



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

ESTUDIO Y MODIFICACIÓN DE *ENTEROBACTER AEROGENES*
MEDIANTE INGENIERÍA GENÉTICA: ANÁLISIS DE LAS VÍAS PARA LA
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA,
MENCION INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

JUAN ALBERTO MORGADO GALDAMES

PROFESOR GUÍA:

M^a ORIANA SALAZAR AGUIRRE

PROFESOR CO-GUÍA:

ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

BERNARDO GONZÁLEZ OJEDA

SANTIAGO DE CHILE

2018

RESUMEN

En esta tesis se examinó la presencia de las vías de producción de bioH_2 en una cepa de *E. aerogenes*, denominada en nuestro laboratorio como 2F. La aproximación bioinformática realizada con el genoma de la cepa comercial KCTC 2190 demostró que esta cepa de *E. aerogenes* posee una [Ni-Fe]-hidrogenasa representada por la hidrogenasa-3 (Hyd-3) presente en el complejo proteico Formato Hidrógeno Liasa (FHL) encargada de generar bioH_2 por la vía del formato. Junto con lo anterior, la búsqueda experimental con partidores que poseen ambigüedad nucleotídica sugiere que Hyd-3 es la única hidrogenasa presente en la cepa *E. aerogenes* de nuestro laboratorio, no encontrando evidencia de la existencia de otras [Ni-Fe]-hidrogenasas así como de [Fe-Fe]-hidrogenasas.

Las fermentaciones realizadas con *E. aerogenes* 2F demuestran que el complejo proteico FHL es el principal encargado de la generación de bioH_2 a través de la vía del formato, logrando una producción de $2.66 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1}_{\text{Células}}$. Junto con lo anterior, se justifica la existencia de otro tipo de hidrogenasa independiente de formato, que no mostraría relación con el aumento de NADH intracelular. Por otro lado, el análisis de los resultados de las mutaciones, cuyo objetivo era aumentar los niveles de NADH, demuestran que su aumento produce un incremento en la producción de bioH_2 sugiriendo una relación no descrita hasta el momento entre NADH y Hyd-3 (3.69 mmoles de bioH_2 por gramo de célula).

El análisis del balance energético y de carbonos junto con la reconstrucción de las vías metabólicas centrales muestran que el desbalance energético, generado por la eliminación de genes, promueve la activación de otras vías celulares con el objetivo de restaurar este desbalance. De esta forma se produce una activación de vías anapleróticas y el incremento en la producción principalmente de acetato y etanol (0.31 y 1.67 moles de metabolito por mol de glucosa, respectivamente).

El estudio realizado con hidrolizado de paja de trigo, como sustrato renovable primario, demuestra que con el uso de pretratamientos alcalinos de 1 % y 2 % de NaOH, junto con el alcalino con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1.5 % se obtienen los mejores rendimientos de mmoles de bioH_2 por gramo de célula (3.06, 2.97, 2.50, respectivamente).

DEDICATORIA

Dedicada con todo mi amor a mis padres e hija,
quienes me han apoyado y acompañado en todos los aspectos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a la Dra. Oriana Salazar por la oportunidad de trabajar con ella y formar parte de su equipo de trabajo. Quisiera agradecer también su confianza, disponibilidad, consejos y paciencia. Agradezco a la Dra. Ziomara Gerdtzen y a los profesores que forman parte de la comisión evaluadora de esta tesis, al Dr. Juan Asenjo, a la Dra. María Elena Lienqueo y el Dr. Bernardo González por su paciencia y flexibilidad para el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer también a todo el equipo de trabajo del CeBiB, tanto a los que ya no están como a las nuevas generaciones, a Daniela Sandoval, Vida Rodríguez, Natalie Feltes, Cynthia Sanhueza, Anamaría Sánchez, Cristina Ravanal, Mayi Paz, Carlos Cortez, Carlos Gómez, Camila Wilkens, Javier Gimpel, Jose Duguet, Daniela Vaisman, Alicia Lucero, Jean Castro, Valeria Razmilic, Franco López, Diana Saucedo, Medardo Aníbal y a todos los que viven en la pecera. Una mención especial a Diego Lagos por su ingenio, buena onda y amistad.

Agradezco a Gina Madariaga, Irene Román y en especial a Nancy Carrasco, la única y todopoderosa Nancy que fue de gran ayuda no sólo a mí, sino para todos los que han pasado y pasarán por el laboratorio.

Agradezco al Dr. Nicolás Villagra por su apoyo tanto en la realización de esta tesis como en la de Magíster.

Quiero agradecer a mi familia por el apoyo que brindaron durante toda mi carrera y cada locura que he realizado: a Juan Morgado Castro, Emilia Galdames, Carolina y ahora a Tomás, el nuevo integrante. Agradecerles por la increíble alegría, apoyo y amor.

Agradezco a las Javis, primero a Javiera Soto-Aguilar por su invaluable compañía y amor entregado en estos años. Y especialmente agradezco a Javiera Morgado por darle sentido a mi vida.

Finalmente quisiera agradecer a las Beca de Doctorado CONICYT, al proyecto FONDECYT, proyecto No. 1121088 y al Proyecto basal del Centre for Biotechnology and Bioengineering (CeBiB) FB-001.

TABLA DE CONTENIDO

Índice de Figuras	ix
Índice de Tablas	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Desafío Energético	1
1.1.1. Situación energética de Chile	2
1.1.2. Recursos renovables	2
1.2. Hidrógeno	3
1.2.1. Formas de producción de Hidrógeno molecular	4
1.2.2. Fotólisis y fotofermentación	4
1.2.3. Fermentación independiente de luz (<i>dark fermentation</i>)	5
1.3. Hidrogenasas	5
1.3.1. Clasificación de las hidrogenasas	6
1.3.2. [Ni-Fe]-hidrogenasas	7
1.3.3. [Fe-Fe] Hidrogenasas	7
1.4. <i>Enterobacter aerogenes</i>	8
1.4.1. Vía del formato para la producción de bioH ₂	9

1.4.2. Vía de NADH para la producción de bioH ₂	11
1.5. Biología de sistemas	12
1.5.1. Análisis de flujos metabólicos	12
1.6. Motivación	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo General	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Materiales.	14
3.1.1. Reactivos.	14
3.1.2. Material Biológico.	15
3.1.3. Plásmidos.	19
3.1.4. Partidores.	21
3.2. Condiciones de cultivo	25
3.2.1. Cultivos bacterianos	25
3.2.2. Fermentaciones <i>batch</i> para la producción de hidrógeno	25
3.3. Métodos	26
3.3.1. Determinación de la concentración celular y tasa de crecimiento	26
3.3.2. Búsqueda bioinformática	26
3.3.3. Partidores degenerados	27
3.3.4. Electroforesis en geles de agarosa	30

3.3.5. Protocolo extracción ADN cromosomal	32
3.3.6. Extracción de ADN plasmidial	32
3.3.7. Extracción de ADN desde geles de agarosa	32
3.3.8. Amplificación por PCR	33
3.3.9. Purificación de productos de PCR	33
3.3.10. Obtención de mutantes de <i>E. aerogenes</i> 2F	34
3.3.10.1. Obtención del producto de PCR para mutagénesis.	34
3.3.10.2. Mutagénesis.	35
3.3.10.3. Eliminación del cassette de resistencia.	36
3.3.10.4. Retrocruce	36
3.3.10.5. Construcción de dobles y triples mutantes.	36
3.3.11. Cuantificación de NADH y NAD ⁺ intracelular	37
3.3.12. Cuantificación de lignina.	37
3.3.12.1. Lignina Insoluble.	38
3.3.12.2. Lignina soluble.	38
3.3.13. Pretratamientos utilizados para paja de trigo	39
3.3.13.1. Pretratamiento alcalino	39
3.3.13.2. Pretratamiento con peróxido de hidrógeno en medio alcalino	39
3.3.14. Hidrólisis enzimática	39
3.3.15. Cuantificación y caracterización de azúcares y metabolitos.	40
3.3.16. Medición del gas generado y su composición.	40
3.3.17. Análisis de flujos metabólicos	41

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. Búsqueda bioinformática	42
4.1.1. [Ni-Fe]-hidrogenasas	42
4.1.1.1. Contexto genético	47
4.1.2. [Fe-Fe] Hidrogenasas	50
4.2. Búsqueda experimental	52
4.2.1. [Ni-Fe]-hidrogenasas	53
4.2.2. [Fe-Fe]-hidrogenasa	58
4.3. Manipulación genética	61
4.4. Producción de bioH ₂	77
4.4.1. Efecto que tienen las mutaciones en la producción de bioH ₂ en medio rico LB.	77
4.4.1.1. Producción global de bioH ₂ en medio rico.	79
4.4.1.2. Producción de bioH ₂ por parte de la hidrogenasa Hyd-3 independiente en medio rico LB.	82
4.4.1.3. Efecto de las mutaciones en el metabolismo central de <i>E. aerogenes</i> en medio rico LB	85
4.4.2. Producción de bioH ₂ en medio definido con glucosa.	91
4.4.2.1. Producción global de bioH ₂ con glucosa.	91
4.4.2.2. Producción de bioH ₂ por parte de la hidrogenasa Hyd-3 independiente en medio definido con glucosa	95
4.4.2.3. Efecto de las mutaciones en el metabolismo central de <i>E. aerogenes</i> en medio mínimo con glucosa.	102
4.5. MFA	103

4.5.1.	Principales reacciones utilizadas en el Análisis de Flujos Metabólicos.	103
4.5.2.	Efecto de las mutaciones en los flujos internos de <i>E. aerogenes</i>	104
4.5.2.1.	Efecto de las mutaciones en los flujos internos de las variantes utilizadas para el estudio de la producción global de bioH ₂	104
4.5.2.2.	Efecto de las mutaciones en los flujos internos de las variantes con fondo genético <i>hyd-3</i> ⁻	108
4.5.3.	Balance de Carbono y Balance de Energético.	109
4.5.3.1.	Coeficientes estequiométricos experimentales	111
4.5.3.2.	Balance de carbonos	113
4.5.3.3.	Rendimiento experimental y grado de reducción	115
4.6.	Paja de trigo	119
4.6.1.	Antecedentes par el uso de hidrolizado de paja de trigo para la producción de bioH ₂ con <i>E. aerogenes</i>	119
5.	Conclusiones	136
	Bibliografía	137
A.	Anexo A	155
A.1.	Biología de sistemas y MFA	155
B.	Anexo B	185
C.	Anexo C	191
C.1.	Metabolismo anaeróbico de <i>E.aerogenes</i> 2F	199

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Representación gráfica de los dominios estructurales presentes en la familia [Fe-Fe]-hidrogenasas.	8
1.2. Representación gráfica del complejo proteico FHL (<i>Formate Hydrogen Lyase</i>) . .	10
1.3. Vías metabólicas en <i>E. aerogenes</i> para producción de bioH ₂	11
3.1. Diagrama de flujo del proceso bioinformático para determinar la existencia de otras hidrogenasas. (Elaboración propia.)	28
3.2. Diagrama de flujo para la generación de partidores degenerados. (Elaboración propia.)	31
4.1. Alineamiento de secuencia y patrones utilizados para la realización de PHI-BLAST para las [Ni-Fe]- hidrogenasas de la clase 1 en formato PROSITE	45
4.2. Comparación del contexto genético de los operones Hyd-1 y Hyd-2	49
4.3. Comparación del contexto genético de los operones Hyd-3 y Hyd-4	51
4.4. Identificación de secuencias consenso característicos de [Fe-Fe]- hidrogenasas . .	53
4.5. Amplificación de ADN genómico de <i>E. aerogenes</i> 2F Δ Hyd-3 con partidores degenerados para distintas [Ni-Fe]-hidrogenasa.	55
4.6. Segunda amplificación con partidores degenerados para cada clase de [Ni-Fe]-hidrogenasa.	56
4.7. Diagrama y amplificación por PCR de las [Fe-Fe]-hidrogenasas.	60

4.8. Representación del reemplazo alélico (<i>Red-Swap</i>)	63
4.9. Técnica de retrocruce por electrotransformación	64
4.10. Confirmación de la mutación del operón de la hidrogenasa-3 por intercambio alélico <i>Red-swap</i> (cepa MJ-02b)	65
4.11. Confirmación de la mutación del gen <i>ldhA</i> por intercambio alélico <i>Red-swap</i> (cepa MJ-04b).	67
4.12. Cociente NADH/NAD ⁺ para la cepa MJ-04	68
4.13. Confirmación de la mutación del gen <i>dad</i> por intercambio alélico <i>Red-swap</i> (cepa MJ-06b).	69
4.14. Cociente NADH/NAD ⁺ para la cepa MJ-06	69
4.15. Confirmación de la doble mutante en el operón <i>hyd-3</i> y el gen <i>ldhA</i> por intercambio alélico <i>Red-swap</i> (cepa MJ-12).	71
4.16. Confirmación de la doble mutante en el operón <i>hyd-3</i> y el gen <i>dld</i> por intercambio alélico <i>Red-swap</i> (cepa MJ-11).	72
4.17. Cociente NADH/NAD ⁺ para las variantes MJ-12 y MJ-11	73
4.18. Confirmación de la doble mutante en los genes <i>ldhA</i> y <i>dld</i> por intercambio alélico <i>Red-swap</i> (variante MJ-09b).	74
4.19. Cociente NADH/NAD ⁺ para la variante MJ-09	75
4.20. Confirmación de la triple mutante en el operón <i>hyd-3</i> , el gen <i>ldhA</i> y el gen <i>dld</i> por intercambio alélico <i>Red-swap</i> (variante MJ-14).	76
4.21. Cociente NADH/NAD ⁺ para la variante MJ-14	77
4.22. Efecto en la producción global de bioH ₂ en medio LB.	80
4.23. Efecto de la eliminación de Hyd-3 en la producción de bioH ₂ en medio LB.	83
4.24. Efecto de la hidrogenasa Hyd-3 independiente en la producción de bioH ₂ en medio LB.	84

4.25. Efecto de las mutaciones en la variación de pH en medio LB	86
4.26. Productos metabólicos de la fermentación en medio LB	88
4.27. Productos metabólicos de la fermentación en medio LB con las cepas con fondo genético <i>hyd-3⁻</i>	89
4.28. Producción global de bioH ₂ en medio definido con glucosa.	93
4.29. Acumulación de gases en medio definido con glucosa.	94
4.30. Producción de bioH ₂ debido a la hidrogenasa Hyd-3 independiente en medio definido con glucosa.	96
4.31. Mapa de las unidades transcripcionales activadas por FhIA.	101
4.32. Diagrama de las reacciones y genes usados para el MFA	105
4.33. Distribución de flujos metabólicos para la producción global de bioH ₂	107
4.34. Distribución de flujos metabólicos para las variantes con fondo genético Hyd-3 ⁻	110
4.35. Representación gráfica del procedimiento experimental para obtener bioH ₂ a partir de paja de trigo.	121
4.36. Hidrólisis enzimática de la paja de trigo.	126
4.37. Fermentación anaeróbica con distintos pretratamientos de paja de trigo.	127
4.38. Metabolitos presentes en la fermentación anaeróbica con distintos pretratamientos de paja de trigo.	132
A.1. Uso de codones utilizados por <i>E. aerogenes</i>	184
B.1. NADH y NAD ⁺ para las cepas MJ-04, MJ-06 y MJ-09	185
B.2. NADH y NAD ⁺ para las cepas MJ-02, MJ-12, MJ-11 y MJ-14	186
B.3. Producción global de hidrógeno en fase logarítmica medio LB	187

B.4. Producción de hidrógeno por la hidrogenasa hipotética en fase logarítmica medio LB	188
B.5. Productos metabólicos de la fermentación en medio mínimo suplementado con glucosa	189
B.6. Productos metabólicos de la fermentación en medio mínimo suplementado con glucosa para las cepas con fondo genético <i>hyd-3⁻</i>	190

