doudoroff donde se degrada en gliceraldehído-3-fosfato y piruvato, moléculas que forman parte de la ruta de la glucólisis, como se muestra en la Figura 13 (Kim et al., 2011; Wargacki et al., 2012).

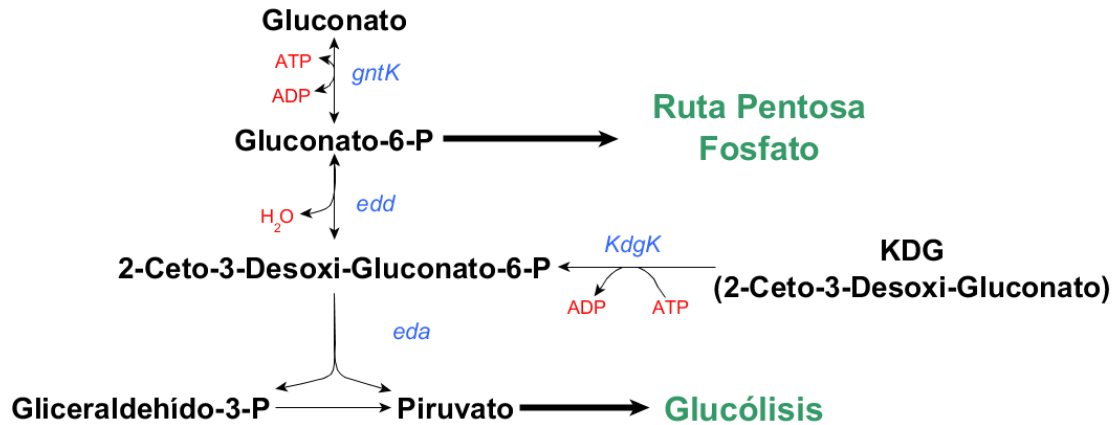


Figura 13 Ruta Entner-Doudoroff. Adaptado de (Peekhaus y Conway, 1998).

1.2.5 Alginato Liasas

Las alginato liasas pueden ser caracterizadas como liasas específicas a poliM, poliG y poliMG basado en la especificidad al sustrato. Estas liasas tienen actividad de degradación endo- o exo-, con la especificidad al sustrato correspondiente. Las diferentes alginato liasas se muestran en la Figura 14 (Kim et al., 2011).

Las alginato liasas tienen el potencial como importantes biocatalizadores para la aplicación del alginato como fuente renovable de bioquímicos y biocombustibles en el futuro cercano (Wong et al., 2000).

En microorganismos que crecen en alginato, utilizan alginato liasas extracelulares para degradar el alginato para luego transportar el producto al citoplasma para asimilarlos por la vía metabólica. Algunas bacterias como *Sphingomonas sp.* A1 pueden captar el polímero de alginato directamente utilizando transportadores periplasmáticos dependientes de ATP. Luego de ser transportados al citoplasma, el alginato es degradado por las alginato liasas del tipo exo- y endo- (Kim et al., 2011; Wong et al., 2000).

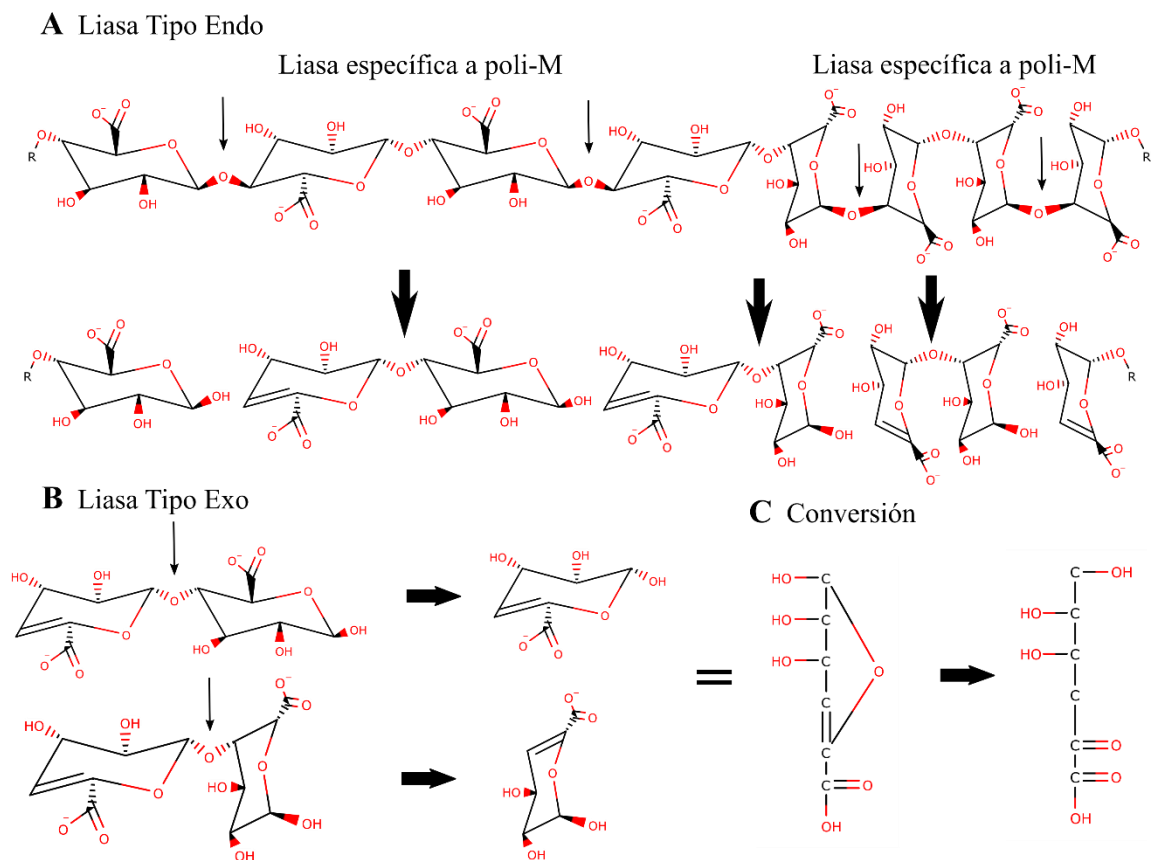


Figura 14 Alginato liasas. La degradación de alginato se realiza por beta eliminación de forma endolítica (a) y exolítica (B). Monosacaridos insaturados son liberados del alginato o oligosacaridos por las alginato liasas exolíticas. Los monosacaridos son convertidos no enzimáticamente en Ácido urónico 4-deoxi-L-eritro-5-hexoceulosa (DEHU) (C) (Kim et al., 2011).

Los sistemas de expresión procarionte, en particular *E. coli*, han sido explotados para la producción de una variedad de proteínas terapéuticas a una escala industrial. *E. coli* es el huésped preferido para la expresión de proteína foránea debido a que requiere de fuentes de carbono económicas, rápida acumulación de biomasa, alcanzar altas densidad en la fermentación y el proceso de escalamiento es simple (Sahdev et al., 2007; Vaisman, 2014). En el presente trabajo, se utiliza la cepa modificada de *E. coli* BAL 1611, utilizado en el trabajo de (Wargacki et al., 2012).

1.3 Ceba BAL 1611

Esta cepa es una cepa modificada a partir de ATCC 8739, se encuentra disponible la base de datos con la secuencia completa del genoma de esta cepa (Copeland et al., 2008) y es una cepa comúnmente utilizada para aplicaciones industriales (Archer et al., 2011). La cepa BAL 1611 utiliza azúcares de macroalgas, específicamente una especie de macroalga parda (*Saccharina japonica*), para la producción de etanol. En esta cepa se insertó una vía metabólica que permite el consumo de alginato y se diseñó un sistema *Aly* que permite una rápida y eficiente degradación del alginato. Además, este sistema se encuentra acoplado al metabolismo central de la célula huésped. Los genes necesarios para el transporte, degradación y metabolismo de alginato se obtuvieron del genoma de *V. splendidus* y de *Sphingomonas sp.* A1. Por otro lado, se realizaron modificaciones para mejorar la captación de alginato. Estas modificaciones incluyen transportadores auxiliares que permiten un mayor flujo de alginato hacia el interior de la célula.

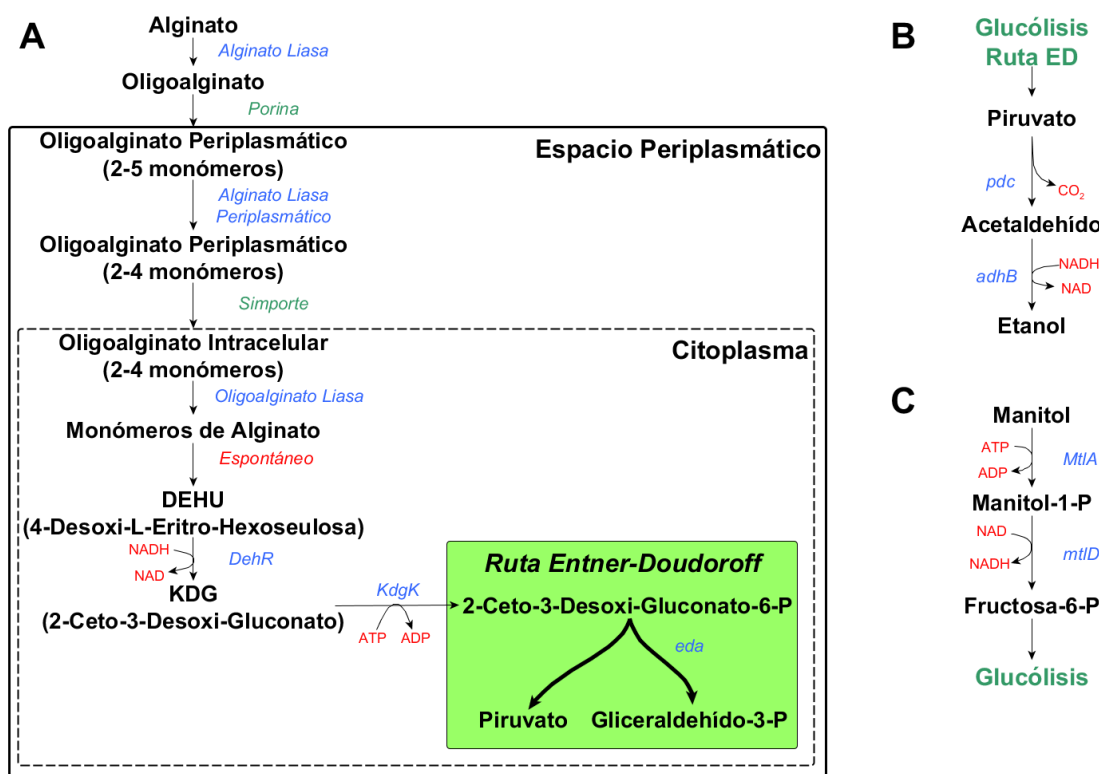


Figura 15 Vías metabólicas en BAL 1611. Adaptado de (Lengeler y Lin, 1972; Saier y Reizer, 1992; Wargacki et al., 2012).

En la Figura 15 A se puede apreciar la parte correspondiente a la vía metabólica para la degradación de alginato. La vía generada de degradación de alginato se acopla al ingresar en la vía Entner-Doudoroff (Figura 13) al sintetizar 2-dehidro-3-deoxi-gluconato-6-fosfato como producto final. Además, contiene genes provenientes del genoma de *Z.*

mobilis para la síntesis más eficiente de etanol (piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa) a partir de piruvato en vez de acetyl-CoA, que se muestra en la Figura 15 parte B. Por otro lado, *E. coli* contiene en su genoma los genes necesarios para la captación, transporte y degradación del manitol. Esto significa que no es necesario realizar modificaciones en este aspecto. En la Figura 15 parte C se muestra la vía para la degradación de manitol. El inicio del catabolismo de manitol se muestra simplificado ya que el proceso de transporte del manitol ocurre en un sistema que involucra la enzima fosfotransferasa, sistema similar al que existe para glucosa y otros carbohidratos, dónde *MtlA* y *MtlD* forman parte de este complejo proteico de la membrana celular (Deutscher et al., 2014; Saier y Reizer, 1992). Por otro lado, en este mismo proceso, se obtiene piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (ver Figura 38) (Deutscher et al., 2014; Lengeler y Lin, 1972).

También tiene modificaciones para mejorar la síntesis de etanol al disminuir la carga metabólica en la célula en condiciones anaeróbicas. Estas modificaciones incluyen la delección de genes *pflB-focA*, *frdABCD* y *ldhA* (Figura 16) (Wargacki et al., 2012). El primer gen (A) corresponde a un operón compuesto por la enzima piruvato formato liasa I, que degrada piruvato para formar acetyl-CoA y formato, y un transportador de formato. El segundo gen (B) corresponde al operón formato liasa, donde se degrada fumarato para obtener succinato. El tercer gen (C) corresponde a la enzima lactato deshidrogenasa que permite la formación de lactato a partir de piruvato.

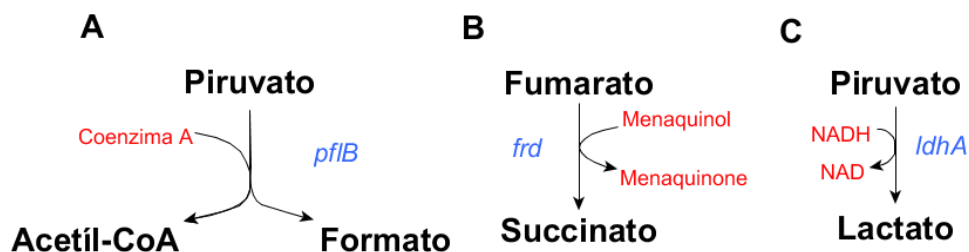


Figura 16 Genes eliminados del genoma de BAL 1611 (Wargacki et al., 2012).

Por toda la información mencionada anteriormente, se busca modificar la cepa BAL 1611 para que sintetice ácido hialurónico, una molécula de alto valor en el mercado, utilizando dos de los carbohidratos que se encuentran en mayor abundancia en las algas pardas, alginato y manito, como fuente de carbono.

OBJETIVOS

Capítulo 2

2.1 Objetivo General

El objetivo general de este estudio es generar una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar ácido hialurónico, utilizando carbohidratos de algas como materia prima.

2.2 Objetivos Específicos

Para desarrollar este trabajo, se plantearon objetivos específicos que se mencionan a continuación:

- Eliminación de genes que produzcan subproductos metabólicos, tales como los de la vía de síntesis de etanol.
- Incorporación de genes de *streptococcus* para producción de ácido hialurónico en la cepa BAL 1611 modificada.
- Evaluación de la producción de AH por la cepa modificada y prospección de posible optimización de la producción.
- Diseño de un modelo metabólico correspondiente a la nueva cepa de *E. coli* que caracterice la producción de AH.

METODOLOGÍA

Capítulo 3

3.1 Plan de Trabajo

El plan de trabajo dentro de esta tesis consistió, en primer lugar, en realizar knock-out de genes de producción de etanol, estos genes son *AdhB* (alcohol deshidrogenasa) y *pdc* (piruvato descarboxilasa) que son exógenos a *E. coli*. Para ello se utiliza un método descrito por Wanner y Datsenko. Posteriormente se desea incorporar los genes de síntesis de ácido Hialurónico para iniciar la producción. Para ello se utiliza un plásmido que contiene los genes faltantes, *ugd* (UDP-Glucosa Deshidrogenasa) y *hasA* (Ácido Hialurónico Sintasa). Luego se quiere cuantificar la producción, para ello se selecciona un método de cuantificación. Primero se experimenta con un método que utiliza el equipo de HPLC y otro en donde se realiza la degradación del ácido por hialuronidasas. Finalmente, se realiza un análisis de flujos metabólicos a la cepa resultante, donde se caracteriza la cepa y analiza posibles nuevas estrategias para mejorar la síntesis de ácido hialurónico.

3.2 Materiales

Entre los materiales y reactivos utilizados en este trabajo se incluye: fosfato de sodio (Merck), ácido acético (Merck), cloruro de sodio (Merck), SDS (Calbiochem), dNTP set (Fermenta), sal de ácido hialurónico sódico (Sigma), hialuronidasa de bovino (Sigma), 1 kb Ladder (Invitrogen), DNA polimerasa Phusion (NEB), DNA polimerasa Taq (Promega), suero de albumina bovina (Sigma), ampicilina (Winkler), etanol absoluto (Merck), ácido tricloroacético (Merck), Bacto agar (Difco), Arabinosa (Sigma), cloranfenicol (Calbiochem), LB base Miller (Difco), manitol (Merck), alginato de sodio (Sigma), cloruro de calcio (Merck), cloruro de magnesio (Merck).

3.3 Equipos

Equipos utilizados durante el trabajo de tesis incluyen: electroporador, termociclador, cámara de electroforesis, centrifuga, shaker, espectrofotómetro, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), columna Biorad Aminex HPX-87H, columna OHpak SB-806M HQ, sensor UV, sensor de índice de refracción, columna PD-10, thermomixer, pHmetro, autoclave.

3.4 Metodología Experimental

A continuación, se presenta, en detalle, la metodología experimental realizada durante el trabajo de tesis.

3.4.1 Knock-Out de genes

Para lograr la eliminación de los genes de producción de etanol provenientes de *Z. mobilis*, se realiza en base al método descrito por (Datsenko y Wanner, 2000) y ha sido utilizado en trabajos como (Sandoval, 2014; Wargacki et al., 2012). En la Figura 17 se describe este método. En primer lugar, se amplifica un fragmento por la reacción de PCR que contenga un gen de resistencia a algún antibiótico. En este trabajo se utiliza el plasmidio pKD3 como templado. Este plásmido contiene el gen *CAT* (cloranfenicol acetiltransferasa) que le permite a la cepa adquirir la resistencia al antibiótico cloranfenicol. Este gen de resistencia o marcador esta flanqueado por sitios de reconocimientos a flipasas (FRT). Además, este fragmento debe contener extremos con secuencias diferentes que correspondan con las zonas dónde se desea realiza la recombinación homóloga (en color rojo en la Figura 17). Una vez realizado la recombinación, es posible eliminar el gen de resistencia gracias a la presencia de los FRT para realizar otras transformaciones con el mismo marcador de selección.

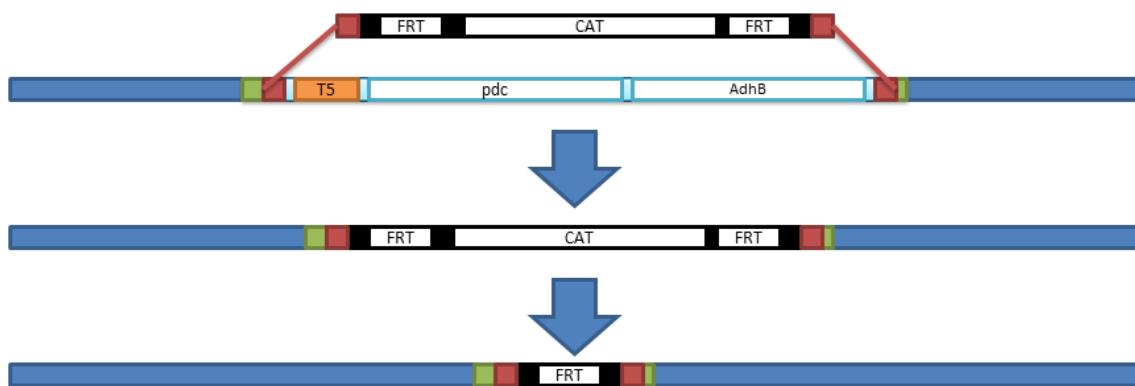


Figura 17 Diagrama que describe el método utilizado por (Datsenko y Wanner, 2000), aplicado al trabajo de tesis.

3.4.2 Células de *E. coli* electrocompetentes

Para obtener una electroporación exitosa, es necesario que las cepas a utilizar cumplan con algunas condiciones, entre ellas se encuentra que las células estén presentes con la menor cantidad de sales al momento de la descarga eléctrica. De esta manera se evita que las células fallezcan por una electrocución. Además de concentrar la cantidad de células para aumentar las posibilidades de que el plasmidio ingrese al citoplasma de la célula. Se efectúa un cultivo por la noche de la cepa BAL 1611, luego, a partir de este cultivo se realiza un escalamiento de 1:100 (volumen: volumen). Se mide la densidad óptica a 600 [nm], utilizando un espectrofotómetro. Una vez que se tenga una OD₆₀₀ de entre 0.5 [] y 0.6 [], se realiza un lavado y concentración de células. Este lavado consiste en Centrifugar a 1500 [RCF] a 4 [°C], eliminar el sobrenadante y lavar con glicerol 10

[%] frío a 4 [°C] a un mismo volumen el primer ciclo y con menor volumen los siguientes ciclos, logrando concentrar unas 50-100 veces. El proceso se realiza manteniendo las células en hielo. Las muestras que no se utilicen para electroporar se almacenan a -80 [°C].

3.4.3 Electroporación con plásmido pkD46

Para la transformación, se utiliza 50 [μl] de células electrocompetentes y 2 [μl] de pkD46, se colocan dentro de una cubeta para luego aplicar una descarga de 2200 [V], en un electroporador. Una vez realizada la descarga en las células, estas se colocan en 1 [ml] con medio LB líquido a 30 [°C] por 1 [h] y en agitación de 200 [RPM]. Una vez cumplido el tiempo, se siembran 100 [μl] del cultivo en una placa con medio LB y ampicilina. El resto de cultivo se centrifuga a 5000 [RPM], se extrae sobrenadante hasta quedar con 10 [μl]. Se resuspende las células y se siembra en placas con medio LB agar y ampicilina. Las placas recién sembradas se dejan a 30 [°C] por la noche. Al día siguiente se elige una colonia candidato para ser cultivado en 10 [ml] de cultivo LB con ampicilina. Se induce con L-arabinosa 1 [M] al tener una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,1 []. Luego se cultiva a 30 [°C] con una agitación de 200 [RPM] hasta obtener una OD₆₀₀ de 0,6 [] y se repite el proceso de obtener células electrocompetentes de manera análoga a como ha sido descrito anteriormente en la sección 3.4.2.

3.4.4 Transformación con fragmento (producto de la amplificación con plásmido pkD3)

Para la transformación, se utiliza 40 [μl] de células electrocompetentes y 10 [μl] de fragmento, se dispensan en una cubeta y se aplica una descarga de 2200 [V]. Una vez realizado la electroporación a las células, estas se cultivan en medio LB líquido a 37 [°C] por 1 [h] y en agitación a 200 [RPM].

Una vez cumplido el tiempo, se siembran 100 [μl] del cultivo en una placa de medio LB con cloranfenicol. El resto de cultivo se centrifuga a 5000 [RPM], se extrae sobrenadante hasta quedar con un volumen total de 100 [μl]. Se resuspende las células y se siembra en otra placa nueva. Las placas recién sembradas se dejan a 37 [°C] por la noche y se seleccionan las colonias para realizar una reacción de PCR para la verificación de la inserción del fragmento.

3.4.5 Preparación de gel para electroforesis

Para preparar 100 [ml] de gel al 1 [%], se mezclan 1 [g] de agarosa en polvo con 100 [ml] de buffer TAE 1X. Luego se calienta la mezcla hasta que el líquido sea transparente. Luego se enfría y se agrega 5 [μl] de bromuro. Este gel se utilizó tanto para

verificar la presencia de los fragmentos de interés como también para realizar purificaciones de fragmentos.

3.4.6 Electroforesis

Una vez calentada la mezcla antes mencionada, se vierte en un recipiente con el molde que permita obtener carriles donde verter las muestras a analizar. Luego se deja enfriar hasta que el gel se solidifique. Se extrae la peineta, mientras que el molde con el gel se coloca en el equipo y se llena en buffer TAE 1X. El gel debe quedar completamente sumergido en el buffer. Después, en el primer carril, se agrega 5 [µl] de ladder Generuler 1kb plus. Para los otros carriles se utiliza 1 [µl] de buffer carga 6X y 5 [µl] de la muestra de interés. Una vez que se agrega todas las muestras, el gel es inducido a una corriente eléctrica de 40 [V] por aproximadamente 45 [min]. Una vez completado este tiempo, el gel se expone a luz UV para la identificación de bandas.

3.4.7 Reacción de PCR

Los protocolos para realizar una reacción de PCR son específicos para la ADN polimerasa que se esté utilizando. En este caso, se utilizan los partidores “forward” (FW) que contiene dos partes, una que alinea con la zona final del gen de la subunidad D de fumarato reductasa en el genoma de la cepa BAL 1611 de un largo de 39 [pb] y una segunda parte que contiene el código para alinear en el sitio específico del plásmido pKD3. Para el caso del partidador “reverse” (RV), también contiene dos partes. Una parte consiste en una secuencia que alinea en la zona al principio del gen de la subunidad flavoproteína de la enzima fumarato reductasa. La segunda parte consiste en una secuencia que alinea con un sitio específico del plásmido pKD3. Los partidores utilizados se detallan en la tabla a continuación. Para todos los casos, se mezclan los reactivos que se detallan en la Tabla III pero con la precaución de agregar al final la polimerasa con el objetivo de reducir la cantidad de reacciones no deseadas, como también de mantener la máxima actividad desde el inicio de la reacción. Luego, cada muestra se coloca en el termociclador con el programa que también se detalla en la Tabla III. Estos partidores son diseñados con respecto a la sección que alinea al plásmido pKD3. Estas secciones se muestran en negrita, mientras que el resto corresponde a la secuencia que alinea con el genoma de BAL1611 cuando se realice la recombinación homóloga. Luego se verifica la presencia de producto al realizar una electroforesis. La banda de interés es de aproximadamente 1,1 [kpb] de largo. Luego se realiza una extracción gel del fragmento, siguiendo las instrucciones del kit con el mínimo volumen de eluyente para maximizar la concentración.

Tabla II Partidores utilizados para la generación del fragmento para el knock-out.

Partidores	T _m [°C]	Secuencia Completa (5' a 3') (59 [pb])
EC pdc-adhB PKD3 FW	58,1	GACACCAATCAGCGTGACAACACTGTCAGGATAGCAGCCAGGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC
EC pdc-adhB PKD3 RV	54,8	CTCAAAAAGTATACCCGATGCGTAGCCATACCGTTGCTGCATG GGAATTAGCCATGGTCC

3.4.7.1 Amplificación de ADN mediante PCR

En la tabla a continuación se muestra los reactivos utilizados para la reacción. Para esta reacción se utiliza la polimerasa Phusion.

Tabla III Reactivos y cantidades utilizadas en las reacciones con polimerasa Phusion para cada tubo, para el caso con una temperatura y un gradiente de temperaturas.

Reactivo	Volumen [µl]
Tampon HF (5x)	10,0
10 [mM] dNTP	1,0
10 [µM] Partidor FW	2,5
10 [µM] Partidor RV	2,5
DMSO	1,5
Templado	1,0
Agua	31,0
Polimerasa Phusion	0,5
Total	50

Para la reacción de PCR, donde se amplifica el plásmido obtenido de la miniprep, se utiliza el siguiente programa:

Tabla IV Programa utilizado para la polimerasa Phusion.

	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]
Iniciación	98	0:30
	98	0:05
30 Ciclos	64	0:20
	72	0:20
Terminación	72	5:00

3.4.8 Verificación de inserción de fragmento por PCR de Colonia

Para la verificación, se realiza una reacción de PCR de colonia preparando el templado como se menciona anteriormente, como también el protocolo para la reacción de PCR de colonia, pero con algunas diferencias en ambos casos.

Para la verificación, se diseñaron partidores de manera tal que amplificaran distintos genes dentro de la zona de interés. En la Figura 18 se muestra la zona de interés en el genoma de BAL 1611. Los genes de interés a eliminar son *pdc* (piruvato descarboxilasa) y *AdhB* (alcohol deshidrogenasa). Los genes en color verde corresponden a genes que flanquean la zona de interés. Estos genes son *EcolC_3855* (proteína relacionada a lisil-tRNA sintetasa) y *EcolC_3860* (beta lactamasa). Los partidores son representados con flechas de color negro. La zona nombrada con T5 es un promotor proveniente del bacteriófago T5.



Figura 18 Diagrama que representa la zona de interés en el genoma de BAL 1611.

3.4.9 Reacción de PCR de Colonia

Los protocolos para realizar la reacción de PCR son específicos para la DNA polimerasa que se esté utilizando. En este caso se utiliza la DNA polimerasa Taq. Se utiliza pares de partidores FW y RV que se alinean con la zona inicial y final respectivamente de los genes que codifican para las enzimas alcohol deshidrogenasa (*AdhB*) y piruvato descarboxilasa (*pdc*). Sus características se detallan en la Tabla V. Para todos los casos, se mezclan los reactivos que se detallan posteriormente con la precaución de agregar al final la polimerasa y evitar reacciones no deseadas, como también la pérdida de actividad. Luego, cada muestra se coloca en el termociclador con el programa que también se detalla posteriormente para cada caso. Luego se verifica la presencia de producto al realizar una electroforesis. Las bandas de interés son de un tamaño aproximado de 1050 y 1650 [pb] respectivamente.

Tabla V Partidores diseñados para la comprobación de la eliminación de genes de *Z. mobilis*.

Partidores	T _m [°C]	Secuencia (5' a 3')
EC <i>Z.mobilis AdhB</i> FW	56,8	GTCAACGAAATGGGCGAAGG
EC <i>Z.mobilis AdhB</i> RV	56,8	AGCATCTTTCAGAGCGTGGT
EC <i>Z.mobilis pdc</i> FW	59,8	GGCTTACGGCTGTTGGCG
EC <i>Z.mobilis pdc</i> RV	57,1	GGCTTGTCCAGATTGGTCTCA

3.4.9.1 Otros Partidores

También se diseñaron otros partidores para ser utilizados como controles para los protocolos de verificación. Estos partidores amplifican genes que se encuentran próximos a la zona donde se encuentra los genes de *Z. mobilis*. Estos genes son lysyl-tRNA y β -Lactamasa. El tamaño aproximado de los fragmentos amplificados es de 360 y 930 [pb] respectivamente. En la tabla VI se muestra un detalle de estos partidores.

Tabla VI Partidores diseñados para la presencia de genes que flanquean los de interes.

Partidores	T _m [°C]	Secuencia (5' a 3')
EC ATCC8739 lysyl-tRNA FW	58,1	TCAACACCTAATGCCACGCC
EC ATCC8739 lysyl-tRNA RV	56,9	TTGCTGATACCGAAGAAGACCG
EC ATCC8739 B-Lact FW	54,5	TTACTTTACCTGGGGCTATGC
EC ATCC8739 B-Lact RV	58,0	CGACTCTCGCTGGATTGGG

3.4.9.2 Amplificación de DNA mediante PCR

En la tabla a continuación se muestra los reactivos y sus cantidades respectivas utilizadas. En esta amplificación se utiliza la polimerasa GoTaq (Promega).

Tabla VII Reactivos utilizados en una reacción con GoTaq.

Reactivo	Volumen [μl]
Tampon Flexi GoTaq (5x)	5
dNTP	0,5
MgCl ₂	1,5
10 [μM] Partidor Fw	1
10 [μM] Partidor Rv	1
GoTaq Polimerasa	0,12
DMSO	0,5
Templado	1
Agua	14,38
Total	25

Se utiliza el siguiente programa para realizar la amplificación por la reacción de PCR:

Tabla VIII Programa utilizado para la polimerasa GoTaq.

	Temperatura [°C]	Tiempo [min:seg]
Iniciación	95	5:00
	95	1:00
30 Ciclos	58,6	0:45
	72	4:00
Terminación	72	10:00

3.4.10 Incorporación de genes para la síntesis de ácido hialurónico

Una vez que se verifique la transformación, se realiza la transformación para incorporar la vía de síntesis de Ácido hialurónico a la nueva cepa recombinante. Para ello se realizan los siguientes procedimientos.

3.4.10.1 Preparación de células electrocompetentes

Para obtener células electrocompetentes, se realiza de manera análoga a como se menciona antes en la sección 3.4.3, pero se utiliza la nueva cepa recombinante.

3.4.10.2 Transformación con Plásmido pMBAD

La transformación se realiza de manera similar a como se menciona antes con el plásmido pkD46. Las diferencias son la utilización de un plásmido diferente, el antibiótico de las placas de selección (ampicilina) y la temperatura de incubación del cultivo (37 [°C]). Se incubó por una noche. El plásmido pMBAD-*sseAB* a utilizar se muestra en la Figura 19. Este plásmido contiene los genes provenientes de *Streptococcus equisimilis* y ha sido utilizado en otros trabajos (Vaisman, 2014; Yu y Stephanopoulos, 2008).