ÍNDICE DE TABLAS

1.1. Comparación entre Fotólisis, fotofermentación y <i>dark fermentation</i>	6
1.2. Clasificación y función de la familia de las [Ni-Fe]-hidrogenasas.	7
3.1. Lista de cepas utilizadas.	15
3.2. Lista de plásmidos utilizados.	19
3.3. Lista de partidores utilizados.	21
3.4. Tabla con los microorganismos utilizados para diseñar los partidores degenerados para las [Fe-Fe]-hidrogenasas.	30
4.1. [Ni-Fe]-hidrogenasa de <i>E. coli</i>	43
4.2. Patrones conservados en las [Ni-Fe]-hidrogenasas usados en PHI-BLAST	48
4.3. Tabla con los resultados de la secuenciación de las [Ni-Fe]-hidrogenasas.	57
4.4. Características de los partidores utilizados para encontrar las [Fe-Fe]-hidrogenasas.	59
4.5. Tabla con los resultados de la secuenciación de las [Fe-Fe]-hidrogenasas.	61
4.6. Genes de interés cuya delección genera un aumento en la concentración de NADH	66
4.7. Tabla resumen de los valores intracelulares de NADH/NAD ⁺	77
4.8. Producción global de bioH ₂ en fase logarítmica en medio LB	81
4.9. Producción de bioH ₂ por la hidrogenasa Hyd-3 independiente en medio LB fondo genético <i>hyd-3</i> ⁻	85

4.10. Comparación en la producción de metabolitos secundarios en la fermentación en medio LB.	91
4.11. Tabla resumen en medio mínimo R suplementado con glucosa.	99
4.12. Tabla de metabolitos para la fermentación en medio mínimo con glucosa.	103
4.13. Coeficientes estequiométricos y rendimientos molares de los productos finales (mol mol_G^{-1}) de la fermentación <i>batch</i>	112
4.14. Balance de carbono y grado de reducción en medio mínimo con glucosa.	114
4.15. Grado de reducción en medio mínimo con glucosa.	117
4.16. Composición porcentual de la paja de trigo antes y después del pretratamiento.	123
4.17. Porcentaje de biomasa recuperada después del pretratamiento.	124
4.18. Productos metabólicos finales de la fermentación con paja de trigo	130
4.19. Producción de etanol de la fermentación con paja de trigo	134
A.1. Código nucleotídico en formato IUPAC	157
A.2. Lista de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1	157
A.3. Lista de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 2a	164
A.4. Lista de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 2b	166
A.5. Lista de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3a	167
A.6. Lista de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3b	168
A.7. Lista de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3c	169
A.8. Lista de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3d	171
A.9. Lista de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 4	173
A.10. Lista de las [Fe-fe] hidrogenasas	178

C.1. Tabla de metabolitos involucrados en la glicólisis	191
C.2. Tabla de metabolitos involucrados en la glicólisis especificando	192
C.3. Tabla de metabolitos involucrados en vía de las pentosas fosfato	193
C.4. Tabla de metabolitos involucrados en vía de las pentosas fosfato	193
C.5. Tabla de metabolitos involucrados en el ciclo ácido tricarboxílico	194
C.6. Tabla de metabolitos involucrados en el ciclo ácido tricarboxílico	195
C.7. Tabla de metabolitos involucrados en el metabolismo del piruvato	195
C.8. Tabla de metabolitos involucrados en el metabolismo del piruvato	196
C.9. Tabla de metabolitos involucrados en el metabolismo energético	197
C.10. Tabla de metabolitos involucrados en el metabolismo energético	198
C.11. Tabla de metabolitos involucrados en las reacciones de transporte	199

1.1 Desafío Energético

La enorme demanda energética que es necesaria para satisfacer las necesidades socioeconómicas tanto en Chile como a nivel mundial ha planteado un gran desafío debido a que la principal fuente para la generación de energía proviene de los combustibles de origen fósil, es decir, esta energía deriva del petróleo, gas natural y carbón. Se ha calculado que estos recursos naturales no renovables se agotarán dentro de poco tiempo, de hecho se ha estimado que las reservas mundiales de petróleo se consumirán dentro de no más de 80 años, para el caso de gas natural se han determinado alrededor de los 60 años y entre 170 a 200 años para el carbón [1]. Por lo que, a medida que pase el tiempo estos combustibles se harán más escasos lo que generará eventualmente un aumento en su valor.

El sustento de nuestra sociedad se ha basado en un suministro seguro y constante de energía basada en combustibles fósiles, por consiguiente, además de lidiar con el límite de temporalidad y la constante fluctuación en el mercado, debemos enfrentarnos al impacto ambiental que ha causado su uso. La utilización de estas fuentes de energía ha contribuido a efectos en el cambio climático, reflejados en un aumento progresivo de temperatura en la superficie terrestre, aumento en el nivel de los océanos, cambios en los patrones de precipitación, cambios en los ecosistemas y por último problemas de salud debido a la contaminación ambiental [2, 3].

Estos antecedentes han guiado la investigación en búsqueda de nuevas formas de energías a través del uso de tecnologías que permitan la transformación de fuentes renovables primarias en fuentes de energía que sean útiles, de bajo costo, amigables con el medio ambiente y de fácil utilización. Las energías renovables son aquellas que se obtienen de fuentes capaces de regenerarse en el tiempo, entre estas se encuentra la energía eólica, geotérmica, hidroeléctrica, mareomotriz,

solar y biomasa.

1.1.1 Situación energética de Chile

El estado de Chile ha logrado un crecimiento económico sostenible durante esta última década, lo que ha ido de la mano con una mayor necesidad energética. En relación a la necesidad energética primaria de Chile, esta se ve protagonizada principalmente a través del uso de petróleo (32.9%), carbón (24.4%), leña y biomasa (23.7%), gas natural (12.6%) e hidroeléctrica (6.4%) [4]. En relación al consumo energético en Chile, este se compone de 3 grandes sectores de consumo. i) Industrial y minero, ii) Transporte y iii) Comercial, público y residencial. El sector que comprende la industria y minería fue el principal consumidor en el año 2014 con aproximadamente un 40% del consumo final del país, que comprendió tres fuentes principales de energía; eléctrica (33%), diésel (26%) y biomasa (20%). El segundo sector con mayor utilización es el de transporte con un 33% del consumo final del país, representado por un 99% de derivados del petróleo (diésel y gasolina). El tercer sector (comercial, público y residencial) representa el 21% del consumo final del país, cuya fuente energética fue la electricidad [4].

Los antecedentes anteriores reflejan la necesidad que tiene Chile de una entrada constante y regular de combustibles de origen fósil, llegando a importar alrededor del 95% del petróleo utilizado. Esto nos hace vulnerables a las interrupciones y fluctuaciones en los valores de mercado que ocurren fuera del país. Por lo tanto, el desafío que enfrenta Chile es contar con recursos energéticos económicamente eficientes y competitivos que permitan un desarrollo económico sustentable con resguardo en la protección del medio ambiente entregando energía limpia y segura, que permita soslayar la fragilidad de nuestro actual sistema de abastecimiento energético.

1.1.2 Recursos renovables

Como se nombró anteriormente, las formas de energía sustentable a partir de recursos renovables son aquellas que virtualmente existen de forma inagotable, entre estas formas de energía se encuentra la energía eólica, geotérmica, hidroeléctrica, mareomotriz, solar y biomasa. La obtención de energía renovable a partir de biomasa es la que tiene mayor presencia en nuestro país. Dentro de este recurso primario se encuentra el caso de la biomasa maderera, la cual es la más abundante en el planeta y está compuesta de hemicelulosa, celulosa y lignina [5], estos componentes difieren en la forma en que se pueden degradar, para finalmente generar monómeros de

azúcares que pueden ser utilizados como fuente de energía por otros organismos.

A partir de los residuos biomásicos se puede obtener diferentes compuestos, los cuales han sido utilizados como vectores para la obtención de energía a nivel mundial tal como el hidrógeno molecular (H_2), metano, etanol entre otros productos [6, 7, 8]. Dentro de estos, el H_2 es considerado el vector de energía más prometedor que reemplazará a los combustibles de origen fósil, debido por un lado a que presenta un alto valor calorífico (142 MJ Kg^{-1}) [9, 10], este valor es mayor que la gasolina ($47,5 \text{ MJ Kg}^{-1}$), metano ($55,53 \text{ MJ Kg}^{-1}$), propano ($50,36 \text{ MJ Kg}^{-1}$) y diésel ($44,8 \text{ MJ Kg}^{-1}$). El alto contenido energético en el H_2 implica que la combustión de este gas genera más de 2,5 veces la energía que produce la combustión, de la misma masa de cualquiera de los otros combustibles. Otro punto importante del H_2 es que en el ámbito ambiental la combustión solo genera calor y vapor de agua como producto de desecho, por lo que el uso de esta tecnología es amigable con el medio ambiente.

1.2 Hidrógeno

El hidrógeno, cuyo símbolo químico es H, es el elemento más simple y abundante en el universo, sin embargo en su forma molecular (H_2) no es abundante. Este elemento está constituido de un protón y un electrón y se encuentra comúnmente asociado a otros elementos formando moléculas más complejas como agua (H_2O), hidrocarburos (como el gas natural - metano - CH_4 -), o en la biomasa formando parte de animales y plantas. Debido a que el H_2 no se encuentra en la naturaleza en su forma molecular, este debe ser obtenido a partir de compuestos que contengan hidrógeno como los combustibles fósiles, biomasa o del agua. El H_2 al igual que la electricidad es considerado un vector energético, no obstante a diferencia de la electricidad, el H_2 puede ser almacenado y transportado para su comercio. En cuanto a su uso, este podría ser suministrado a una *fuel cell*, que consiste en una celda o batería que es alimentada de forma continua por H_2 , obteniéndose energía en forma de electricidad, con una eficiencia energética mayor que la de un motor a combustión [11] y generando vapor de agua como desecho. Estas características convierten al H_2 en una alternativa para satisfacer la necesidad energética y solucionar la dependencia de fuentes externas, además de disminuir o mitigar la contaminación ambiental generada por el uso de combustibles fósiles.

1.2.1 Formas de producción de Hidrógeno molecular

La producción de H_2 puede ser llevado a cabo principalmente a través de 3 procesos; i) Procesos Termoquímicos (como la separación del agua, reformado de gas natural y gasificación), ii) Procesos Eléctricos (electrólisis de agua) y iii) biológicos (fotofermentación y fermentación sin luz). En la actualidad, la producción de H_2 a nivel mundial, se lleva a cabo casi exclusivamente a través del primero de los tres procesos, el que involucra el reformado de combustibles de origen fósil, por consiguiente hasta ahora no es una forma de energía renovable [12]. La siguiente forma más utilizada también pertenece a procesos termoquímicos y es la separación del agua, el principal inconveniente de estas dos tecnologías son las altas temperaturas de reacción lo que implica un aumento en el costo de producción [12]. Por otro lado, los procesos eléctricos y biológicos poseen las mejores proyecciones para la generación H_2 . Por un lado, la electrólisis de agua es considerada como una de las tecnologías más eficientes y seguras debido a que necesita sólo agua y energía en forma de electricidad [13] y la producción biológica es considerada la más amigable con el medio ambiente y la que requiere menos energía si se le compara con los otros métodos [14].

El producto obtenido de la producción biológica de H_2 es llamado biohidrógeno ($BioH_2$), este biohidrógeno puede ser obtenido de recursos renovables como la biomasa y energía solar [15]. Entre éstos, el potencial energético presente en la biomasa ha sido calificada como el recurso renovable más prometedor debido principalmente a su distribución y disponibilidad [16].

Los mecanismos de producción de biohidrógeno se pueden dividir en 3 categorías principales:

- Fotólisis, que se divide a su vez en:
 - Biofotólisis directa
 - Biofotólisis indirecta
- Fotofermentación
- Fermentación independiente de luz (*dark fermentation*)

1.2.2 Fotólisis y fotofermentación

La biofotólisis se define como la disociación de un sustrato (usualmente agua), por acción de la energía radiante del sol, para formar $BioH_2$ y oxígeno. Este tipo de proceso se lleva cabo por

bacterias fotosintetizadoras, como por algas verdes foto-autotróficas y cianobacterias que utilizan luz y dióxido de carbono como fuentes de energía [15]. Por otro lado, la fotofermentación, es utilizada por microorganismos que generan bioH₂ utilizando la energía solar para reducir componentes orgánicos. La desventaja que presentan estos dos sistemas radica principalmente en que existe una baja conversión energética a partir de la energía radiante, lo que se traduce en una baja tasa de producción. Junto con lo anterior, además, se necesitan grandes áreas en cuanto al diseño de los reactores, por lo que el proceso se encarece [17].

1.2.3 Fermentación independiente de luz (*dark fermentation*)

Se ha descrito este tipo de fermentación como la forma biológica más sustentable para la generación de bioH₂, donde se han reportado distintas bacterias mesófilas capaces de realizar este tipo de proceso como *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. y *Enterobacter* sp, [17, 18, 19]. Estas bacterias son capaces de generar bioH₂ de forma continua sin la necesidad de energía solar, a través del uso de enzimas específicas denominadas hidrogenasas, con una tasa de producción mayor en comparación con la fotólisis y la fotofermentación (Tabla 1.1) [17]. Además los reactores utilizados presentan diseños simples como los digestores anaeróbicos convencionales [9]. Si se compara la tasa de generación de bioH₂ con la tasa de generación de otra fuente energética como el metano, la tasa de producción de bioH₂ es mayor, este hecho ha sido clave para la utilización de la fermentación en la producción de hidrógeno [18]. Es por estas razones que la investigación se ha dirigido a la generación de bioH₂ a través de las fermentaciones sin luz. Sin embargo, los rendimientos en la producción de bioH₂ que se generan por esta vía, aún son bajos para satisfacer la demanda energética. Se ha descrito que uno de los principales factores limitantes en el rendimiento de la producción de bioH₂, radica en la formación de metabolitos secundarios que disminuyen la disponibilidad de intermediarios reducidos necesarios para la su generación [9].

1.3 Hidrogenasas

Las primeras hidrogenasas se describieron como enzimas capaces de catalizar el traspaso de electrones desde H₂ a un aceptor como el oxígeno, nitrato, sulfato, entre otros [20, 21]. De forma general se les denomina hidrogenasas a las enzimas que participan en el metabolismo de H₂, las que son capaces de catalizar la siguiente reacción reversible:



Tabla 1.1: Comparación entre Fotólisis, fotofermentación y *dark fermentation*.

Tipo de tecnología	Tasa de producción $H_2 \cdot (L \cdot H)^{-1}$
Fotólisis directa	0.07
Fotólisis indirecta	0.35
Fotofermentación	0.16
<i>Dark fermentation</i>	
Cepas mesófilas puras	21.0

Modificado de Levin D.B. y cols 2004 [17]

La dirección de reacción en la [Ecuación 1.1](#) dependerá del potencial *redox* de la molécula o compuesto que interactúe con la enzima, de esta forma algunos compuestos en presencia de H_2 actuarán como aceptores de electrones y la reacción procederá hacia la izquierda. Las enzimas que llevan a cabo este tipo de reacción se les denomina *uptake*-hidrogenasas, permitiendo a los microorganismos ocupar H_2 como fuente de energía. Por otro lado, si las hidrogenasas se encuentran en presencia de un compuesto capaz de donar electrones en presencia de protones, la reacción procederá hacia la derecha y se catalizará la producción de H_2 . Las hidrogenasas se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes microorganismos; en su mayoría se encuentran en procariontes como bacterias y arqueas, pero también se encuentran en menor proporción en eucariontes como protozoos y algas unicelulares [15, 22, 23], al igual que en algunos organismos multicelulares [24].

1.3.1 Clasificación de las hidrogenasas

Las hidrogenasas se clasifican en 3 diferentes familias dependiendo del tipo de metal que se encuentra presente en su sitio activo. Las hidrogenasas que presentan un centro de Níquel-Hierro [Ni-Fe] pertenecen a una de las familias más conocidas y estudiadas y se encuentran distribuidas en bacterias y arqueas. Las hidrogenasas que poseen un centro de Hierro-Hierro [Fe-Fe] se encuentran casi exclusivamente en bacterias y en algunos eucariontes. Por último se encuentran las hidrogenasas que poseen un centro de Hierro-Azufre [Fe-S] que han sido descritas en organismos metanógenos y se les denomina [Fe]-hidrogenasas. Estas últimas no serán abordadas en este trabajo.

1.3.2 [Ni-Fe]-hidrogenasas

De las familias de hidrogenasas, esta es la más estudiada y numerosa. Las proteínas que componen esta familia están constituidas estructuralmente como un heterodímero con una subunidad mayor denominada α (subunidad que posee el sitio activo) y una subunidad pequeña denominada β . Esta familia se clasifica en 7 clases diferentes, y se encuentran distribuidas en diversos organismos procariontes tanto aerobios como anaerobios, así como en autótrofos y heterótrofos (Tabla 1.2) [25].

Tabla 1.2: Clasificación y función de la familia de las [Ni-Fe]-hidrogenasas. Esta familia se distribuye en 7 subfamilias con funciones diferentes [26, 22].

Clase	Función
1	<i>Uptake</i> -hidrogenasa unida a la membrana
2a	<i>Uptake</i> -hidrogenasa presentes en cianobacterias
2b	Hidrogenasas censoras de H ₂
3a	Hidrogenasas F ₄₂₀
3c	NADP ⁺ -hidrogenasas bifuncionales
3d	Hidrogenasas reductoras de metilviológeno
4	Hidrogenasas productoras de H ₂ unidas a la membrana

Modificado de Vignais P.M. y Billoud B. 2007 [22]

1.3.3 [Fe-Fe] Hidrogenasas

Este tipo de hidrogenasas se encuentran en procariontes anaeróbicos como los microorganismos de la clase *Clostridia* y bacterias reductoras de sulfato, además han sido descritas en algunos organismos eucariontes anaerobios. En la mayoría de los casos estas hidrogenasas se encuentran en la naturaleza en forma monomérica, pero se pueden encontrar formando dímeros, trímeros y tetrámeros [27, 25]. Han sido descritas como productoras de bioH₂, pero se pueden encontrar casos donde además actúan como *uptake*-hidrogenasas [28].

Las hidrogenasas que pertenecen a esta familia poseen una gran diversidad de tamaños en cuanto a los péptidos que poseen la subunidad catalítica. El sitio activo de estas hidrogenasas es llamado *cluster*-H y participan en su formación 4 cisteínas que constituyen un enlace coordinado con centros de [Fe-S]. El *cluster*-H se encuentra bastante conservado en las [Fe-Fe]-hidrogenasas

y está formado por 3 patrones (H-1, H-2 y H-3) [29]. Si bien la mayoría de las hidrogenasas posee los tres patrones, existen casos donde uno o dos de estos patrones se encuentra ausente, como es el caso de una hidrogenasa recientemente descrita en *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 que no posee dentro de su secuencia el patrón H-2 [30]. Además algunas de las hidrogenasas de esta familia poseen un dominio adicional que puede coordinar un enlace con otro centro de [Fe-S] (Figura 1.1)

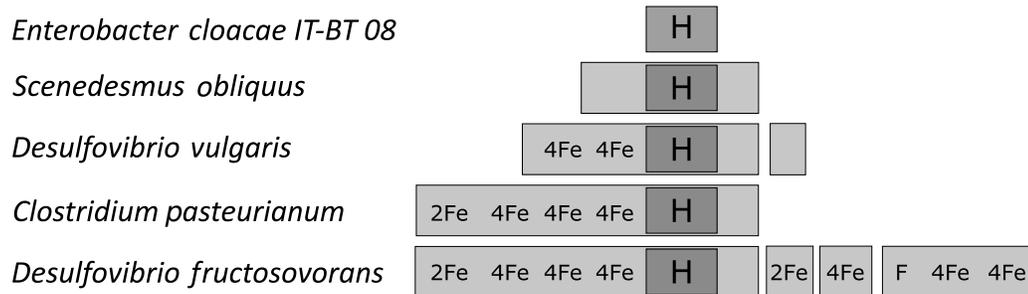


Figura 1.1: Representación gráfica de los dominios estructurales presentes en la familia [Fe-Fe]-hidrogenasas. Los módulos no se encuentran a escala y fueron inferidos de la comparación de secuencia y estructura. Símbolos: H: *cluster-H*; 2Fe: [2Fe-2S]; 4Fe: *cluster* [4Fe-4S]; F: sitio de unión de NADP⁺ Modificado de *Vignais P.M. y Billoud B. 2007* [22]

1.4 *Enterobacter aerogenes*

Como se señaló anteriormente, se han descrito diferentes cepas bacterianas capaces de generar bioH₂. Dentro de estas se encuentran bacterias pertenecientes al género *Enterobacter*, donde destacan *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*. Este género ha atraído el interés de los investigadores debido a diferentes factores donde sobresalen variables como altas tasas de crecimiento, fácil manipulación y cultivo, además de utilizar un amplio rango de sustratos [31, 32, 33], convirtiéndola en un género de uso cómodo, útil y conveniente. Entre estas cepas de *Enterobacter*, la especie *E. aerogenes* ha sido una de las más estudiadas, debido principalmente a que presenta las siguientes ventajas:

- Es de fácil manipulación, debido a que es un organismo anaerobio facultativo, pudiendo crecer en presencia de oxígeno, en contraste con otros organismos utilizados para generar bioH₂ como los del género *Clostridium*, que son anaerobios estrictos.

- Posee altas tasas de crecimiento.
- Altas tasas de producción de bioH₂ con gran potencial para la producción a gran escala.
- Un rendimiento teórico de 10 mol de bioH₂ mol⁻¹_{Glucosa} si se logra obtener una cepa capaz de generar hidrógeno en aerobiosis [34].
- Puede crecer en una atmósfera de 100 % H₂ [35].

Enterobacter aerogenes pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*, siendo una *Enterobacteria* Gram negativo y aerobia facultativa que forma parte importante de la biósfera. Dentro de las especies de *Enterobacter aerogenes* se encuentran cepas patógenas que causan enfermedades en diferentes tejidos de mamíferos y se caracterizan por presentar resistencia a variados antibióticos [36, 37]. Además de su importancia como agente etiológico de diferentes enfermedades, esta bacteria ha sido recientemente utilizada como modelo de estudio para la producción de diversos compuestos o moléculas de importancia industrial y científica [38, 39, 40, 41].

Los principales estudios en relación a la producción de bioH₂ por parte de *E. aerogenes* se han realizado optimizando las condiciones de cultivo y experimentando con la cepa silvestre [18], sin embargo hasta el momento el rendimiento en la producción de bioH₂ es bajo si se compara con el del género *Clostridium*, 1.58 mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa} y 2-3 mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa} respectivamente [42, 43].

Se ha sugerido que *E. aerogenes* genera bioH₂ por dos vías diferentes:

- Vía del formato
- Vía de NADH.

1.4.1 Vía del formato para la producción de bioH₂

Se ha descrito en *E. coli* que se produce formato en condiciones anaeróbicas a partir de piruvato por acción de la enzima piruvato formato liasa. Esto permite a la bacteria crecer y obtener energía a través de procesos fermentativos, acidificando el citoplasma y finalmente el medio. Para evitar la acidificación del medio, el complejo enzimático llamado Formato Hidrógeno Liasa (FHL, del inglés **Formate Hydrogen Lyase** (Figura 1.2)) genera H₂ y CO₂ con un rendimiento

teórico de 2 moles de bioH_2 por cada mol de glucosa (Figura 1.3). Este complejo está formado por la formato deshidrogenasa H (codificada en el gen *fdhF*) y por la hidrogenasa-3, codificada en el operón *hycABCDEFG*. El complejo FHL es regulado positivamente por el factor transcripcional FhlA (**F**ormate **H**ydrogen **L**yase **A**ctivator), el cual se vuelve activo cuando se encuentra unido a formato. Además, el complejo FHL es regulado negativamente por la proteína HycA evitando la activación de FhlA [44, 45, 46, 47].

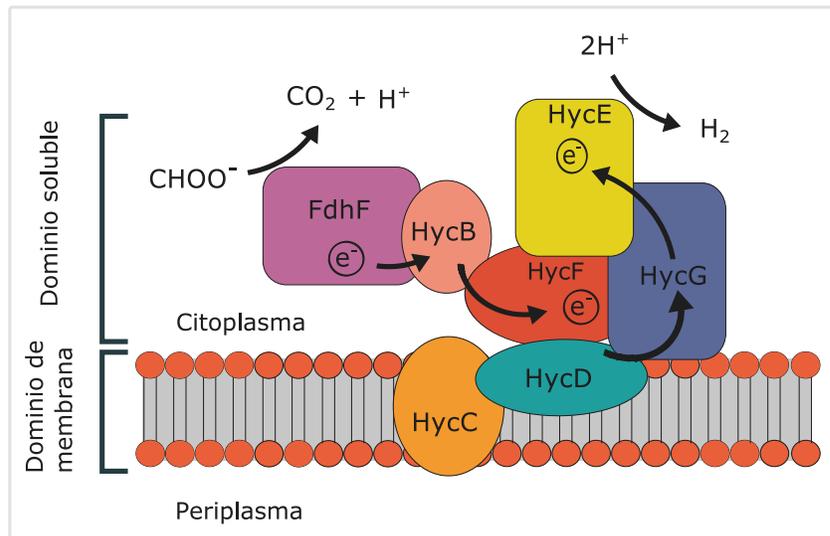


Figura 1.2: Representación gráfica del complejo proteico FHL (**F**ormate **H**ydrogen **L**yase). La generación de bioH_2 por el complejo proteico FHL comienza cuando el formato (HCOO^-) presente en el citoplasma cede electrones a la proteína FdhF generando una molécula de CO_2 y un protón. Los electrones obtenidos de esta forma son transportados a través del complejo enzimático gracias a las proteínas que poseen centros de [Fe-S], como HycB, HycF, para que finalmente la proteína HycE ceda estos electrones a los protones que se encuentran libres en el citoplasma generando finalmente una molécula de bioH_2 . (Elaboración propia.)

La presencia de la vía de formato en *E. aerogenes* fue sugerida en base a resultados experimentales agregando formato o ácido fórmico al medio de cultivo, confirmando que la evolución de bioH_2 aumentaba en presencia de estos compuestos [48]. Por otra parte, se demostró la presencia de una región de 5.431 pares de bases que contenía el grupo de genes *hycABCDE*, que codifica para el complejo enzimático FHL [46]. Además, se caracterizó y comprobó la presencia de los genes que codifican para los reguladores transcripcionales FhlA y HycA [47]. Si bien hay evidencia de la existencia de esta vía, poco se sabe acerca de ella y su regulación.

1.4.2 Vía de NADH para la producción de bioH₂

En esta vía el bioH₂ se forma a partir de los protones presentes en la célula cuando esta se encuentra en condiciones anaeróbicas. Debido a que durante la anaerobiosis se forman 4 moles de NADH por mol de glucosa, esta vía tiene un rendimiento teórico de 4 moles de bioH₂ por mol de glucosa (Figura 1.3). En *E. aerogenes* se sugirió la presencia de esta vía debido a que el rendimiento en la producción de bioH₂ se afectaba directamente al cambiar el estado *redox* de la célula por el uso de sustratos con diferentes estados de oxidación [35]. Junto con lo anterior, se demostró que la adición de NADH o NAD⁺ al medio de cultivo igualmente afectan la producción de bioH₂ al generar cambios en el estado *redox* de la vía de NADH intracelular [49]. Por otra parte, cuando se bloquean las vías metabólicas que compiten por la utilización de intermediarios reducidos, aumenta la producción de bioH₂. Conjuntamente, cuando se introduce una vía de regeneración de NADH, el rendimiento en la producción de bioH₂ aumenta [50, 51]. Si bien estos resultados sugieren la presencia de una vía de generación de bioH₂ dependiente de NADH, nada se sabe acerca de las enzimas que participan en esta.

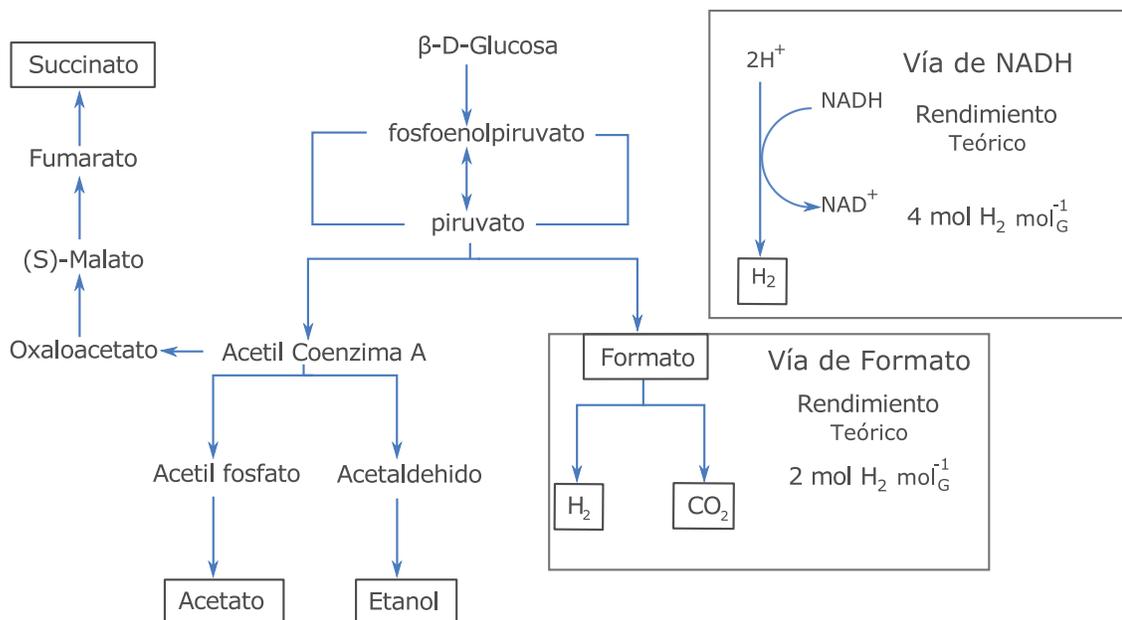


Figura 1.3: Mapa de las principales reacciones de la formación de bioH₂ presentes en *E. aerogenes*. (Elaboración propia.)

1.5 Biología de sistemas

Con la secuenciación del primer genoma humano se intensificó la generación de tecnologías que permitieron procesar y entregar gran cantidad información en forma masiva. Estas tecnologías originan plataformas de trabajo que otorgan la capacidad de realizar análisis científicos en forma global, permitiendo el estudio de los componentes de un sistema y su interrelación. La aparición de estas tecnologías permitió abordar la biología como un sistema, la cual no se enfoca sólo en sus componentes sino en los vínculos que existen entre estos. Esta visión ayuda a entregar información acerca de la naturaleza de las interacciones y sus redes regulatorias a través de varias herramientas como la bioinformática, matemáticas y métodos de análisis de sistema.

1.5.1 Análisis de flujos metabólicos

El análisis de flujos metabólicos (MFA, del inglés, **Metabolic Flux Analysis**) es una herramienta utilizada para la reconstrucción de redes metabólicas, las cuales contienen todas las reacciones metabólicas conocidas de un organismo además de los genes que codifican para las enzimas que catalizan las reacciones que componen la vía. De esta forma el MFA calcula el flujo de metabolitos dentro de una red metabólica, permitiendo predecir, por ejemplo, el comportamiento de la tasa de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo o en la producción de un metabolito de importancia biotecnológica [52].