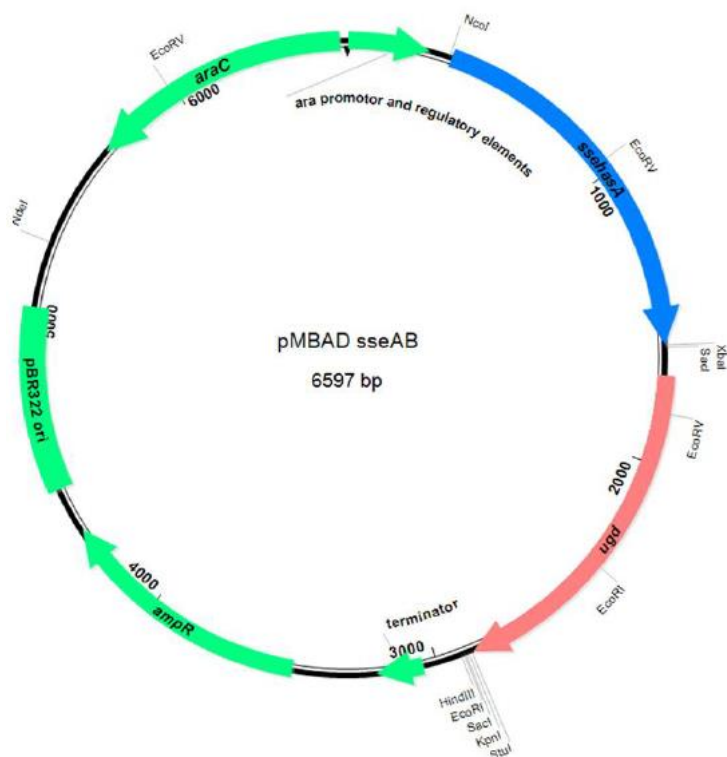


Figura 19 Esquema del plásmido pMBAD-*sseAB*.(Vaisman, 2014)

3.4.11 Preparación de medio LB líquido.

Para la preparación de 100 [ml] de medio de cultivo se agregan 1,55 [g] de medio LB en polvo, 0,95 [g] de NaCl en caso que el medio no contenga y completar con agua hasta los 100 [ml]. Luego, este medio es dosificado en tubos de ensayos con 5 [ml] de medio en cada uno (u otro recipiente con otros volúmenes) y se esterilizan.

3.4.12 Cultivo en medio LB líquido

Para los siguientes procedimientos, se tomaron medidas de manera tal de mantener un ambiente estéril. Una vez que los tubos con medio LB estén esterilizados, se toma una muestra de cultivo de la cepa de interés con una punta estéril para la micropipeta, se deja dentro del tubo correspondiente y se tapa. Luego los tubos se colocan en agitación a 200 [RPM] a una temperatura de 37 [°C] por toda la noche.

3.4.13 Preparación de medio líquido M9 con alginato al 1 [%]

Para la preparación de 100 [ml] de este medio de cultivo se prepara la solución de sales M9 a una concentración 10X con las sales que se muestran en la Tabla IX. Una vez agregada estas sales, se ajusta el pH a 7,2 y se esteriliza en autoclave. Por otro lado, se prepara una solución con alginato al 4 [%]. En esta solución se agregan 4 [g] de alginato

de sodio, se completa a 100 [ml] con agua destilada y se agita hasta que el alginato de sodio se disuelva por completo. Luego, se esteriliza esta solución en autoclave. Además, se preparan soluciones de sulfato de magnesio (MgSO_4) y de cloruro de calcio (CaCl_2) a una concentración de 1 [M] en ambos casos. Estas dos soluciones se esterilizan por filtración. Una vez que las soluciones que fueron esterilizadas en autoclave se enfrían, se prepara el medio mínimo. En la Tabla X, se muestran las cantidades para la preparación de 100 [ml] de medio M9. Además, se agrega sulfato de magnesio y cloruro de calcio a una concentración final de 2 [mM] y 0,1 [mM] respectivamente. En otros casos se preparan cultivos con diferentes proporciones de alginato y manitol, además de variar en la concentración total. En otros casos en dónde se agregue manitol, se toma una proporción peso-peso con respecto a alginato para calcular las cantidades.

TABLA IX Compuestos para preparar medio mínimo M9.

Compuesto	Cantidad [g]
Na_2HPO_4	6
KH_2PO_4	3
NaCl	0,5
NH_4Cl	1
H_2O	Completar a 100 [ml]

TABLA X Compuestos para preparar una fermentación de medio mínimo con alginato como única fuente de carbono.

Compuesto	Volumen [ml]
Alginato 4 [%]	25
Manitol 1 [M]	0
M9 10X	10
MgSO_4 1 [M]	0,2
CaCl_2 1 [M]	0,01
H_2O	64,79

3.4.14 Condiciones de cultivo para la producción de ácido hialurónico

En primer lugar, los medios de cultivo se preparan de manera similar a los medios que se describen anteriormente. Las diferencias son que se utilizan medios con una proporción de carbohidratos, para efectos de este trabajo, de alginato y manitol de 2:1, además de una concentración total de azúcares de 1 [%] en los cultivos. Los cultivos tienen dos etapas. La primera etapa tiene como objetivo producir biomasa en un tiempo corto, en donde se tiene el cultivo en medio LB con antibióticos AMP y/o CAM (cuando

corresponda) a 37 [°C] y se monitorea la densidad óptica hasta llegar a una OD₆₀₀ de alrededor de 0,8 a 1. Luego, se inicia la segunda etapa con la inducción del cultivo con arabinosa a una concentración final de 0,05 [g/l]. Para mejorar la actividad de la enzima con el cofactor Mg⁺², se agrega cloruro de magnesio (MgCl₂) a una concentración final de 10 [mM] y se reduce la temperatura a 30 [°C] para disminuir la generación de biomasa, lo que permite aumentar la producción de ácido hialurónico. Después de 2 [h] de la primera inducción, se realiza una segunda inducción con adición de arabinosa a una concentración final de 0,05 [g/l]. Además, se agrega alginato y manitol los que suman una concentración final de 1 [%] en una proporción definida de cada uno. A las 24 [h] de inicio del cultivo, se agrega nuevamente estos azúcares a una concentración final de 1 [%]. Finalmente, a las 48 [h] de cultivo, se inicia la recuperación de ácido hialurónico desde el medio de cultivo.

3.4.15 Concentración de Ácido Hialurónico producido en *E. coli*

A un cultivo de 100 [ml] se adiciona 5 [ml] de ácido tricloroacético 100 [%]. Esto ayuda en la separación de las células del caldo, como también en la separación del ácido hialurónico. Luego, se centrifuga por 10 [min] a 7000 [g] para obtener el sobrenadante. Luego este se diluye en un volumen de 0,1 [%] (p/v) de dodecilsulfato sódico (SDS), correspondiente a 100 [ml] en este caso. Se deja incubar por 10 [min] a temperatura ambiente para liberar el ácido hialurónico que esté encapsulado. Luego se agrega 2 volúmenes de etanol (200 [ml]) y se incuba por 1 [h] a 4 [°C] para precipitar el ácido. Una vez cumplido el tiempo, se centrifuga a 3000 [RPM] por 20 [min] a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante. Luego se resuspende en 5 [ml] de NaCl 0,1 [M] para concentrar la muestra. Finalmente se incuba por 10 [min].

3.4.16 Obtención de muestras y medición de las concentraciones de carbohidratos, etanol y ácido hialurónico en muestras de cultivo

Se obtienen muestras tanto para la medición de la densidad óptica como también para posterior análisis de las cantidades de compuestos de interés. Al momento de la obtención de las muestras se realiza una filtración de esta, utilizando filtros de un tamaño de poro de 0,22 [µm]. Luego se almacenan en tubos Eppendorf con capacidad de 1,5 [ml], envueltos en papel aluminio y a -20 [°C]. Las muestras a cuantificar se descongelan y son diluidas 5 veces en viales de 1,5 [ml] de capacidad. Para el análisis, se utiliza el equipo de HPLC Shimadzu con la columna Biorad Aminex HPX-87H donde se utiliza H₂SO₄ 0,005 [M] como medio, 0,5 [ml/min] de flujo y una temperatura de 45 [°C] para la cuantificación de carbohidratos (alginato y manitol) y etanol. Se utilizó 10 [µl] como volumen de inyección y el equipo de índice de refracción como detector. Se prepararon estándares en el rango que se describe en la Tabla XI. En el caso de cuantificar la cantidad de ácido hialurónico, se utiliza la columna Shodex OHPak SB-806M HQ donde se utiliza NaNO₃

0,1 [M] como medio, 0,5 [ml/min] de flujo y una temperatura de 40 [°C]. Se utilizó 50 [µl] como volumen de inyección y el equipo de índice de refracción como detector. Se prepararon soluciones estándares de 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 y 1 [g/l] para cuantificar la concentración en las muestras.

Tabla XI Rango de los estándares preparados.

Compuesto	Rango [g/l]
Alginato	1 a 10
Manitol	0,02 a 0,2
Etanol	0,2 a 2
Arabinosa	0,02 a 0,2
Acetato	0,2 a 2

3.4.17 Cuantificación de la concentración de ácido hialurónico utilizando un método turbidimétrico

Este método se basa en un ensayo enzimático (Dorfman, 1955; Dorfman y Ott, 1948; Sigma-Aldrich, 2016) de hialuronidasas que utiliza ácido hialurónico como sustrato en la reacción (Song et al., 2009). Las hialuronidasas hidrolizan las cadenas poliméricas de ácido Hialurónico (Stern y Jedrzejcas, 2006) para luego agregar un suero de albúmina ácida con el cual se produce la turbiedad. (Dorfman y Ott, 1948) En primer lugar se preparan los medios necesarios. Tanto para las muestras a medir como los estándares, se prepara un buffer de fosfato de sodio 300 [mM] a pH 5,35 (reactivo A). Para 10 [ml] de buffer, se utiliza 414 [mg] de fosfato de sodio y se ajusta el pH con hidróxido de sodio. Es necesario que las muestras se encuentren en las condiciones adecuadas para realizar el protocolo. Para ello, se realiza una desalación de las muestras utilizando la columna PD-10 de GE para luego utilizar el reactivo A como medio de elución. El protocolo se encuentra descrito en el manual de la misma columna (GE Healthcare, 2007). Además, se prepara los estándares para elaborar la curva estándar. Para esta curva se utilizaron concentraciones de 0,6, 0,4, 0,2 y 0,1 [g/l] de ácido hialurónico en reactivo A. Por otro lado, se prepara el buffer de fosfato de sodio 20 [mM], cloruro de sodio 77 [mM] y albúmina de suero bovino a 0,1 [g/l] en pH 7.0 (reactivo B) para la hialuronidasa. En 10 [ml] de reactivo B, se agrega 27,6 [mg] de fosfato de sodio, 45 [mg] de cloruro de sodio, 1 [mg] de albúmina de suero bovino en agua purificada y se ajusta el pH con hidróxido de sodio. Luego se prepara un stock de hialuronidasa a una concentración aproximada de 5000 [U/ml] y se almacena a 20[°C]. De este concentrado se diluye en reactivo B hasta 50 [U/ml] para realizar la cuantificación. Finalmente, se prepara el último reactivo de acetato de sodio 24 [mM], ácido acético 79 [mM] y albúmina de suero bovino 1 [g/l] pH 3.75 (reactivo C) que produce la reacción de turbiedad con los oligómeros de ácido hialurónico. Para 10 [ml] de reactivo C, se agrega 19,7 [g] de acetato de sodio, 50 [µl] de ácido acético

puro, 10 [mg] de albúmina de suero bovino en agua purificada y se ajusta el pH con ácido clorhídrico.

3.4.17.1 Elaboración de curva de calibración y cuantificación de ácido hialurónico

Para la elaboración de la curva estándar, se utilizaron las cantidades que se describen en la Tabla XII. En primer lugar, se incuba la muestra de hialuronidasa a 37 [°C] por 10 [min]. Luego se agrega ácido hialurónico y reactivo B en las cantidades correspondientes y se incuba por 45 [min] a 37 [°C]. Posteriormente, se mezcla 0,25 [ml] de esta muestra en 1,25 [ml] de reactivo C y se incubar por 10 [min] a temperatura ambiente. Finalmente se mide la absorbancia a 600 [nm].

TABLA XII Composición de cada muestra para curva de calibración.

Muestra	Blanco	1	2	3	4
Concentración [g/l]	0	0,6	0,4	0,2	0,1
Hialuronidasa (10 [u/ml]) [ml]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ácido Hialurónico (1 [g/l]) [ml]	0	0,3	0,2	0,1	0,05
Reactivo B [ml]	0,5	0,2	0,3	0,4	0,45

Para el caso de las muestras, el protocolo es similar, pero en vez de ácido hialurónico y reactivo B, se utiliza las muestras que correspondan como se describe en la Tabla XIII.

TABLA XIII Composición de muestras para análisis de concentración de ácido hialurónico.

	Blanco	Muestra
Concentración [g/l]	0	N/A
Hialuronidasa [ml]	0,5	0,5
Muestra [ml]	0	0,5
Reactivo B [ml]	0,5	0

3.4.18 Cultivos para FBA

Para realizar el análisis de balance de flujo, se utilizaron medios mínimos de M9 con alginato y manitol a una proporción definida, como únicas fuentes de carbono. Además, se utiliza la cepa modificada para los cultivos. Para un cultivo de 200 [ml], primero se deja crecer inóculos con 5 [ml] de este medio desde el día anterior. Luego, se inocula un matraz con 50 [ml] de medio fresco. Una vez que alcance una OD₆₀₀ de 1,0 se induce la producción de ácido hialurónico agregando L-arabinosa a una concentración

final de 0,1 [g/l]. A las 24 [h] de cultivo, se verifica que el cultivo tenga una OD₆₀₀ de entre 0,3 y 0,7 [] y se agregan 150 [ml] de medio fresco. Una vez agregado el medio, se inicia la toma de muestras cada 30 [min] en dónde se toman 1,5 [ml] para la medición de ácido hialurónico, 1,5 [ml] para la medición de azúcares y etanol y se mide la densidad óptica. Esta última muestra se guarda como se menciona en el tema anterior de obtención de muestra. El proceso se realiza hasta que la curva de crecimiento deje la etapa de crecimiento exponencial. Los cultivos se realizaron a una temperatura de 30 [°C] con agitación de 200 [RPM].

3.4.19 FBA (*Flux Balance Analysis*)

Para el análisis de balance de flujo, se utilizó el programa Matlab con el toolbox COBRA (Hyduke et al., 2011; Schellenberger et al., 2011). Se realiza comparaciones de flujos entre los resultados obtenidos experimentalmente con respecto a los flujos óptimos *in silico*. Las condiciones y procedimientos utilizados para realizar esta parte de la tesis son similares a los descritos por (Vaisman, 2014). Entre las diferencias, se encuentra que la temperatura utilizada durante el cultivo es de 30 [°C] y que se utiliza medio M9 con alginato y manitol como fuentes de carbono.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 4

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el trabajo realizado en esta tesis. En este capítulo también se incluye las discusiones pertinentes a cada sección de resultados.

4.1 *Knock-out* de genes para síntesis de etanol desde la cepa BAL 1611

La cepa BAL 1611 es una cepa que contiene modificaciones con el fin de optimizar la producción de etanol. Entre ellas se encuentra los genes de síntesis de etanol provenientes del organismo *Z. mobilis* que permite disminuir el número de pasos para llegar al producto final al producir acetaldehído directamente desde piruvato, en vez de desde acetyl-CoA. Además, contiene acoplado la secuencia correspondiente al promotor del bacteriófago T5. Este promotor tiene una alta afinidad a la enzima RNA polimerasa en *E. coli*. (Gentz y Bujard, 1985) Este paso tiene por objetivo el de disminuir la carga metabólica y la pérdida de recursos de la cepa al eliminar completamente este operón.

4.1.1 Diseño y síntesis de fragmento de ADN para el knock-out

Para llevar a cabo el knock-out, es necesario diseñar partidores específicos para las zonas a realizar la recombinación homóloga. También es importante tener en cuenta el sentido de la recombinación, como también el sentido en que se realiza la transcripción. Dependiendo de ello, se obtiene el éxito de sintetizar la proteína de interés. Los partidores diseñados se detallan en la sección 3.4.1 Se amplifica el fragmento a utilizar a través de una reacción de PCR y se verifica tanto la presencia como el tamaño de este a través de un gel. La amplificación se realiza a partir del plasmidio pkD3 como secuencia molde.

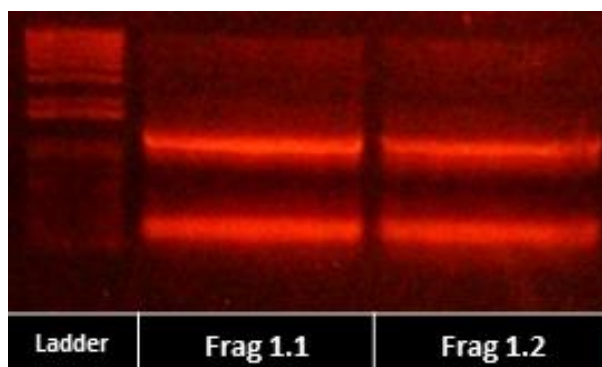


Figura 20 Geles de electroforesis con los fragmentos para el knock-out.

En la Figura 20 se muestra el gel de electroforesis, con la primera columna correspondiente al *ladder* Generuler (sección A.5 en los anexos). Además, se muestran dos columnas correspondientes a dos reacciones diferentes de PCR. En estas dos columnas se aprecian distintivamente 2 bandas de 200 y 1100 [pb] aproximadamente,

donde la banda de mayor tamaño tiene la dimensión correspondiente al fragmento de interés.

4.1.2 Transformación de cepas con pkD46 y fragmento

Una vez que las cepas son transformadas con el fragmento, estas adquieren la resistencia a cloranfenicol. En la Figura 21 se muestran dos cultivos en medio LB con cloranfenicol. El tubo izquierdo corresponde a la nueva cepa y el tubo a la derecha corresponde a un cultivo con la cepa original (BAL 1611). Cómo es posible apreciar, se logra transformar, con éxito, la cepa BAL 1611 a una nueva cepa resistente a cloranfenicol.



Figura 21 Cultivos en tubos de ensayo de *E. coli* transformada (izquierda) y no transformada (derecha) en medio LB con cloranfenicol.

Una vez obtenido esta nueva cepa, es esperable que no tenga presente en el genoma los genes de *Z. mobilis*. Para ello, se realiza comprobaciones en paralelo, por genotipo y por fenotipo, de la ausencia de estos genes.

4.1.3 Comprobación de *knock-out* por genotipo

Por un lado, se realiza la comprobación del *knock-out* al tener ausente los genes en el genoma de la cepa. Para ello, se diseñaron una variedad de pares de partidores que amplifican genes de interés. Estos genes se presentan gráficamente en la Figura 22. Para mayor detalle de las secuencias y protocolos revisar la sección 3.4.1. En primer lugar, se diseña el par de partidores para obtener el fragmento 1 con el objetivo de comparar la diferencia de tamaño de los fragmentos de PCR de colonia entre la cepa original BAL 1611 y la cepa transformada. El tamaño de fragmento esperado en la cepa original debería ser de alrededor de 2900 [pb], si se toma solamente en cuenta los marcos de lectura abierto de los tres genes *in tandem*, y, en la cepa transformada, se espera un tamaño de alrededor de 1100 [pb] aproximadamente, dónde se tiene el gen de resistencia a cloranfenicol y los

sitios FRT. Luego, los siguientes partidores son diseñados en caso que la primera estrategia no sea satisfactoria. Los fragmentos 3 y 4 corresponden a los genes de *Z. mobilis* que tienen tamaños esperados de 1654 y 1053 [pb] respectivamente. Mientras que los fragmentos 2 y 5, corresponden a los genes flancos al operón con tamaños esperados de 363 y 935 [pb] respectivamente.

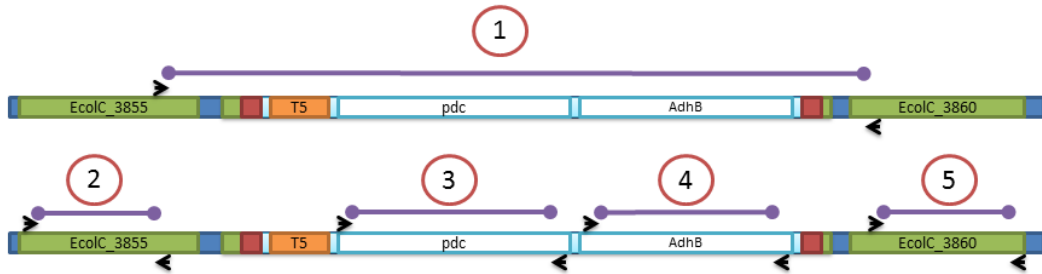


Figura 22 Diagrama de los fragmentos de interés a amplificar.

En la Figura 23 se muestra los geles de electroforesis luego de realizar un protocolo de PCR de colonia. En esta figura, cada columna está nombrada por una letra, seguida por un número que corresponde al set de partidores utilizado (ver Figura 22) y, consecuentemente, el fragmento esperado. Se realiza la PCR para tres colonias que corresponden a la cepa BAL 1611 y las otras dos a clones de la cepa modificada. Como se puede apreciar en la Figura 23, no se aprecia la presencia de banda correspondiente al fragmento 1 en ninguno de los casos (columnas A, B y C), como tampoco del fragmento 3. Por otro lado, se encuentra presente una banda del tamaño esperado en las 3 colonias para los fragmentos 2, 4 y 5, con el fragmento 4 correspondiendo a piruvato descarboxilasa de *Z. mobilis*.

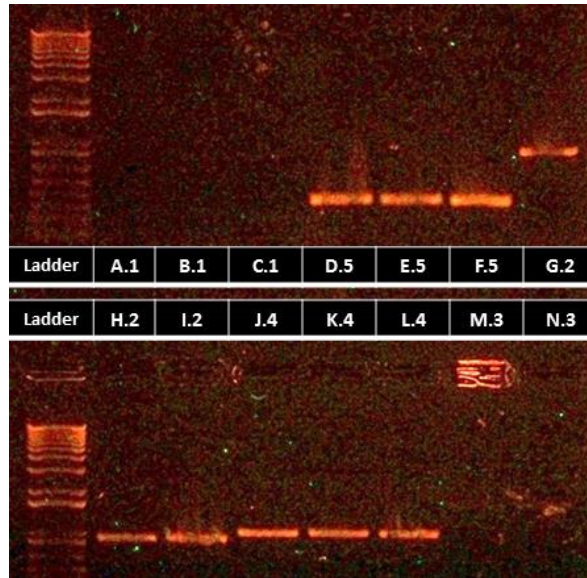


Figura 23 Geles con resultados de la PCR de colonias de cepas de BAL 1611 modificadas y no modificadas.

En la Figura 24, se muestra otro gel en dónde se analiza el producto de la amplificación de otra reacción de PCR de colonia con un gradiente de temperatura con una colonia, pero sin tener éxito de obtener alguna banda para el fragmento 1. Las columnas F, G y H son controles positivos. También se probaron otras temperaturas, tiempos de alineamiento, diferentes concentraciones de partidores y templados, como también de polimerasa y de DMSO, pero no se obtiene éxito en amplificar la banda de interés.

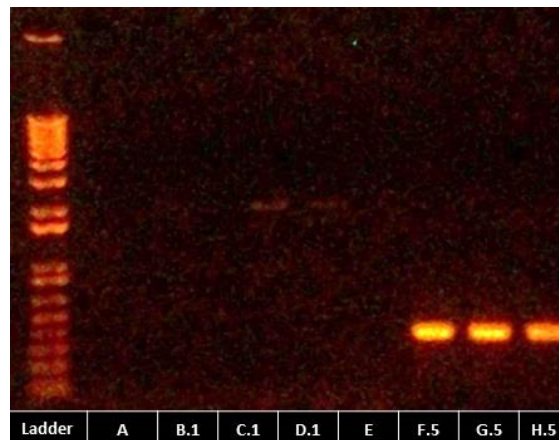


Figura 24 Gel con resultados de la PCR de colonia.

En la Figura 25, se presenta otro gel dónde se verifica la presencia de los genes de *Z. mobilis*. La distribución es similar a la utilizada en la Figura 23, en dónde la primera columna corresponde a la cepa BAL 1611 y las otras dos clones diferentes de la cepa BAL

1611 modificada. Se puede apreciar que ambos genes están presentes en todas las variantes.

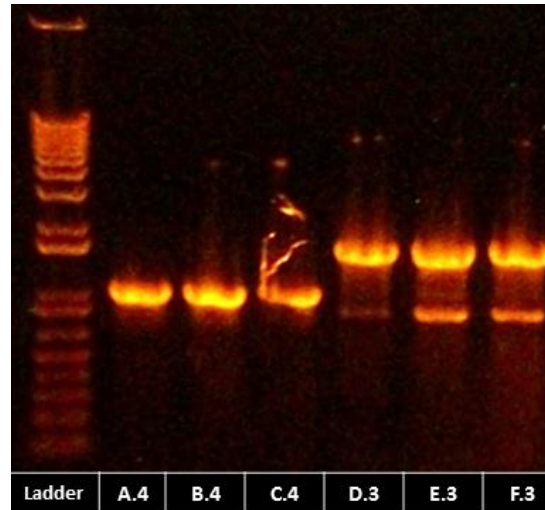


Figura 25 Gel de electroforesis con resultados de una PCR de colonias de cepas de *E. coli*.

Luego de analizar estos resultados, aunque se realicé el procedimiento de *knock-out*, se tiene que en las colonias están aún presentes los genes a eliminar. Por ello, se busca otra estrategia, por producción de etanol.

4.1.4 Comprobación de *knock-out* por Fenotipo

Para la comprobación del *knock-out* realizado a la cepa BAL 1611, se utiliza otra estrategia a través de la verificación por fenotipo. Para ello, se realizaron fermentaciones con las condiciones que se mencionan en la Tabla XIV y se miden las concentraciones de etanol de los diferentes cultivos. Para mayor detalle, en la sección 3.4.12 se encuentra el protocolo de cultivo y la sección 3.4.16 para la medición de concentración de etanol. Este experimento se realizó en duplicado.

Tabla XIV Condiciones utilizadas para la fermentación de comprobación de *knock-out* por fenotipo.

Fermentación	Aeróbica
Volumen Total [ml]	25
Temperatura [°C]	37
Tiempo [h]	8
Agitación [RPM]	200
Medio de Cultivo	LB
Antibiótico	CAM

A partir de la Figura 26, se aprecia diferentes cultivos correspondientes a diferentes clones de la cepa modificada y la original de BAL 1611. Los puntos corresponden a las concentraciones de etanol en diferentes tiempos dentro de la duración

del cultivo. Al inicio de la fermentación, no hay presencia de etanol en el caldo hasta el tiempo 3,77 [h] dónde algunas variantes marcan presencia de este compuesto. Pasado el tiempo de 8 [h], se tiene que el cultivo de la cepa original de BAL 1611 es la que presenta la mayor concentración de etanol, con una concentración de 2,326 [g/l]. Por otro lado, el cultivo de la cepa modificada número 10 contiene la menor cantidad de etanol. En la Figura 27 se tiene el detalle de las curvas de los cultivos de las cepas clones.

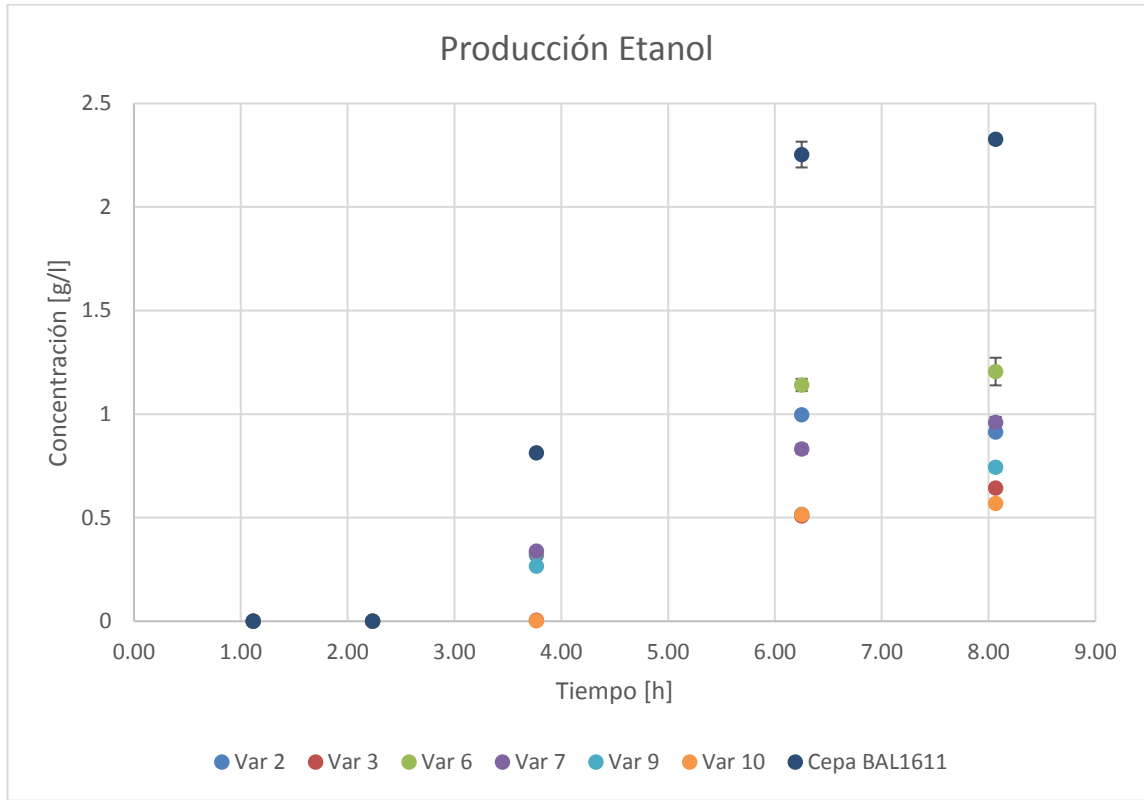


Figura 26 Producción de etanol clones de cepa BAL 1611 modificada.

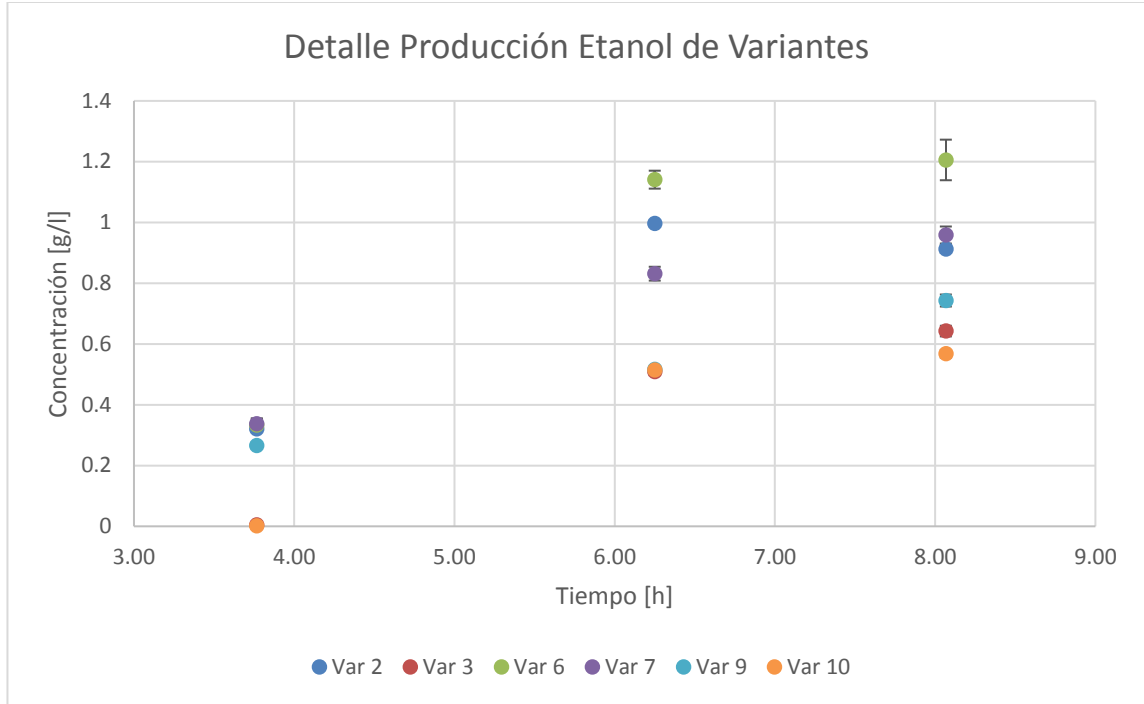


Figura 27 Detalle de la producción de etanol de diferentes clones de cepa BAL 1611 modificada.

En la Figura 28, se muestra la comparación de la concentración de etanol de los diferentes cultivos después de las 8 [h] del inicio de la fermentación. La máxima concentración se presenta en el cultivo de la cepa 6 con 1,206 [g/l]. Por otro lado, el cultivo de la cepa 10 es la de menor concentración de etanol con 0,568 [g/l].

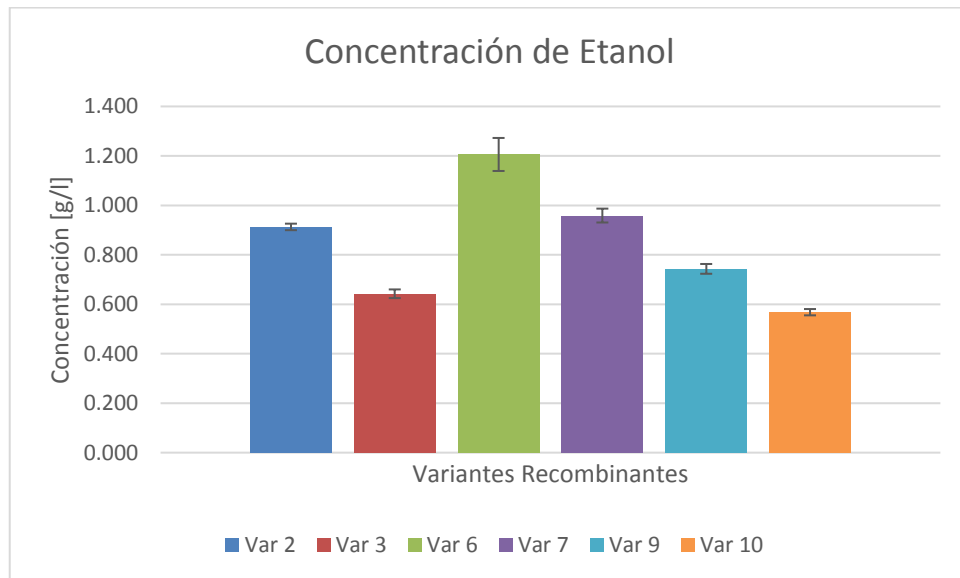


Figura 28 Concentración de Etanol de diferentes variantes recombinantes.