1.6 Motivación

De acuerdo a los antecedentes expuestos, cabe destacar que el desafío general que plantea resolver este estudio es generar conocimiento, herramientas y material necesario que permita avanzar en la resolución del problema energético, a través del uso de nuevas formas de energía de fácil utilización. El desafío específico y la motivación de esta investigación radican en el estudio de las vías involucradas en la producción de H₂ y su interrelación, utilizando como modelo una cepa de *Enterobacter aerogenes*. Estos conocimientos servirán para una mejora del rendimiento de producción de Bio-hidrógeno a través de la fermentación con cultivos puros y genéticamente modificados de *E. aerogenes*, debido a que estos hasta el día de hoy sigue siendo bajo para ser considerado económicamente sustentable.

2.1 Objetivo General

Estudiar las vías involucradas en la producción de bioH₂ en la cepa *Enterobacter aerogenes*.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificación bioinformática y experimental del gen con actividad hidrogenasa independiente de formato en *E. aerogenes*.
- Realizar la reconstrucción de las vías centrales para la producción de bioH₂ en *E. aerogenes* y analizar los flujos metabólicos en diferentes condiciones y con diferentes sustratos.
- Realizar manipulación genética racional de las vías metabólicas que permiten modificar la producción de bioH₂ en *E. aerogenes*.
- Estudiar la producción de bioH₂ en *E. aerogenes* utilizando como fuente de carbono biomasa lignocelulósica.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.

3.1.1 Reactivos.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Merck: Acetato de sodio anhidro, ácido acético glacial, ácido cítrico monohidratado, ácido clorhídrico (HCl), alcohol isoamílico, azul de bromofenol, cisteína, cloroformo, cloruro de amonio (NH_4Cl) cloruro de sodio (NaCl), cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil formamido, etanol absoluto, fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4), fosfato di-ácido de sodio (NaH_2PO_4), formaldehído, fenol, hidróxido de sodio (NaOH), glucosa, glicerol, hidróxido de sodio (NaOH) e isopropanol.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (Gibco/BRL): dATP 100mM, dCTP 100mM, dGTP 100mM, dTTP 100mM, EDTA, 1kb *DNA plus ladder* (estándar de peso para ADN), ADN ligasa del fago T4 y todos los partidores de la [Tabla 3.3](#).

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma: Ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), aceite mineral, acetato de amonio, ampicilina, arabinosa, azul de bromofenol, agarosa, alcohol isoamílico, bromuro de etidio, cloranfenicol, filtros Millipore 0,025 μm , Carbenicilina, IPTG, metil viológeno, SDS, Trisma[®] (TRIS base) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosido (X-Gal).

El agar-agar granulado, extracto de levadura, peptona de caseína, se obtuvieron de **Bacto difco**. La Taq polimerasa *Phusion*[®] *High-Fidelity* se obtuvo de **Thermo Fisher Scientific**. La ADN polimerasa GoTaq[®] Flexi, el sistema de purificación de ADN "*The wizard*[®] *Genomic DNA Purification Kit*", Proteinasa K y el vector de clonamiento pGEM[®]-T Easy se obtuvieron de **Promega**.

3.1.2 Material Biológico.

Tabla 3.1: Lista de cepas utilizadas en esta tesis.

Nombre de cepario	Genotipo / Fenotipo relevante	Origen
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Derivada de K12, F ⁻ , λ^- , Φ 80dlacZ, $\Delta M15$ <i>endA1 recA1 hsdR</i> (r_k^- k_k^+) <i>phoA supE44 thi</i> <i>gyrA relA</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ U169	Stock laboratorio
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
<i>Enterobacter aerogenes</i> Hormaeche and Edwards KCTC 2190	Silvestre.	KCTC (<i>K</i> orean <i>C</i> ollection for <i>T</i> ype <i>C</i> ultures)
<i>Enterobacter aerogenes</i> 2F	Cepa clínica productora de hidrógeno.	Stock laboratorio
Cepas derivadas de <i>Enterobacter aerogenes</i> 2F		
MJ-01	<i>Enterobacter aerogenes</i> 2F / pKD46 ⁺ Carbe ^R Cam ^S . Generada por electroporación. Debe ser cultivada a 30 °C.	Esta tesis
MJ-02	$\Delta hyc-3::cat$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . No produce bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por intercambio alélico <i>Red-Swap</i> [53].	Esta tesis
MJ-02b	$\Delta hyc-3::cat$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . No produce bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por retrocruce con MJ-02 como dadora y <i>E. aerogenes</i> 2F como receptora [54].	Esta tesis

Continúa en la siguiente hoja

Tabla 3.1 – Continuación de las cepas utilizadas

Nombre de cepario	Genotipo / Fenotipo relevante	Origen
MJ-02c	$\Delta hyc-3::cat$ / pCP20 ⁺ pKD46 ⁻ Carbe ^R Cam ^R . No produce bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por electroporación. Debe ser cultivada a 30 °C.	Esta tesis
MJ-03	$\Delta hyc-3::FRT$ pCP20 ⁻ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^S . No produce bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por escisión del <i>cassette</i> de resistencia a cloranfenicol desde la cepa MJ-02c y el curado del plásmido pCP20.	Esta tesis
MJ-04	$\Delta ldhA::cat$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por intercambio alélico <i>Red-Swap</i> [53].	Esta tesis
MJ-04b	$\Delta ldhA::cat$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por retrocruce con MJ-04 como dadora y <i>E. aerogenes</i> 2F como receptora [54].	Esta tesis
MJ-04c	$\Delta ldhA::cat$ / pCP20 ⁺ pKD46 ⁻ Carbe ^R Cam ^R . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por electroporación. Debe ser cultivada a 30 °C.	Esta tesis

Continúa en la siguiente hoja

Tabla 3.1 – Continuación de las cepas utilizadas

Nombre de cepario	Genotipo / Fenotipo relevante	Origen
MJ-05	$\Delta dhA::FRT$ pCP20 ⁻ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^S . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por escisión del <i>cassette</i> de resistencia a cloranfenicol desde la cepa MJ-04c y el curado del plásmido pCP20.	Esta tesis
MJ-06	$\Delta dld::cat$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por intercambio alélico <i>Red-Swap</i> [53].	Esta tesis
MJ-06b	$\Delta dld::cat$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por retrocruce con MJ-06 como dadora y <i>E. aerogenes</i> 2F como receptora [54].	Esta tesis
MJ-06c	$\Delta dld::cat$ / pCP20 ⁺ pKD46 ⁻ Carbe ^R Cam ^R . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por electroporación. Debe ser cultivada a 30 °C.	Esta tesis
MJ-07	$\Delta dld::FRT$ pCP20 ⁻ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^S . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental, similar a MJ-04b. Generada por escisión del <i>cassette</i> de resistencia a cloranfenicol desde la cepa MJ-06c y el curado del plásmido pCP20.	Esta tesis
MJ-08	$\Delta dld::FRT$ / pKD46 ⁺ Carbe ^R Cam ^S . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por electroporación. Debe ser cultivada a 30 °C.	Esta tesis

Continúa en la siguiente hoja

Tabla 3.1 – Continuación de las cepas utilizadas

Nombre de cepario	Genotipo / Fenotipo relevante	Origen
MJ-09	$\Delta dld::FRT \ \Delta ldhA::cat.$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . Presenta una producción de bioH ₂ levemente mayor que la cepa parental. Generada por intercambio alélico <i>Red-Swap</i> [53] y el curado del plásmido pKD46.	Esta tesis
MJ-10	$\Delta hyc-3::FRT$ / pKD46 ⁺ Carbe ^R Cam ^S . No produce bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por electroporación. Debe ser cultivada a 30 °C.	Esta tesis
MJ-11	$\Delta hyc-3::FRT \ \Delta dld::cat$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . No produce bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por intercambio alélico <i>Red-Swap</i> [53] y el curado del plásmido pKD46.	Esta tesis
MJ-12	$\Delta hyc-3::FRT \ \Delta ldhA::cat$ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . Casi nula producción de bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por intercambio alélico <i>Red-Swap</i> [53].	Esta tesis
MJ-12b	$\Delta hyc-3::FRT \ \Delta ldhA::cat$ / pCP20 ⁺ pKD46 ⁻ Carbe ^R Cam ^R . Casi nula producción de bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por electroporación. Debe ser cultivada a 30 °C.	Esta tesis

Continúa en la siguiente hoja

Tabla 3.1 – Continuación de las cepas utilizadas

Nombre de cepario	Genotipo / Fenotipo relevante	Origen
MJ-13	$\Delta hyc-3::FRT \Delta ldhA::FRT$ pCP20 ⁻ pKD46 ⁻ Carbe ^S Cam ^S . Casi nula producción de bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por escisión del <i>cassette</i> de resistencia a cloranfenicol desde la cepa MJ-12b y el curado del plásmido pCP20.	Esta tesis
MJ-13b	$\Delta hyc-3::FRT \Delta ldhA::FRT$ / pKD46 ⁺ pCP20 ⁻ Carbe ^R Cam ^S . Casi nula producción de bioH ₂ . Presenta crecimiento más lento que la cepa parental. Generada por electroporación. Debe ser cultivada a 30 °C.	Esta tesis
MJ-14	$\Delta hyc-3::FRT \Delta ldhA::FRT \Delta dld::cat$ pKD46 ⁻ pCP20 ⁻ Carbe ^S Cam ^R . Casi nula producción de bioH ₂ . Generada por intercambio alélico <i>Red-Swap</i> [53].	Esta tesis

3.1.3 Plásmidos.

Tabla 3.2: Lista de plásmidos utilizados en esta tesis.

Plásmido	Características	Fuente
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 oriT ^S , Amp ^R	[53]
pKD3	<i>bla</i> FRT <i>cat</i> FRT PS1 PS2 ori R6K, Amp ^R Cam ^R	[53]
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT PS1 PS2 ori R6K, Amp ^R Cam ^R	[53]

Continúa en la siguiente hoja

Tabla 3.2 – Continuación de la lista de plásmidos

Plásmido	Características	Fuente
pCP20	<i>bla cat cl857</i> IPR <i>flp</i> pSC101 oriT ^S , Cam ^R	[53]
pGEM [®] -T Easy	Vector de clonamiento comercial de alto número de copias, Amp ^R	Promega
pC2b ₆₅₀	Vector que lleva clonado un fragmento de 650 pb en pGEM-T Easy usando los partidores Hidro-G2b_F y Hidro-G2b_R, Amp ^R	Esta tesis
pC3d ₁₀₀₀	Vector que lleva clonado un fragmento de 1000 pb en pGEM-T Easy usando los partidores Hidro-C3d_F y Hidro-C3d_R, Amp ^R	Esta tesis
pC3d ₁₅₀₀	Vector que lleva clonado un fragmento de 1500 pb en pGEM-T Easy usando los partidores Hidro-C3d_F y Hidro-C3d_R, Amp ^R	Esta tesis
pGFe ₆₅₀	Vector que lleva clonado un fragmento de 650 pb en pGEM-T Easy usando los partidores Hyd-H1 y Hyd-H3, Amp ^R	Esta tesis
pGFe ₈₀₀	Vector que lleva clonado un fragmento de 800 pb en pGEM-T Easy usando los partidores Hyd-H1 y Hyd-H3, Amp ^R	Esta tesis
pGFe ₇₅₀	Vector que lleva clonado un fragmento de 750 pb en pGEM-T Easy usando los partidores Ext H-2 y Hyd-H3, Amp ^R	Esta tesis
pGFe ₈₅₀	Vector que lleva clonado un fragmento de 850 pb en pGEM-T Easy usando los partidores Ext H-2 y Hyd-H3, Amp ^R	Esta tesis
pGFe ₁₂₀₀	Vector que lleva clonado un fragmento de 1200 pb en pGEM-T Easy usando los partidores Ext H-2 y Hyd-H3, Amp ^R	Esta tesis

3.1.4 Partidores.

Tabla 3.3: Lista de partidores utilizados en esta tesis.

Nombre partidor	Secuencia
Partidores con ambigüedad nucleotídica. ¹ Ver nomenclatura en el apéndice (Tabla A.1)	
Partidores para las [Fe-Fe]-hidrogenasas	
Ext H-1	<i>KGCSGCVMRDGCRTC</i>
Ext H-2	<i>GCGYCGKCCRTCMKCGKCSMC</i>
Ext H-3	<i>GGTGTGCAGCAGCTYGTGGGC</i>
Hyd-H1	<i>WYCACCTGCYKCTGCMMS</i>
Hyd-H2D	<i>RKGCCGTGCA YCKCGAAGMRG</i>
Hyd-H2R	<i>CYKCTTCGMGRTGCACGGCMY</i>
Hyd H2-3D	<i>TWCGSCGYCACCGGCGGCGTG</i>
Hyd H2-3R	<i>CACGCCGCCGGTGRCGSCGWA</i>
Hyd-H3	<i>GCAGCCGSCCRSGCAGSCCAT</i>
Partidores para las [Ni-Fe]-hidrogenasas	
Hidro-C1_F	<i>NVNMGNDBNTGYGGNRTNTGY</i>
Hidro-C1_R	<i>RCANGGRTYNDVNSHNYK</i>
Hidro-C2a_F	<i>CCNMGNRYNTGYGGNATHTY</i>

Continúa en la siguiente hoja

¹ Estos partidores contienen ambigüedad nucleotídica en posiciones definidas dentro de su secuencia (negrita y cursiva). La nomenclatura utilizada es la IUPAC.

Tabla 3.3 – Continuación de la página anterior

Nombre partididor	Secuencia
Hidro-C2a_R	<i>NTKNRYNSWRCANACNNNRCA</i>
Hidro-C2b_F	<i>CCNMGNRTNTGYGGNATHHTGYWSN</i>
Hidro-C2b_R	<i>RTGNRCNGTRCANACCTRCANGG</i>
Hidro-C3a_F	<i>MGNNTNTGYGGNNTNTGYCMN</i>
Hidro-C3a_R	<i>RCANSHNRNRCANRKRTCRTA</i>
Hidro-C3b_F	<i>MGNRTNTGYDSNHTNTGY</i>
Hidro-C3b_R	<i>RTGNRYNSHRCANSWDATRCA</i>
Hidro-C3c_F	<i>NVNNNNRTNKGNRTNTGY</i>
Hidro-C3c_R	<i>RCANGGRTCRWANNNNCKNAH</i>
Hidro-C3d_F	<i>MGNNNNTGYGGNHTNTGYNNNNNNNDSNCA Y</i>
Hidro-C3d_R	<i>RTGNSHNSHRCANSWNADRCANGGRTC</i>
Hidro-C4_F	<i>RTNTGYDSNNTNTGYDVN</i>
Hidro-C4_R	<i>NBHRCANSHNWNRCANRRNTC</i>

Partidores para intercambio alélico² [53]

WhycBG-D	<i>GTGAACCGTTTTGTAATTGCTGATTCCAGCGTCTGTAT-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</i>
----------	---

Continúa en la siguiente hoja

²Estos partidores hibridan con el plásmido templado pKD3 (secuencia negrita y cursiva). Además, los partidores presentan una extensión de 40 pb de identidad con una región intergénica del operón blanco de la mutagénesis *Red-Swap*

Tabla 3.3 – Continuación de la página anterior

Nombre partidador	Secuencia
WhycBG-R	GATACGCGCCCCCTCGACCACCTGATTCAGGTGCGTGA- CCATATGAATATCCTCCTTAG
WhycE_F	CGCGTGGAAGTCGACGCTAACAAACCGGAATATCCGTC- GGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
WhycE_R	GCAACATATCCACCAGCTCCTGCACATCGCGGCGCATC- TGCATATGAATATCCTCCTTAG
WarcA_F	CACGTTAAAAGTATTTTCGAAGCAGAAGGTTATGATG- TAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
WarcA_R	TCCGGCGTGGATTCGAAATGCTTACGAATGCGACGAAT- GGCATATGAATATCCTCCTTAG
WhdhA_F	ACAGCAGCTGTTTAACCTGCAGGAGCGCGTCGCTTTCG- TGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
WhdhA_R	TTCTACCTTCGCCATGCGCTGCATCGGGGTCTGGCTTT- CACATATGAATATCCTCCTTAG
WldhA_F	AGTATCTGCAGCATGTTAACGACGCATACGGCTTTGAA- CTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
WldhA_R	GCCGGCGGAACACGTCATCCTGGATGACATCATTTCGAT- TTCATATGAATATCCTCCTTAG
Wdld_F	CCCTTTTTGGCGGAACCTGGCGCGGCTGGTTGGCTCCT- CGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
Wdld_R	TGCTGTTGGTGGGATCGTTCTGGCGATAGAAGCGTTT- TAAACATATGAATATCCTCCTTAG

Continúa en la siguiente hoja

Tabla 3.3 – Continuación de la página anterior

Nombre partidior	Secuencia
WnuoG_F	ACGGAGCGGACAACCTGCTAGAGGCTTGTCTCTCTCTT- GGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
WnuoG_R	GAAGGAAACCATCGCCCCGGCATTGACGCCAAGCTTTG- CGCATATGAATATCCTCCTTAG

Partidores para la comprobación del intercambio alélico

Tst-hyc_D	CGCGGCCTGATTTTCGTCAA
Tst-hyc_R	GCCAGCATCGCCACGTGATT
Tst_hycE.F	GTTGCCGGCTCCACCCATAT
Tst_hycE.R	AGGCATTTCTGACGCTTGCA
Tst_arcA.F	TAAACTGTTACATTGGACA
Tst_arcA.R	ACTTTTATGGCCTTCTTCGT
Tst_hdhA.F	TATATGGTGAAACAGAACCACGGC
Tst_hdhA.R	GAGTAGCGGTGCGCGTTCGG
Tst_ldhA.F	GAGCCCTTGCCCTCAACCAGCAT
Tst_ldhA.R	GTCGCCAGCGTGAGCTGATT
Tst_dld.F	CTTCAGGCGGCTTAGCTGCA
Tst_dld.R	ATTGTGGCCGTGCGCGATAA
Tst_nuoG.F	TAAAGCCTGGCAGCCGGGCG
Tst_nuoG.R	CCACCACGCCCATCAGGGAG

3.2 Condiciones de cultivo

3.2.1 Cultivos bacterianos

Las bacterias se cultivaron rutinariamente a 37 °C en forma aeróbica en caldo LB (triptona 10 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹, cloruro de sodio 5 g L⁻¹). Para la medición de metabolitos y ensayos con fuentes de carbono específicas, se utilizó medio mínimo R1/2 [(NH₄)₂HPO₄ 2 g L⁻¹, KH₂PO₄ 6.75 g L⁻¹, ácido cítrico H₂O 0.85 g L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 0.7 g L⁻¹]. El medio mínimo se suplementó con la fuente de carbono (azúcares de la hidrólisis de paja de trigo o glucosa) al 1 % y con 5 mL L⁻¹ de metales traza [HCl 3M 12.3 mL L⁻¹, FeSO₄ · 7H₂O 5 g L⁻¹, ZnSO₄ · 7H₂O 1.1 g L⁻¹, CuSO₄ · 5H₂O 0.5 g L⁻¹, MnSO₄ · H₂O 0.1865 g L⁻¹, Na₂B₄O₇ · 10H₂O 0.115 g L⁻¹, CaCl₂ · 2H₂O 1 g L⁻¹, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.05 g L⁻¹].

Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en los mismos medios base conteniendo 15 g L⁻¹ de Bacto agar. Aquellas cepas que poseían plásmidos de replicación termosensibles (pKD46, pCP20) se incubaron a 30 °C. Cuando fue necesario curarlas de estos plásmidos, las cepas se crecieron sin selección a una temperatura no permisiva (42 °C). Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Amp) 100 µg mL⁻¹, carbenicilina (Carbe) 300 µg mL⁻¹, cloranfenicol (Cam) 20 µg mL⁻¹. El indicador cromogénico para la actividad β-galactosidasa (X-Gal) se utilizó a una concentración final de 40 µg mL⁻¹.

3.2.2 Fermentaciones *batch* para la producción de hidrógeno

Estos experimentos se realizaron en viales de 120 mL con un volumen de trabajo de 75 mL. El medio base utilizado fue R1/2 suplementado con metales traza y fuente de carbono (glucosa o hidrolizado de paja de trigo) al 1 % final. Para el caso de las fermentaciones con hidrolizado de paja de trigo, el hidrolizado (ver Sección 3.3.14) se suplementó con medio R1/2 (30X), triptona (10 g L⁻¹) y extracto de levadura (5 g L⁻¹) ajustando el pH a 6.3. El medio obtenido de esta forma se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa *Millipore* (0.22 µm) y se transfirió a un vial de 120 mL estéril.

Una vez cerrados los viales con tapones de goma de butilo (*butyl rubber stopper*) y sujetos

con sellos de aluminio, se burbujeó con nitrógeno estéril por 15 min. para purgar el oxígeno de los viales y crear un ambiente anaeróbico. Las fermentaciones en modo batch se iniciaron agregando un precultivo de *E. aerogenes* 2F crecido hasta fase logarítmica a una densidad óptica (OD_{600}) final de 0.015 unidades. Los viales fueron entonces incubados a 37 °C hasta alcanzar el estado estacionario de crecimiento. Desde cada reactor se observó periódicamente la densidad óptica, pH y el volumen de gas generado (ver [Sección 3.3.16](#)).

3.3 Métodos

3.3.1 Determinación de la concentración celular y tasa de crecimiento

Para determinar la cantidad de células se monitoreó constantemente la densidad óptica en los cultivos. Cuando se llegó al estado logarítmico se tomaron muestras líquidas y se determinó la cantidad de gramos de bacterias presentes a esa determinada densidad óptica. Estos datos fueron utilizados para realizar una curva estándar y determinar los gramos de bacterias en toda la curva de crecimiento. La densidad óptica se midió a 600 nm en un espectrofotómetro UV-visible y las mediciones se mantuvieron en un rango entre 0.3 y 0.7 unidades.

La tasa de crecimiento se determinó de acuerdo a la ecuación 3.1:

$$\theta = \theta_0 \cdot 10^{\frac{\mu(t - t_0)}{2,303}} \quad (3.1)$$

donde θ corresponde a la cantidad de células, μ es la velocidad de crecimiento y t es el tiempo. Esta ecuación se utilizó debido a que predice una relación lineal entre el logaritmo de la cantidad de células y el tiempo con una pendiente igual a $\frac{\mu}{2,303}$.

3.3.2 Búsqueda bioinformática

Se realizó la búsqueda bioinformática utilizando las secuencias de hidrogenasas descritas y depositadas en ExpPASy-PROSITE y NCBI [55] (ver [Tablas A.2](#) al [A.10](#) en el [Anexo A](#)) y como blanco de análisis se utilizó el genoma de *E. aerogenes* KCTC 2190 [56], el cual fue depositado en el *GenBank* de NCBI con el número de acceso <CP002824>. En la [Figura 3.1](#) se muestra un diagrama de flujo de la metodología utilizada en esta búsqueda bioinformática.

Brevemente, con las secuencias de las hidrogenasas se realizó un análisis con la herramienta

bioinformática *BLASTp* [57]. Esta herramienta utiliza una secuencia de aminoácidos como molde y la analiza contra una base de datos aminoacídica. Si en el análisis anterior se obtienen resultados negativos, se realiza un *tBLASTn* [58], que se utiliza para analizar la posibilidad de que modificaciones genéticas generen cambios o corrimientos del marco de lectura. *tBLASTn* utiliza una secuencia de aminoácidos y la analiza contra una base de datos nucleotídica, analizando los 6 marcos de lectura posibles del genoma blanco .

Cuando los resultados obtenidos del análisis *tBLASTn* fueron negativos, se realizó un PSI-BLAST. Esta herramienta se utiliza para encontrar homólogos en microorganismos poco relacionados filogenéticamente. PSI-BLAST primero analiza una secuencia de aminoácidos templado contra una base de datos de aminoácidos. Con los resultados de este alineamiento, el programa genera una matriz de sustitución propia que es utilizada para una nueva búsqueda y con este nuevo alineamiento se genera una nueva matriz de sustitución (correspondiendo esto a una iteración). Este proceso de iteración se repite de acuerdo al criterio del investigador o hasta que no se encuentren nuevos alineamientos [59]. PSI-BLAST resulta una herramienta muy útil para encontrar genes de especies de organismos muy lejanos, sin embargo puede generar una gran cantidad de falsos positivos, los cuales pueden ser evitados realizando una búsqueda más estricta y acotada. Para acotar la búsqueda, se agrega una secuencia consenso (en formato PROSITE) la cual se mantendrá durante las iteraciones, rigiendo de esta forma la búsqueda. Las secuencias consenso para este tipo de análisis fueron obtenidas de las hidrogenasas disponibles (ver [Tabla A.2](#) a la [A.10](#) en el [Anexo A](#)). Las secuencias consenso de las [Ni-Fe]-hidrogenasas se encuentran en la [Tabla 4.2](#) y las secuencias consenso para las [Fe-Fe]-hidrogenasas se encuentran en la [Figura 4.4](#).

3.3.3 Partidores degenerados

Para el desarrollo de los partidores degenerados se utilizó la secuencia ya obtenida por el alineamiento múltiple a través de la herramienta Clustal-W que fueron utilizados con la herramienta PHI-BLAST para encontrar de forma bioinformática los genes de hidrogenasas presentes en *E. aerogenes* (ver [Materiales y Métodos 3.3.2](#)). Los alineamientos de secuencia para las [Ni-Fe]-hidrogenasas se encuentran en la [Tabla 4.2](#) y para las [Fe-Fe]-hidrogenasas se encuentran en la [Figura 4.4](#) (c). Como se mencionó, estas secuencias se obtuvieron del sitio activo de las enzimas con actividad catalítica (subunidad α de cada enzima).

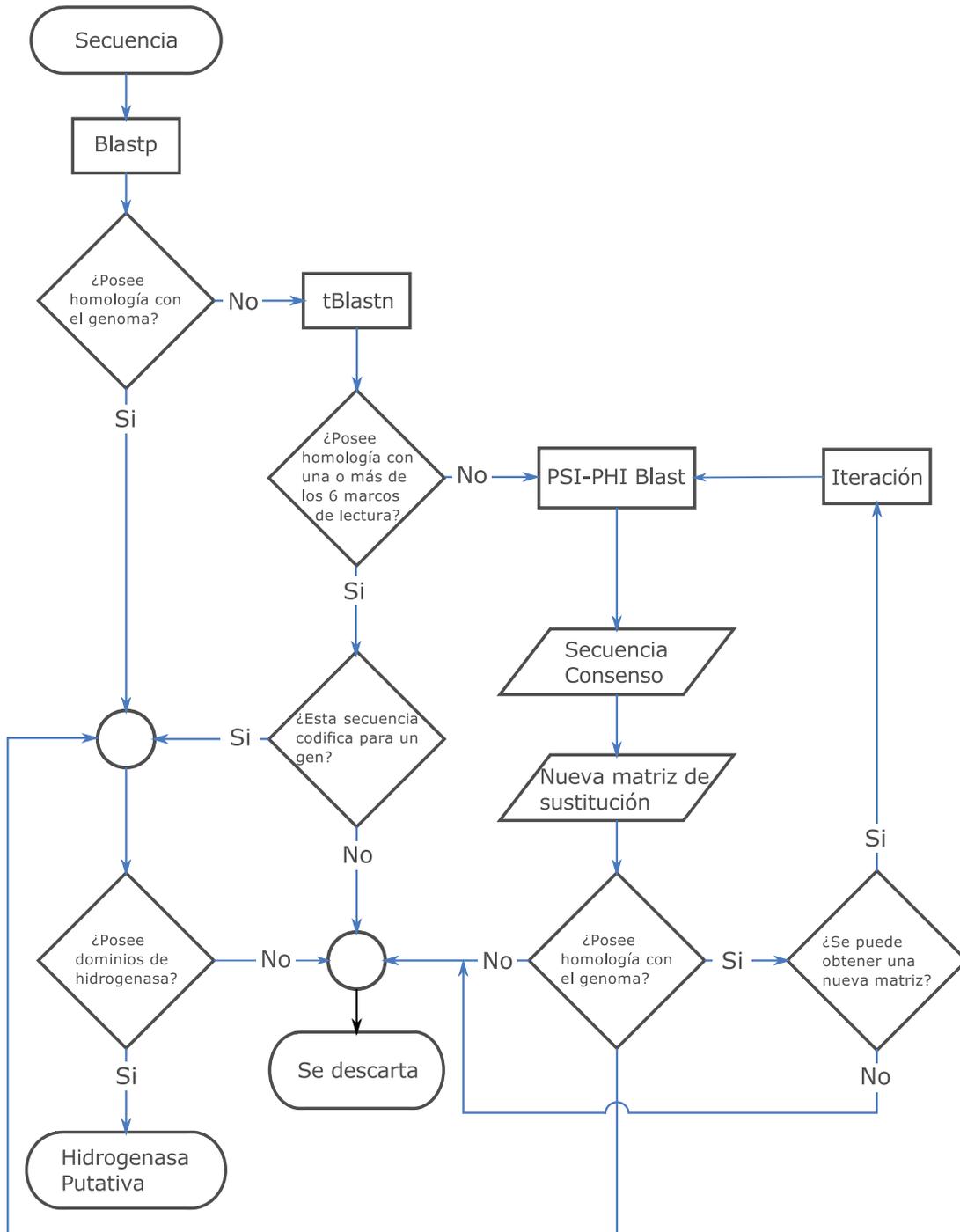


Figura 3.1: Diagrama de flujo del proceso bioinformático para determinar la existencia de otras hidrogenasas. (Elaboración propia.)

Una vez generado el alineamiento de secuencia, se comprobó si las secuencias poseían al menos un 75 % de identidad entre ellas. Debido a que la variación de las secuencias de aminoácidos eran muy elevadas, se tomó en cuenta sólo las regiones conservadas para el análisis de identidad. Luego, se generó el patrón de la secuencia consenso con el cual se generó la secuencia nucleotídica degenerada.

Adicionalmente, si la secuencia nucleotídica poseía menos de un 20 % de ambigüedad, se ordenó su producción (ver partidores en la [Tabla 3.3](#)). Si la secuencia nucleotídica poseía más del 20 % de ambigüedad, se eliminó de la secuencia consenso los aminoácidos más improbables (aquellos aminoácidos de enzimas filogenéticamente muy alejadas), cabe destacar que en algunos par de partidores esta última etapa se obvió permitiendo la existencia de un mayor porcentaje de ambigüedad. En la [Figura 3.2](#) se muestra un diagrama de flujo con el que se trabajó en la generación de partidores degenerados.

En el caso de las [Fe-Fe]-hidrogenasas se realizó una pequeña variación en el protocolo planteado anteriormente. Para esto se tomó la secuencia de 21 hidrogenasas perteneciente a microorganismos diferentes, y los cuales son representativos de todos los microorganismos que presentan este tipo de hidrogenasa (ver [Tabla 3.4](#)), y se realizó un alineamiento múltiple de secuencia, con el que se determinó las secuencias conservadas, para luego continuar de acuerdo al protocolo anterior.