A partir de estos resultados, se selecciona la cepa que produce la menor concentración de etanol. En este caso, es la cepa 10. Se selecciona la cepa que produce la menor concentración debido a que se busca producir otro compuesto. Por ello, se requiere reducir la carga metabólica de producción de etanol y, en vez, producir ácido hialurónico.

Otro punto importante es que en el diseño del operón para la síntesis de etanol, se coloca un promotor T5 de bacteriófago previo a los genes (Figura 18). Este promotor tiene una alta afinidad lo que aumenta el estrés metabólico a la célula por producir más enzima de este operón y desviar recursos a un subproducto que no es de interés en el estudio. Todo esto ocurriendo desde el principio del cultivo.

Cómo se puede apreciar de las figuras anteriores (Figuras 26, 27 y 28), se obtienen variantes que tienen una reducción en la producción de etanol al producir una menor cantidad de esta (siendo más de 4 veces menor a la cepa original). Estas corresponden a las clones 4 y 10. Por otro lado, siendo un cultivo aeróbico, no debería de producir etanol del todo. A través de un análisis bibliográfico, se encuentra que la enzima alcohol deshidrogenasa nativa de *E. coli* tiene actividad durante la fermentación aeróbica pero es 10 veces menor que en un cultivo anaeróbico (Echave et al., 2003; Holland-staley et al., 2000). Por el contrario, la enzima proveniente de *Z. mobilis* se inactiva (Cabiscol et al., 1994), pero no necesariamente por completo ya que tiene un mecanismo similar de inactivación que la nativa de *E. coli*, a través de la oxidación catalizada por metales (Neale et al., 1986).

A partir de los resultados obtenidos de las secciones 4.1.3 y 4.1.4, se tiene que existe una reducción de la producción de etanol por el knock-out realizado pero que no se elimina la presencia de los genes para esta producción, como muestra el gel de electroforesis de la Figura 25. Por ello, se deduce que la recombinación homóloga realizada a la cepa con los genes de *Z. mobilis*, no fue del todo específica y se encuentra presente en otras partes del genoma. Se tendría que realizar un análisis más profundo para corroborar esta hipótesis, como por ejemplo secuenciar el genoma de la cepa BAL 1611.

4.2 Incorporación de genes de producción de ácido hialurónico

La extracción del plásmido se realizó de una cepa que ya se sabe que produce ácido Hialurónico. Es una cepa de *E. coli* Top10 con el plasmidio pMBAD-*sseAB*. Este plasmidio es el mismo utilizado en el trabajo de (Vaisman, 2014). En esta sección, se tiene como objetivo transformar la cepa modificada de la sección anterior con el plasmidio pMBAD-*sseAB*.

En la Figura 29 se muestra un gel de agarosa, dónde las muestras corresponden a las extracciones de plasmidio contenidos en dos cultivos de cepa Top10 con el plasmidio

de interés. El material genético presente en el tope del gel corresponde al plasmidio. Esta acumulación se debe a que los plasmidios son de gran tamaño en comparación a la matriz, lo que dificulta la traslación. Una vez confirmado la presencia del plasmidio, se realiza la transformación de la Cepa 10 (sección 4.1.4) con este plasmidio. La transformación se realiza por electroporación y se cultiva en medio LB con el antibiótico ampicilina, análogo a lo que se realiza en la Figura 21. Esto último es debido a que el plasmidio contiene el gen de resistencia para este antibiótico. Se obtiene cepas resistentes a ampicilina y a cloranfenicol, lo que significa que se tiene éxito en incorporar el plasmidio pMBAD-*sseAB*. La confirmación de la presencia de los genes se realizó a través de la cuantificación de ácido Hialurónico.



Figura 29 gel de electroforesis correspondiente a la extracción de plasmidio de dos cepas top 10.

4.3 Producción de Ácido Hialurónico

Para cuantificar la producción de ácido Hialurónico, es necesario realizar los cultivos para el análisis, las condiciones ocupadas se muestran en la Tabla XV. Para todos los casos en esta sección, se realiza dos inducciones de arabinosa a una concentración final de 0,1 [g/l]. Además, en la primera inducción, se agrega cloruro de magnesio para proveer del cofactor Mg^{+} a la enzima AH sintasa.

Tabla XV Condiciones de cultivo.

Volumen Total [ml]	25
Temperatura [°C]	37/30 (post inducción)
Tiempo [h]	48
Agitación [RPM]	200
Medio de Cultivo	M9 Alginato/Manitol y AMP
Azúcares Totales [%]	2
Proporción (p/p)	2 a 1
Inducción	Arabinosa 1 [M]

4.3.1 Cuantificación por HPLC

Debido a experiencias en otros trabajos como (Sousa et al., 2009; Vaisman, 2014) se decide medir la concentración mediante HPLC. El método utiliza la columna Shodex OHpak SB-806M HQ y NaNO_3 0,1 [M] como medio de elución. En la Figura 30 se muestra los estándares correspondientes al ácido Hialurónico disponible en el laboratorio. Cada curva representa una concentración diferente.

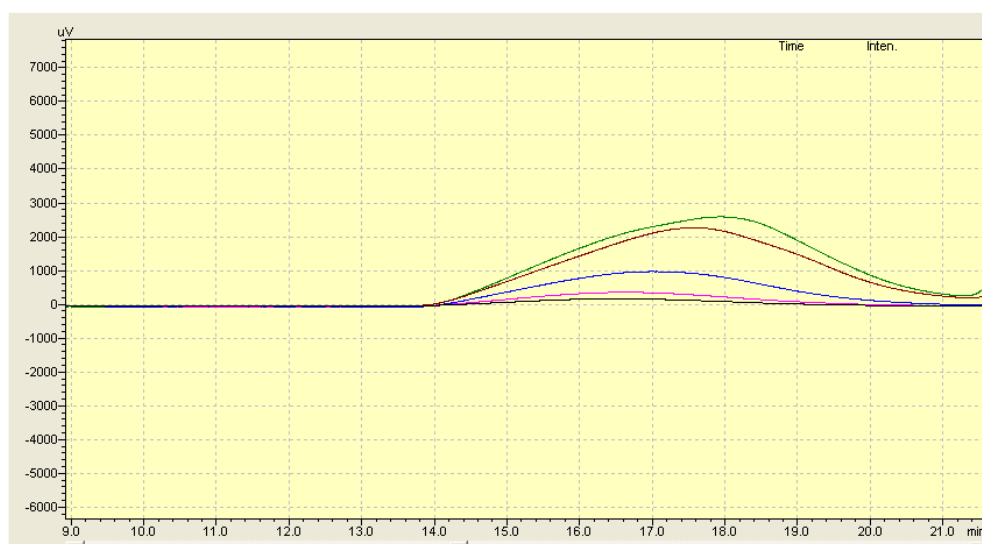


Figura 30 Perfil cromatográfico del estándar de AH a diferentes concentraciones.

Se tomaron muestras de las fermentaciones donde se realizaron la inducción para la síntesis de AH. En la Figura 31 se muestra el perfil cromatográfico para el ácido hialurónico en la cepa recombinante de BAL 1611 (Cepa 10 con el plasmidio pMBAD-*sseAB*). Esto ocurre en ambos casos, cuando se concentra y no las muestras.

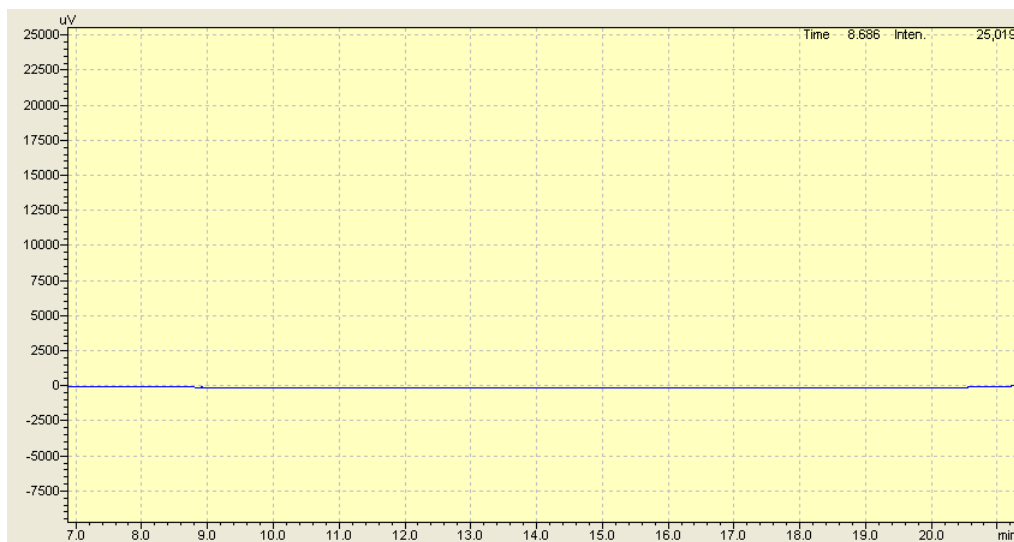


Figura 31 Perfil cromatográfico de la cepa modificada.

Con estos resultados, se puede inferir que no se produce ácido Hialurónico en la nueva cepa. Pero puede ser que no sea el caso, debido a que el tamaño de la molécula afecta en el tiempo que aparece el *peak* correspondiente, como se muestra en la Figura 32. (Shodex, 2016) En esta figura se muestra el ácido hialurónico de diferentes fuentes y que cada fuente tiene un tamaño diferente de la molécula. La tendencia que se puede apreciar es que, al disminuir el tamaño, aumenta el tiempo en que aparece el punto máximo. Por ello, está la posibilidad que el ácido Hialurónico que se produce es de un tamaño menor al del estándar. El ácido hialurónico del estándar corresponde a *Streptococcus equi* que tiene un tamaño promedio del orden de 10^6 [Da]. (Krahulec y Krahulcová, 2006) Además, si el tamaño es pequeño, no es posible de cuantificar con la presencia de monómeros y oligómeros de alginato que producen una superposición de los *peaks* (no se muestra en las figuras anteriores).

Por otro lado, también está la posibilidad de que exista pérdida de ácido hialurónico al utilizar el método de concentración descrito en la sección 3.4.15.

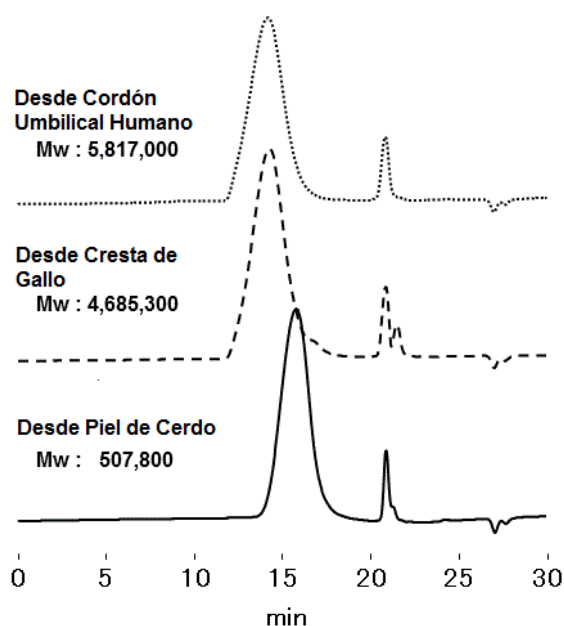


Figura 32 Perfil cromatográfico de ácidos hialurónicos de diferentes fuentes. (Shodex, 2016)

Debido al resultado obtenido, se opta por intentar otra metodología para realizar la cuantificación del ácido hialurónico. Además de medir la concentración tanto antes como después del protocolo de concentración de AH, para verificar si este método afecta la concentración.

4.3.2 Cuantificación por turbidimetría

Con éste método se espera detectar la presencia de ácido hialurónico en el medio de cultivo a través de la cuantificación de la concentración de esta molécula.

Las muestras que se utilizaron para este protocolo fueron sometidas a un cambio de sales en el medio para no afectar la actividad de la enzima hialuronidasa. Luego de este proceso, se construye una curva de calibración con el estándar de ácido hialurónico disponible en laboratorio.

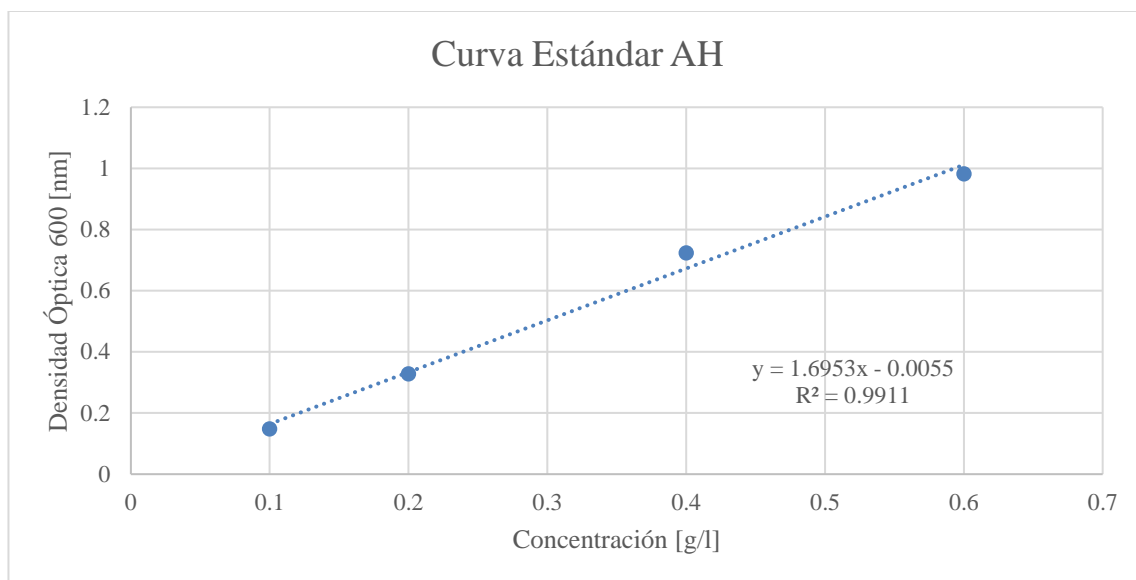


Figura 33 Resultados utilizando el estándar de ácido hialurónico.

A partir de esta figura se tiene que el valor del coeficiente de determinación (R^2) es cercano a uno. Por ello, los datos se ajustan a una recta casi perfectamente por lo cual es posible de interpolar datos. En este caso, es posible de calcular la concentración de AH a partir de la DO_{600} . Además, significa que la variación de concentración de AH, en el rango experimentado, no afecta la medición del espectrofotómetro.

Tabla XVI Condiciones de cultivo para las diferentes cepas.

Cepa	Top 10	Var. 10 LB	Var. 10 M9
Volumen Total [ml]		25	
Temperatura [°C]		37/30 (post inducción)	
Tiempo [h]		48	
Agitación [RPM]		200	
Medio de Cultivo	LB/Glucosa	LB Alginato/Manitol	M9 Alginato/Manitol
Azúcares Totales [%]	N/A		2
Proporción (p/p)	N/A		2 a 1
Inducción		Arabinosa 1 [M]	

Luego, se realiza la cuantificación de los cultivos de la cepa Top 10 en LB con glucosa, la cepa modificada en medio de cultivo LB con alginato y manitol y en medio M9 con alginato y manitol. En las Figura 34, FIGURA 35 y FIGURA 36 se muestran los matraces de cultivo utilizados.



Figura 34 Cultivos con var. 10 (cepa BAL 1611 con reducción en la síntesis de etanol y síntesis de AH) en medio LB con glucosa y ampicilina



Figura 35 Cultivos con var. 10 (cepa BAL 1611 con reducción en la síntesis de etanol y síntesis de AH) en Medio M9 con ampicilina.



Figura 36 Cultivos con var. 10 (cepa BAL 1611 con reducción en la síntesis de etanol y síntesis de AH) en medio LB con con alginato, manitol y ampicilina.

En la Figura 37 se muestra las concentraciones finales de ácido hialurónico de los diferentes cultivos antes y después de realizar el protocolo de concentración (denominado con una C después del nombre de la cepa). Las muestras se tomaron a las 48 horas después de iniciar la fermentación. Se tiene presencia de ácido hialurónico ya que, en el tiempo de 24 [h], el alginato se encuentra completamente degradado por lo que no debería existir interferencia de este en las mediciones. Detalles de los resultados se encuentran en la sección A.3.2 de los anexos. Además, se puede apreciar que, en todos los casos, existe una caída de la concentración después de realizar la concentración del ácido. Por ello, se tiene una pérdida de ácido hialurónico por el protocolo. La mayor pérdida se puede apreciar para la cepa Top10 donde la reducción de un 75 [%] aproximadamente. Es posible que dentro de alguno de los pasos de la concentración (sección 3.4.15) donde se requiere de centrifugar, se tenga una pérdida de ácido hialurónico. Esto es posible ya que se utiliza el sobrenadante para realizar las mediciones y el resto se descarta.

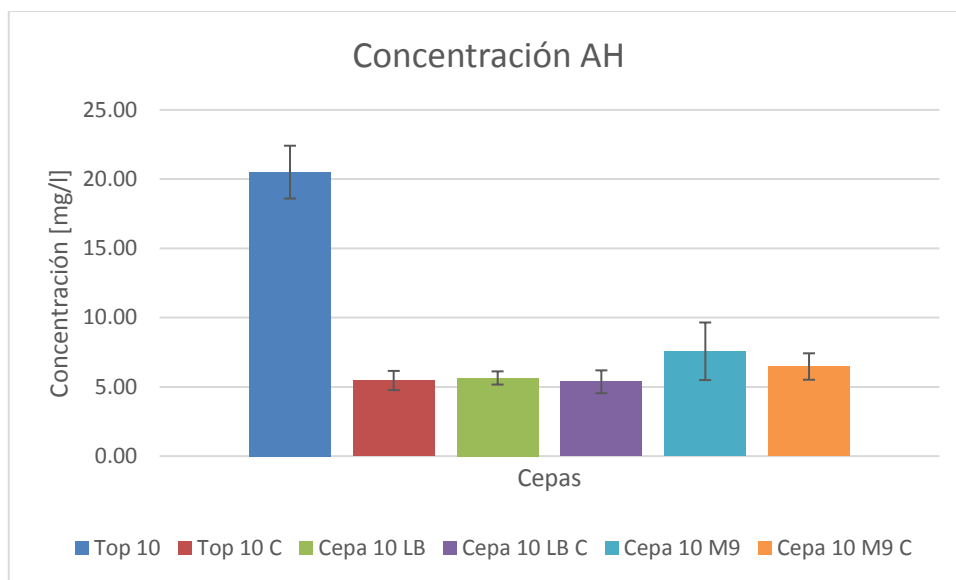


Figura 37 Concentraciones finales de ácido hialurónico.

Finalmente, se decide ocupar el método de cuantificación por turbidimetría con muestras directas de la fermentación sin realizar el proceso de concentración. Aunque se utilicen otros protocolos dónde se concentra las muestras, como en los trabajos de (Sousa et al., 2009; Vaisman, 2014), debido principalmente a la baja concentración que se tiene de ácido hialurónico.

Tabla XVII Rendimientos de ácido hialurónico.

		Rendimiento [mg AH/g Cell]
Top10	Top 10	288.732
	Top 10 C	76.866
Var. 10 LB	Cepa 10 LB	37.184
	Cepa 10 LB C	35.370
Var. 10 M9	Cepa 10 M9	53.483
	Cepa 10 M9 C	45.703

4.4 Análisis de Flujo Metabólico en Nueva Cepa Recombinante

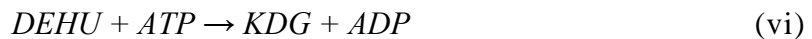
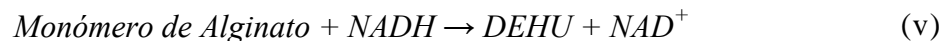
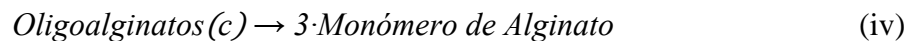
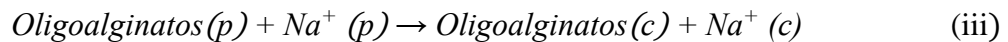
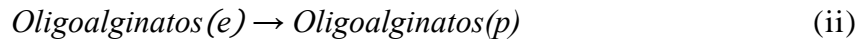
En este paso se tiene como objetivo la de caracterizar la ruta metabólica de la nueva cepa recombinante.

4.4.1 Construcción de modelo a escala genómica

Para realizar el análisis de flujo metabólico, fue necesario realizar modificaciones al modelo realizado por (Orth et al., 2011) para aproximarse a la cepa que se utiliza en este estudio. Por ello, se realiza la eliminación de algunas reacciones. Estas reacciones corresponden a las modificaciones realizadas por (Wargacki et al., 2012) para optimizar la producción de etanol. Estos son los genes *ldhA*, *frd* y *pflB*, que se mencionan en la sección de introducción (Sección 1.3). Además, se agregan las reacciones correspondientes a la producción de etanol, provenientes de *Z. mobilis*. Se realiza esta adición debido a que se tiene presente las bandas correspondientes en los geles de ADN, posterior a la transformación con pkD3 (Sección 4.1.3). Solamente se agrega el gen de piruvato descarboxilasa (Ecuación (i)) debido a que existe una ecuación similar para la enzima alcohol deshidrogenasa presente en *E. coli* y en el modelo.



Por otro lado, también se agregan las reacciones para la degradación de alginato. En este caso, se realizan algunas simplificaciones y se tomaron consideraciones para el modelamiento. Esto debido a que la cepa transporta oligoalginatos al espacio periplasmático (*p*) (Ecuación (ii)) por una porina (sin costo energético) y luego al citosol por un simporter de sodio (Ecuación (iii)). Además, se toma el supuesto de que todos los oligoalginatos están compuestos de 3 monómeros de alginatos y que todos estos monómeros son similares al momento de realizar los cálculos (no hay diferencia entre manuronato y guluronato). Luego, en el citosol (*c*), los oligoalginatos se degradan directamente en 3 monómeros (Ecuación (iv)), luego en DEHU (Ecuación (v)), luego en KDG (Ecuación (vi)) y continúan por la ruta metabólica cómo se describe en la sección 1.2.4.



Finalmente, la ruta metabólica para esta cepa modificada se muestra en la Figura 38. Además de las rutas de degradación de alginato y manitol y la ruta de síntesis de ácido hialurónico, se incluye las rutas de Entner-Doudoroff y la ruta de las pentosas fosfato. Se incluye estas rutas debido a que estas vías se encuentran presentes en *E. coli* y esta la posibilidad de que estas vías participen en el metabolismo. Además, se muestran otras vías. Una de ellas es la de síntesis de etanol con los genes de *Z. mobilis* y la vía de

degradación de arabinosa, representados con línea punteada para los flujos. Por otro lado, en esta figura no se toma en cuenta la compartimentalización de la célula, como por ejemplo que parte de la degradación de alginato se realiza en el medio extracelular.

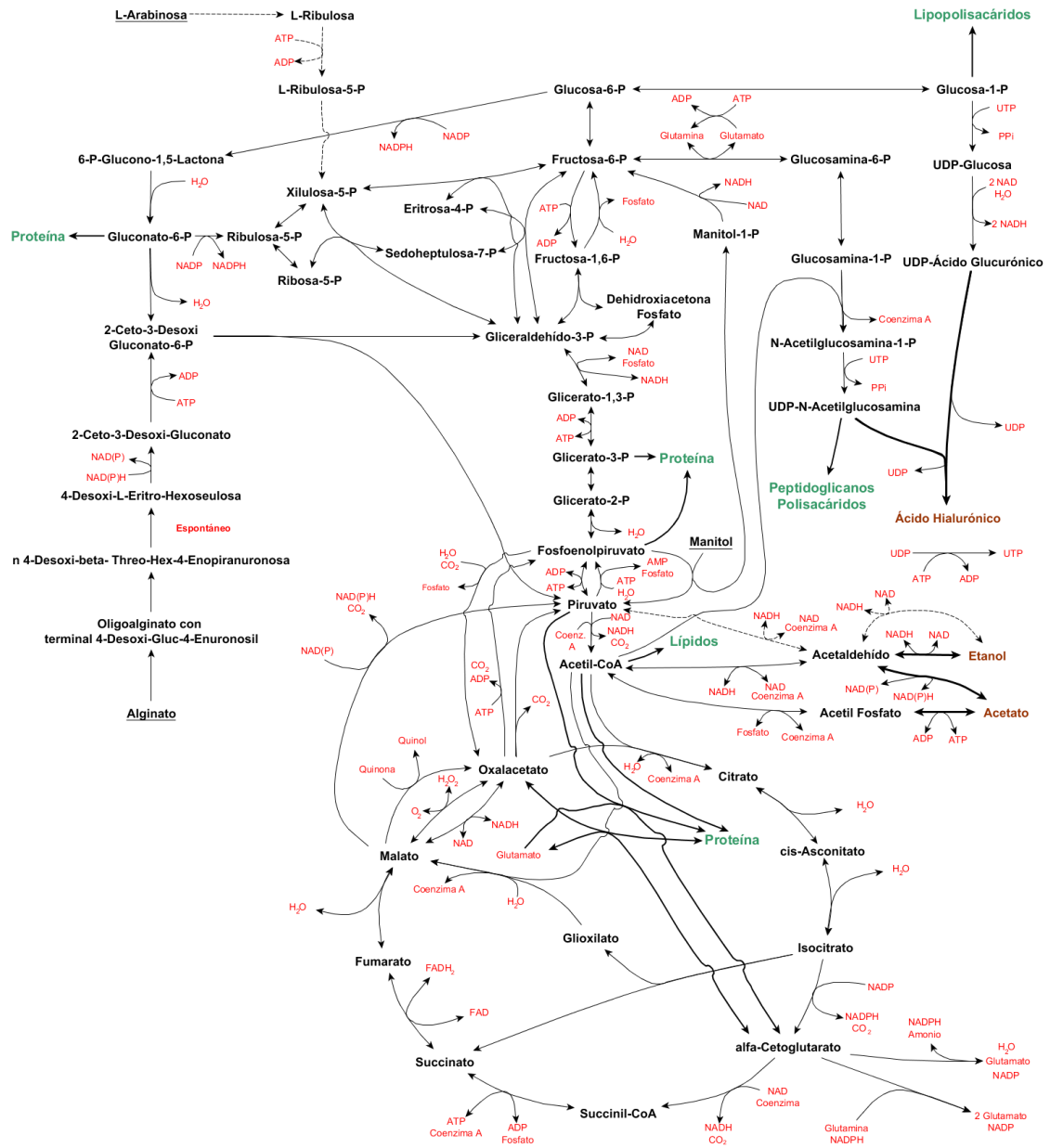


Figura 38 Diagrama de la red metabólica de la cepa modificada de *E. coli*. La red fue construida con la recopilación de información de (BioCyc, 2016; Conway, 1992; Deutscher et al., 2014; Kayser et al., 2005; Marcus y Halpern, 1969; MetaCyc, 2016; Nelson y Cox, 2005; Peekhaus y Conway, 1998; Wargacki et al., 2012; Yu y Stephanopoulos, 2008; Zhang et al., 1995)

4.4.2 Obtención de datos para el modelo

Para el análisis de flujo metabólico, es necesario obtener los datos de flujos de entrada y de salida en estado estacionario. Para ello, se realiza cultivos en condiciones específicas que se mencionan en la Tabla XVIII. La proporción corresponde a dos partes de alginato por una de manitol en peso. En esta sección, también se agrega cloruro de magnesio a una concentración final de 10 [mM] para aumentar la presencia del cofactor Mg^{2+} para la enzima ácido hialurónico sintasa. Los cultivos se iniciaron con un inóculo de 25 [ml], para más detalle sobre el protocolo utilizado para estos resultados, revisar la sección 3.4.18.

Tabla XVIII Condiciones de cultivo.

Volumen Total [ml]	200
Temperatura [°C]	30
Tiempo [h]	24
Agitación [RPM]	200
Medio de Cultivo	M9 Alginato/Manitol y AMP
Azúcares Totales [%]	2
Proporción (p/p)	2 a 1
Inducción	Arabinosa 1 [M]

Las Figura 39 y Figura 40 se muestran los matraces de cultivo, con los cuales se obtiene las muestras para los análisis.

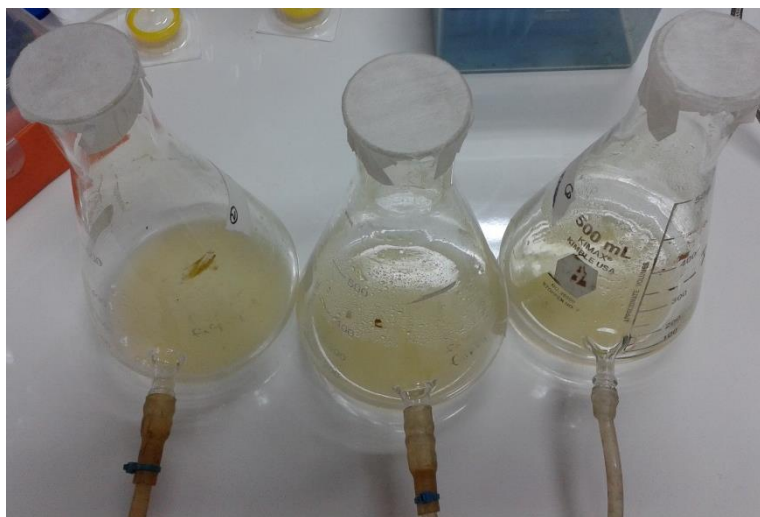


Figura 39 Matraces al final del proceso de obtención de muestras.



Figura 40 Matraz con sistema de extracción de muestras a través de una manguera y jeringa.

4.4.2.1 Medición de biomasa

Se realizan 3 cultivos a las mismas condiciones, donde se toman muestras hasta que la densidad óptica comienza a decaer. Utilizando estos datos, es posible determinar los tiempos de inicio y final del estado estacionario.

Con la Figura 41, se define que los tiempos de inicio y final del estado estacionario son entre las 1,8 y 6,78 [h]. Se toma esta decisión debido a que, en este tramo de tiempo, la unión de los puntos se aproxima a una recta que corresponde a la etapa de crecimiento exponencial del cultivo. Además, es posible de calcular la tasa de crecimiento de la cepa a las condiciones especificadas, que se muestra en la Figura 42. Por otro lado, en la Figura 41, se tiene un comportamiento esperado en el crecimiento de la cepa. Esto se debe a que es posible describir una fase logarítmica al inicio, luego exponencial, luego estacionaria y finalmente de muerte. Estas son fases que se describen para una población de bacterias, cómo *E. coli*.

A partir de la regresión lineal realizada en la Figura 42, se calcula que la tasa de crecimiento es de 0,205 [1/h]. En comparación a la tasa de crecimiento de una cepa de *E. coli* de uso común en laboratorio en medio LB, que es 1,38 [1/h] (Seo y Bailey, 1985), es menor. Es esperado que sea menor en el cultivo mínimo ya que este cultivo tiene los elementos mínimos para que la cepa pueda sobrevivir, mientras que el medio LB es un medio complejo que contiene otros elementos que mejoran el crecimiento celular (Andersen y Meyenburg, 1980; Marr, 1991; Sezonov et al., 2007).

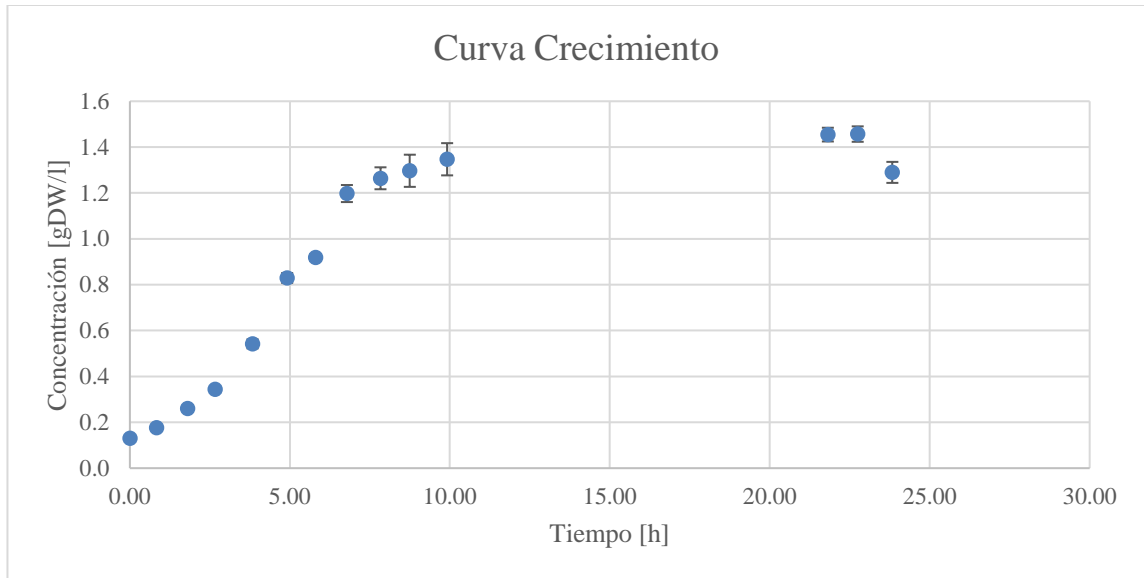


Figura 41 Análisis del crecimiento de la cepa modificada en el medio de cultivo.