Tabla 3.4: Tabla con los microorganismos utilizados para diseñar los partidores degenerados para las [Fe-Fe]-hidrogenasas.

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 21gr	Q9FYU1	hyd1	497
<i>Chlorella fusca</i>	Q8VX03	hydA	436
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Q59262	hydA	582
<i>Clostridium pasteurianum</i> ATCC 6013	P29166	S/N	574
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Q0TMV5	hydA	572
<i>Clostridium saccharobutylicum</i> P262	Q59261	hydA	574
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Q9XC55	hydA	579
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q18R81	Dhaf_0601	425
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q9AM36	hydA	421
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> DSM 3604	O08311	hydA	421
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	Q46606	hydC	606
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DP4	Q0ENS6	DvulDRAFT_2758	421
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> str. Hildenborough	P07598	hydA	421
<i>Entamoeba histolytica</i>	Q9GTX0	S/N	468
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Q8EAI2	hydA	410
<i>Spironucleus barkhanus</i> ATCC50380	Q9GTP1	S/N	467
<i>Thermotoga maritima</i> ATCC 43578	Q9WY44	TM_0201	608
<i>Thermotoga maritima</i> ATCC 43578	O52683	hydA	645
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Q27096	TvhydB	449
<i>Trichomonas vaginalis</i> ATCC 30001	Q27094	TvhydA	468
<i>Enterobacter cloacae</i> IT-BT 08	AAU11811	S/N	147

Técnicas bioquímicas y de biología molecular

3.3.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles se prepararon usando agarosa a concentraciones entre 0.8 % y 1 % en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) y agregando bromuro de etidio a una concentración final de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o GelRed *Nucleic Acid Gel Stain*. Las muestras de ADN a analizar se mezclaron con el volumen adecuado de amortiguador Blue II 10x (glicerol 20 % (v v⁻¹), azul

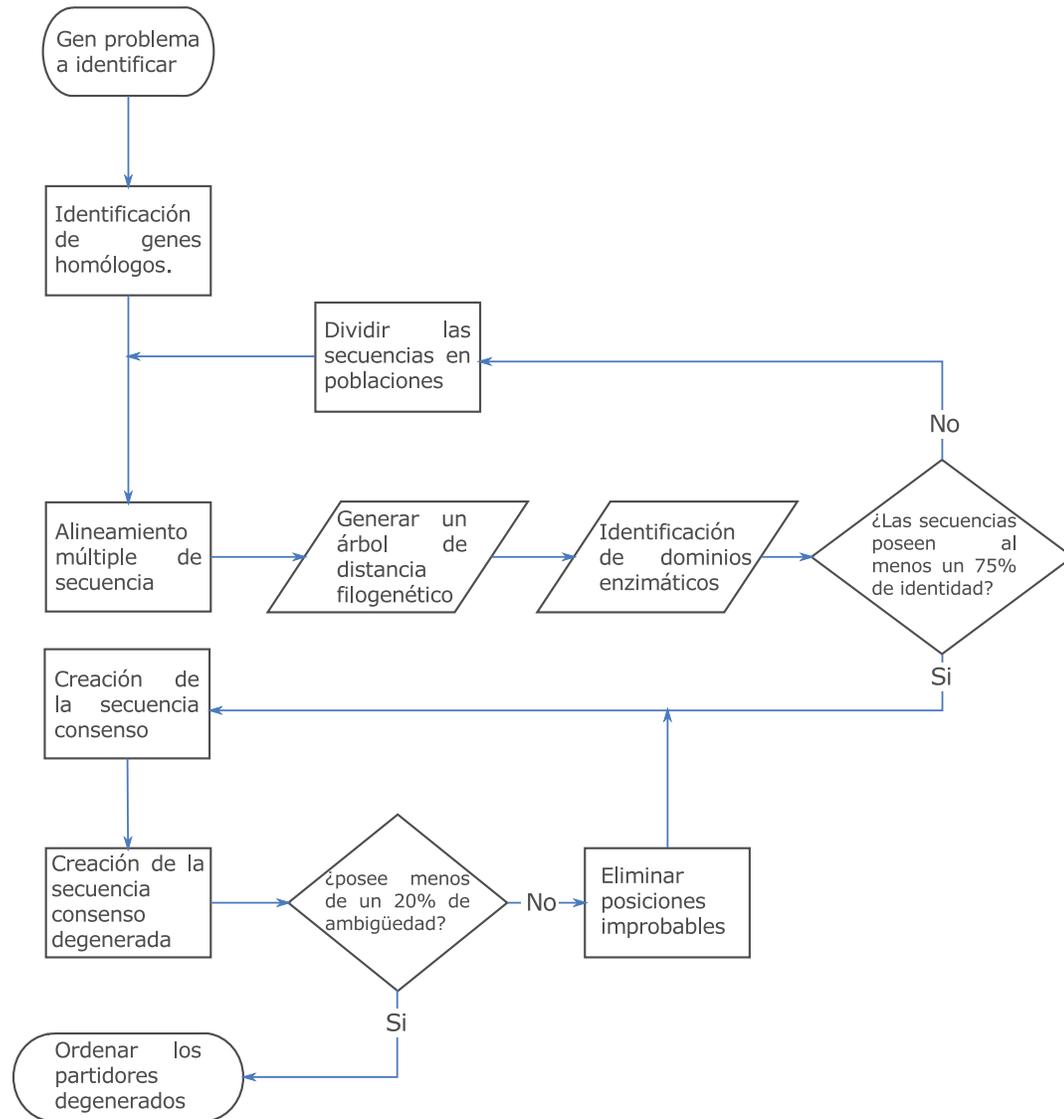


Figura 3.2: Diagrama de flujo para la generación de partidores degenerados. (Elaboración propia.)

de bromofenol 0.25 % ($p v^{-1}$), xilencianol 0.25 % ($p v^{-1}$), EDTA 0.1 M) antes de ser cargadas en el gel. Las electroforesis se realizaron entre 80 y 100 V constantes. Las bandas de DNA se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

3.3.5 Protocolo extracción ADN cromosomal

Las cepas se cultivaron en 2 mL de caldo LB fresco y estéril durante toda la noche a 37 °C con agitación. Se centrifugó 2 mL de cultivo por 5 min a 10.000 x g. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 150 μ L de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM). Se agregó 8 μ L de lisozima (50 mg mL⁻¹). La mezcla se incubó por 30 min a 37 °C. Luego se agregó 9 μ L de SDS 20 % y 5 μ L de proteinasa K (100 mg mL⁻¹). La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 1 h a 60 °C. Luego se agregó 54 μ L de H₂O y 45 μ L de NaCl 5M, se mezcló por vórtex unos segundos y se agregó 30 μ L de CTAB 10 %, nuevamente se mezcló por vórtex hasta obtener una suspensión lechosa y se incubó por 30 min a 65 °C. Luego se agregó 300 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por vórtex 10 s y se centrifugó a 10.000 x g por 5 min, se recuperó la fase acuosa y se repitió el procedimiento una vez más. Luego de recuperar la fase acuosa se le agregó 180 μ L de isopropanol y se incubó 30 min a -20 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 10.000 x g por 30 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 500 μ L de etanol 70 % frío, se centrifugó por 5 min a 10.000 x g, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 μ L de H₂O bidestilada estéril y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

3.3.6 Extracción de ADN plasmidial

Las cepas se cultivaron en 2 mL de caldo LB durante toda la noche a 37 °C con agitación. Se centrifugó el cultivo a 10.000 x g por 3 min y se eliminó el sobrenadante. La extracción de ADN plasmidial se llevó a cabo utilizando el kit de extracción *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* de **Thermo Fisher Scientific**, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

3.3.7 Extracción de ADN desde geles de agarosa

Luego de la electroforesis y la tinción con bromuro de etidio o GelRed, y utilizando una hoja de bisturí estéril, se cortaron del gel de agarosa las bandas de ADN a purificar. El ADN se extrajo según el protocolo de *PureLink Quick Gel Extraction Kit* de **invitrogen** de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

3.3.8 Amplificación por PCR

Las amplificaciones rutinarias de PCR fueron realizadas utilizando un termociclador *Eppendorf* y ADN polimerasas *GoTaq Green Master Mix* de **Promega** o *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* de **Invitrogen** en un volumen estándar de 20 μL . Las mezclas de reacción se realizaron con los respectivos reactivos para cada enzima como se indica a continuación:

	GoTaq	Phusion Taq
Amortiguador de PCR 5X	4 μL	4 μL
MgCl ₂ (25mM)	1.2 μL	–
dNTPs (10 mM)	0.4 μL	0.4 μL
Partidor 1 (10 uM)	1 μL	1 μL
Partidor 2 (10 uM)	1 μL	1 μL
Templado	0.5-2 μL	0.5-2 μL
DMSO (100 %)	–	0.6 μL
Taq	0.16 μL	0.2 μL
H ₂ O	Hasta 20 μL	Hasta 20 μL

Las condiciones estándar de amplificación para la **GoTaq** consistieron en un ciclo de desnaturalización (95 °C por 3 min), 30 ciclos de amplificación (95 °C por 45 s; 50-72 °C por 45 s; 72 °C por 1 min por Kb) y un ciclo de elongación final (72 °C por 10 min).

Para el caso de la **Phusion Taq**, las amplificaciones consistieron en un ciclo de desnaturalización (98 °C por 30 s), 30 ciclos de amplificación (98 °C por 10 s; 50-72 °C por 20 s; 72 °C por 20 s por Kb) y un ciclo de elongación final (72 °C por 5 min) Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa como se indica en la [Sección 3.3.4](#).

3.3.9 Purificación de productos de PCR

Luego de las amplificaciones por PCR y de asegurarse de la existencia de solo una banda acotada por medio de geles de agarosa, se purificaron las bandas de PCR según el protocolo de *GeneJET PCR Purification Kit* de de **Thermo Fisher Scientific**, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

3.3.10 Obtención de mutantes de *E. aerogenes* 2F

Las mutantes se obtuvieron por reemplazo alélico del gen correspondiente por un *cassette* génico compuesto por el gen *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa; resistencia a cloranfenicol) flanqueado por la secuencia de consenso FRT, que es reconocida por la recombinasa Flp. El reemplazo se realizó mediante una técnica que involucra la recombinación homóloga de productos de PCR utilizando el sistema de recombinación Red del fago lambda (λ) (sistema *Red-Swap*) [53] como se describe a continuación, y como se muestra en la [Figura 4.8](#) en los resultados.

3.3.10.1 Obtención del producto de PCR para mutagénesis.

Se diseñó partidores de aproximadamente 60 pb, cuyos extremos 5' contienen 40 nucleótidos idénticos a las regiones del gen a mutar. Junto con lo anterior, el extremo 3' de estos partidores contienen 20 nucleótidos (negrita y cursiva en las secuencias, ver [Tabla 3.3](#)) cuya secuencia aparea perfectamente con secuencias presentes en el plásmido pKD3. Este plásmido posee clonado el *cassette* génico *cat*, flanqueado por las secuencias FRT. La amplificación del *cassette* utilizando pKD3 como templado se realizó según la siguiente reacción de PCR:

Amortiguador de PCR 5X	20 μ L
dNTPs (10 mM)	2 μ L
Partidor 1 (10 uM)	2.5 μ L
Partidor 2 (10 uM)	2.5 μ L
Templado	1 μ L
DMSO (100 %)	1.5 μ L
Taq	0.5 μ L
H ₂ O	70 μ L

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización (98 °C x 30 s), 30 ciclos de amplificación (98 °C x 10 s; 60 °C x 20 s; 72 °C x 40 s) y un ciclo de elongación final (72 °C x 5 min). Se obtuvo productos de amplificación de \sim 1.1 kpb correspondientes al gen *cat* flanqueado por secuencias idénticas a zonas del gen a mutar. Estos productos se purificaron de acuerdo lo expuesto en Materiales y Métodos ([Sección 3.3.9](#)), para ser finalmente resuspendidos en 10 μ L de H₂O bidestilada estéril.

3.3.10.2 Mutagénesis.

La mutagénesis se realizó sobre *E. aerogenes* 2F previamente electrotransformada con el plásmido termosensible pKD46 (Tabla 3.2). Este contiene los genes que codifican para las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo el control del promotor inducible por arabinosa (P_{ara}). Para obtener la cepa *E. aerogenes* 2F / pKD46, se preparó células electrocompetentes, para lo cual las bacterias se cultivaron a 37 °C en caldo LB con agitación hasta una OD_{600} de 0.6. Se centrifugó 3 mL del cultivo a 10.000 x g por 4 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de glicerol al 10 % (v/v) estéril y frío. Se centrifugó nuevamente a 10.000 x g por 4 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 μ L de glicerol al 10 % (v/v) estéril. Se mezcló 50 μ L de células electrocompetentes con ADN (1 μ L) de plásmido pKD46 previamente purificado y se electrotransformó en un electroporador a un voltaje de 2.2 kV. Inmediatamente después de electroporar se agregó 1 mL de medio SOC (triptona 20 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó a 30 °C por 60 min. Luego, se sembró 500 μ L de las células transformadas en placas de agar LB con carbenicilina 300 μ g mL⁻¹ y se incubó toda la noche a 30 °C. Finalmente se seleccionó uno de los clones resistentes a carbenicilina. La cepa *E. aerogenes* 2F / pKD46 así construida se cultivó a 30 °C y agitación, hasta una OD_{600} de 0.2 en 200 mL de caldo LB con carbenicilina 200 μ g mL⁻¹ y L-arabinosa 10 mM para inducir la expresión de la recombinasa Red. Luego, se preparó células electrocompetentes como se describió anteriormente y se mezcló 80 μ L de bacterias con 10 μ L de producto de PCR purificado y concentrado. Las transformantes fueron recuperadas en caldo LB a 37 °C por 1 h para luego ser seleccionadas a 37 °C en placas de agar LB suplementadas con cloranfenicol 20 μ g mL⁻¹. El plásmido pKD46 se eliminó sembrando e incubando repetidamente las transformantes en placas de agar LB con cloranfenicol 20 μ g mL⁻¹ a 42 °C. Finalmente se seleccionaron aquellas colonias resistentes a cloranfenicol, y sensibles a carbenicilina. El reemplazo alélico en cada mutante generada se confirmó mediante reacción de PCR utilizando partidores que apareaban en regiones externas al sitio del reemplazo (Tabla 3.3). Como templado se utilizó 2 μ L de la suspensión que resulta al resuspender una colonia en 50 μ L de H₂O bidestilada. La reacción de PCR de confirmación se realizó con la enzima GoTaq de acuerdo a los protocolos de PCR estándar (Sección 3.3.8).

3.3.10.3 Eliminación del cassette de resistencia.

Una vez verificada la inserción del *cassette* de resistencia y la pérdida del plásmido pKD46, es posible eliminar este *cassette* de resistencia. Para ello, se transformó las diferentes cepas mutantes con el plásmido pCP20 (Amp^R, Cam^R ori^{T^S}, [Tabla 3.2](#)). Este plásmido tiene clonado el gen que codifica para la recombinasa FLP lo que permite eliminar los genes de resistencia a antibiótico de las diferentes mutantes dejando una copia del sitio FRT y una deleción en el gen interrumpido. Se seleccionó aproximadamente 50 colonias transformadas con el plásmido pCP20, se sembraron por triplicado en placas de agar LB, agar LB con carbenicilina 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y agar LB con cloranfenicol 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y se incubaron a 42 °C durante toda la noche. Esto se repitió hasta que la mutante creciera sólo en la placa que no contenía antibiótico de selección. Las mutaciones fueron verificadas por amplificaciones de PCR.