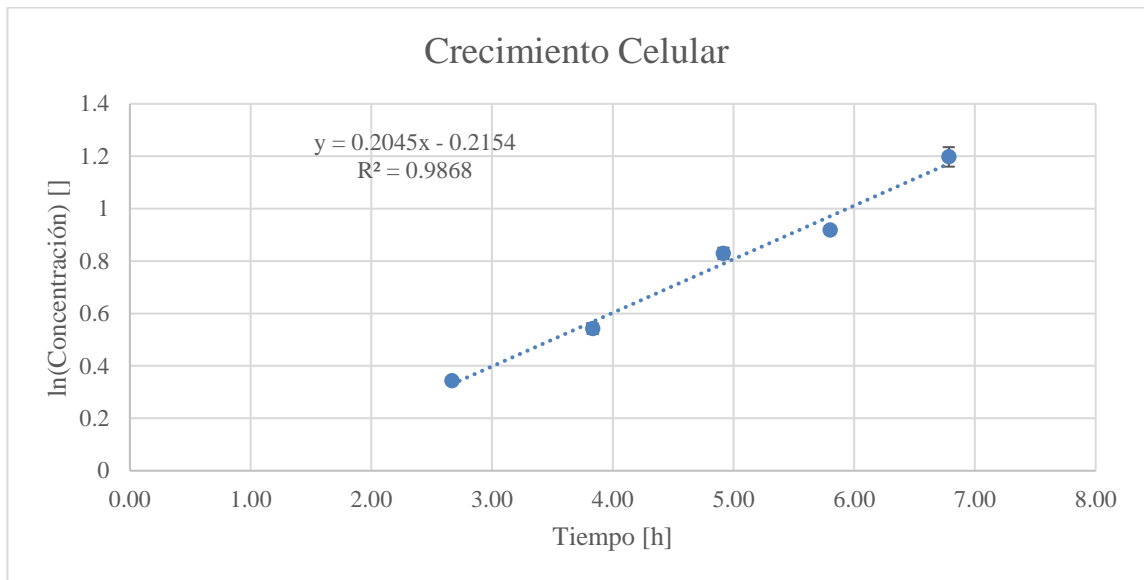


Figura 42 Tasa de crecimiento.

A continuación, se muestra en detalle los resultados para cada compuesto medido.

4.4.2.2 Medición de acetato

En primer lugar, se tiene la medición del acetato. Aunque existen trabajos donde utilizan el detector de ultra violeta para realizar la detección de acetato. Se utiliza el largo de banda de 210 [nm] en el detector (Luli y Strohl, 1990). En este caso se utiliza la detección de índice de refracción, debido a que existen otros compuestos que también se

detectan al mismo tiempo por lo que la medición no sería fidedigna. En la Figura 43 se muestra las concentraciones de acetato en el tiempo durante la fermentación. Se tiene que la aparición de acetato comienza después de la primera hora con aumento de la concentración para luego decaer a las 8 horas de cultivo. Esto significa que, en un principio, el acetato es un subproducto del metabolismo que se va acumulando y, que después, la cepa utiliza al momento que las fuentes principales de carbono se agotan.

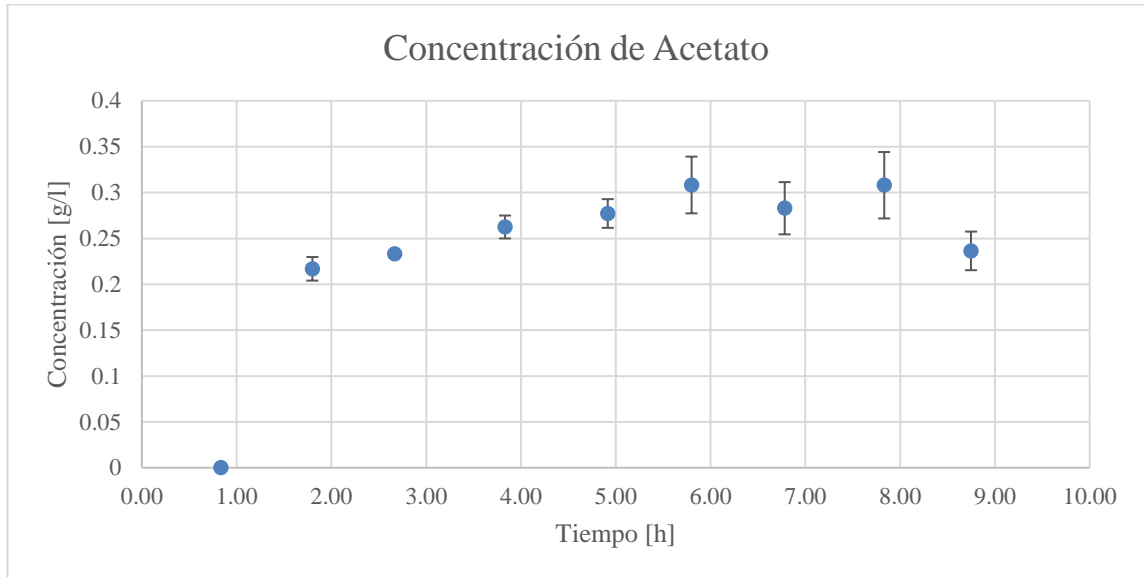


Figura 43 Análisis de la producción de acetato en el medio de cultivo.

A partir de estas mediciones es posible obtener la tasa de generación de acetato. En la Figura 44 se muestra la sección que corresponde a la etapa de crecimiento exponencial que se define anteriormente. Al realizar una regresión lineal, se obtiene que la tasa de generación de acetato es de 0,0144 [g/l/h].

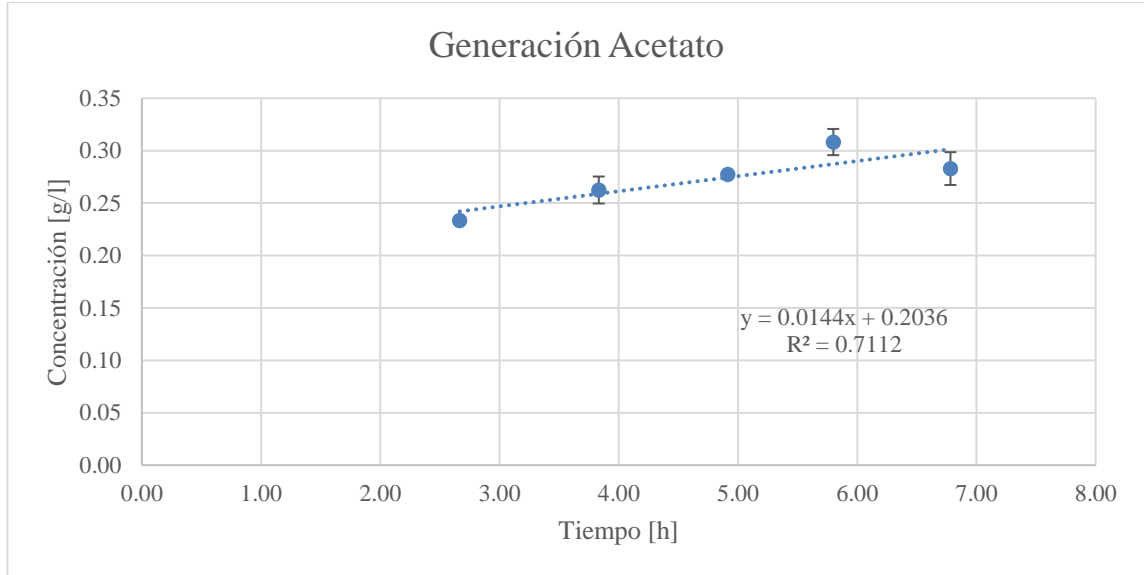


Figura 44 Análisis de la generación de acetato en el medio de cultivo, durante la fase exponencial.

4.4.2.3 Medición de ácido hialurónico

Las mediciones del ácido hialurónico se realizaron utilizando el método de turbidimetría detallado en la sección 3.4.17. En la Figura 45 se tiene los resultados obtenido a lo largo del cultivo. A partir de estos resultados, se puede apreciar una alta concentración al principio, para luego decaer casi a cero cerca de la séptima hora de fermentación. Las altas concentraciones presentes al principio se deben a la presencia de cadenas de alginatos que afectan en la turbiedad de la muestra produciendo una alta densidad óptica (sección A.3.3.2 para más detalle). Además, el alginato tiene una estructura similar a la cadena de AH. Al pasar el tiempo, las cadenas largas de alginatos son degradados en pequeñas cadenas de oligoalginatos, perdiendo el efecto. Al llegar a la novena hora de cultivo, aproximadamente, se aprecia un leve aumento de la concentración, lo que indicaría una minúscula producción del ácido hialurónico.

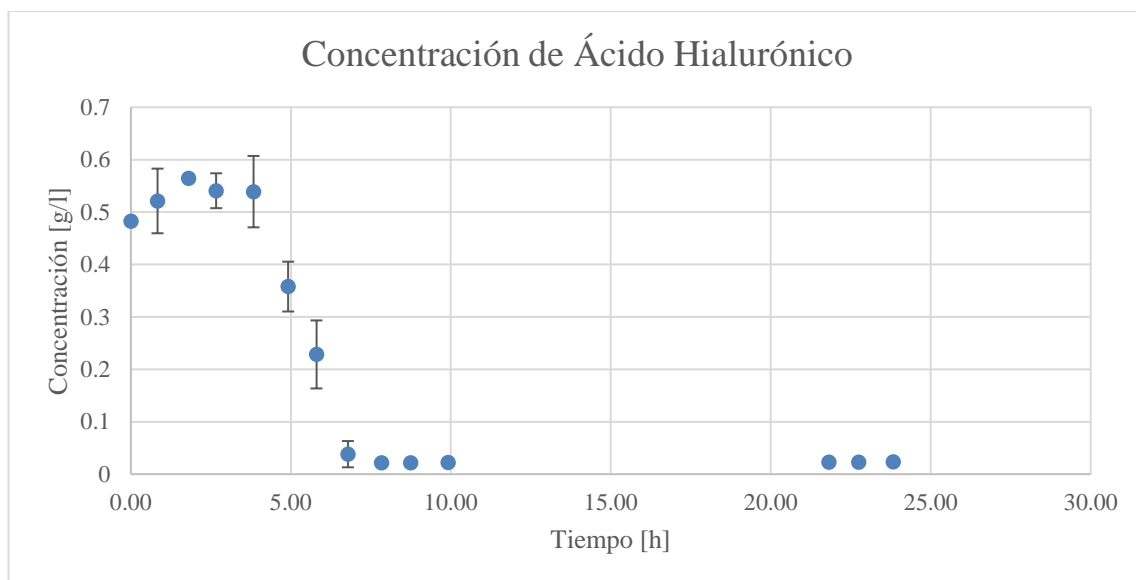


Figura 45 Resultados del método de cuantificación por turbidimetría. Se muestra el análisis de las concentraciones de ácido hialurónico en el medio de cultivo.

A partir de la Figura 46, se logra apreciar un aumento de la concentración correspondiendo a ácido hialurónico ya que el alginato se encuentra ausente. Por otro lado, debido a la presencia del alginato en las primeras horas de cultivo, aumenta la dificultad de medir el ácido hialurónico presente en este periodo de tiempo con el método de turbidimetría. Por ello, se opta por una aproximación en la producción al asumir una producción constante. Es decir, la pendiente de producción es la misma en todo el tiempo. De esta manera se utiliza los últimos puntos de la curva que se encuentran con la menor influencia del alginato en su medición.

Es importante tener en cuenta que esta suposición no es completamente real ya que la cepa se encuentra en constante producción de la enzima lo que hace variar la tasa de producción en el tiempo. Por otro lado, los primeros puntos tomados pueden tener algunas variaciones debido a la tasa de degradación del alginato que puedan alterar la tasa real de producción. Esto produciría una reducción de la producción real de AH. Además, la cepa se encuentra consumiendo arabinosa (Esto se muestra en la sección 4.4.2.5), por lo que la inducción es limitada en la cepa. Esto significa que se expresa el gen de AH sintasa por un tiempo, lo que se traduce a que, en cierto punto, se tiene una cantidad constante de enzima presente para realizar la producción de AH.

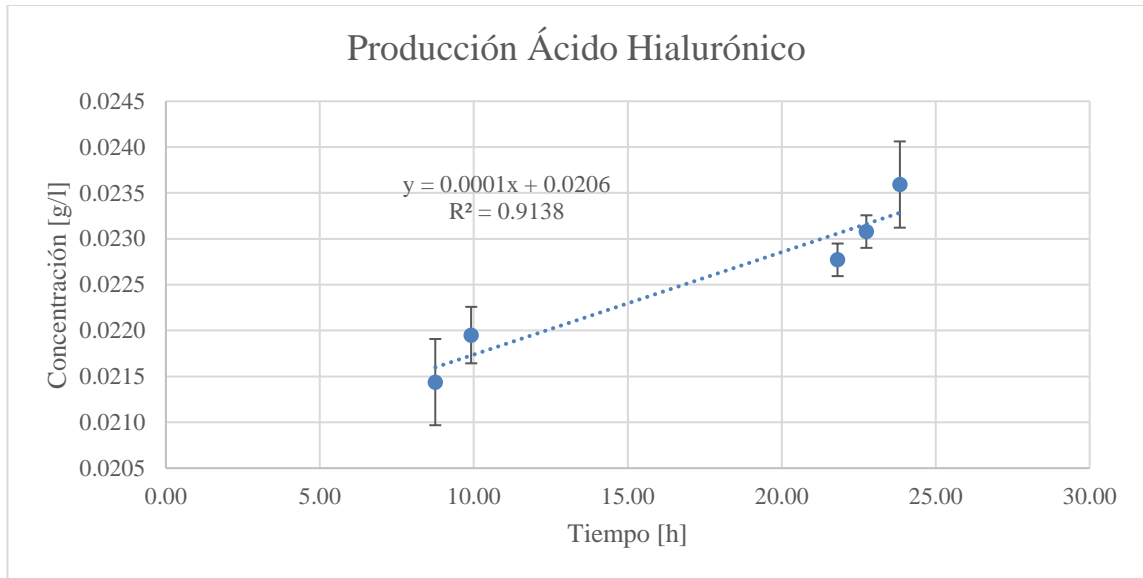


Figura 46 Análisis de la producción de ácido hialurónico en el medio de cultivo, durante la fase exponencial.

De la Figura 46, al realizar una regresión final a los últimos puntos medidos, se tiene que la tasa de producción de ácido hialurónico es de 0,0001 [g/l/h].

Por otro lado, siempre está la posibilidad de que las mediciones realizadas sean erróneas debido al método que se utiliza no es el más preciso, específico y, especialmente, que las concentraciones son bajas. Idealmente, las mediciones se realizarían a través de un método más confiable, por ejemplo, la cromatografía, pero no era posible en el momento debido a la falta de disponibilidad de estándares de AH de cadenas más pequeñas o a la disponibilidad de equipos como el espectrómetro de masa, para realizar un análisis de mayor profundidad a las muestras.

4.4.2.4 Medición de alginato

A continuación, se presentan los resultados de la medición de alginato en el medio de cultivo. En la Figura 47, se muestra que la concentración de alginato decae en el tiempo hasta que se degrada por completo antes de las 7 [h] de cultivo. Al realizar una regresión lineal a los puntos que se encuentran dentro de la fase exponencial, la tasa de degradación de alginato es de 1,845 [g/l/h]. Esto último se muestra en la Figura 48. Notar que es degradación y no un consumo debido a que esta cepa fue diseñada para que primero se degrade las cadenas de alginato en el medio extracelular. Mientras tanto, la célula empieza a transportar pequeñas cadenas de oligoalginatos al interior.

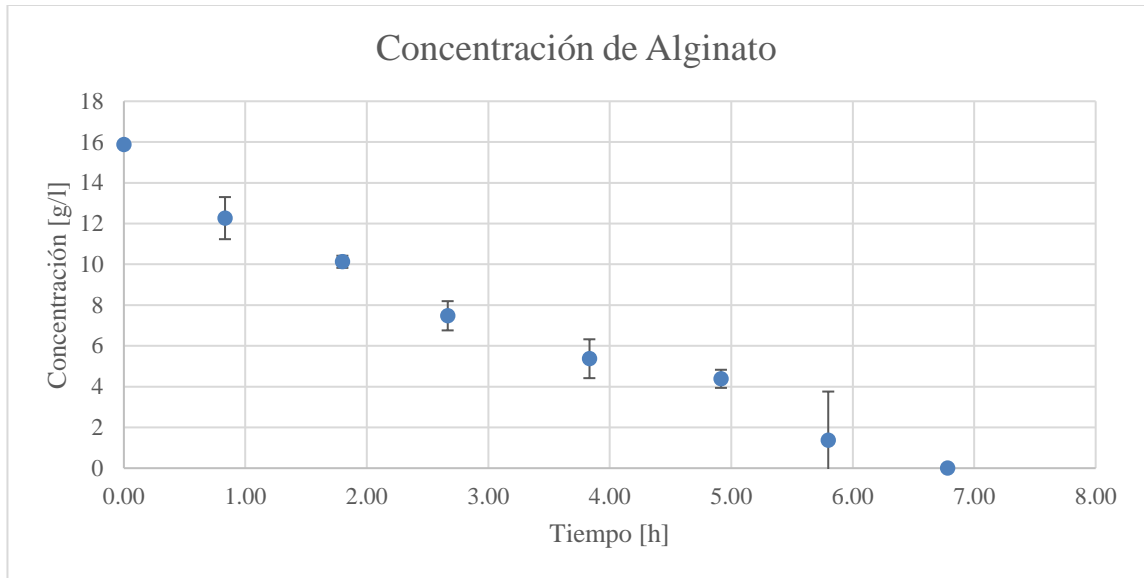


Figura 47 Análisis de la concentración de alginato en el medio de cultivo.

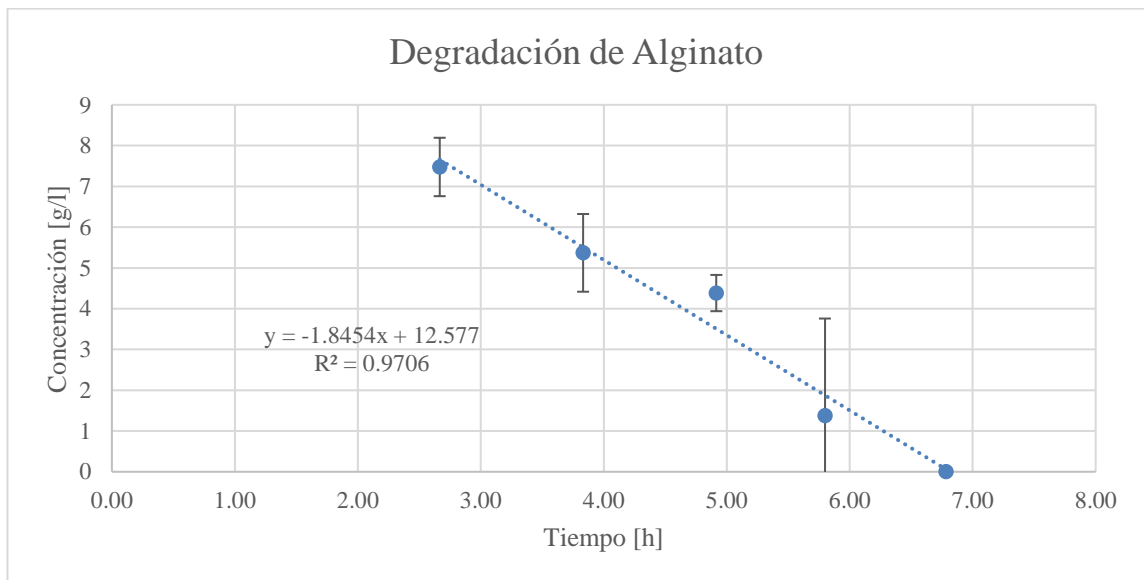


Figura 48 Análisis de la degradación de alginato en el medio de cultivo, durante la fase exponencial.

4.4.2.5 Medición de arabinosa

A continuación, se exponen los resultados del análisis de las concentraciones de arabinosa en el cultivo. Tomar en consideración que se utiliza específicamente L-arabinosa en todo el proyecto. Esta molécula es la utilizada para la inducción de la síntesis de las enzimas *HasA* y *Ugd*. Como se muestra en la Figura 49, se tiene una disminución de la concentración en el tiempo. Es cierto que en una cepa silvestre de *E. coli* este presente el gen *araA* (L-arabinosa isomerasa) que permite la degradación de Arabinosa (BioCyc, 2016). En este caso, según en la metodología realizada en el trabajo de (Wargacki et al., 2012), a la cepa original se le realizan inducciones con L-arabinosa.

Debido a esto, se presume la posibilidad de que la cepa final de la publicación sea diferente a la que utilizaron para la inducción, o bien, a la cepa que utilizaron se le incorpora el gen *araA* en un momento posterior a la recopilación de datos experimentales. Por otro lado, en la cepa que se utiliza en este proyecto, se obtuvo exitosamente la resistencia a cloranfenicol en un protocolo donde se utiliza arabinosa como inductor. Por ello, la degradación de arabinosa no es impedimento para lograr realizar el método de Datsenko y Wanner.

Tomando en cuenta todo lo mencionado antes, la arabinosa presente tiene efecto de inducción, aunque por un corto tiempo debido a que la presencia de esta molécula decae en el tiempo.

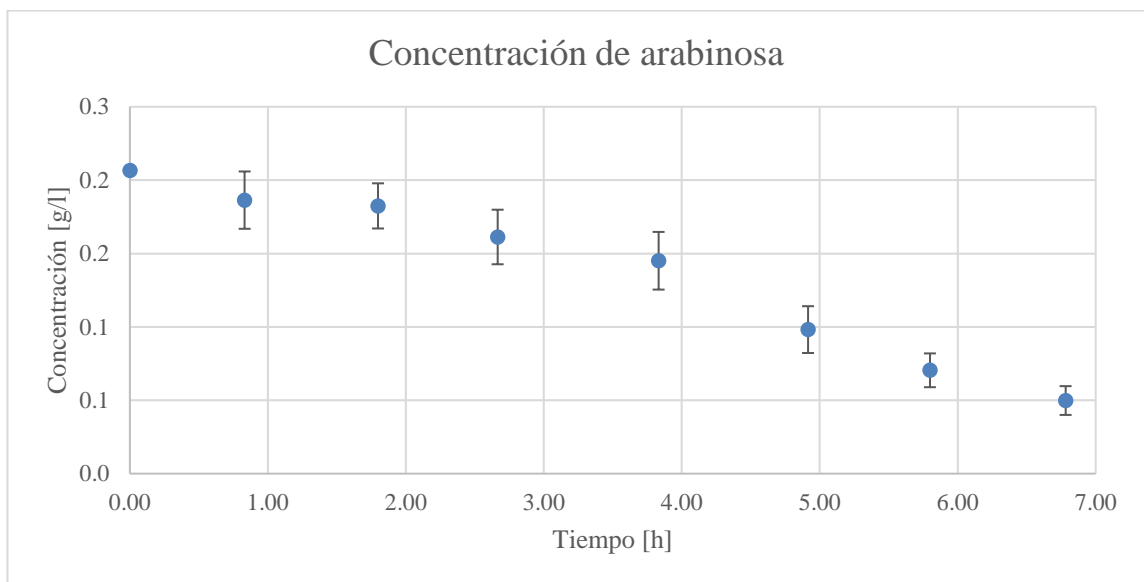


Figura 49 Análisis de los niveles de arabinosa en el medio de cultivo

Realizando una regresión lineal a los puntos que se encuentran dentro de la fase exponencial, se obtiene que la tasa de consumo de arabinosa es de $0,029 \text{ [g/l/h]}$, como se muestra en la Figura 50.

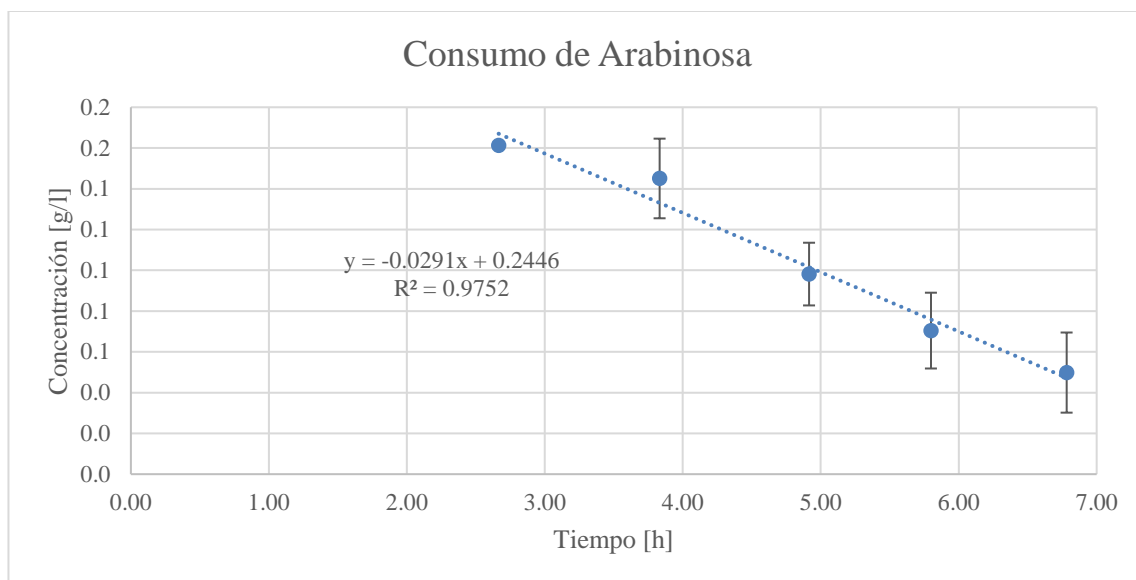


Figura 50 Análisis del consumo de arabinosa en el medio de cultivo, durante la fase exponencial.

4.4.2.6 Medición de etanol

A continuación, se presenta la concentración de etanol presente en el cultivo. Como muestra la Figura 51, la concentración de etanol aumenta hasta llegar a su máximo a las 7,83 [h], después decae y vuelve subir hasta los 0,809 [g/l], dónde se toma la última muestra del cultivo. Esta decaída de la concentración puede tener explicación por un consumo de este compuesto ante la carencia de las otras fuentes presentes al inicio. Aunque una cepa de *E. coli* silvestre no sea capaz de crecer con etanol como única fuente de carbono en condiciones aeróbicas (Membrillo-Hernández et al., 2000), igual es posible que sea capaz de desarrollarse en conjunto con otras fuentes de carbono. En este caso, durante este tiempo, todavía están presente los oligoalginatos y el acetato para el consumo. Eso sí, luego aumenta de nuevo la concentración. Esto se puede deber a que existe un consumo del etanol durante el periodo de transición hacia el consumo de acetato. Otra posibilidad es que se esté produciendo una pérdida de etanol en las muestras debido a la volatilidad que tiene esta molécula, cómo también a la alta variación de los valores de las muestras. Esto último se muestra en el error experimental asociado a la toma de las muestras.

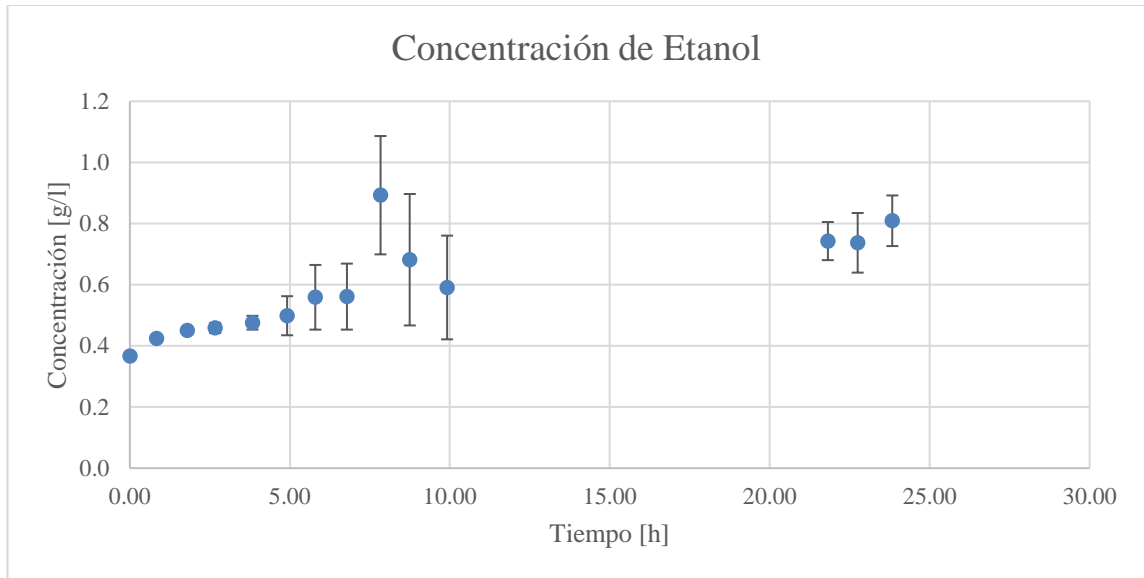


Figura 51 Análisis de la producción de etanol en el medio de cultivo.

En la Figura 52 se observa la curva de concentración de etanol durante la etapa de crecimiento exponencial. A partir de la regresión lineal, se obtiene que la tasa de producción de etanol es de 0,028 [g/l/h].

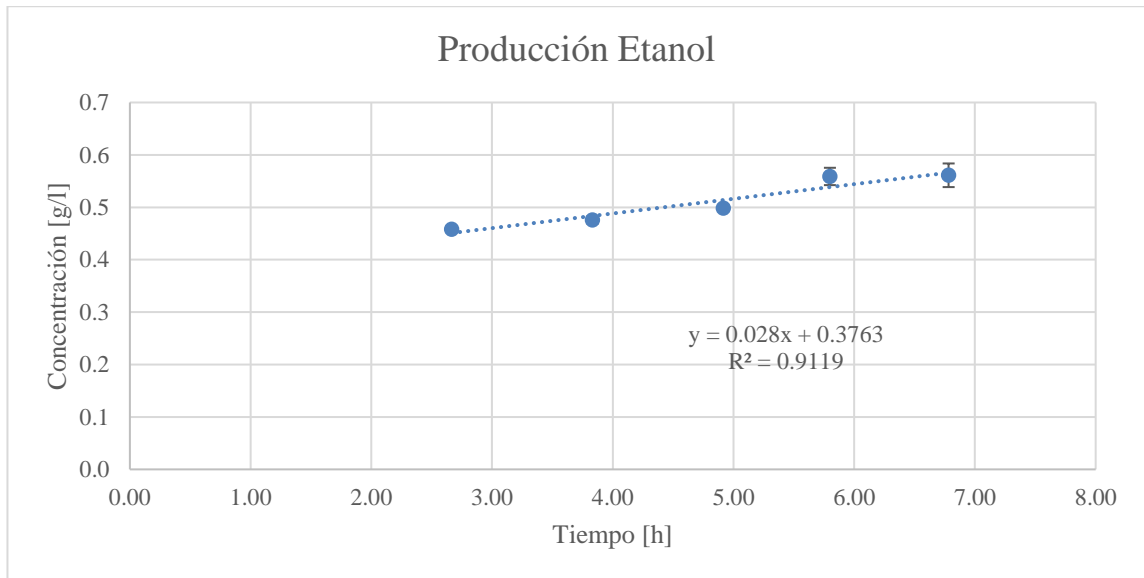


Figura 52 Análisis de la producción de etanol en el medio de cultivo, detalle durante la fase exponencial.

4.4.2.7 Medición de manitol

En la presente sección, se reporta la concentración de manitol presente en el cultivo durante el proceso de fermentación. En la Figura 53 se distingue que la tendencia de la concentración de manitol es a la disminución hasta que se consume completamente, antes de completar 8 [h] desde el inicio del cultivo.

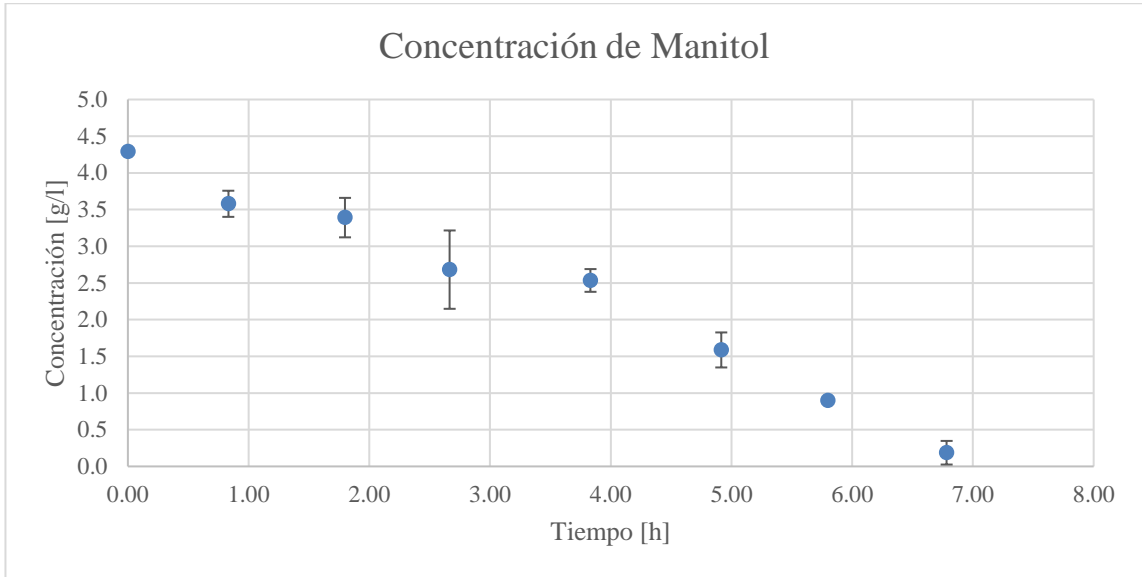


Figura 53 Análisis de la concentración de manitol en el medio de cultivo.

Los puntos que se presentan en la Figura 54 corresponden a las concentraciones de manitol durante la fase exponencial de la curva de crecimiento. A partir de una regresión lineal, se calcula que la tasa de consumo de manitol es de 0,644 [g/l/h].

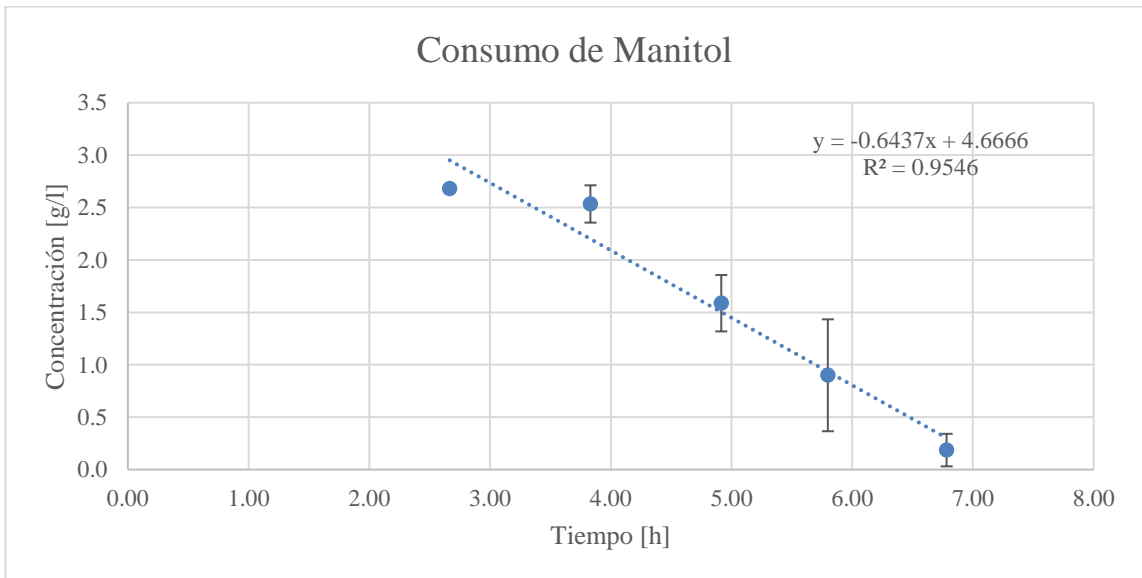


Figura 54 Análisis del consumo de manitol durante la fase exponencial.

4.4.2.8 Medición de oligómeros de alginato

En esta sección se presenta los resultados de la medición de la concentración de oligoalginatos, u oligómeros de alginato, durante la fermentación. En la Figura 55 se muestra las concentraciones en el tiempo durante el cultivo de la cepa. Se puede apreciar que la concentración de oligoalginatos aumenta hasta llegar a la máxima concentración de 12,43 [g/l] a las 7,83 [h] y luego disminuye hasta el final del cultivo, dónde se encuentra presente una pequeña cantidad.

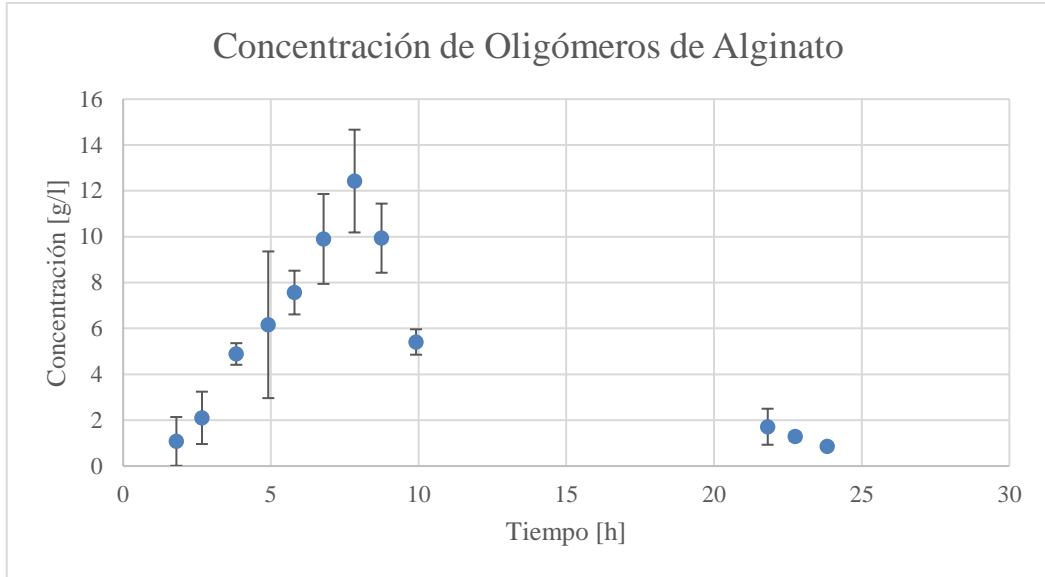


Figura 55 análisis de la concentración de oligómeros de alginato en el medio de cultivo.

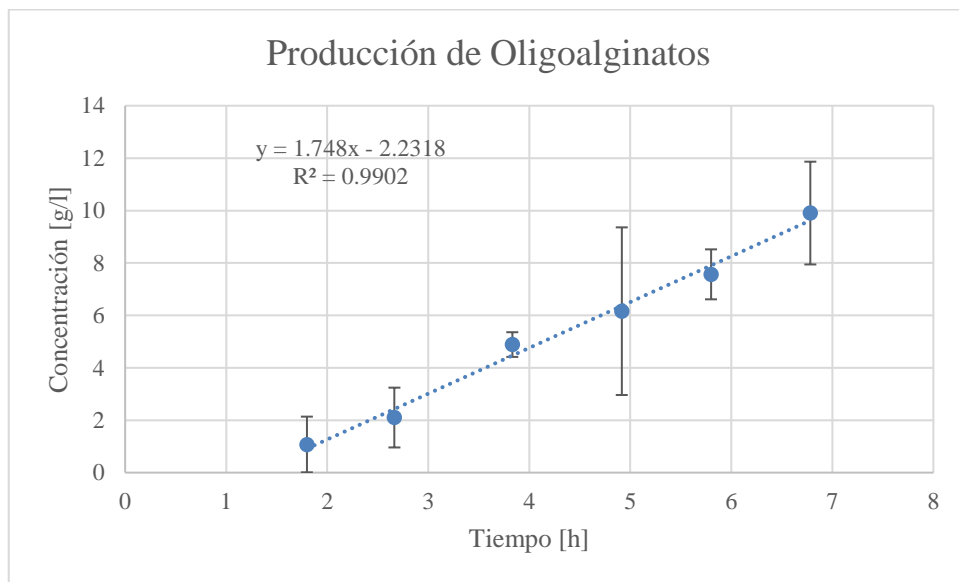


Figura 56 Producción de oligómeros de alginato en la fermentación.

A partir de una regresión lineal de la Figura 56, se tiene que la generación de oligoalginatos es de 1,748 [g/l/h]. Por balance de masa, todo el alginato que se degrada, se convierte en otros productos (oligómeros y monómeros). Para efecto de simplificaciones de cálculo, se tiene de producto solamente oligoalginatos. Debido a la manera que está diseñado la vía metabólica, la célula es capaz de incorporar a partir de oligoalginatos al interior de la célula (sección 1.2.4). Entonces, parte de este producto lo consume las células (Ecuación (vii)). Este consumo es menor que la degradación de alginato, por lo tanto, existe una acumulación de oligoalginatos.

$$Tasa\ de\ degradación\ de\ Alginato = Tasa\ de\ generación\ de\ oligoalginatos + Tasa\ de\ consumo\ de\ oligoalginatos \quad (vii)$$

Resolviendo esta ecuación, se tiene un consumo de -0,0974 [g/l/h] de oligoalginatos por parte de las células, durante la fase exponencial.

4.4.2.9 Resumen de las mediciones

A continuación, se tiene un resumen de las curvas de todos los compuestos medidos. El lapso de tiempo corresponde a la etapa de crecimiento exponencial de la curva de crecimiento, entre 1,8 y 6,78 [h] de fermentación.

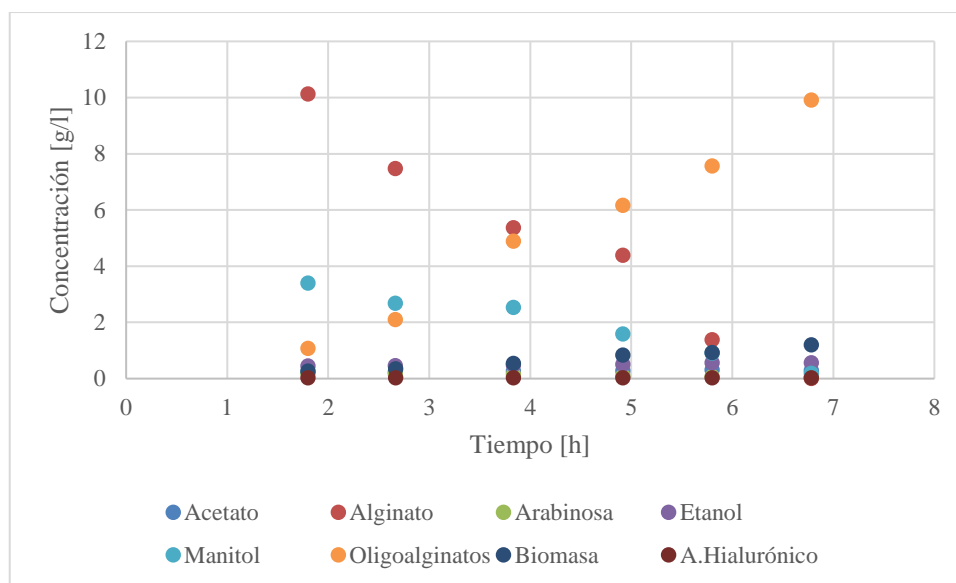


Figura 57 Concentraciones de los diferentes compuestos del cultivo.

En la Figura 58, se tiene un detalle de los compuestos que no se logra apreciar en la Figura 57. Esto se debe a las diferencias de magnitud de las concentraciones entre el alginato, los oligoalginatos y el resto de los compuestos.

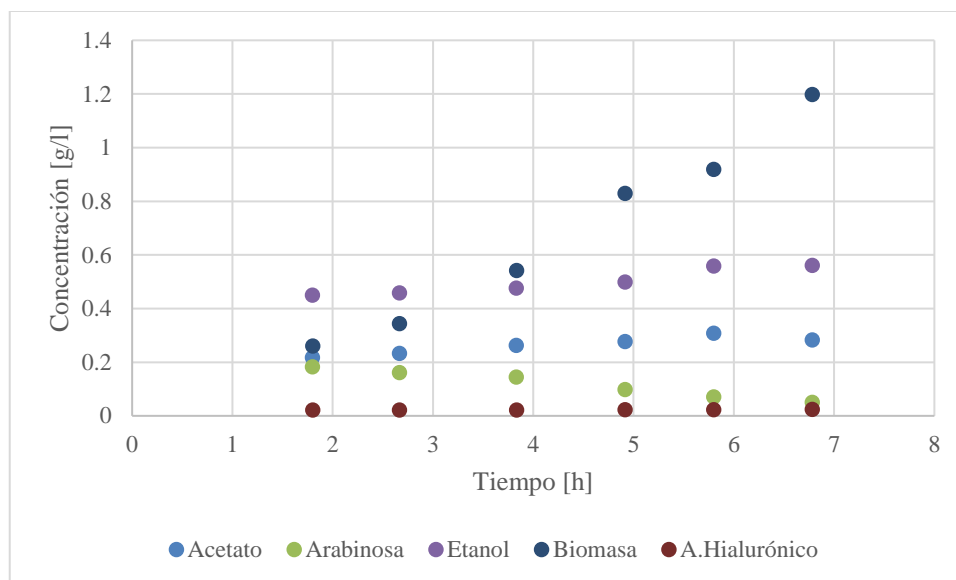


Figura 58 Detalle de las concentraciones de los compuestos con las menores magnitudes.

En la Tabla XIX, se mencionan todos los flujos de generación y consumo de los compuestos medidos. Además, se deduce el flux el cual se utiliza en los cálculos para el análisis de flujos metabólicos.

Tabla XIX Resultados de generación y consumo de los diferentes compuestos medidos.

Compuesto	Generación/Consumo [g/l/h]	Flux [mmol/gDW/h]
Acetato	0,014	0,317
Alginato	-1,85	-0,0079
Arabinosa	-0,029	-0,252
Etanol	0,028	0,789
Manitol	-0,644	-4,586
Oligoalginatos	1,75/-0,097	4,03/-0,213
AH	0,0001	0,0003

El rendimiento obtenido, en la producción de ácido hialurónico, es de 3,67 [mg AH/l/gDW].

4.4.3 Análisis de balance de flujo

Tabla XX Condiciones iniciales de las simulaciones para análisis de balance de flujo.

Condición	Flux Acetato [mmol/gDW/h]	Flux Arabinosa [mmol/gDW/h]	Flux Etanol [mmol/gDW/h]	Flux Manitol [mmol/gDW/h]	Flux Oligo-alginatos [mmol/gDW/h]	Flux AH [mmol/gDW/h]	Tasa de Crecimiento [1/ μ]
Experimento (c/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	0,0003	0,205
Experimento (s/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	0,0003	0,205
Optimizado HA (c/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	<u>Max</u>	0,205
Optimizado HA (s/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	<u>Max</u>	0,205
Optimizado Biomasa (c/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	0,0003	<u>Max</u>
Optimizada Biomasa (s/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	0,0003	<u>Max</u>

Para el análisis, se realizan simulaciones con diferentes condiciones iniciales de flux que se detalla en la Tabla XX. Para el flux de AH y la tasa de crecimiento, que contienen un Max que corresponde a optimizar la función objetivo con respecto a ese flux en el modelo. Además, todas las simulaciones se realizan con una cota mínima de flux de oxígeno de -1000 [mmol/gDW/h], lo que corresponde a que la cepa tiene una libre demanda de oxígeno. Por otro lado, en las condiciones, se aplican restricciones para que sea posible producir etanol vía piruvato descarboxilasa de *Z. mobilis* (c/pdc) y en otros casos sin esta enzima (s/pdc). Al analizar esta diferencia de condiciones se busca caracterizar si existe algún efecto al estar presente esta enzima, en especial en la producción AH y de biomasa.

Tabla XXI Flux y tasa de crecimiento de la cepa modificada de *E.coli*. Incluye los resultados del FBA que están subrayados.

Condición	Flux Acetato [mmol/gDW/h]	Flux Arabinosa [mmol/gDW/h]	Flux Etanol [mmol/gDW/h]	Flux Manitol [mmol/gDW/h]	Flux Oligo-alginatos [mmol/gDW/h]	Flux AH [mmol/gDW/h]	Tasa de Crecimiento [1/h]
Experimento (c/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	0,0003	0,205
Experimento (s/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	0,0003	0,205
Optimizado HA (c/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	<u>1,30</u>	0,205
Optimizado HA (s/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	<u>1,30</u>	0,205
Optimizado Biomasa (c/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	0,0003	<u>0,51</u>
Optimizada Biomasa (s/pdc)	0,317	-0,0079	-0,252	-4,586	-0,213	0,0003	<u>0,51</u>

En la Tabla XXI se muestra un resumen de las simulaciones realizadas, con los flux de cada reacción presente en el diagrama de la Figura 59. La mayor parte de estas reacciones se encuentran dentro del metabolismo del carbono. Existe un detalle de los nombres y una comparación de los flux en diferentes condiciones que se encuentran en la sección A.5 de los anexos.

En primer lugar, se tiene que, al maximizar la función objetivo de producción de biomasa, la tasa de crecimiento es de 0,51 [1/h] que es mayor que la experimental. Esto es de esperar ya que se busca reducir la biomasa que compite con la producción de AH.

Por otro lado, al optimizar la función objetivo de la producción de AH, se tiene un flux de 1,30 [mmol/gDW/h]. Este flux es mayor al que se produce experimentalmente. Por ello, existe un potencial teórico de optimizar la cepa para una mayor producción.

Además, no existiría influencia tanto en la producción de AH cómo en la producción de biomasa cuando está presente o ausente la enzima piruvato descarboxilasa. Aunque existen variaciones en los flujos internos, estos se acomodan para lograr que los valores de los flujos externos sean similares.

Se tiene que tomar en cuenta que, en los supuestos, se tiene una condición que varía mientras que los otros flujos se mantienen constantes. Por lo cual, esto es solo una

aproximación a la realidad. Además, que está la posibilidad de que la cepa al adaptarse a las diferentes condiciones, se produzca variaciones a los flujos que se tomaron como constantes en estas simulaciones. Es decir, que en la realidad puede que varíen un poco o de manera significativa, desde el punto de vista de los valores absolutos.

Uno de los flujos que se pueden destacar, es en los niveles de oxígeno disponibles. Estos niveles que se encuentran en el medio deben ser controlados. Esto se debe a que, según los datos, requiere de más oxígeno para la optimización de la producción de biomasa que de producir AH. Además, en el caso experimental, se observa un mayor consumo de oxígeno, pero no se produce una mayor cantidad de biomasa ni de AH. Esto significaría que la cepa produce otros compuestos con el exceso de ATP que se obtiene en presencia de los altos niveles de oxígeno en el medio.

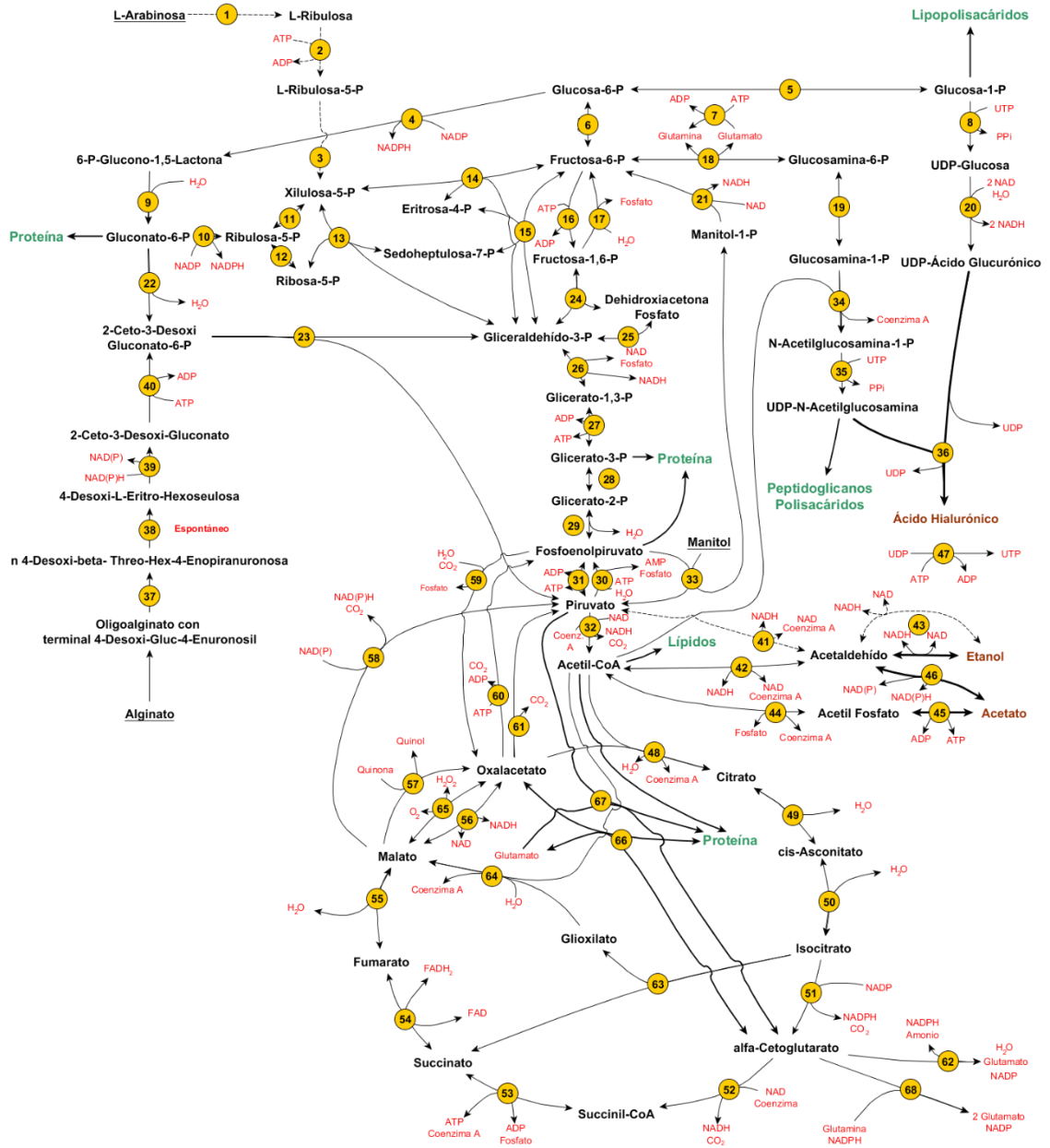


Figura 59 Diagrama de flujos metabólicos en *E.coli* utilizada en este estudio. Se muestra los valores de los flujos en los círculos amarillos.

Capítulo 4

Tabla XXII Reacciones con los flujos para cada simulación, con su número asociado.

#	Reacción \ Flux [mmol/gDW/h]	Prueba c/pdc	Prueba s/pdc	Óptimo AH c/pdc	Óptimo AH s/pdc	Óptimo Biomasa c/pdc	Óptimo Biomasa s/pdc
1	L-Arabinosa Isomerasa	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03
2	L-Ribuloquinasa	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03
3	L-Ribulosa Fosfato 4-Epimerasa	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03	7,90E-03
4	Glucosa 6-P Deshidrogenasa	1,84E+01	0,00E+00	-5,63E-27	1,22E-27	2,10E+00	2,10E+00
5	Fosfoglucomutasa	-4,02E-02	-4,02E-02	-1,34E+00	-1,34E+00	-9,98E-02	-9,98E-02
6	Glucosa 6-P Isomerasa	-1,84E+01	-4,02E-02	-1,34E+00	-1,34E+00	-2,20E+00	-2,20E+00
7	Glutamina Sintetasa	3,56E-01	3,56E-01	1,65E+00	1,65E+00	8,87E-01	8,87E-01
8	UTP-Glucosa-1-P Uridilil Transferasa	6,97E-03	6,97E-03	1,31E+00	1,31E+00	1,69E-02	1,69E-02
9	6-Fosfogluconolactonasa	1,84E+01	0,00E+00	-5,63E-27	1,23E-27	2,10E+00	2,10E+00
10	Fosfogluconato Deshidrogenasa	1,84E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,10E+00	2,10E+00
11	Ribulosa 5-P 3-Epimerasa	1,21E+01	-1,58E-01	-1,58E-01	-1,58E-01	1,01E+00	1,01E+00
12	Ribosa 5-P Epimerasa	-6,28E+00	-1,53E-01	-1,53E-01	-1,53E-01	-1,08E+00	-1,08E+00
13	Transquetolasa 1	6,09E+00	-3,38E-02	-3,38E-02	-3,38E-02	6,12E-01	6,12E-01
14	Transquetolasa 2	6,01E+00	-1,17E-01	-1,17E-01	-1,17E-01	4,06E-01	4,06E-01
15	Transaldolasa	6,09E+00	-4,42E+00	-4,04E-02	-4,04E-02	-2,75E+00	5,96E-01
16	Fosfofructoquinasa	0,00E+00	0,00E+00	1,78E+00	1,78E+00	0,00E+00	3,35E+00
17	Fructosa Bifosfatasa	1,75E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
18	Glutamina-Fructosa-6-P Transminasa	1,49E-02	1,49E-02	1,31E+00	1,31E+00	3,68E-02	3,68E-02
19	Fosfoglucoamina Mutasa	-1,49E-02	-1,49E-02	-1,31E+00	-1,31E+00	-3,68E-02	-3,68E-02
20	UDP-Glucosa 6-Deshidrogenasa	3,00E-04	3,00E-04	1,30E+00	1,30E+00	3,00E-04	3,00E-04
21	Manitol-1-P 5-Deshidrogenasa	4,59E+00	4,59E+00	4,59E+00	4,59E+00	4,59E+00	4,59E+00
22	6-fosfogluconato deshidratasa	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
23	2-Dehidro-3-Desoxifosfogluconato ald,	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01
24	Fructosa-Bifosfato Aldolasa	-1,75E+00	0,00E+00	1,78E+00	1,78E+00	0,00E+00	3,35E+00
25	Triosa Fosfato Isomerasa	-1,79E+00	4,34E+00	1,74E+00	1,74E+00	3,27E+00	3,27E+00
26	Gliceraldehído-3-P Deshidrogenasa	3,13E+00	9,25E+00	4,06E+00	4,06E+00	7,70E+00	7,70E+00
27	Fosfoglicerato Quinasa	-3,13E+00	-9,25E+00	-4,06E+00	-4,06E+00	-7,70E+00	-7,70E+00
28	Fosfoglicerato Mutasa	-2,79E+00	-8,92E+00	-3,72E+00	-3,72E+00	-6,86E+00	-6,86E+00
29	Enolasa	2,79E+00	8,92E+00	3,72E+00	3,72E+00	6,86E+00	6,86E+00
30	Fosfoenolpiruvato Sintasa	1,96E+00	0,00E+00	1,29E+00	1,29E+00	0,00E+00	0,00E+00
31	Piruvato Quinasa	0,00E+00	3,57E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,77E-01	3,77E-01
32	Piruvato Deshidrogenasa	0,00E+00	8,21E+00	0,00E+00	3,35E+00	4,15E+00	4,15E+00
33	Manitol Transporte vía PTS	4,59E+00	4,59E+00	4,59E+00	4,59E+00	4,59E+00	4,59E+00
34	Glucosa-1-P N-Acetil Transferasa	1,49E-02	1,49E-02	1,31E+00	1,31E+00	3,68E-02	3,68E-02
35	UDP-N-Acetilglucosamina Transferasa	-4,93E-34	0,00E+00	-3,91E-34	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
36	AH Sintetasa	3,00E-04	3,00E-04	1,30E+00	1,30E+00	3,00E-04	3,00E-04
37	Oligoalginato Liasas	2,13E-01	2,13E-01	2,13E-01	2,13E-01	2,13E-01	2,13E-01
38	Síntesis DEHU	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01
39	DEHU Reductasa (NAD)	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01
39	DEHU Reductasa (NADP)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
40	2-Dehidro-3-Desoxiglucoquinasa	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01	6,38E-01
41	Piruvato Descarboxilasa (Z. mobilis)	2,68E+00	0,00E+00	3,35E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
42	Acetaldehído Deshidrogenasa	1,58E+02	-7,64E-01	2,59E+00	-7,64E-01	-5,83E-01	-5,83E-01
43	Alcohol Deshidrogenasa	-2,52E-01	-2,52E-01	-2,52E-01	-2,52E-01	-2,52E-01	-2,52E-01
44	Fosfoacetiltransferasa	-3,17E-01	-3,17E-01	-3,17E-01	-3,17E-01	-3,17E-01	-3,17E-01
45	Acetato Quinasa	3,17E-01	3,17E-01	3,17E-01	3,17E-01	3,17E-01	3,17E-01
46	Aldehído Deshidrogenasa (NAD)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
46	Aldehído Deshidrogenasa (NADP)	5,12E-01	5,12E-01	5,12E-01	5,12E-01	3,31E-01	3,31E-01
47	Difosfato kinasa	8,74E-02	8,74E-02	2,69E+00	2,69E+00	2,17E-01	2,17E-01
48	Citrato Sintasa	9,27E-01	7,05E+00	5,57E-01	5,57E-01	2,11E+00	2,11E+00
49	Aconitasa (Citrato Hidrolíasa)	9,27E-01	7,05E+00	5,57E-01	5,57E-01	2,11E+00	2,11E+00
50	Aconitasa (Isocitrato Hidrolíasa)	9,27E-01	7,05E+00	5,57E-01	5,57E-01	2,11E+00	2,11E+00
51	Isocitrato Deshidrogenasa (NADP)	3,28E-01	7,05E+00	2,23E-01	2,23E-01	2,11E+00	2,11E+00
52	2-Oxoglutarato Deshidrogenasa	1,06E-01	6,83E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,55E+00	1,55E+00
53	Succinil-CoA Sintetasa	-1,00E+03	-1,00E+03	1,06E-01	1,06E-01	-1,00E+03	-1,00E+03
54	Succinato Deshidrogenasa	7,70E-01	6,90E+00	4,00E-01	4,00E-01	1,72E+00	1,72E+00
55	Fumarasa	9,11E-01	7,04E+00	5,41E-01	5,41E-01	2,07E+00	2,07E+00
56	Malato Deshidrogenasa	1,51E+00	7,04E+00	8,76E-01	8,76E-01	2,07E+00	2,07E+00

57	Malato Deshidrogenasa 2	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
58	Malato Oxidoreductasa Descarboxilante	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
59	Fosfoenolpiruvato Carboxilasa	0,00E+00	5,98E-01	2,64E-01	2,64E-01	1,49E+00	1,49E+00
60	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
61	Oxaloacetato Descarboxilasa	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
62	Glutamato Deshidrogenasa (NADP)	-1,71E+00	-1,71E+00	-1,71E+00	-1,71E+00	-4,26E+00	-4,26E+00
63	Isocitrato Liasa	5,98E-01	0,00E+00	3,34E-01	3,34E-01	0,00E+00	0,00E+00
64	Malato Sintasa	5,98E-01	1,82E-04	3,35E-01	3,35E-01	4,55E-04	4,55E-04
65	Malato Óxidasa	2,48E-04	2,48E-04	2,48E-04	2,48E-04	6,19E-04	7,32E-04
66	Aspartato Transmitasa	-5,83E-01	-5,83E-01	-5,83E-01	-5,83E-01	-1,45E+00	-1,45E+00
67	L-Alanina Transminasa	-1,00E+03	-1,00E+03	-1,00E+03	-1,00E+03	-1,00E+03	-1,00E+03
68	Glutamato Sintasa	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

4.4.4 Otros análisis y discusiones

Además de las discusiones y análisis realizadas anteriormente, también se comenta otros aspectos de interés con respecto a este tema, que se mencionan a continuación.

En primer lugar, se realiza un análisis comparativo de producción energética posible de diferentes fuentes de carbono. En este caso son glucosa, alginato y manitol. En la Tabla XXIII se muestra la producción total de ATP para diferentes hidratos de carbono. Para mayor detalle de los cálculos, revisar la sección en los anexos. En este caso, se toma como supuesto que la molécula se metaboliza hasta cumplir un ciclo dentro del ciclo del TCA.

Tabla XXIII Producción energética en ATP de diferentes fuentes de carbohidratos.

Composición	NAD(P)H [1/mol]	ATP [1/mol]	FADH ₂ [1/mol]	Total [ATP/mol]
Alginato	20	3	3	26
Glucosa	25	4	3	32
Manitol	27,5	4	3	34,5

A partir de esta tabla se puede notar que el manitol es el compuesto que produce la mayor cantidad de ATP por molécula, seguido de cerca por glucosa y más atrás alginato. Alginato produce un 18,75 [%] menos de energía en comparación a glucosa y un 24,64 [%] menos en comparación a manitol. Esta puede ser una razón por la cual se tiene una pequeña producción de ácido hialurónico. La menor eficiencia por molécula, hace que la célula tenga una menor disponibilidad de recursos y estos recursos más limitados son para los procesos de mayor importancia en el metabolismo. Además, en otros trabajos (Leyton, 2015) se presenta que el crecimiento de la cepa, en presencia de alginato como única fuente de carbono, es nula o muy baja.

Además, se tiene los resultados de la Tabla XXIV, dónde se muestra la energía disponible en forma de moléculas de ATP. En este cálculo, se incluye la vía de producción de AH. Como se puede ver, se tiene una menor disponibilidad de energía y cofactores, en especial con alginato. Con esta fuente de carbono, se obtiene incluso pérdidas de energía

por el alto consumo de la molécula de ATP. Alginato presenta un 49,41 [%] menos de energía disponible con respecto a glucosa. En el caso con respecto a manitol es de un 60 [%] menos.

Tabla XXIV Producción energética en ATP de diferentes fuentes de carbono, dónde se incluye producir un dímero de AH.