3.3.10.4 Electrotransformación con ADN genómico fragmentado para retrocruce (*back cross*).

El retrocruce se utiliza para mover una mutación a un fondo genético limpio, para ello se realizó la técnica descrita por Toro y cols. [54]. Brevemente, se extrajo ADN_g de la cepa mutante generada por la técnica de intercambio alélico *Red-Swap* [53] (cepa dadora) y 30 μl de este se fraccionó mecánicamente usando vórtex durante 5 - 10 min. Todo el volumen de DNA así tratado se utilizó para la transformación de 100 μl de bacterias electrocompetentes (lavadas 3 veces con glicerol 10 % estéril y frío) de la cepa receptora *E. aerogenes* 2F silvestre. La transformación se recuperó en un 1 ml de medio SOC (triptona 20 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó por 1 h a 37 °C con agitación constante. Transcurrido este tiempo, la suspensión bacteriana se concentró por centrifugación a 10.000 x g por 3 min, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo en sedimento en 100 μl , el cual se sembró en placas de agar LB cloranfenicol 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las colonias obtenidas luego de 16 h de incubación a 37 °C se sembraron en caldo LB con el antibiótico correspondiente, se obtuvo su ADN_g y se analizó la presencia o ausencia del marcador de resistencia mediante una reacción de PCR con partidores que alineaban río arriba y río debajo de la zona blanco.

3.3.10.5 Construcción de dobles y triples mutantes.

La construcción de dobles y triples mutantes se llevó a cabo utilizando la misma técnica descrita en el punto anterior. Primero, se generaron las mutantes simples mediante la técnica del

intercambio alélico *Red-Swap* [53] ya descrita. Luego, se extrajo el ADNg de la cepa "dadora", se fragmentó mecánicamente y se electrotransformó sobre la cepa receptora. De no ser posible la obtención de dobles mutantes con esta técnica, se utilizaron los partidores externos de confirmación de las mutaciones simples (los cuales hibridan 500 pb río arriba y 500 pb río abajo del lugar de inserción), para amplificar tanto el contexto genético del gen a mutar como el *cassette* de resistencia. Los fragmentos así generados fueron utilizados en la técnica de retrocruce o en la técnica de intercambio alélico *Red-Swap*. Las mutaciones dobles y triples se verificaron por PCR.

3.3.11 Cuantificación de NADH y NAD⁺ intracelular

Para realizar la cuantificación de NAD⁺ y NADH se utilizó el test colorimétrico obtenido de **Sigma-Aldrich** (*NAD/NADH Quantification Kit*). Brevemente, Las células fueron centrifugadas a 2.000 x g por 5 min a 4 °C. El medio de cultivo fue descartado y luego se lavó las células con PBS frío, para continuar con una centrifugación 2.000 x g por 5 min a 4 °C. Luego se agregó *NADH/NAD Extraction Buffer* y se realizaron dos pasajes de cambios de temperatura, primero se dejó en hielo por 20 min y luego a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se realizó un vórtex por 10 min y se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4 °C para luego transferir el sobrenadante a un tubo limpio. La muestra así obtenida fue utilizada para la cuantificación de NADH y NAD⁺ total y para la cuantificación sólo de NADH, para esto último, se realizó la degradación de NAD⁺ incubando 200 µL de la muestra a 60 °C por 30 min para luego ser dejadas en hielo. Las muestras fueron medidas en una placa de 96 pocillos por triplicado a un volumen final de reacción de 150 µL. Una vez detenida la reacción, las muestras fueron medidas a 450 nm.

3.3.12 Cuantificación de lignina.

La cuantificación de lignina se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos propuestos por *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) *Laboratory Analytical procedure* (LAP) [60]. Este consiste en la medición, cuantificación y suma de dos tipos de ligninas, que dependen de su solubilidad en ácido.

Para llevar a cabo este procedimiento se dejó secando la paja de trigo a 55 °C por 24 horas. Como primera etapa se realizó una hidrólisis ácida, para esto se mezcló 0.3 g de paja de trigo con 3 mL de ácido sulfúrico 72 % en peso y se dejó a 30 °C por 30 min con agitación constante. Luego

se agregó suficiente agua destilada para diluir el ácido presente en las muestras hasta 4 % (~84 g de agua destilada). Las muestras diluidas fueron cambiadas de vial y autoclavadas. En este paso se incluyeron los azúcares utilizados como blancos los que fueron utilizados para cuantificar el contenido de azúcares en la paja de trigo de acuerdo a la [Sección 3.3.15](#).

3.3.12.1 Lignina Insoluble.

Una vez autoclavado y alcanzada la temperatura ambiente, las muestras fueron filtradas bajo presión utilizando filtros previamente secos y masados (*Whatman 1*). La lignina insoluble así obtenida se lavó estando en el filtro con agua destilada para luego ser secadas a 60 °C hasta mantener una masa fija y luego ser masado. El líquido filtrado (hidrolizado de la paja de trigo) se utilizó para cuantificar la lignina soluble.

3.3.12.2 Lignina soluble.

El líquido obtenido de la filtración anterior se utilizó para determinar la cantidad de lignina soluble. Para esto se midió la absorbancia de cada una de las muestras en un espectrofotómetro UV-visible, utilizando como blanco ácido sulfúrico 4 % (p/v). Las muestras fueron diluidas en ácido sulfúrico 4 % (p/v) de ser necesario para mantener las mediciones en un rango de 0.7 a 1.0 unidades de absorbancia. Todos los análisis se realizaron en triplicado y la cantidad de lignina soluble (LS) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%LS = \frac{UV_{abs} \cdot Vol_{fil} \cdot \left(\frac{V_{muestra} + V_{H_2SO_4}}{V_{muestra}} \right)}{\varepsilon \cdot M_{muestra} \cdot D_{cubeta}}$$

Donde UV_{abs} corresponde al promedio de la absorbancia para cada muestra medida en el espectrofotómetro (UV-visible a 205 nm). Vol_{fil} corresponde al volumen de filtrado una vez agregado los ~80 g de agua. Por otro lado, la expresión $\frac{V_{muestra} + V_{H_2SO_4}}{V_{muestra}}$ corresponde al volumen de muestra analizado más el volumen de H_2SO_4 4 % (p/v) utilizado para diluir y mantener la medición dentro del rango. ε corresponde a coeficiente de absortividad molar de la paja de trigo a la longitud de onda utilizada ($110 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). $M_{muestra}$ corresponde a la masa de muestra expresada en miligramos y D_{cubeta} a la distancia recorrida por el haz de luz en la cubeta.

3.3.13 Pretratamientos utilizados para paja de trigo

La paja de trigo utilizada en los experimentos fue obtenida de productores locales para luego ser molida y tamizada en nuestro laboratorio. Para tener una mejor área superficial se trabajó con pajas de trigo con un tamaño de partícula de 500 μm (35 *mesh Tyler Standard screen scale*). Los dos pretratamientos analizados fueron llevados a cabo en modo *batch* con una carga de paja de trigo de 6.6 % (peso/volumen).

3.3.13.1 Pretratamiento alcalino

Para la realización del pretratamiento alcalino, se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) a tres concentraciones finales diferentes en triplicado (0.5 %, 1.0 % y 2.0 %). Las mezclas de paja de trigo al 6.6 % con cada una de las concentraciones de NaOH, fueron autoclavadas a 120 °C por 20 min. Luego, una vez que las soluciones alcanzaron la temperatura ambiente fueron filtradas, lavadas de tres a cinco veces con agua destilada (hasta alcanzar un pH cercano a 6) y secadas a 55 °C. Adicionalmente, la paja de trigo tratada fue almacenada a temperatura ambiente en un lugar seco hasta su utilización.

3.3.13.2 Pretratamiento con peróxido de hidrógeno en medio alcalino

Para la realización del pretratamiento con peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas, se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a tres concentraciones diferentes en triplicado (1.5 %, 2.0 % y 2.5 %) con una carga de paja de trigo de 6.6 % para luego ajustar el pH de cada pretratamiento a 11.5 con NaOH. Las mezclas obtenidas se dejaron por 3 horas a 35 °C con agitación constante (200 rpm). Luego, cada muestra fue lavada de tres a cinco veces con agua destilada y secadas a 55 °C. Adicionalmente, la paja de trigo tratada fue almacenada a temperatura ambiente en un lugar seco hasta su utilización.

3.3.14 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática fue realizada en triplicado en las pajas de trigo pretratadas (pretratamiento alcalino y H_2O_2 alcalino) como en la sin tratar que fue utilizada como control. Para determinar y cuantificar la recuperación de azúcares antes y después del pretratamiento, se llevaron a cabo hidrólisis en modo *batch* con *buffer* citrato (pH 5.0) y una carga de biomasa de 1 %.

Las enzimas comerciales celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 y glucosidasa de *Aspergillus niger* fueron agregadas a una concentración de 20 FPU g⁻¹ y 20 CBU g⁻¹ de biomasa seca. También se agregó xilanasas de *Thermomyces lanuginosus* a una concentración de 50 Unidades g⁻¹ de biomasa seca. La hidrólisis se realizó a 50 °C durante 74 horas en un agitador orbital a 200 rpm (*Labtech* LSI-3016R). Durante este tiempo la reacción fue supervisada sacando muestras periódicamente para medir la cantidad de azúcares reductores liberados a través del ensayo de DNS [61]. La composición de azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática fueron analizados y cuantificados utilizando HPLC detallado en la Sección 3.3.15.

3.3.15 Cuantificación y caracterización de azúcares y metabolitos.

La cuantificación de glucosa, xilosa, arabinosa y ácidos orgánicos fue realizada por cromatografía líquida HPLC (*high-performance liquid chromatography*). Las muestras fueron analizadas utilizando un sistema Shimadzu Prominence SIL 20 (*Shimadzu Scientific Instruments*) equipada con la columna HPX-87H para ácidos orgánicos (Bio-Rad) como fase estacionaria, a una temperatura de 55 °C, la fase móvil fue H₂SO₄ (5mM) a un flujo constante de 0.5 mL min⁻¹. Para la medición de azúcares y ácidos orgánicos provenientes de las fermentaciones, se tomó continuamente una alícuota de cultivo la cual se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa *Millipore* (0.22 μm). 10 μL de la muestra así obtenida fue inyectada al HPLC.

3.3.16 Medición del gas generado y su composición.

La medición del volumen total de gas generado durante la fermentación se llevó a cabo de forma continua a través del desplazamiento de una columna con agua dentro de un recipiente graduado. Junto con lo anterior, Se tomó continuamente una muestra de 1 mL de gas desde la parte superior de los reactores mientras operaban en modo *batch* utilizando una jeringa al vacío. El gas obtenido de esta forma fue inyectado en un cromatógrafo de gases (*Perkin elmer Clarus* 500, *precisely*). El cromatógrafo estaba equipado con la columna empacada CTR-1 como fase estacionaria, la que se encontraba a 45°C y por donde pasaba un flujo de 80 mL min⁻¹ de helio (99.9999 %) como fase móvil. El detector (TCD - *Thermal Conductivity Detector*) se encontraba a una temperatura de 150 °C.

3.3.17 Análisis de flujos metabólicos

Como base para los análisis se utilizó el genoma de la cepa recientemente secuenciada de *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 [56]. Esta secuenciación fue utilizada para la generación de una base de dato de reacciones utilizando el programa *PathoLogic* [62, 63, 64] disponible en *MetaCyc* [65], estas reacciones fueron analizadas de forma manual para encontrar posibles errores debido a que se originaron de forma automática por *PathoLogic*. El modelo para *E. aerogenes* fue desarrollado con experimentos realizados en esta tesis y datos publicados [66] tomando en cuenta el metabolismo central descrito para esta bacteria.

Consideraciones:

- I Se asumió un estado pseudo-estacionario (*pseudo-steady state*), el cual es necesario para el cálculo de flujos metabólicos, asumir este estado implica que no existe una significativa acumulación de metabolitos.
- II Para la simplificación del modelo, la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y lípidos fueron considerados como parte de la formación de biomasa.
- III La formación de acetoína (3-hidroxibutanona) y 2,3-butanediol no fueron considerados debido a que en las condiciones probadas estos no se producen, o se producen en cantidades indetectables en la cepa parental utilizada (Datos no mostrados).
- IV El principal rol de la actividad de la piruvato deshidrogenasa (*pdh*) fue considerado para generar precursores como acetil coenzima A y 2-oxoglutarato.

Finalmente, el modelo quedó conformado por 32 compuestos y 29 reacciones, resultando en un sistema con 6 grados de libertad. El sistema de ecuaciones se resolvió midiendo 7 flujos. Este sistema de ecuaciones sobredeterminado fue resuelto empleando regresión lineal de mínimos cuadrados utilizando la pseudoinversa de *Moore-Penrose*. Se utilizó *Python* para resolver el sistema de ecuaciones. Para más información acerca del nombre de las enzimas, las reacciones, genes, metabolitos involucrados y las abreviaciones ver [Tablas](#) desde [C.1](#) al [C.11](#) en el [Anexo C](#).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Búsqueda de genes de hidrogenasas en *E. aerogenes* por métodos bioinformáticos

4.1.1 [Ni-Fe]-hidrogenasas

En relación a la clasificación de las 7 diferentes clases de [Ni-Fe]-hidrogenasas mencionadas en la introducción, se ha descrito en *E. coli* la presencia de 2 diferentes clases, la clase 1 (*Uptake*-hidrogenasas unidas a membranas) y la clase 4 (hidrogenasas productoras de H₂ unidas a la membrana). Estas 2 clases se encuentran representadas por cuatro complejos proteicos diferentes, codificados en 4 operones distintos que son nombrados como Hyd-1 al Hyd-4. Hyd-1 y Hyd-2 pertenecen a la clase 1 y Hyd-3 y Hyd-4 pertenecen a la clase 4. Junto con lo anterior, Hyd-1 se encuentra codificada en el operón *hyaABCDF*, Hyd-2 está codificada en el operón *hybABCDEFGO*, Hyd-3 se encuentra codificada en el operón *hycABCDEFGHI*, por último la Hyd-4 está codificada en el operón *hyfABCDEFGHIR* [67] (Tabla 4.1).

Hyd-4 se ha descrito como una hidrogenasa silente, en cambio Hyd-1 y Hyd-2 fueron descritas como *uptake*-hidrogenasas [68]. Hyd-3 se ha descrito como una hidrogenasa productora de bioH₂ unida a la membrana perteneciente a la clase 4 de las [Ni-Fe]-hidrogenasas (ver Tabla A.9 en el Anexo A). Este último tipo de hidrogenasa genera bioH₂ a partir de formato a través de un complejo proteico denominado como **F**ormato **H**idrógeno **L**iasa (FHL) que ha sido encontrado y descrito en diferentes bacterias además de *E. coli* (Figura 1.2)[69, 70, 71].

Como se describió en la introducción, la presencia de Hyd-3 ya fue descrita en *E. aerogenes* [44, 45]. Sin embargo se desconoce si otras [Ni-Fe]-hidrogenasas se encuentran presentes en esta bacteria. Debido a la importancia que tiene esta bacteria en la producción de bioH₂, se decidió

Tabla 4.1: Esta tabla muestra las [Ni-Fe]-hidrogenasa presente en *E. coli* y su clasificación.

[Ni-Fe]-hidrogenasa presente en <i>E. coli</i>	Clase a la que pertenece
Hyd-1	Clase 1
Hyd-2	Clase 1
Hyd-3	Clase 4
Hyd-4	Clase 4

determinar la existencia de otras [Ni-Fe]-hidrogenasas en *E. aerogenes*, para esto se realizó un análisis bioinformático con las secuencias disponibles de diferentes hidrogenasas que pudieran estar aportando al metabolismo de bioH₂.

Como primera aproximación se realizó un análisis de secuencias con la herramienta bioinformática BLASTp ¹ [57] tomando la secuencia de cada hidrogenasa (ver Tablas A.2 a la A.9 en el Anexo A) correspondiente a cada una de las 7 clases (Tabla 1.2).