Fuente de C.	NAD(P)H [1/mol]	ATP [1/mol]	FADH ₂ [1/mol]	Total [ATP/mol]
Alginato	4,375	-0,125	1,125	5,375
Glucosa	9,375	0,125	1,125	10,625
Manitol	11,875	0,4375	1,125	13,4375

Por otro lado, esto demuestra que es necesario tener una proporción de alginato y manitol u otro carbohidrato similar para mejorar la cantidad de energía disponible. Esto se traduce en más recursos que potencialmente pueden ser utilizados en la producción de ácido hialurónico sin comprometer el crecimiento celular. Además de mejorar el equilibrio oxido-reducción presente en la célula (Contador et al., 2015).

Además de estos puntos, es posible de realizar, en futuros trabajos, otros cambios en una variedad de aspectos con el objetivo de mejorar el rendimiento de la producción de ácido hialurónico. Entre estas mejoras, se encuentra la de realizar diferentes ensayos con variaciones en las condiciones de cultivo como pH, tiempo de inducción, concentración de azúcares, proporción de estos azúcares, temperatura, entre otros. También se encuentran la de probar utilizando la expresión del gen AH sintasa proveniente de la bacteria gram negativo *Pasteurella multocida*, debido a que se ha logrado obtener AH en *E. coli*. Además, que *E. coli* también es una bacteria gram negativo. También está la posibilidad de buscar una estrategia para el control de la síntesis de la pared celular (Vigetti et al., 2014b) como por ejemplo algún inhibidor de la producción de la pared celular como fosfomicina con la cual se ha logrado mejorar la síntesis de AH (Mao et al., 2009). Por otro lado, también se encuentra reducir la presencia de β -glucuronidasas que se encuentra presente en el genoma de *E. coli* e influyen en la producción de AH (Krahulec y Krahulcová, 2006).

También, en el caso que se continúe trabajando con esta cepa u otra similar de *E. coli*, es necesario eliminar las enzimas de degradación de arabinosa, y con ello sería posible mantener la inducción por más tiempo. Otra opción es el reemplazo del sistema de expresión para los genes de producción de AH. Es necesario tener un sistema de inducción ya que, como se menciona antes, se debe obtener una cantidad importante de biomasa para luego realizar la producción de AH. Esto último debido al conflicto que existe entre ambas rutas en el metabolismo de *E. coli*. En el caso que se tenga una baja concentración de biomasa, se traduce en una baja concentración de la enzima AH sintasa que significa bajas concentraciones de AH para un mismo tiempo de fermentación. Por

otro lado, se podría mejorar la expresión de algunas enzimas para mejorar la acumulación de AH, un ejemplo es UDP-glucosa fosforilasa (Vigetti et al., 2014b).

Otra estrategia interesante para mejorar la producción de ácido hialurónico, es la de la Adaptación evolucionaria (Lee et al., 2012). Este método ha sido utilizada en otros trabajos como (Vaisman, 2014) en donde se logra mejorar el rendimiento de AH con otra fuente de carbono.

Otro punto a tomar en cuenta es de realizar modificaciones a partir de una cepa de *E. coli* sin modificaciones previas, en vez de utilizar directamente la cepa BAL 1611. A esta cepa que, aunque se le ha realizado un knock-out de los genes de síntesis de etanol, aún se encuentran presentes en el genoma. Por ello, está la posibilidad de utilizar un método novedoso para la edición genómica de una cepa de *E. coli*. Este método corresponde a CRISP-R/CAS9 que ha sido utilizado en varios microorganismos incluyendo *E. coli*. Además de tener una alta efectividad, ser relativamente barato de realizar y un gran potencial para diferentes aplicaciones a futuro (Choi y Lee, 2016; Li et al., 2015; Ng et al., 2016; Singh et al., 2016).

CONCLUSIONES

Capítulo 5

En este trabajo se modificó la cepa BAL 1611, a la cual se redujo la producción de etanol y se incorporó los genes de síntesis de ácido hialurónico (AH) en un plasmidio. Las fermentaciones realizadas con esta cepa modificada incluyen condiciones aeróbicas y el uso de alginato y manitol como fuentes principales de carbono. La composición de estos medios de cultivos es de 20 [g/l] de azúcares totales y una proporción 2 a 1 de alginato a manitol en peso. Además, la inducción para la expresión de las enzimas necesarias para la síntesis de AH se realizó con L-arabinosa. Entre los resultados más destacables de estos experimentos se puede mencionar la producción de 0,1 [mg AH/l/h] y rendimientos de 3,67 [mg AH/l/gDW]. Con estos resultados se muestra producción de ácido hialurónico a partir de carbohidratos de algas, alginato y manitol. Además de que se genera una cepa que produce a partir de una que no.

Se concluye que el método utilizado para medir concentración de AH no es el apropiado. Esto se debe a que tiene una baja especificidad entre los oligómeros de alginato y el AH. Por lo tanto, es recomendable utilizar otro método más confiable como es la cromatografía, teniendo en cuenta la disponibilidad de estándares de diferentes tamaños de cadenas de AH.

Además, dada las bajas concentraciones de AH obtenidas, se recomienda utilizar un método de concentración de la muestra que no presente pérdidas.

La variante obtenida consume el azúcar inductor arabinosa, pero se observa que, aunque este en bajos niveles, existe una producción de AH en el medio. Esto indica que hay presencia de la enzima *HasA*. Para evitar el consumo de arabinosa, se recomienda eliminar la vía de degradación de arabinosa para mantener la inducción en el tiempo. Otra opción sería utilizar otro sistema de expresión para la producción de la enzima AH sintasa.

Se modifica un modelo metabólico con el cual se realizó un análisis, *in silico*, de flujo metabólico. En este análisis se concluye que es posible producir ácido hialurónico. Además, se concluye que la presencia de la enzima piruvato descarboxilasa no afectaría el flujo de producción de ácido hialurónico. También, se concluye que la cantidad de oxígeno que consuma la cepa tiene un efecto en la producción de AH, por lo que debería ser controlado.

Se concluyó que alginato es una fuente de carbono con la cual la cepa tiene complicaciones para crecer. Esto se debe a la baja producción de energía en comparación con glucosa u otro azúcar. Por ello, es necesario tener presente otras fuentes de carbohidratos con alto aporte energético y de cofactores como es el caso de manitol.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, K., Meyenburg, K. von, 1980. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J. Bacteriol.* 144, 114–123.
- Archer, C.T., Kim, J.F., Jeong, H., Park, J.H., Vickers, C.E., Lee, S.Y., Nielsen, L.K., 2011. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics* 12, 9. doi:10.1186/1471-2164-12-9
- ASAPS, 2015. Fillers - The American Society for Aesthetic Plastic Surgery [En Línea]. URL: <http://www.smartbeautyguide.com/procedures/injectables/fillers> (accedido 1-noviembre-2015).
- Avila, M., Seguel, M., 1993. An overview of seaweed resources in Chile. *J. Appl. Phycol.* 5, 133–139. doi:10.1007/BF00004008
- BioCyc, 2016. *Escherichia coli* ATCC 8739 L-arabinose degradation I [En Línea]. URL: <http://biocyc.org/ECOL481805/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=ARABCAT-PWY> (accedido 14-abril-2016).
- Boeriu, C.G., Springer, J., Kooy, F.K., van den Broek, L. a. M., Eggink, G., 2013. Production Methods for Hyaluronan. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2013, 1–14. doi:10.1155/2013/624967
- Buschmann, A., 2008. Seaweed future cultivation in Chile: perspectives and challenges. *Int. J. Environ. Pollut.* 33, 432–456.
- Cabiscol, E., Aguilar, J., Ros, J., 1994. Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ dehydrogenases. Consensus target sequence between propanediol oxidoreductase of *Escherichia coli* and alcohol dehydrogenase II of *Zymomonas mobilis*. *J. Biol. Chem.* 269, 6592–7.
- Choi, K.R., Lee, S.Y., 2016. CRISPR technologies for bacterial systems: Current achievements and future directions. *Biotechnol. Adv.* 34, 1180–1209. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.08.002
- Chong, B.F., Blank, L., McLaughlin, R., Nielsen, L.K., 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341–351. doi:10.1007/s00253-004-1774-4
- Contador, C.A., Shene, C., Olivera, A., Yoshikuni, Y., Buschmann, A., Andrews, B.A., Asenjo, J.A., 2015. Analyzing redox balance in a synthetic yeast platform to improve utilization of brown macroalgae as feedstock. *Metab. Eng. Commun.* 2, 76–84. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meteno.2015.06.004>
- Conway, T., 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol. Lett.*
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Glavina del Rio, T., Dalin, E., Tice, H., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Kiss, H., Brettin, T., Etter, J.C., Han, C., Kuske, C.R., Schmutz, J., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Kyrpides, N., Mikhailova, N., Ingram, L., Richardson, P., 2008. *Escherichia coli* ATCC 8739, complete genome [En Línea]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000946.1> (accedido 25-

- abril-2016).
- Datsenko, K., Wanner, B., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645.
- Davis, T., Volesky, B., Mucci, A., 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.* 37, 4311–4330. doi:10.1016/S0043-1354(03)00293-8
- Dawes, C., 1998. *Marine botany*, Second. ed. Wiley.
- DeAngelis, P.L., 2002. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology* 12, 9R–16. doi:10.1093/glycob/12.1.9R
- DeAngelis, P.L., 1999. Hyaluronan synthases: Fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 670–682. doi:10.1007/s000180050461
- DeAngelis, P.L., 1996. Enzymological characterization of the *Pasteurella multocida* hyaluronic acid synthase. *Biochemistry* 35, 9768–71. doi:10.1021/bi960154k
- DeAngelis, P.L., White, C.L., 1998. Identification and molecular cloning of a hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. *J. Biol. Chem.* 273, 8454–8458. doi:10.1074/jbc.273.14.8454
- Deniaud-Bouët, E., Kervarec, N., Michel, G., Tonon, T., Kloareg, B., Hervé, C., 2014. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from *Fucales*: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Ann. Bot.* 114, 1203–16. doi:10.1093/aob/mcu096
- Deutscher, J., Aké, F.M.D., Derkaoui, M., Zébré, A.C., Cao, T.N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E., Joyet, P., 2014. The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 231–56. doi:10.1128/MMBR.00001-14
- Dorfman, A., 1955. Mucopolysaccharidases. *Methods Enzymol.* 1, 166–173. doi:10.1016/0076-6879(55)01023-9
- Dorfman, A., Ott, M., 1948. A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J. Biol. Chem.* 172, 367–375.
- Echave, P., Tamarit, J., Cabiscol, E., Ros, J., 2003. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 30193–30198. doi:10.1074/jbc.M304351200
- GE Healthcare, 2007. PD-10 Desalting Columns.
- Gentz, R., Bujard, H., 1985. Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: Highly efficient promoters from bacteriophage T5. *J. Bacteriol.* 164, 70–77.
- Holland-staley, C.A., Lee, K., Clark, D.P., Cunningham, P.R., 2000. Aerobic Activity of

- Escherichia coli Alcohol Dehydrogenase Is Determined by a Single Amino Acid. *J. Bacteriol.* 182, 6049–6054. doi:10.1128/JB.182.21.6049-6054.2000.Updated
- Hoshi, H., Nakagawa, H., Nishiguchi, S., Iwata, K., Niikura, K., Monde, K., Nishimura, S., 2004. An Engineered Hyaluronan Synthase. *Biochemistry* 279, 2341–2349. doi:10.1074/jbc.M305723200
- Hyduke, D., Hyduke, D., Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R., Thiele, I., Orth, J., Feist, A., Zielinski, D., Bordbar, A., Lewis, N., Rahmanian, S., Kang, J., Palsson, B., 2011. COBRA Toolbox 2.0. *Protoc. Exch.* doi:10.1038/protex.2011.234
- Jeong, E., Shim, W.Y., Kim, J.H., 2014. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *J. Biotechnol.* 185, 28–36. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.05.018
- Kayser, A., Weber, J., Hecht, V., Rinas, U., 2005. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture . I . Growth-rate- dependent metabolic efficiency at steady state Printed in Great Britain 693–706. doi:10.1099/mic.0.27481-0
- Kim, H., Lee, C., Lee, E., 2011. Alginate lyase: Structure, property, and application. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 851, 843–851. doi:10.1007/s12257-011-0352-8
- Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Gemeiner, P., 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.* 17–25. doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- Krahulec, J., Krahulcová, J., 2006. Increase in hyaluronic acid production by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strain deficient in β -glucuronidase in laboratory conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 415–422. doi:10.1007/s00253-005-0173-9
- Lee, C.H., Oon, J.S.H., Lee, K.C., Ling, M.H.T., 2012. *Escherichia coli* ATCC 8739 Adapts to the Presence of Sodium Chloride, Monosodium Glutamate, and Benzoic Acid after Extended Culture. *ISRN Microbiol.* 2012, 1–10. doi:10.5402/2012/965356
- Lengeler, J., Lin, E.C., 1972. Reversal of the mannitol-sorbitol diauxie in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112, 840–848.
- Lewis, N.G., Yamamoto, E., 1990. Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 455–496. doi:10.1146/annurev.pp.41.060190.002323
- Leyton, C.C., 2015. Condiciones Óptimas de Fermentación de Carbohidratos de Algas Pardas, Mediante el Uso de Organismos Genéticamente Modificados. Tesis. Universidad de Chile.
- Li, Y., Lin, Z., Huang, C., Zhang, Y., Wang, Z., Tang, Y., Chen, T., Zhao, X., 2015. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR–Cas9 mediated genome editing. *Metab. Eng.* 31, 13–21. doi:10.1016/j.ymben.2015.06.006
- Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J., 2011. Microbial production of hyaluronic acid :

- current state , challenges , and perspectives. *Microb. Cell Fact.* 10, 99. doi:10.1186/1475-2859-10-99
- Luli, G.W., Strohl, W.R., 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1004–1011.
- Mao, Z., Shin, H.D., Chen, R., 2009. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 63–69. doi:10.1007/s00253-009-1963-2
- Marcus, M., Halpern, Y.S., 1969. The metabolic pathway of glutamate in *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta* 177, 314–320.
- Marr, A.G., 1991. Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55, 316–333. doi:PMC372817
- McHugh, D., 2003. A guide to the seaweed industry.
- Membrillo-Hernández, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J., Lin, E.C.C., 2000. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase: Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 33869–33875. doi:10.1074/jbc.M005464200
- MetaCyc, 2016. MetaCyc Pathway: Alginate Degradation [En Línea]. URL: <http://www.metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-6986&detail-level=3> (accedido 10-marzo-2016).
- Neale, A.D.D., Scopes, R.K.K., KELLY, J.M.M., WETTENHALL, R.E.H.E., 1986. The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* 154, 119–124.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth. ed. United States of America.
- Ng, I.-S., Hung, Y.-H., Kao, P.-H., Zhou, Y., Zhang, X., 2016. CRISPR/Cas9 nuclease cleavage enables marker-free genome editing in *Escherichia coli*: A sequential study. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 68, 31–39. doi:10.1016/j.jtice.2016.08.015
- Norambuena, R., 1996. Recent trends of seaweed production in Chile. *Fifteenth Int. Seaweed Symp.* 371–379.
- Orth, J.D., Conrad, T.M., Na, J., Lerman, J. a, Nam, H., Feist, A.M., Palsson, B.Ø., 2011. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Mol. Syst. Biol.* 7, 1–9. doi:10.1038/msb.2011.65
- Peekhaus, N., Conway, T., 1998. What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 3495–3502.
- Percival, E., 1979. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.* 37–41. doi:10.1080/00071617900650121
- Preiss, J., Ashwell, G., 1962. Alginic acid metabolism in bacteria I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-l-erythro-5-hexoseulose uronic acid. *J. Biol. Chem.* 237, 309–316.

- Preiss, J., Ashwell, G., 1962. Alginic acid metabolism in bacteria II. The enzymatic reduction of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid. *J. Biol. Chem.* 237, 317–321.
- Rioux, L., Turgeon, S., Beaulieu, M., 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydr. Polym.* 69, 530–537. doi:10.1016/j.carbpol.2007.01.009
- Roesijadi, G., Jones, S., 2010. Macroalgae as a biomass feedstock: a preliminary analysis, PNNL 19944. Pacific Northwest
- Sahdev, S., Khattar, S.K., Saini, K.S., 2007. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 307, 249–264. doi:10.1007/s11010-007-9603-6
- Saier, M.H., Reizer, J., 1992. Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 174, 1433–1438.
- Sandoval, D., 2014. Producción de Bioetanol a Partir de Ácidos Grasos en Cultivos Aeróbicos de Escherichia Coli K12, Utilizando Ingeniería Genética y Herramientas de Ingeniería Metabólica. Tesis. Universidad de Chile.
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R.M.T., Thiele, I., Orth, J.D., Feist, A.M., Zielinski, D.C., Bordbar, A., Lewis, N.E., Rahmanian, S., Kang, J., Hyduke, D.R., Palsson, B.Ø., 2011. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Protoc.* 6, 1290–307. doi:10.1038/nprot.2011.308
- Seo, J., Bailey, J.E., 1985. Effects of Recombinant Plasmid Content on Growth Properties and Cloned Gene Product Formation in Escherichia coli. *Biotechnology XXVII*, 1668–1674.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D’Ari, R., 2007. Escherichia coli Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749. doi:10.1128/JB.01368-07
- Sheng, J.Z., Ling, P.X., Zhu, X.Q., Guo, X.P., Zhang, T.M., He, Y.L., Wang, F.S., 2009. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of Streptococcus zooepidemicus expression in Lactococcus lactis: a case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer. *J. Appl. Microbiol.* 107, 136–44. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04185.x
- Shodex, 2016. Hyaluronic Acid (2) (SB-806M HQ) [En Línea]. URL: <https://www.shodex.com/en/dc/03/06/19.html> (accedido 7-marzo-2016).
- Sigma-Aldrich, 2016. Enzymatic Assay of Hyaluronidase [En Línea]. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-hyaluronidase.html>
- Singh, V., Braddick, D., Dhar, P.K., 2016. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene.* doi:10.1016/j.gene.2016.11.008
- Song, J.-M., Im, J.-H., Kang, J.-H., Kang, D.-J., 2009. A simple method for hyaluronic

- acid quantification in culture broth. *Carbohydr. Polym.* 78, 633–634. doi:10.1016/j.carbpol.2009.04.033
- Sousa, A.S., Guimarães, A.P., Gonçalves, C. V., Silva, I.J., Cavalcante, C.L., Azevedo, D.C.S., 2009. Purification and Characterization of Microbial Hyaluronic Acid by Solvent Precipitation and Size-Exclusion Chromatography. *Sep. Sci. Technol.* 44, 906–923. doi:10.1080/01496390802691281
- Stern, R., Jedrzejewski, M.J., 2006. The Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. *Chem. Rev.* 106, 818–839. doi:10.1021/cr050247k
- Vaisman, D., 2014. Optimización de la biosíntesis de ácido hialurónico en *Escherichia coli* recombinante a partir de xilosa. Tesis. Universidad de Chile.
- Vásquez, J., 2009. Production, use and fate of Chilean brown seaweeds: re-resources for a sustainable fishery. *Ninet. Int. Seaweed Symp.* 20, 7–17. doi:10.1007/s10811-007-9308-y
- Vigetti, D., Karousou, E., Viola, M., DeLeonibus, S., De Luca, G., Passi, A., 2014a. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 2452–2459. doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001
- Vigetti, D., Viola, M., Karousou, E., De Luca, G., Passi, A., 2014b. Metabolic control of hyaluronan synthases. *Matrix Biol.* 35, 8–13. doi:10.1016/j.matbio.2013.10.002
- Wargacki, A., Leonard, E., Win, M., Regitsky, D., Santos, C., Kim, P., Cooper, S., Raisner, R., Herman, A., Sivitz, A., Lakshmanaswamy, A., Kashiwama, Y., Baker, D., Yoshikuni, Y., 2012. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science* (80-.). 335, 308–313. doi:10.1126/science.1214547
- Weigel, P.H., 1998. Bacterial Hyaluronan Synthase [En Línea]. Glycoforum. URL: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>.
- Weigel, P.H., DeAngelis, P.L., 2007. Hyaluronan Synthases: A Decade-plus of Novel Glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 282, 36777–36781. doi:10.1074/jbc.R700036200
- Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., Deangelis, P.L., Weigel, P.H., Brown, S., 2005. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3747–52. doi:10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005
- Wong, T.Y., Preston, L.A., Schiller, N.L., 2000. Alginate Lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 289–340. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.289
- Yu, H., Stephanopoulos, G., 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab. Eng.* 10, 24–32. doi:10.1016/j.ymben.2007.09.001
- Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* (80-.). 267, 240–243.

ANEXOS

A.1 Ruta Metabólica Cepa BAL 1611

En la Figura 60 se muestra un diagrama de las rutas metabólicas principales en la cepa BAL 1611. Notar que en esta figura no se incluye la ruta de las pentosas fosfato de forma detallada. Además, existen dos rutas de síntesis de etanol, una por *E. coli* y otra por *Z. mobilis*. Esta última representada en letra cursiva y con línea punteada en la dirección de los flujos.

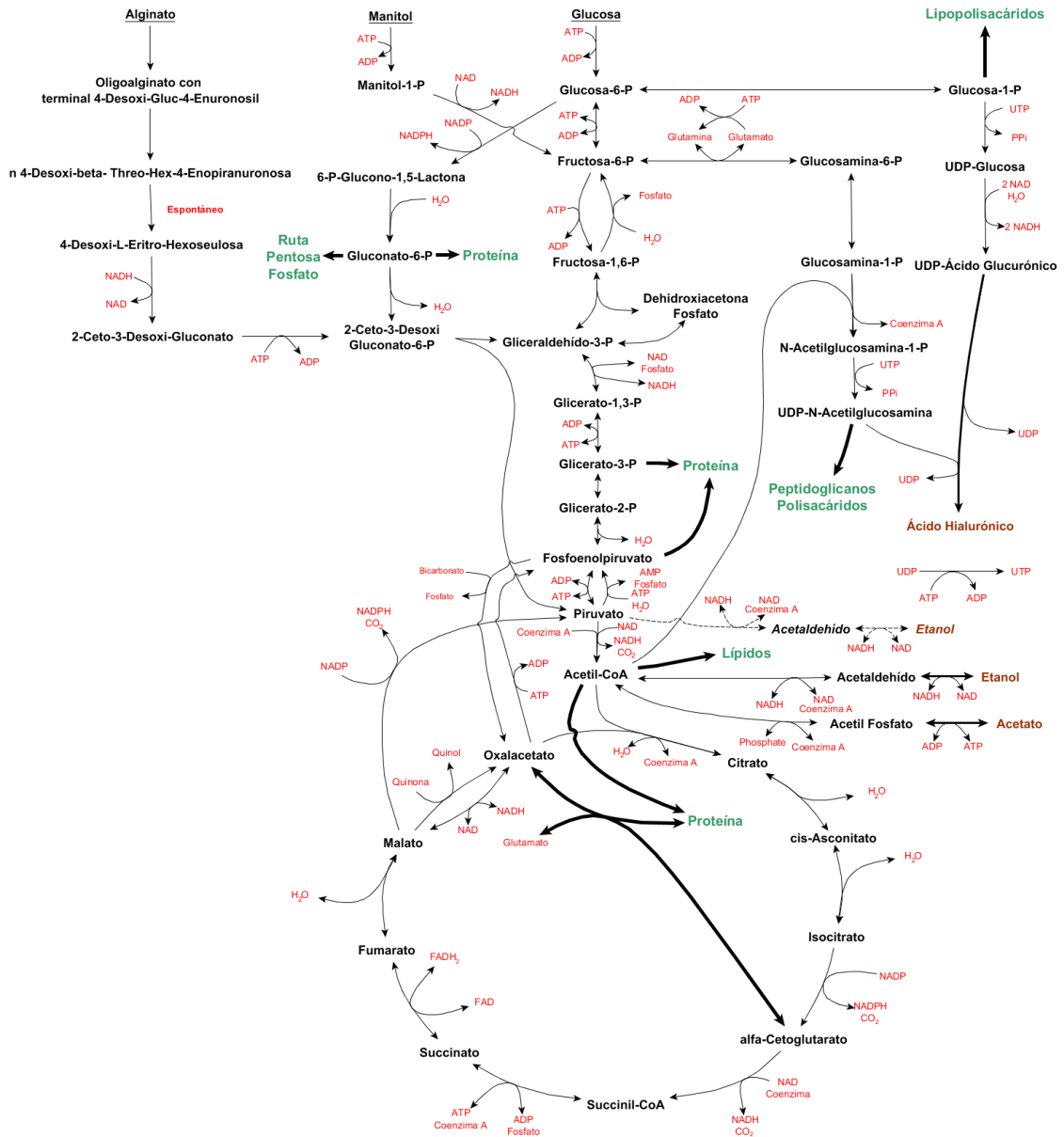


Figura 60 Diagrama de rutas metabólicas en la cepa BAL 1611. También se incluye la sección de la ruta de la producción de ácido hialurónico. Construcción del diagrama a partir de la información de (MetaCyc, 2016; Nelson y Cox, 2005; Wargacki et al., 2012; Yu y Stephanopoulos, 2008)

A.2 Tecnologías de manufactura de Ácido Hialurónico

En la Tabla XXV se tiene una comparación de diferentes tecnologías que se utilizan y otros en desarrollo para la producción de AH.

Tabla XXV Tecnologías de producción de ácido hialurónico. (Boeriu et al., 2013)

	Ventajas	Desventajas
Extracción de materiales animales	Tecnología Establecida	Variación de la calidad del producto
	Disponibilidad de materia prima a bajo costo	Riesgo de degradación del polímero
	Producto de muy alto peso molecular (alrededor de 20 [MDa])	Riesgo de contaminación con proteína, ácidos nucleicos y virus
	Producto Natural	Purificaciones extensivas Bajos rendimientos
Producción bacterial	Tecnología madura	Uso de organismos genéticamente modificados (GMO)
	Altos rendimientos	Riesgo de contaminación con endotoxinas bacteriales, proteínas, ácidos nucleicos y metales pesados
	Producto con alto peso molecular (entre 1 y 4 [MDa])	
Síntesis enzimática	Tecnología versátil	Tecnología emergente en desarrollo
	Control del peso molecular del producto. Productos de hasta 0,55-2,5 [MDa], como también oligosacáridos de tamaño definido	Viabilidad tecnológica y económica aún debe ser demostrada
	No hay riesgo de contaminación	
	Calidad constante del producto	

A.3 Tablas y Gráficos Fermentaciones

A.3.1 Datos comprobación de la producción de etanol

En las Tabla XVI y Tabla XVII se muestran las concentraciones de etanol en el tiempo de diferentes cultivos de cepas clones. La “cepa blanco” corresponde a la cepa BAL 1611.

Tabla XXVI Concentraciones de etanol de diferentes cultivos Parte 1.

Concentración Etanol [g/l]								
Hora [h]	Var. 2		Var. 3		Var. 6		Var. 7	
1,12	0	0	0	0	0	0	0	0
2,23	0	0	0	0	0	0	0	0
3,77	0,3239	0,3169	0,0085	0	0,3177	0,3485	0,3261	0,3495
6,25	1,0015	0,9923	0,5169	0,5007	1,1617	1,1199	0,8153	0,8475
8,07	0,9221	0,9035	0,6301	0,6549	1,1585	1,2529	0,9389	0,9785

Tabla XXVII Concentraciones de etanol de diferentes cultivos Parte 2.

Concentración Etanol [g/l]							
Hora [h]	Var. 9		Var. 10		Cepa Blanco		
1,12	0	0	0	0	0	0	
2,23	0	0	0	0	0	0	
3,77	0,2589	0,2723	0,0029	0	0,8027	0,8234	
6,25	0,5217	0,5109	0,5207	0,5089	2,2093	2,2973	
8,07	0,7291	0,7571	0,5769	0,5589	2,3122	2,3402	

En las Tabla XXVIII y Tabla XXIX se muestran el promedio de la concentración de etanol de los cultivos junto a su respectiva desviación estándar.

Tabla XXVIII Concentración promedio de etanol de diferentes cultivos Parte 1.

Concentración Etanol [g/l]								
Hora [h]	2		3		6		7	
1,12	0	0	0	0	0	0	0	0
2,23	0	0	0	0	0	0	0	0
3,77	0,320	0,00495	0,004	0,00601	0,333	0,021779	0,338	0,016546
6,25	0,997	0,006505	0,509	0,011455	1,141	0,029557	0,831	0,022769
8,07	0,913	0,013152	0,643	0,017536	1,206	0,066751	0,959	0,028001

Tabla XXIX Concentración promedio de etanol de diferentes cultivos Parte 2.

Hora [h]	Concentración Etanol [g/l]					
	9		10		Blanco	
1,12	0	0	0	0	0	0
2,23	0	0	0	0	0	0
3,77	0,266	0,009475	0,001	0,002051	0,813	0,014637
6,25	0,516	0,007637	0,515	0,008344	2,253	0,062225
8,07	0,743	0,019799	0,568	0,012728	2,326	0,019799

A.3.2 Datos para cuantificación de AH

A continuación, en la Tabla XXX se muestran las concentraciones de AH obtenidas de diferentes muestras. Las muestras que tienen un **conc** en la primera columna, corresponde a muestras a las que se aplicó el método de concentración de AH.

Tabla XXX Concentraciones finales de diferentes cultivos.

	Nombre	Muestra	OD ₆₀₀	Concentración [g/l]	Concentración [mg/l]	Dilución (3.5/2.5) [mg/l]
	top10 1	1	0,018	0,01386	13,86	19,407
	top10 2	2	0,022	0,01622	16,22	22,710
	top10 3	3	0,018	0,01386	13,86	19,407
	cepa10 lb 1	4	0,001	0,00383	3,83	5,368
	cepa10 lb 2	9	0,002	0,00442	4,42	6,194
	cepa10 lb 3	6	0,001	0,00383	3,83	5,368
	c10 M9 1	7	0,001	0,00383	3,83	5,368
	c10 M9 2	8	0,006	0,00678	6,78	9,497
	c10 m9 3	5	0,004	0,00560	5,60	7,845
conc	top 10 1A	10	0	0,00324	3,24	4,542
conc	top 10 1b	11	0,001	0,00383	3,83	5,368
conc	top 10 1c	12	0	0,00324	3,24	4,542
conc	top 10 2	13	0,002	0,00442	4,42	6,194
conc	top 10 3	14	0,001	0,00383	3,83	5,368
conc	c10 lb 1	15	0	0,00324	3,24	4,542
conc	c10 lb 2	16	0,001	0,00383	3,83	5,368
conc	c10 lb 3	17	0,002	0,00442	4,42	6,194
conc	c10 m9	18	0,003	0,00501	5,01	7,019
conc	c10 m9 2	19	0,003	0,00501	5,01	7,019
conc	c10 m9 3	20	0,001	0,00383	3,83	5,368

A.3.3 Datos recopilados para FBA

A continuación, se presentan los datos recopilados durante el proceso de fermentación para realizar el análisis de flujo metabólico. Se realiza un detalle para los diferentes parámetros medidos.

A.3.3.1 Medición biomasa

Tabla XXXI Densidad óptica para el seguimiento del cultivo.

Tiempo [hr]	OD ₆₀₀		
	10-2.1	10-2.2	10-2.3
0,00	0,37	0,37	0,38
0,83	0,5	0,5	0,51
1,80	0,72	0,77	0,74
2,67	0,95	1,02	0,97
3,83	1,53	1,61	1,5
4,92	2,38	2,42	2,3
5,80	2,67	2,6	2,59
6,78	3,53	3,4	3,32
7,83	3,7	3,67	3,45
8,75	3,9	3,7	3,5
9,92	3,83	4,05	3,65
21,82	4,16	4,06	4,23
22,75	4,14	4,26	4,07
23,83	3,77	3,74	3,53

Tabla XXXII Recopilación de pesos para el cálculo de peso seco de células.

	Antes [g]	Después [g]	Peso [g]	Volumen [ml]	Peso [mg]	Concentración [g/l]
Día 1	6,6001	6,6072	0,0071	5	7,1	1,42
	6,4959	6,5019	0,006	5	6	1,2
	6,6018	6,6083	0,0065	5	6,5	1,3
Día 2	6,6067	6,6135	0,0068	5	6,8	1,36
	6,5408	6,5464	0,0056	5	5,6	1,12
	6,6424	6,6492	0,0068	5	6,8	1,36

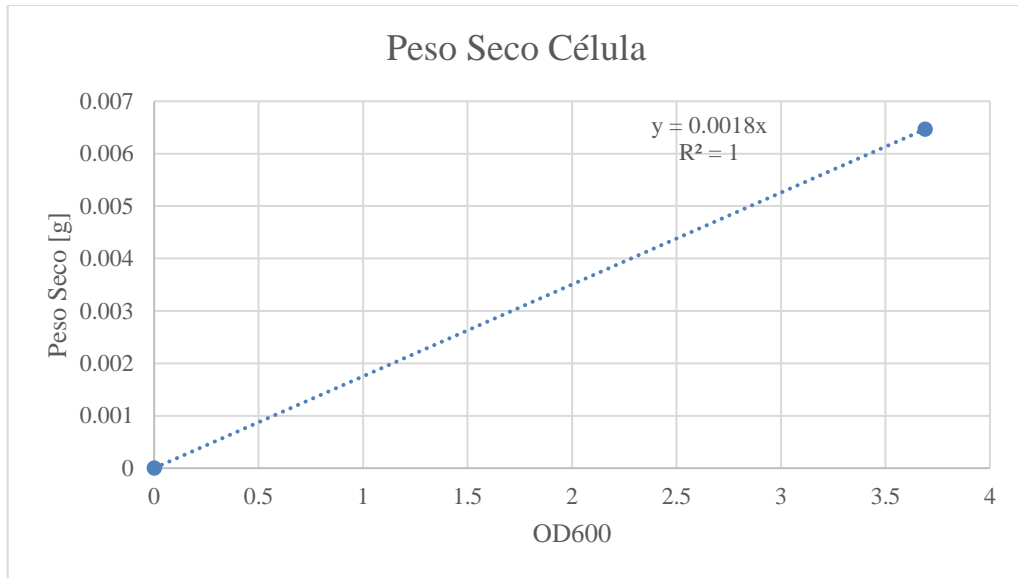


Figura 61 Curva estándar para el cálculo de peso seco.

A.3.3.2 Medición ácido hialurónico

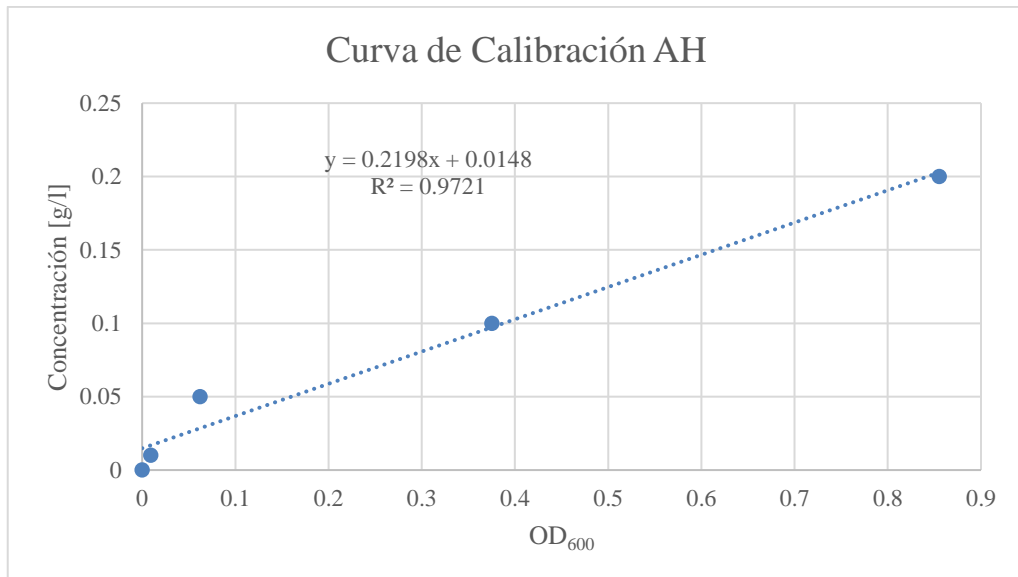


Figura 62 Resultados utilizando una concentración stock de ácido hialurónico.

Tabla XXXIII Densidad óptica para el cálculo de ácido hialurónico.

Tiempo [hr]	OD ₆₀₀ Ácido Hialurónico []			Promedio [g/l]	Desviación Estándar
0,00	1,5	1,5	1,5	1,5000	0
0,83	1,4	1,7	1,78	1,6267	0,2003
1,80	1,77	1,75	1,78	1,7667	0,0153
2,67	1,57	1,72	1,78	1,6900	0,1082
3,83	1,77	1,85	1,433	1,6843	0,2213
4,92	1,267	1,053	0,967	1,0957	0,1545
5,80	0,914	0,515	0,596	0,6750	0,2109
6,78	0,15	0,019	0,001	0,0567	0,0813
7,83	0,002	0,003	0,006	0,0037	0,0021
8,75	0,001	0,002	0,004	0,0023	0,0015
9,92	0,004	0,003	0,005	0,0040	0,0010
21,82	0,007	0,006	0,007	0,0067	0,0006
22,75	0,008	0,007	0,008	0,0077	0,0006
23,83	0,008	0,009	0,011	0,0093	0,0015

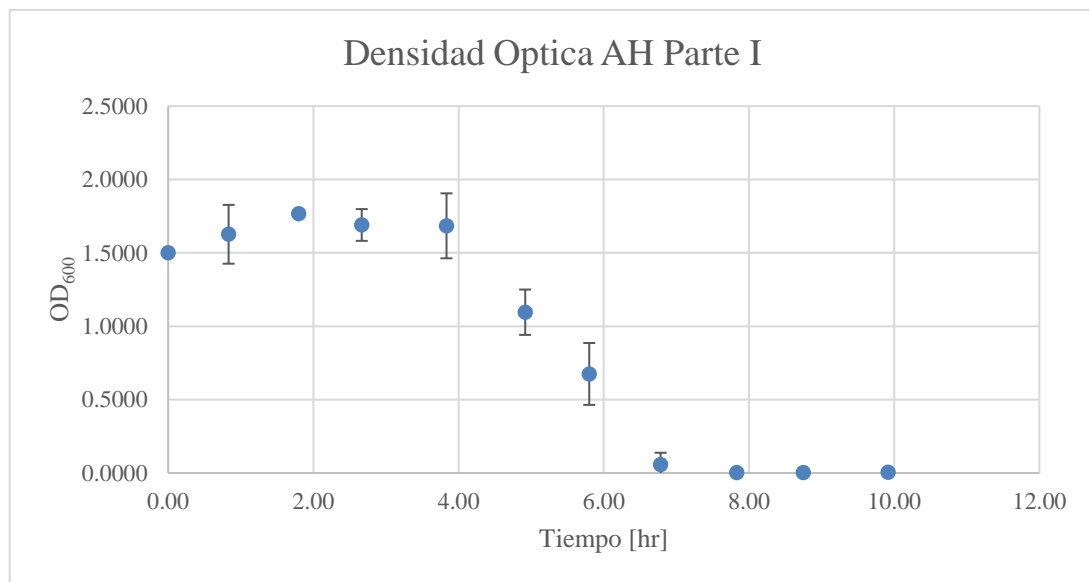


Figura 63 Resultados del método de cuantificación por turbidimetría, antes de las 10 horas de cultivo.

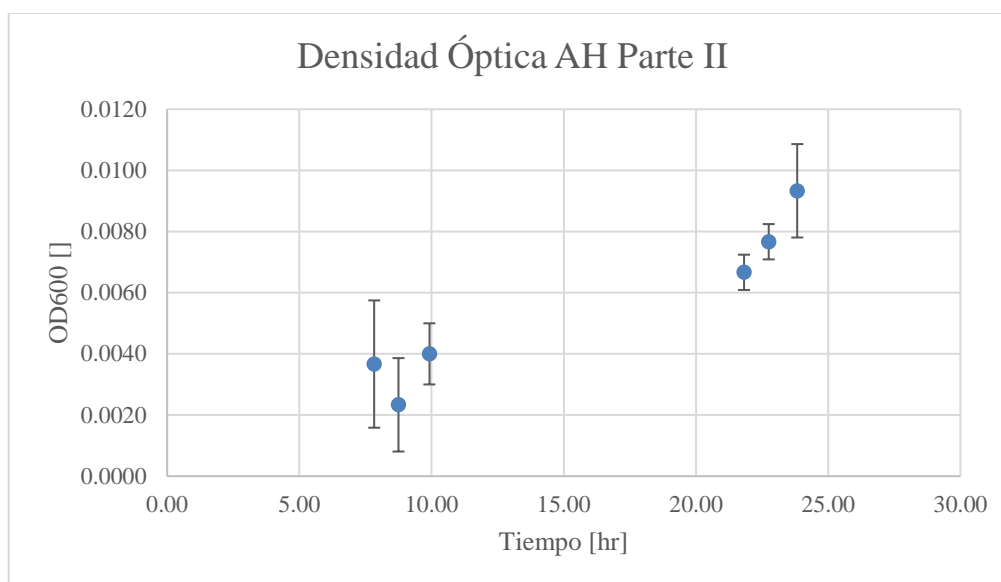


Figura 64 Resultados del método de cuantificación por turbidimetría después de las 8 horas de cultivo.

A.3.3.3 Tiempos de retención HPLC

En este proceso se utilizan el detector de índice de refracción (IR) y de ultra violeta (UV). En la Tabla XXIV, se muestra los tiempos de retención para diferentes compuestos utilizados en la preparación del medio de cultivo. Los tiempos de retención corresponden para la columna Biorad Aminex HPX-87H. No se muestran los tiempos de retención para algunos compuestos debido a que no es necesario utilizar el detector de luz ultravioleta para estos compuestos. Además, en otros procedimientos, ha resultado satisfactorio utilizar solamente el detector de índice de refracción.

Tabla XXXIV Tiempo de retención de diferentes compuestos presentes en los medios de cultivo con diferentes detectores.

Compuesto	Tiempo retención IR [min]	Tiempo de Retención UV [min]
Acetato	~17,4	~18,24
Alginato	~6,9	-
Arabinosa	~11,9	-
Etanol	~25,2	-
Manitol	~11,3	-
Oligómeros	~7,5	-
MgSO ₄	N/A	N/A
CaCl	N/A	~18,45
M9	~9,8	N/A

A.3.3.4 Medición acetato

A continuación, se muestran las curvas de calibración de acetato, utilizando un stock de ácido acético. Para la cuantificación, se utiliza los detectores de índice de refracción (Figura 65) y de luz ultra violeta (Figura 66).

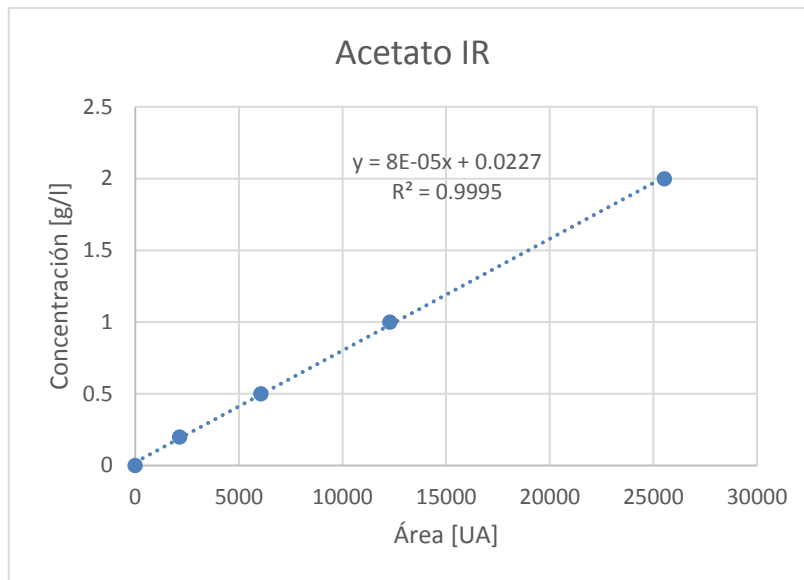


Figura 65 Resultados utilizando una concentración stock de acetato con un detector de índice de refracción.

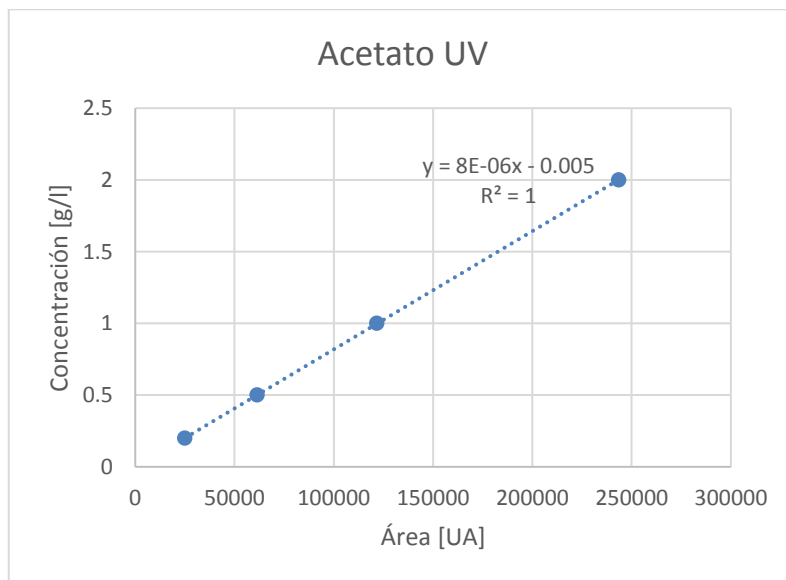


Figura 66 Resultados utilizando una concentración stock de acetato con un detector de luz ultra violeta.

Tabla XXXV Concentraciones de acetato en el tiempo presentes en las fermentaciones.

Tiempo [h]	Area [UA]			Promedio [g/l]	Desviación Estandar
0,00	-	-	-	-	-
0,83	-	-	-	-	-
1,80	108	43	82	0.216	0.0129
2,67	124	120	114	0.233	0.0020
3,83	158	204	219	0.262	0.0125
4,92	185	254	254	0.277	0.0157
5,80	234	305	391	0.308	0.0309
6,78	305	165	267	0.282	0.0285
7,83	344	379	205	0.308	0.0362
8,75	136	70	176	0.236	0.0211
9,92	-	-	-	-	-
21,82	-	-	-	-	-
22,75	-	-	-	-	-
23,83	-	-	-	-	-

Hay que tomar en cuenta que para el cálculo de la concentración se toma en consideración que se realiza una dilución 5X de las muestras.

A.3.3.5 Medición alginato

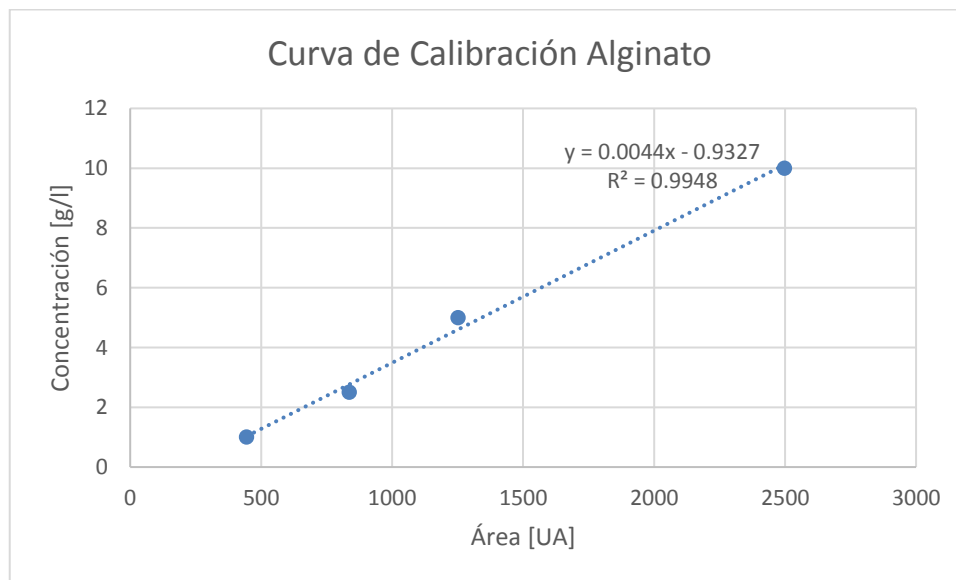


Figura 67 Resultados utilizando una concentración Stock de Alginato.

Tabla XXXVI Concentraciones de Alginato en el tiempo presentes en las fermentaciones.

Tiempo [h]	Area [UA]			Promedio [g/l]	Desviación Estandar
0,00	831	831	831	15,872	0,000
0,83	650	589	508	12,266	1,032
1,80	452	412	440	10,125	0,297
2,67	295	263	198	7,476	0,716
3,83	180	53	87	5,369	0,953
4,92	71	10	35	4,383	0,444
5,80	21	0	0	1,375	2,382
6,78	-	-	-	-	-
7,83	-	-	-	-	-
8,75	-	-	-	-	-
9,92	-	-	-	-	-
21,82	-	-	-	-	-
22,75	-	-	-	-	-
23,83	-	-	-	-	-

A.3.3.6 Medición arabinosa

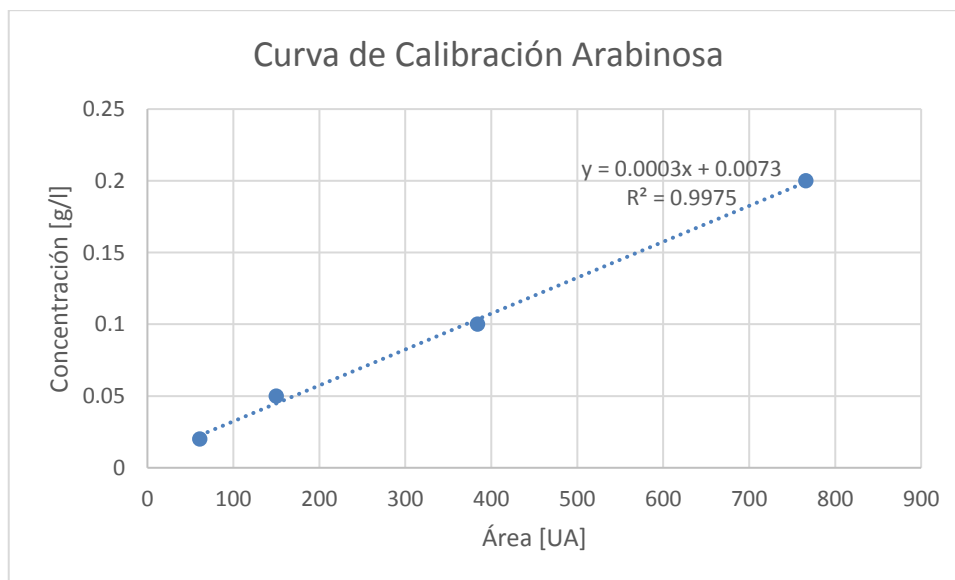


Figura 68 Resultados utilizando una concentración stock de arabinosa.

Tabla XXXVII Cocentraciones de Arabinosa en el tiempo presentes en las fermentaciones.

Tiempo [h]	Area [UA]			Promedio [g/l]	Desviación Estandar
0,00	113	113	113	0,207	0,000
0,83	115	90	96	0,186	0,020
1,80	108	87	97	0,182	0,015
2,67	84	70	95	0,161	0,019
3,83	73	59	85	0,145	0,020
4,92	53	33	37	0,098	0,016
5,80	31	19	17	0,070	0,012
6,78	-	-	-	-	-
7,83	-	-	-	-	-
8,75	-	-	-	-	-
9,92	-	-	-	-	-
21,82	-	-	-	-	-
22,75	-	-	-	-	-
23,83	-	-	-	-	-

A.3.3.7 Medición etanol

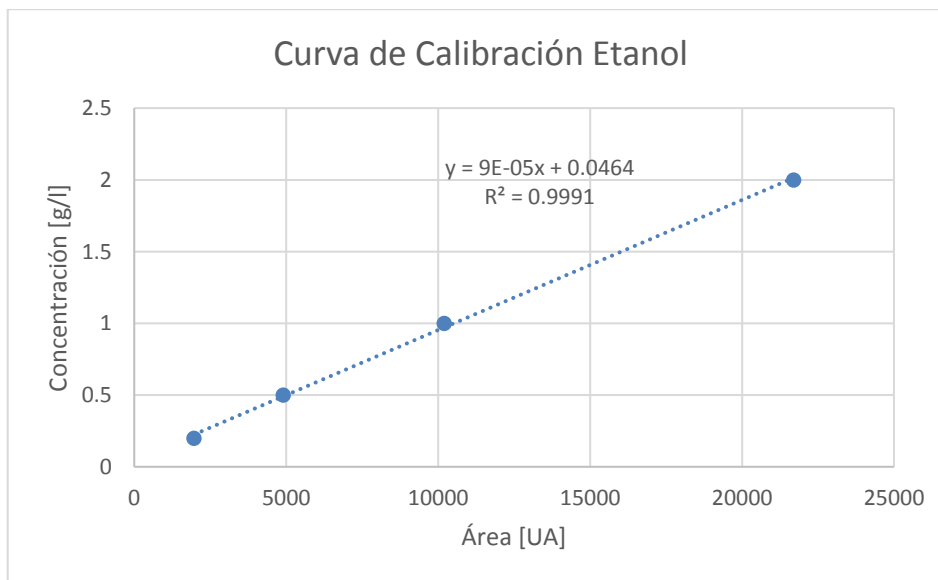


Figura 69 Resultados utilizando una concentración stock de etanol.

Tabla XXXVIII Concentración de etanol en el tiempo presentes en las fermentaciones.

Tiempo [h]	Area [UA]			Promedio [g/l]	Desviación Estandar
0,00	300	300	300	0,367	0,0000
0,83	430	442	412	0,425	0,0068
1,80	477	491	489	0,451	0,0034
2,67	522	461	527	0,459	0,0165
3,83	493	539	593	0,476	0,0225
4,92	458	578	741	0,499	0,0639
5,80	528	665	986	0,559	0,1058
6,78	679	522	993	0,561	0,1079
7,83	1625	1798	982	0,893	0,1935
8,75	1511	565	922	0,682	0,2150
9,92	748	448	1197	0,591	0,1696
21,82	1159	1260	986	0,743	0,0624
22,75	938	1068	1361	0,737	0,0975
23,83	1075	1425	1348	0,809	0,0828

A.3.3.8 Medición manitol

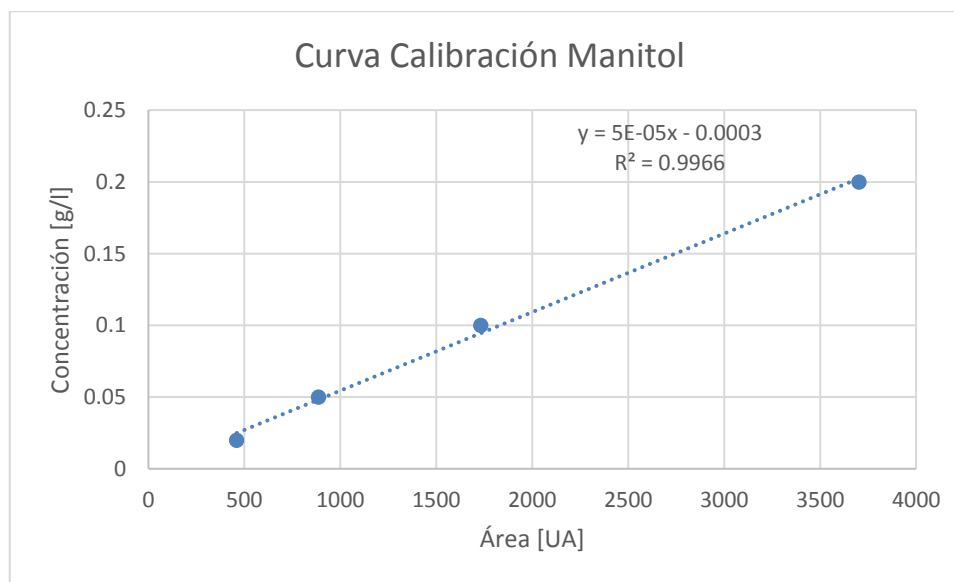


Figura 70 Resultados utilizando una concentración stock de manitol.

Tabla XXXIX concentraciones de manitol en el tiempo presentes en las fermentaciones.

Tiempo [h]	Área [UA]			Promedio [g/l]	Desviación Estándar
0,00	17172	17172	17172	4,293	0,000
0,83	15121	14064	13766	3,579	0,178
1,80	14156	12323	14214	3,391	0,269
2,67	11799	8269	12116	2,682	0,534
3,83	10538	9424	10454	2,534	0,155
4,92	7439	5652	5962	1,587	0,239
5,80	3714	3549	3545	0,900	0,024
6,78	1438	163	642	0,186	0,161
7,83	-	-	-	-	-
8,75	-	-	-	-	-
9,92	-	-	-	-	-
21,82	-	-	-	-	-
22,75	-	-	-	-	-
23,83	-	-	-	-	-

A.3.3.9 Medición oligómeros de alginato

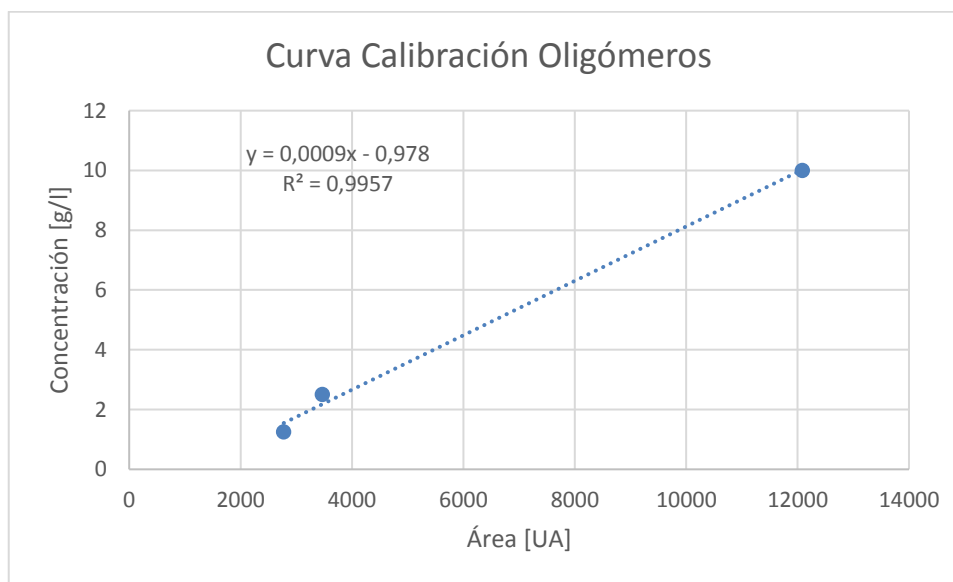


Figura 71 Curva Oligómeros, basado en alginato degradado por hidróxido de sodio.

Tabla XL Concentración de oligómeros de alginato presentes en el tiempo en las fermentaciones.

Tiempo [h]	Area [UA]			Promedio [g/l]	Desviación Estándar
0,00					
0,83	30	55	250	-0,476	0,542
1,80	254	415	699	1,074	1,014
2,67	476	636	941	2,102	1,063
3,83	1037	1331	1542	4,887	1,141
4,92	1507	1705	1547	6,161	0,471
5,80	1135	2020	2541	7,566	3,199
6,78	2653	2361	2241	9,905	0,954
7,83	3428	2951	2558	12,428	1,961
8,75	2997	2083	2197	9,938	2,241
9,92	1101	1389	1769	5,411	1,508
21,82	546	510	739	1,715	0,554
22,75	423	382	703	1,284	0,786
23,83	367	412	448	0,863	0,183

A.4 Tablas Comparativas FBA

Tabla XLI Flujos de las simulaciones con más reacciones.

#	Reacción \ Flux [mmol/gDW/h]	Prueba c/pdc	Prueba s/pdc	Óptimo AH c/pdc	Óptimo AH s/pdc	Óptimo Biomasa c/pdc	Óptimo Biomasa s/pdc
1	L-Arabinosa Isomerasa	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03
2	L-Ribuloquinasa	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03
3	L-Ribulosa Fosfato 4-Epimerasa	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03
4	Glucosa 6-P Deshidrogenasa	1.84E+01	0.00E+00	-5.63E-27	1.22E-27	2.10E+00	2.10E+00
5	Fosfoglucomutasa	-4.02E-02	-4.02E-02	-1.34E+00	-1.34E+00	-9.98E-02	-9.98E-02
6	Glucosa 6-P Isomerasa	-1.84E+01	-4.02E-02	-1.34E+00	-1.34E+00	-2.20E+00	-2.20E+00
7	Glutamina Sintetasa	3.56E-01	3.56E-01	1.65E+00	1.65E+00	8.87E-01	8.87E-01
8	UTP-Glucosa-1-P Uridilil Transferasa	6.97E-03	6.97E-03	1.31E+00	1.31E+00	1.69E-02	1.69E-02
9	6-Fosfogluconolactonasa	1.84E+01	0.00E+00	-5.63E-27	1.23E-27	2.10E+00	2.10E+00
10	Fosfogluconato Deshidrogenasa	1.84E+01	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.10E+00	2.10E+00
11	Ribulosa 5-P 3-Epimerasa	1.21E+01	-1.58E-01	-1.58E-01	-1.58E-01	1.01E+00	1.01E+00

Anexos

12	Ribosa 5-P Epimerasa	-6.28E+00	-1.53E-01	-1.53E-01	-1.53E-01	-1.08E+00	-1.08E+00
13	Transquetolasa 1	6.09E+00	-3.38E-02	-3.38E-02	-3.38E-02	6.12E-01	6.12E-01
14	Transquetolasa 2	6.01E+00	-1.17E-01	-1.17E-01	-1.17E-01	4.06E-01	4.06E-01
15	Transaldolasa	6.09E+00	-4.42E+00	-4.04E-02	-4.04E-02	-2.75E+00	5.96E-01
16	Fosfofructoquinasa	0.00E+00	0.00E+00	1.78E+00	1.78E+00	0.00E+00	3.35E+00
17	Fructosa Bifosfatasa	1.75E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
18	Glutamina-Fructosa-6-P Transminasa	1.49E-02	1.49E-02	1.31E+00	1.31E+00	3.68E-02	3.68E-02
19	Fosfoglucoamina Mutasa	-1.49E-02	-1.49E-02	-1.31E+00	-1.31E+00	-3.68E-02	-3.68E-02
20	UDP-Glucosa 6-Deshidrogenasa	3.00E-04	3.00E-04	1.30E+00	1.30E+00	3.00E-04	3.00E-04
21	Manitol-1-P 5-Deshidrogenasa	4.59E+00	4.59E+00	4.59E+00	4.59E+00	4.59E+00	4.59E+00
22	6-fosfogluconato deshidratasa	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
23	2-Dehidro-3-Desoxifosfogluconato aldolasa	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01
24	Fructosa-Bifosfato Aldolasa	-1.75E+00	0.00E+00	1.78E+00	1.78E+00	0.00E+00	3.35E+00
25	Triosa Fosfato Isomerasa	-1.79E+00	4.34E+00	1.74E+00	1.74E+00	3.27E+00	3.27E+00
26	Gliceraldehído-3-P Deshidrogenasa	3.13E+00	9.25E+00	4.06E+00	4.06E+00	7.70E+00	7.70E+00
27	Fosfoglicerato Quinasa	-3.13E+00	-9.25E+00	-4.06E+00	-4.06E+00	-7.70E+00	-7.70E+00
28	Fosfoglicerato Mutasa	-2.79E+00	-8.92E+00	-3.72E+00	-3.72E+00	-6.86E+00	-6.86E+00
29	Enolasa	2.79E+00	8.92E+00	3.72E+00	3.72E+00	6.86E+00	6.86E+00
30	Fosfoenolpiruvato Sintasa	1.96E+00	0.00E+00	1.29E+00	1.29E+00	0.00E+00	0.00E+00
31	Piruvato Quinasa	0.00E+00	3.57E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.77E-01	3.77E-01
32	Piruvato Deshidrogenasa	0.00E+00	8.21E+00	0.00E+00	3.35E+00	4.15E+00	4.15E+00
33	Manitol Transporte vía PTS	4.59E+00	4.59E+00	4.59E+00	4.59E+00	4.59E+00	4.59E+00
34	Glucosa-1-P N-Acetil Transferasa	1.49E-02	1.49E-02	1.31E+00	1.31E+00	3.68E-02	3.68E-02
35	UDP-N-Acetilglucosamina Transferasa	-4.93E-34	0.00E+00	-3.91E-34	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
36	AH Sintetasa	3.00E-04	3.00E-04	1.30E+00	1.30E+00	3.00E-04	3.00E-04
37	Oligoalginato Liasas	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01
38	Síntesis DEHU	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01
39	DEHU Reductasa (NAD)	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01
39	DEHU Reductasa (NADP)	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

Anexos

40	2-Dehidro-3-Desoxiglucosquinasa	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01	6.38E-01
41	Piruvato Descarboxilasa (Z. mobilis)	2.68E+00	0.00E+00	3.35E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
42	Acetaldehído Deshidrogenasa	1.58E+02	-7.64E-01	2.59E+00	-7.64E-01	-5.83E-01	-5.83E-01
43	Alcohol Deshidrogenasa	-2.52E-01	-2.52E-01	-2.52E-01	-2.52E-01	-2.52E-01	-2.52E-01
44	Fosfoacetiltransferasa	-3.17E-01	-3.17E-01	-3.17E-01	-3.17E-01	-3.17E-01	-3.17E-01
45	Acetato Quinasa	3.17E-01	3.17E-01	3.17E-01	3.17E-01	3.17E-01	3.17E-01
46	Aldehído Deshidrogenasa (NAD)	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
46	Aldehído Deshidrogenasa (NADP)	5.12E-01	5.12E-01	5.12E-01	5.12E-01	3.31E-01	3.31E-01
47	Difosfato kinasa	8.74E-02	8.74E-02	2.69E+00	2.69E+00	2.17E-01	2.17E-01
48	Citrato Sintasa	9.27E-01	7.05E+00	5.57E-01	5.57E-01	2.11E+00	2.11E+00
49	Aconitasa (Citrato Hidrolíasa)	9.27E-01	7.05E+00	5.57E-01	5.57E-01	2.11E+00	2.11E+00
50	Aconitasa (Isocitrato Hidrolíasa)	9.27E-01	7.05E+00	5.57E-01	5.57E-01	2.11E+00	2.11E+00
51	Isocitrato Deshidrogenasa (NADP)	3.28E-01	7.05E+00	2.23E-01	2.23E-01	2.11E+00	2.11E+00
52	2-Oxoglutarato Deshidrogenasa	1.06E-01	6.83E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.55E+00	1.55E+00
53	Succinil-CoA Sintetasa	-1.00E+03	-1.00E+03	1.06E-01	1.06E-01	-1.00E+03	-1.00E+03
54	Succinato Deshidrogenasa	7.70E-01	6.90E+00	4.00E-01	4.00E-01	1.72E+00	1.72E+00
55	Fumarasa	9.11E-01	7.04E+00	5.41E-01	5.41E-01	2.07E+00	2.07E+00
56	Malato Deshidrogenasa	1.51E+00	7.04E+00	8.76E-01	8.76E-01	2.07E+00	2.07E+00
57	Malato Deshidrogenasa 2	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
58	Malato Oxidoreductasa Descarboxilante	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
59	Fosfoenolpiruvato Carboxilasa	0.00E+00	5.98E-01	2.64E-01	2.64E-01	1.49E+00	1.49E+00
60	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
61	Oxaloacetato Descarboxilasa	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
62	Glutamato Deshidrogenasa (NADP)	-1.71E+00	-1.71E+00	-1.71E+00	-1.71E+00	-4.26E+00	-4.26E+00
63	Isocitrato Liasa	5.98E-01	0.00E+00	3.34E-01	3.34E-01	0.00E+00	0.00E+00
64	Malato Sintasa	5.98E-01	1.82E-04	3.35E-01	3.35E-01	4.55E-04	4.55E-04
65	Malato Óxidasa	2.48E-04	2.48E-04	2.48E-04	2.48E-04	6.19E-04	7.32E-04
66	Aspartato Transmitasa	-5.83E-01	-5.83E-01	-5.83E-01	-5.83E-01	-1.45E+00	-1.45E+00
67	L-Alanina Transaminasa	-1.00E+03	-1.00E+03	-1.00E+03	-1.00E+03	-1.00E+03	-1.00E+03

Anexos

68	Glutamato Sintasa	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
-	Biomasa	2.05E-01	2.05E-01	2.05E-01	2.05E-01	5.10E-01	5.10E-01
-	Intercambio L-Arabinosa	-7.90E-03	-7.90E-03	-7.90E-03	-7.90E-03	-7.90E-03	-7.90E-03
-	Intercambio Manitol	-4.59E+00	-4.59E+00	-4.59E+00	-4.59E+00	-4.59E+00	-4.59E+00
-	Intercambio Amonia	-2.15E+00	-2.15E+00	-3.45E+00	-3.45E+00	-5.36E+00	-5.36E+00
-	Intercambio O2	-2.29E+01	-2.29E+01	-5.98E+00	-5.98E+00	-9.73E+00	-9.73E+00
-	Intercambio Fosfato	-1.90E-01	-1.90E-01	-1.90E-01	-1.90E-01	-4.73E-01	-4.73E-01
-	L-Arabinosa Transporte vía Sistema ABC	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
-	L-Arabinosa Transporte vía Proton Symporter	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03
-	L-Arabinosa Transporte vía Difusión	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03	7.90E-03
-	Glucosa-1-P Timidilil Transferasa	1.67E-03	1.67E-03	1.67E-03	1.67E-03	4.16E-03	4.16E-03
-	Glucógeno Sintasa	3.15E-02	3.15E-02	3.15E-02	3.15E-02	7.87E-02	7.87E-02
-	Glucosa-1-P Adenilil Transferasa	3.15E-02	3.15E-02	3.15E-02	3.15E-02	7.87E-02	7.87E-02
-	Piruvato Sintasa	2.20E-02	2.20E-02	2.20E-02	2.20E-02	5.49E-02	5.49E-02
-	UDP-N-Acetilglucosamina Acetiltransferasa	3.33E-03	3.33E-03	3.33E-03	3.33E-03	8.32E-03	8.32E-03
-	UDP-N-Acetilglucosamina 1-Carboxiviniltransferasa	5.64E-03	5.64E-03	5.64E-03	5.64E-03	1.41E-02	1.41E-02
-	UDP-N-Acetilglucosamina Difosforilasa	1.49E-02	1.49E-02	1.31E+00	1.31E+00	3.68E-02	3.68E-02
-	UDP-N-Acetilglucosamina-N-Acetilmuramil Transferasa	5.64E-03	5.64E-03	5.64E-03	5.64E-03	1.41E-02	1.41E-02
-	UDP-Glucosa 4-Epimerasa	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
-	UDP-Glucosa 4-Epimerasa-Hexosa-1-P Uridililtransferasa	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
-	Intercambio Oligoalginato	-2.13E-01	-2.13E-01	-2.13E-01	-2.13E-01	-2.13E-01	-2.13E-01
-	Oligoalginato Transporte vía Difusión	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01
-	Oligoalginato Transporte vía Sodio Symporter	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01	2.13E-01
-	Intercambio AH	3.00E-04	3.00E-04	1.30E+00	1.30E+00	3.00E-04	3.00E-04
-	Acetil CoA Sintetasa	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

Anexos

Tabla XLII Tabla comparativa con la simulación de la prueba experimental sin piruvato descarboxilasa como base para la comparación.

#	Reacción \ Flux [mmol/gDW/h]	Prueba s/pc (Base)	Prueba c/pc	Óptimo AH c/pc	Óptimo AH s/pc	Óptimo Biomasa c/pc	Óptimo Biomasa s/pc
1	L-Arabinosa Isomerasa	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
2	L-Ribuloquinasa	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
3	L-Ribulosa Fosfato 4-Epimerasa	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
4	Glucosa 6-P Deshidrogenasa	0.00E+00	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
5	Fosfoglucomutasa	-4.02E-02	0.00%	3234.83%	3234.83%	148.49%	148.49%
6	Glucosa 6-P Isomerasa	-4.02E-02	45761.59%	3234.83%	3234.83%	5380.49%	5380.49%
7	Glutamina Sintetasa	3.56E-01	0.00%	365.36%	365.36%	149.48%	149.48%
8	UTP-Glucosa-1-P Uridilil Transferasa	6.97E-03	0.00%	18647.81%	18647.81%	143.17%	143.17%
9	6-Fosfogluconolactonasa	0.00E+00	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
10	Fosfogluconato Deshidrogenasa	0.00E+00	Presente	0.00%	0.00%	Presente	Presente
11	Ribulosa 5-P 3-Epimerasa	-1.58E-01	Cambio de Dirección	0.00%	0.00%	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección
12	Ribosa 5-P Epimerasa	-1.53E-01	4004.23%	0.00%	0.00%	604.84%	604.84%
13	Transquetolasa 1	-3.38E-02	Cambio de Dirección	0.00%	0.00%	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección
14	Transquetolasa 2	-1.17E-01	Cambio de Dirección	0.00%	0.00%	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección
15	Transaldolasa	-4.42E+00	Cambio de Dirección	-99.08%	-99.08%	-37.64%	Cambio de Dirección
16	Fosfofructoquinasa	0.00E+00	0.00%	Presente	Presente	0.00%	Presente
17	Fructosa Bifosfatasa	0.00E+00	Presente	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
18	Glutamina-Fructosa-6-P Transminasa	1.49E-02	0.00%	8712.61%	8712.61%	146.60%	146.60%
19	Fosfoglucosamina Mutasa	-1.49E-02	0.00%	8712.61%	8712.61%	146.60%	146.60%
20	UDP-Glucosa 6-Deshidrogenasa	3.00E-04	0.00%	433096.4%	433096.4%	0.00%	0.00%
21	Manitol-1-P 5-Deshidrogenasa	4.59E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
22	6-fosfogluconato deshidratasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
23	2-Dehidro-3-Desoxifosfogluconato aldolasa	6.38E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
24	Fructosa-Bifosfato Aldolasa	0.00E+00	Presente	Presente	Presente	0.00%	Presente

Anexos

25	Triosa Fosfato Isomerasa	4.34E+00	Cambio de Dirección	-59.87%	-59.87%	-24.76%	-24.76%
26	Gliceraldehído-3-P Deshidrogenasa	9.25E+00	-66.22%	-56.17%	-56.17%	-16.78%	-16.78%
27	Fosfoglicerato Quinasa	-9.25E+00	-66.22%	-56.17%	-56.17%	-16.78%	-16.78%
28	Fosfoglicerato Mutasa	-8.92E+00	-68.71%	-58.29%	-58.29%	-23.04%	-23.04%
29	Enolasa	8.92E+00	-68.71%	-58.29%	-58.29%	-23.04%	-23.04%
30	Fosfoenolpiruvato Sintasa	0.00E+00	Presente	Presente	Presente	0.00%	0.00%
31	Piruvato Quinasa	3.57E+00	Ausente	Ausente	Ausente	-89.45%	-89.45%
32	Piruvato Deshidrogenasa	8.21E+00	Ausente	Ausente	-59.22%	-49.50%	-49.50%
33	Manitol Transporte vía PTS	4.59E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
34	Glucosa-1-P N-Acetil Transferasa	1.49E-02	0.00%	8712.61%	8712.61%	146.60%	146.60%
35	UDP-N-Acetilglucosamina Transferasa	0.00E+00	Presente	Presente	0.00%	0.00%	0.00%
36	AH Sintetasa	3.00E-04	0.00%	433096.4%	433096.4%	0.00%	0.00%
37	Oligoalginato Liasas	2.13E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
38	Síntesis DEHU	6.38E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
39	DEHU Reductasa (NAD)	6.38E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
39	DEHU Reductasa (NADP)	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
40	2-Dehidro-3-Desoxiglucoquinasa	6.38E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
41	Piruvato Descarboxilasa (Z. mobilis)	0.00E+00	Presente	Presente	0.00%	0.00%	0.00%
42	Acetaldehído Deshidrogenasa	-7.64E-01	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	0.00%	-23.70%	-23.70%
43	Alcohol Deshidrogenasa	-2.52E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
44	Fosfoacetiltransferasa	-3.17E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
45	Acetato Quinasa	3.17E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
46	Aldehído Deshidrogenasa (NAD)	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
46	Aldehído Deshidrogenasa (NADP)	5.12E-01	0.00%	0.00%	0.00%	-35.35%	-35.35%
47	Difosfato kinasa	8.74E-02	0.00%	2973.66%	2973.66%	148.58%	148.58%
48	Citrato Sintasa	7.05E+00	-86.86%	-92.10%	-92.10%	-70.13%	-70.13%
49	Aconitasa (Citrato Hidrolíasa)	7.05E+00	-86.86%	-92.10%	-92.10%	-70.13%	-70.13%
50	Aconitasa (Isocitrato Hidrolíasa)	7.05E+00	-86.86%	-92.10%	-92.10%	-70.13%	-70.13%
51	Isocitrato Deshidrogenasa (NADP)	7.05E+00	-95.34%	-96.85%	-96.85%	-70.13%	-70.13%

Anexos

52	2-Oxoglutarato Deshidrogenasa	6.83E+00	-98.45%	Ausente	Ausente	-77.29%	-77.29%
53	Succinil-CoA Sintetasa	-1.00E+03	0.00%	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	0.00%	0.00%
54	Succinato Deshidrogenasa	6.90E+00	-88.84%	-94.20%	-94.20%	-75.13%	-75.13%
55	Fumarasa	7.04E+00	-87.05%	-92.31%	-92.31%	-70.62%	-70.62%
56	Malato Deshidrogenasa	7.04E+00	-78.56%	-87.56%	-87.56%	-70.62%	-70.62%
57	Malato Deshidrogenasa 2	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
58	Malato Oxidoreductasa Descarboxilante	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
59	Fosfoenolpiruvato Carboxilasa	5.98E-01	Ausente	-55.90%	-55.90%	149.61%	149.61%
60	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
61	Oxaloacetato Descarboxilasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
62	Glutamato Deshidrogenasa (NADP)	-1.71E+00	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
63	Isocitrato Liasa	0.00E+00	Presente	Presente	Presente	0.00%	0.00%
64	Malato Sintasa	1.82E-04	327930.2%	183302.7%	183302.7%	149.61%	149.61%
65	Malato Óxidasas	2.48E-04	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	195.53%
66	Aspartato Transmitasa	-5.83E-01	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
67	L-Alanina Transaminasa	-1.00E+03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
68	Glutamato Sintasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Biomasa	2.05E-01	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	Intercambio L-Arabinosa	-7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Intercambio Manitol	-4.59E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Intercambio Amonia	-2.15E+00	0.00%	60.46%	60.46%	149.59%	149.59%
-	Intercambio O2	-2.29E+01	0.00%	-73.86%	-73.86%	-57.44%	-57.44%
-	Intercambio Fosfato	-1.90E-01	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	L-Arabinosa Transporte vía Sistema ABC	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	L-Arabinosa Transporte vía Proton Simporter	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	L-Arabinosa Transporte vía Difusión	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Glucosa-1-P Timidilil Transferasa	1.67E-03	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	Glucógeno Sintasa	3.15E-02	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	Glucosa-1-P Adenilil Transferasa	3.15E-02	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%

Anexos

-	Piruvato Sintasa	2.20E-02	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	UDP-N-Acetilglucosamina Acetiltransferasa	3.33E-03	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	UDP-N-Acetilglucosamina 1-Carboxiviniltransferasa	5.64E-03	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	UDP-N-Acetilglucosamina Difosforilasa	1.49E-02	0.00%	8712.61%	8712.61%	146.60%	146.60%
-	UDP-N-Acetilglucosamina-N-Acetilmuramil Transferasa	5.64E-03	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	UDP-Glucosa 4-Epimerasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	UDP-Glucosa 4-Epimerasa-Hexosa-1-P Uridililtransferasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Intercambio Oligoalginato	-2.13E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Oligoalginato Transporte vía Difusión	2.13E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Oligoalginato Transporte vía Sodio Simporter	2.13E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Intercambio AH	3.00E-04	0.00%	433096.4%	433096.4%	0.00%	0.00%
-	Acetil CoA Sintetasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Tabla XLIII Tabla comparativa con la simulación de la prueba experimental con piruvato descarboxilasa como base para la comparación.

#	Reacción \ Flux [mmol/gDW/h]	Prueba c/pdc (Base)	Prueba s/pdc	Óptimo AH c/pdc	Óptimo AH s/pdc	Óptimo Biomasa c/pdc	Óptimo Biomasa s/pdc
1	L-Arabinosa Isomerasa	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
2	L-Ribuloquinasa	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
3	L-Ribulosa Fosfato 4-Epimerasa	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
4	Glucosa 6-P Deshidrogenasa	1.84E+01	Ausente	Cambio de Dirección	-100.00%	-88.57%	-88.57%
5	Fosfoglucomutasa	-4.02E-02	0.00%	3234.83%	3234.83%	148.49%	148.49%
6	Glucosa 6-P Isomerasa	-1.84E+01	-99.78%	-92.73%	-92.73%	-88.05%	-88.05%
7	Glutamina Sintetasa	3.56E-01	0.00%	365.36%	365.36%	149.48%	149.48%
8	UTP-Glucosa-1-P Uridilil Transferasa	6.97E-03	0.00%	18647.81%	18647.81%	143.17%	143.17%
9	6-Fosfogluconolactonasa	1.84E+01	Ausente	Cambio de Dirección	-100.00%	-88.57%	-88.57%
10	Fosfogluconato Deshidrogenasa	1.84E+01	Ausente	Ausente	Ausente	-88.57%	-88.57%
11	Ribulosa 5-P 3-Epimerasa	1.21E+01	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	-91.65%	-91.65%
12	Ribosa 5-P Epimerasa	-6.28E+00	-97.56%	-97.56%	-97.56%	-82.83%	-82.83%

Anexos

13	Transquetolasa 1	6.09E+00	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	-89.95%	-89.95%
14	Transquetolasa 2	6.01E+00	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	-93.25%	-93.25%
15	Transaldolasa	6.09E+00	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	-90.21%
16	Fosfofructoquinasa	0.00E+00	0.00%	Presente	Presente	0.00%	Presente
17	Fructosa Bifosfatasa	1.75E+00	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
18	Glutamina-Fructosa-6-P Transminasa	1.49E-02	0.00%	8712.61%	8712.61%	146.60%	146.60%
19	Fosfoglucosamina Mutasa	-1.49E-02	0.00%	8712.61%	8712.61%	146.60%	146.60%
20	UDP-Glucosa 6-Deshidrogenasa	3.00E-04	0.00%	433096.4%	433096.4%	0.00%	0.00%
21	Manitol-1-P 5-Deshidrogenasa	4.59E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
22	6-fosfogluconato deshidratasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
23	2-Dehidro-3-Desoxifosfogluconato aldolasa	6.38E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
24	Fructosa-Bifosfato Aldolasa	-1.75E+00	Ausente	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Ausente	Cambio de Dirección
25	Triosa Fosfato Isomerasa	-1.79E+00	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección
26	Gliceraldehído-3-P Deshidrogenasa	3.13E+00	196.03%	29.74%	29.74%	146.35%	146.35%
27	Fosfoglicerato Quinasa	-3.13E+00	196.03%	29.74%	29.74%	146.35%	146.35%
28	Fosfoglicerato Mutasa	-2.79E+00	219.61%	33.32%	33.32%	145.96%	145.96%
29	Enolasa	2.79E+00	219.61%	33.32%	33.32%	145.96%	145.96%
30	Fosfoenolpiruvato Sintasa	1.96E+00	Ausente	-33.99%	-33.99%	Ausente	Ausente
31	Piruvato Quinasa	0.00E+00	Presente	0.00%	0.00%	Presente	Presente
32	Piruvato Deshidrogenasa	0.00E+00	Presente	0.00%	Presente	Presente	Presente
33	Manitol Transporte vía PTS	4.59E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
34	Glucosa-1-P N-Acetil Transferasa	1.49E-02	0.00%	8712.61%	8712.61%	146.60%	146.60%
35	UDP-N-Acetilglucosamina Transferasa	-4.93E-34	Ausente	-20.69%	Ausente	Ausente	Ausente
36	AH Sintetasa	3.00E-04	0.00%	433096.4%	433096.4%	0.00%	0.00%
37	Oligoalginato Liasas	2.13E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
38	Síntesis DEHU	6.38E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
39	DEHU Reductasa (NAD)	6.38E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Anexos

39	DEHU Reductasa (NADP)	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
40	2-Dehidro-3-Desoxiglucosquinasa	6.38E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
41	Piruvato Descarboxilasa (<i>Z. mobilis</i>)	2.68E+00	Ausente	24.82%	Ausente	Ausente	Ausente
42	Acetaldehído Deshidrogenasa	1.58E+02	Cambio de Dirección	-98.37%	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección
43	Alcohol Deshidrogenasa	-2.52E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
44	Fosfoacetiltransferasa	-3.17E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
45	Acetato Quinasa	3.17E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
46	Aldehído Deshidrogenasa (NAD)	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
46	Aldehído Deshidrogenasa (NADP)	5.12E-01	0.00%	0.00%	0.00%	-35.35%	-35.35%
47	Difosfato kinasa	8.74E-02	0.00%	2973.66%	2973.66%	148.58%	148.58%
48	Citrato Sintasa	9.27E-01	661.26%	-39.89%	-39.89%	127.37%	127.37%
49	Aconitasa (Citrato Hidrolíasa)	9.27E-01	661.26%	-39.89%	-39.89%	127.37%	127.37%
50	Aconitasa (Isocitrato Hidrolíasa)	9.27E-01	661.26%	-39.89%	-39.89%	127.37%	127.37%
51	Isocitrato Deshidrogenasa (NADP)	3.28E-01	2048.18%	-32.23%	-32.23%	541.60%	541.60%
52	2-Oxoglutarato Deshidrogenasa	1.06E-01	6355.49%	Ausente	Ausente	1365.95%	1365.95%
53	Succinil-CoA Sintetasa	-1.00E+03	0.00%	Cambio de Dirección	Cambio de Dirección	0.00%	0.00%
54	Succinato Deshidrogenasa	7.70E-01	795.93%	-48.02%	-48.02%	122.84%	122.84%
55	Fumarasa	9.11E-01	672.49%	-40.57%	-40.57%	126.99%	126.99%
56	Malato Deshidrogenasa	1.51E+00	366.33%	-41.97%	-41.97%	37.02%	37.01%
57	Malato Deshidrogenasa 2	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
58	Malato Oxidoreductasa Descarboxilante	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
59	Fosfoenolpiruvato Carboxilasa	0.00E+00	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
60	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
61	Oxaloacetato Descarboxilasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
62	Glutamato Deshidrogenasa (NADP)	-1.71E+00	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
63	Isocitrato Liasa	5.98E-01	Ausente	-44.10%	-44.10%	Ausente	Ausente
64	Malato Sintasa	5.98E-01	-99.97%	-44.09%	-44.09%	-99.92%	-99.92%
65	Malato Óxidasa	2.48E-04	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	195.53%

Anexos

66	Aspartato Transmitasa	-5.83E-01	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
67	L-Alanina Transminasa	-1.00E+03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
68	Glutamato Sintasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Biomasa	2.05E-01	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	Intercambio L-Arabinosa	-7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Intercambio Manitol	-4.59E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Intercambio Amonia	-2.15E+00	0.00%	60.46%	60.46%	149.59%	149.59%
-	Intercambio O2	-2.29E+01	0.00%	-73.86%	-73.86%	-57.44%	-57.44%
-	Intercambio Fosfato	-1.90E-01	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	L-Arabinosa Transporte vía Sistema ABC	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	L-Arabinosa Transporte vía Proton Simporter	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	L-Arabinosa Transporte vía Difusión	7.90E-03	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Glucosa-1-P Timidilil Transferasa	1.67E-03	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	Glucógeno Sintasa	3.15E-02	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	Glucosa-1-P Adenilil Transferasa	3.15E-02	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	Piruvato Sintasa	2.20E-02	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	UDP-N-Acetilglucosamina Acetiltransferasa	3.33E-03	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	UDP-N-Acetilglucosamina 1-Carboxiviniltransferasa	5.64E-03	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	UDP-N-Acetilglucosamina Difosforilasa	1.49E-02	0.00%	8712.61%	8712.61%	146.60%	146.60%
-	UDP-N-Acetilglucosamina-N-Acetilmuramil Transferasa	5.64E-03	0.00%	0.00%	0.00%	149.61%	149.61%
-	UDP-Glucosa 4-Epimerasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	UDP-Glucosa 4-Epimerasa-Hexosa-1-P Uridililtransferasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Intercambio Oligoalginato	-2.13E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Oligoalginato Transporte vía Difusión	2.13E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Oligoalginato Transporte vía Sodio Simporter	2.13E-01	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
-	Intercambio AH	3.00E-04	0.00%	433096.4%	433096.4%	0.00%	0.00%
-	Acetil CoA Sintetasa	0.00E+00	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

A.5 Cálculo de producción de ATP para diferentes carbohidratos

Para realizar el cálculo, se contaron las cantidades que se producen de cada cofactor de interés (ATP, NAD(P)H y FADH₂). En el caso de la producción de energía sin producir AH, se toma desde se inicia con el principio de la vía con el carbohidrato hasta completar un ciclo en el ciclo del TCA.

Para el cálculo de la producción de energía con la producción de AH, se toma un supuesto para el caso del carbohidrato Alginato, en dónde el gliceraldehído 3-P que se produce en la reacción 23, continúa “río arriba” en la vía metabólica con la gluconeogénesis para producir AH. Por otro lado, el piruvato que se produce continua por la vía hasta completar un ciclo en el ciclo de Krebs.

Una vez cuantificado el total para cada cofactor, se realiza una equivalencia dónde cada mol de NAD(P)H y FADH₂ que se producen, equivalen a 2,5 y 1,5 moles de ATP respectivamente en la respiración celular.

A.6 Ladder GeneRuler 1 kb Plus

En la Figura 72, se muestra el *ladder* utilizado en los geles de electroforesis.

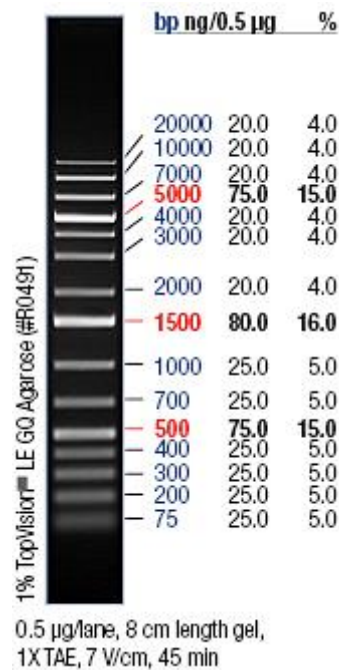


Figura 72 Ladder GeneRuler 1 kb Plus.

A.7 Código MATLAB-COBRA

Para la ejecución del análisis de flujo metabólico, se utilizó el siguiente código en Matlab con el toolbox COBRA 2.0 (Hyduke et al., 2011; Schellenberger et al., 2011). Este código se basa en el utilizado en el trabajo de (Vaisman, 2014).

```

clc
clear all          % Eliminar Todos los datos previos
initCobraToolbox; % Iniciar toolbox
model=readCbModel('Ec_iJO1366'); % leer Modelo Cobra

%% Flujos iniciales de intercambio en cero.

[selExc,selUpt] = findExcRxns(model); % Buscar las reacciones que sean intercambio de metabolitos

for i=1:length(model.rxns) % Todas estas "reacciones" tengan un flujo igual a cero
    if selExc(i,1)==1 || selExc(i,1)==-1
        model=changeRxnBounds(model, model.rxns(i,1),0,'T');
    end
end

%% Compuestos de medio M9 en exceso

model=changeRxnBounds(model,model.rxns(74,1),-1000,'T'); % Calcio [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(82,1),-1000,'T'); % Cloruro [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(85,1),-1000,'T'); % CO2 [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(185,1),-1000,'T'); % H+ [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(187,1),-1000,'T'); % H2O [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(206,1),-1000,'T'); % Potasio [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(233,1),-1000,'T'); % Magnesio [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(242,1),-1000,'T'); % Sodio [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(244,1),-1000,'T'); % Ammonio [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(252,1),-1000,'T'); % Oxígeno [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(263,1),-1000,'T'); % Fosfato [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(291,1),-1000,'T'); % Sulfato [e]

%% Fuera del medio / concentraciones traza
%% Si no se encuentran presentes, la cepa no crece.

model=changeRxnBounds(model,model.rxns(76,1),-0.01,'T'); % Cob(I)alamine
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(86,1),-0.01,'T'); % Cobalto
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(95,1),-0.01,'T'); % Cobre
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(127,1),-0.01,'T'); % Fe(+2)
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(128,1),-0.01,'T'); % Fe(+3)
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(237,1),-0.01,'T'); % Manganeso(+2)
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(239,1),-0.01,'T'); % Molibdato
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(245,1),-0.01,'T'); % Ni(+2)
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(284,1),-0.01,'T'); % Selenato
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(288,1),-0.01,'T'); % Selenito
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(313,1),-0.01,'T'); % Tungstato
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(332,1),-0.01,'T'); % Zinc

%% Eliminación de genes BAL1611

model = removeRxns(model,'LDH_D'); % D-lactate dehydrogenasa (ldhA)
model = removeRxns(model,'FRD2'); % Fumarate Reductase (frd)
model = removeRxns(model,'FRD3'); % Fumarate Reductase (frd)
model = removeRxns(model,'PFL'); % Pyruvate Formate Lyase (pflB)

%% Reacciones de Transporte y Degradación de Alginato

```

```

% Nombrar compuestos a utilizar en las reacciones
% Compuestos nuevos al modelo:
OAlge='OAlge[c]';      % Oligoalginato Extracelular
OAlgp='OAlgp[p]';      % Oligoalginato Espacio Periplasmático
OAlgc='OAlgc[c]';      % Oligoalginato Citoplasma
MonoAlg='MonoAlg[c]';  % Monómeros de Alginato
Dehu='DEHU[c]';        % DEHU

% Compuestos presentes en el modelo:
KDG=model.mets(59,1);  % 2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconate (KDG) [c]
h=model.mets(577,1);   % H+ [c]
nad=model.mets(720,1); % NAD+ [c]
nadh=model.mets(721,1); % NADH [c]
nadp=model.mets(722,1); % NADP [c]
nadph=model.mets(723,1); % NADPH [c]
NaP=model.mets(1679,1); % Sodio Espacio Periplasmático [p]
NaC=model.mets(717,1); % Sodio Citosol [c]

% RXN1 reacción correspondiente al intercambio de oligoalginatos.
metsRXN1={OAlge};      % Compuestos presentes en la reacción (Formato Cell) / Consumo de Oligoalginatos
stoichcoeffs1=[-1];    % Vector de coeficientes estequiométricos correspondientes a cada compuesto
[model]=addReaction(model,'EX_OAlg',metsRXN1,stoichcoeffs1,false); % Agregar reacción al modelo

% RXN2 Incorporación de Oligoalginatos por Porina al Espacio Periplasmático
metsRXN2={OAlge;OAlgp};
stoichcoeffs2=[-1 1];
[model]=addReaction(model,'T_OAlg',metsRXN2,stoichcoeffs2,false);

% RXN3 Incorporación de Oligoalginatos por Simporter de Sodio al Citosol
metsRXN3={OAlgp;OAlgc;NaP;NaC};
stoichcoeffs3=[-1 1 -1 1];
[model]=addReaction(model,'SYMna1Alg',metsRXN3,stoichcoeffs3,false);

% RXN4 Degradación de Oligoalginato (~3 monómeros) en monómeros de Alginato
metsRXN4={OAlgc;MonoAlg};
stoichcoeffs4=[-1 3];
[model]=addReaction(model,'SYNMonoAlg',metsRXN4,stoichcoeffs4,false);

% RXN5 Conversión de Monómeros de Alginato a DEHU
metsRXN5={MonoAlg;Dehu};
stoichcoeffs5=[-1 1];
[model]=addReaction(model,'SYNDehu',metsRXN5,stoichcoeffs5,false);

% RXN61 Conversión de DEHU a KDG (NADH)
metsRXN61={Dehu;KDG;nadh;nad;h};
stoichcoeffs61=[-1 1 -1 1 -1];
[model]=addReaction(model,'SYNKDG',metsRXN61,stoichcoeffs61,false);

% RXN62 Conversión de DEHU a KDG (NADPH)
metsRXN62={Dehu;KDG;nadph;nadp;h};
stoichcoeffs62=[-1 1 -1 1 -1];
[model]=addReaction(model,'SYNKDGP',metsRXN62,stoichcoeffs62,false);

% Agregar compuestos nuevos al modelo
model.metFormulas{1806}='C18H21O18'; % OAlge (3 monómeros)
model.metFormulas{1807}='C18H21O18'; % OAlgp (3 monómeros)
model.metFormulas{1808}='C18H21O18'; % OAlgc (3 monómeros)
model.metFormulas{1809}='C6H7O6';   % MonoAlg
model.metFormulas{1810}='C6H7O6';   % Dehu

```


Anexos

```
%% Reacción de Síntesis y Transporte de AH
% HA Sintasa produce HA hacia el exterior
HyaAcid='HyaAcid[e]'; % Ac. Hialurónico [e]

UDPgluc=model.mets(1010,1);
UDPNacetil=model.mets(994,1);
H2O=model.mets(580,1); % H2O [c]
UDP=model.mets(1003,1); % UDP [c]

% RXN7 Síntesis de Ácido Hialurónico
metsRXN7=[UDPgluc;UDPNacetil;HyaAcid;UDP];
stoichcoeffs7=[-1 -1 1 2];
[model]=addReaction(model,'SYNHA',metsRXN7,stoichcoeffs7,false);

% RXN71 "Transporte" de AH
metsRXN71={HyaAcid};
stoichcoeffs71=[-1];
[model]=addReaction(model,'EX_HA',metsRXN71,stoichcoeffs71,false);

model.metFormulas{1811}='C14H21NO11'; % HA

%% Producción de etanol por genes de Zymomonas mobilis

Acald=model.mets(212,1); % Acetaldehído [c]
Co2=model.mets(357,1); % CO2 [c]
etoh=model.mets(465,1); % Etanol [c]
Pyr=model.mets(853,1); % Piruvato [c]
h=model.mets(577,1); % H+ [c]

% RXN8 Conversión de Piruvato en Acetaldehído
metsRXN8=[Pyr;h;Co2;Acald];
stoichcoeffs8=[-1 -1 1 1];
[model]=addReaction(model,'SYNacald',metsRXN8,stoichcoeffs8,false);

%% Condiciones de Borde Modelo
model=changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',-1000,'l'); % O2[e]
model=changeRxnBounds(model,'EX_glc(e)',0,'l'); % Glucosa [e]
model=changeRxnBounds(model,'ACKr',-0.6,'l'); % Acetato [e]
model=changeRxnBounds(model,'EX_OAlg',-6,'l'); % Oligoalginato [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(291,1),0.2,'u'); % Etanol [e]
model=changeRxnBounds(model,'SYNacald',0,'l'); % Producción de etanol
model=changeRxnBounds(model,'EX_mnl(e)',0,'l'); % Manitol [e]
model=changeRxnBounds(model,'SYNHA',0.02042,'l'); % HA [e]
model=changeRxnBounds(model,model.rxns(62,1),-0.0079,'b'); % Arabinosa [e]
model=changeRxnBounds(model,'Ec_biomass_iJO1366_WT_53p95M',0.2045,'b'); % mu

%% Ecuación Objetivo
%model=changeObjective(model,'SYNHA');
model=changeObjective(model,'Ec_biomass_iJO1366_WT_53p95M');

%% Solución Modelo
sol=optimizeCbModel(model,'max');
sol
```