La primera en ser estudiada fue la clase 1, correspondiente a las *uptake*-hidrogenasas unidas a la membrana. Para realizar estos análisis, en principio se tomó en consideración las secuencias de dos microorganismos filogenéticamente relacionados a *E. aerogenes*, estos fueron *E. coli* y *Shigella* sp. Para esto, se consideraron las proteínas P0ACD8, P0ACE0 (pertenecientes a la subunidad mayor de las Hyd-1 y Hyd-2 de *E. coli* K12) y Q0T663, Q0T0Q3 (pertenecientes a la subunidad mayor de las Hyd-1 y Hyd-2 de *Shigella* sp.), que es donde se encuentran los sitios activos de estas hidrogenasas. Con estas proteínas, se realizó una comparación de secuencias aminoacídicas con la base de datos de *E. aerogenes* utilizando la herramienta BLASTp. Si bien ambos microorganismos son cercanos a *E. aerogenes* estos no presentaron ninguna similitud de secuencia en esta búsqueda, sugiriendo que las secuencias de las proteínas utilizadas en la búsqueda no se encuentran en el genoma de *E. aerogenes*.

Cabe destacar que la base de datos genómica y de vías metabólicas para *E. aerogenes* KCTC 2190 se generó de manera automática utilizando el programa *PathoLogic* y además no fue sometida a una curación, por lo que esta base de datos puede contener errores. Debido a lo anterior,

¹BLATp: Esta herramienta compara una secuencia de aminoácidos contra una base de secuencia de aminoácidos

si bien el análisis de secuencia a través de BLASTp resultó negativo, esto no descarta que el programa entregue falsos negativos debido a posibles corrimientos del marco de lectura. Para descartar esta posibilidad se decidió comparar las secuencias haciendo un análisis con la herramienta tBLASTn². Para realizar este análisis se tomaron las secuencias de las hidrogenasas anteriormente estudiadas (P0ACD8, P0ACE0, Q0T663, Q0T0Q3), junto con otras 15 proteínas entre las 157 hidrogenasas presente en la clase 1 de las [Ni-Fe]-hidrogenasas representando de esta forma a la mayoría de los microorganismos que presentan esta tipo de hidrogenasas. Este análisis al igual que el BLASTp arrojó resultados negativos, sugiriendo que los genes que codifican para este tipo de [Ni-Fe]-hidrogenasa no se encuentran en *E. aerogenes*.

Otra razón para estos resultados negativos es que polimorfismos de secuencia hayan generado proteínas con poca identidad, que no fuesen reconocidos a través de *PathoLogic*, y que sin embargo mantengan características únicas que permitan conservar su actividad catalítica, manteniendo por ejemplo la estructura del sitio activo. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un PSI-BLAST, el cual es utilizado para encontrar posibles homólogos en microorganismos poco relacionados, para esto el programa realiza primero un BLASTp con la secuencia que se disponga para el análisis, para luego generar una matriz de sustitución propia de acuerdo a los resultados obtenidos. Este procedimiento amplía la búsqueda a través de iteraciones consecutivas que permitirá obtener secuencias que no se podrían conseguir si se utilizara una matriz de sustitución común. Para el caso de este estudio además de realizó un PHI-BLAST, el que permite restringir la búsqueda a través del uso de patrones de secuencias conservados (como el sitio activo de la proteína), para luego realizar un PSI-BLAST.

Como se mencionó en el párrafo anterior, para la realización del PHI-BLAST es necesario obtener un patrón conservado dentro de la familia de proteínas en estudio. Para obtener este patrón conservado se tomó la secuencia de 157 hidrogenasas pertenecientes a la clase 1 (ver [Tabla A.2](#)) y se realizó un alineamiento de secuencia con la herramienta clustal-W [72], de tal forma de obtener un patrón que se repitiera en todas las proteínas, independiente del origen del microorganismo [Figura 4.1](#).

De acuerdo a la estructura cristalográfica de la [Ni-Fe]-hidrogenasa de la clase 1 de *Desulfovibrio* sp. [73, 74], en la subunidad α (subunidad mayor) se encuentran 4 cisteínas que forman un

²tBLASTn: Este tipo de análisis compara una secuencia proteica con una base de datos nucleotídica, traduciendo los 6 marcos de lectura posibles.

enlace coordinado que genera el sitio de unión donde se organiza el núcleo metálico (Ni^{2+} y Fe^{2+}) formando el sitio activo. En la secuencia de *Desulfovibrio gigas* estas cisteínas corresponden a la C65, C68, C530 y C533. La formación de este núcleo bimetálico es fundamental para la función de la hidrogenasa, por lo que se buscó patrones conservados que tuvieran estos aminoácidos dentro de la secuencia de todas las hidrogenasas disponibles.

(a)

		C65	C68			C530	C533																																					
P12944	RDAQH	[F	FT	Q	R	A	[C	G	V	C	T	Y	V	H	A	L	A	S	V	R	---	---	[I	L	R	T	V	H	S	Y	D	P	[C	I	A	C	G	V	H	V
Q8XC37	RD	W	A	F	V	E	R	I	C	G	V	C	T	G	V	H	A	L	A	S	V	Y	---	---	[I	L	R	T	L	H	S	F	D	P	[C	L	A	C	S	T	H	V
Q9AMN5	LDA	I	Y	F	T	E	R	I	C	G	I	C	S	T	A	H	A	M	A	S	T	L	---	---	[V	G	R	I	M	R	S	F	D	P	[C	V	S	C	A	T	H	L
Q35NX1	LDA	I	Y	F	T	E	R	I	C	G	I	C	S	T	A	H	A	M	A	S	T	L	---	---	[I	L	R	T	I	H	S	F	D	P	[C	L	A	C	S	T	H	V
Q0TDB6	RD	A	W	M	I	V	Q	R	I	C	G	V	C	T	T	H	A	L	S	S	V	R	---	---	[V	V	R	T	I	H	S	F	D	P	[C	M	A	C	A	V	H	V
Q50226	RD	A	A	F	L	T	Q	R	I	C	R	G	C	P	L	S	H	G	L	T	A	T	N	---	---	[I	F	H	M	G	R	S	Y	D	P	[I	S	C	A	V	H	T

(b)

	<table border="0" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>X</td><td>X</td><td>A</td><td>E</td><td>R</td><td>I</td><td>C</td><td>G</td><td>V</td><td>C</td><td>T</td><td>X</td><td>X</td><td>H</td></tr> <tr><td>V</td><td>G</td><td>F</td><td>R</td><td>I</td><td>P</td><td>T</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T</td><td>Q</td><td>V</td><td></td><td></td><td>S</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C</td><td>S</td><td>S</td><td></td><td></td><td>G</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>M</td><td>M</td><td>T</td><td></td><td></td><td>M</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>S</td><td></td><td>A</td><td></td><td></td><td>A</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>	X	X	A	E	R	I	C	G	V	C	T	X	X	H	V	G	F	R	I	P	T								T	Q	V			S									C	S	S			G									M	M	T			M									S		A			A									<table border="0" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>X</td><td>X</td><td>A</td><td>E</td><td>R</td><td>I</td><td>C</td><td>G</td><td>V</td><td>C</td><td>T</td><td>X</td><td>X</td><td>H</td><td>A</td><td>E</td></tr> <tr><td>V</td><td>G</td><td>F</td><td>R</td><td>I</td><td>P</td><td>T</td><td>V</td><td>G</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>T</td><td>Q</td><td>V</td><td></td><td></td><td>S</td><td></td><td>T</td><td>Q</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>C</td><td>S</td><td>S</td><td></td><td></td><td>G</td><td></td><td>C</td><td>S</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>M</td><td>M</td><td>T</td><td></td><td></td><td>M</td><td></td><td>M</td><td>M</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>S</td><td></td><td>A</td><td></td><td></td><td>A</td><td></td><td>A</td><td>S</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>	X	X	A	E	R	I	C	G	V	C	T	X	X	H	A	E	V	G	F	R	I	P	T	V	G								T	Q	V			S		T	Q								C	S	S			G		C	S								M	M	T			M		M	M								S		A			A		A	S							
X	X	A	E	R	I	C	G	V	C	T	X	X	H																																																																																																																																																																									
V	G	F	R	I	P	T																																																																																																																																																																																
T	Q	V			S																																																																																																																																																																																	
C	S	S			G																																																																																																																																																																																	
M	M	T			M																																																																																																																																																																																	
S		A			A																																																																																																																																																																																	
X	X	A	E	R	I	C	G	V	C	T	X	X	H	A	E																																																																																																																																																																							
V	G	F	R	I	P	T	V	G																																																																																																																																																																														
T	Q	V			S		T	Q																																																																																																																																																																														
C	S	S			G		C	S																																																																																																																																																																														
M	M	T			M		M	M																																																																																																																																																																														
S		A			A		A	S																																																																																																																																																																														
Patrón																																																																																																																																																																																						
Consenso																																																																																																																																																																																						

(c)

XX[AVTCMS][EGQSM]R[IFCSTA]C[GR][VI]C[TPSGMA]XX[HT] [AFGIKLMV][HMR]XX[HR][AS][AFLY][DN]PC[FILMV]XC[AGS]XH

Figura 4.1: Alineamiento de secuencia y patrones utilizados para la realización de PHI-BLAST para las [Ni-Fe]- hidrogenasas de la clase 1 en formato PROSITE. En (a) se muestran las cisteínas encargadas de generar el enlace de coordinación en el sitio activo, las que se encerraron en un rectángulo y se numeraron en la parte superior. Entre corchetes se muestra el rango de secuencia utilizado para generar el patrón consenso. En (b) se muestra un rectángulo con el patrón de consenso anotado de forma vertical. En (c) se encuentra el patrón consenso en formato PROSITE. Para esta figura, se tomó la secuencia hidrogenasas de microorganismos al azar solo para demostrar la concordancia entre el alineamiento y el patrón consenso. *Desulfovibrio gigas* (p12944); *Escherichia coli* O157:H7 (Q8XC37); *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Q9AMN5); *Radyrhizobium* sp. BTAi1 (Q35NX1); *Escherichia coli* 536 (Q0TDB6); *Methanosarcina mazei* Go1 (Q50226). Se utilizó nomenclatura IUPAC para especificar los aminoácidos, X significa que en esa posición puede ir cualquier aminoácido.

La Figura 4.1 muestra una fracción del alineamiento de la secuencia de las 157 hidrogenasas.

Los patrones mostrados en [Figura 4.1 \(c\)](#) se utilizaron para hacer un PHI-BLAST comparando las secuencias de los siguientes géneros: *Acidianus* sp, *Alcaligenes* sp, *Azotobacter* sp, *Campylobacter jejuni* sp, *Clostridium* sp, *Desulfovibrio* sp, *Escherichia coli* sp, *Geobacter* sp, *Helicobacter* sp, *Mycobacterium* sp, *Rhodobacter* sp, *Shewanella* sp, *Shigella* sp, *Thiomicrospira* sp. Estos géneros y especies representan a la gran mayoría de las cepas que poseen [Ni-Fe]-hidrogenasas de la clase 1. El programa PHI-BLAST en un comienzo realiza una matriz de sustitución propia con la secuencia de aminoácidos de los microorganismos nombrados anteriormente, y busca esta nueva posibilidad de secuencia en el organismo blanco (*E. aerogenes* KCTC 2190), manteniendo intacto la secuencia necesaria para la formación del sitio activo. El proceso anterior se considera como una iteración y puede ser repetido de acuerdo al criterio del investigador o hasta que la matriz de sustitución no adquiera más cambios y no se obtengan alineamientos nuevos. El uso de una matriz de sustitución propia para cada iteración produce amplias posibilidades de posiciones en la secuencia, siendo la razón del uso de PHI-BLAST para la búsqueda de proteínas homólogas en microorganismos poco relacionados. En el caso de este trabajo, se realizaron 6 iteraciones (donde no se obtuvo nuevos alineamientos) buscando homología en cada iteración con *E. aerogenes*. En cada una de las iteraciones no se encontraron secuencias homologas en *E. aerogenes* que se relacionaran a la presencia de [Ni-Fe]-hidrogenasas de la clase 1. Estos resultados sugieren que en *E. aerogenes* no se encuentran [Ni-Fe]-hidrogenasas de la clase 1.

Siguiendo el mismo procedimiento ya descrito, se realizó el análisis para las demás clases de [Ni-Fe]-hidrogenasas. Para la clase 2a se tomó la secuencia de 24 proteínas ([Anexo A.3](#)), para la clase 2b se tomó la secuencia de 21 proteínas ([Anexo A.4](#)), para la clase 3a se tomó la secuencia de 19 proteínas ([Anexo A.5](#)), para la clase 3b se tomó la secuencia de 31 proteínas ([Anexo A.6](#)), para la clase 3c se tomó la secuencia de 27 proteínas ([Anexo A.7](#)), para la clase 3d se tomó la secuencia de 36 proteínas ([Anexo A.8](#)) y finalmente para la clase 4 se tomó la secuencia de 102 proteínas ([Anexo A.9](#)). Con estas secuencias se obtuvo un patrón consenso para el sitio activo de cada clase de [Ni-Fe]-hidrogenasa ([Tabla 4.2](#)) con el cual se realizó un análisis en PHI-BLAST.

En relación a los resultados para las clases 2 y 3 (2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 3d) se realizó cada uno de los pasos anteriores y aún después de 6 iteraciones con la herramienta PHI-BLAST no se encontraron secuencias homologas en *E. aerogenes* que se relacionaran a la presencia de estas [Ni-Fe]-hidrogenasas. Esto sugieren (Al igual que los resultados obtenidos para las [Ni-Fe]-hidrogenasas clase 1), que ninguna de las hidrogenasas de la clase 2 y 3 está presente en *E.*

aerogenes. Como se nombró en párrafos anteriores, en *E. aerogenes* se ha descrito la presencia de la hidrogenasa-3 (Hyd-3), perteneciente a las [Ni-Fe]-hidrogenasas de la clase 4 [48, 46, 75]. Debido a lo anterior, y como una forma de validar la metodología propuesta, se realizó el mismo procedimiento llevado a cabo con las otras [Ni-Fe]-hidrogenasas. En el caso de las [Ni-Fe]-hidrogenasa de la clase 4 se encontraron secuencias con homología a las secuencia de búsqueda, esta correspondió a la proteína HycE que forma parte del complejo de la hidrogenasa-3 (complejo FHL), y es la proteína que posee la actividad catalítica de hidrogenasa. Estos resultados sugieren la ausencia de cualquier otra clase de la familia [Ni-Fe]-hidrogenasas en el genoma de *E. aerogenes*.

Cabe destacar que los análisis anteriores se llevaron a cabo para encontrar sólo una proteína dentro de cada operón (aquella que posee la actividad catalítica). Para ahondar más en el análisis, se decidió analizar si los operones que codifican para estas [Ni-Fe]-hidrogenasas se encuentran en *E. aerogenes*. Esto se puede analizar estudiando las regiones genómicas al rededor del operón o contexto genético, haciendo una comparación de secuencias utilizando bacterias filogenéticamente relacionadas a *E. aerogenes*.

4.1.1.1 Contexto genético

Para el análisis del contexto genético de las hidrogenasas se tomó como cepa de comparación *E. coli*, debido a que se encuentra bien caracterizada y porque es un microorganismo cercano filogenéticamente a *E. aerogenes* [44, 45]. Los primeros contextos genéticos en ser analizados correspondieron a [Ni-Fe]-hidrogenasas de la clase 1, específicamente Hyd-1 y Hyd-2 (Figura 4.2). En esta figura se muestra que el operón completo de la hidrogenasa-1 (Hyd-1, Figura 4.2 (a)) sólo se encuentra presente en *E. coli*. Para el caso de las dos especies de *Enterobacter* estudiadas, Hyd-1 no se encuentra presente, sin embargo la región genómica río arriba del operón si se encuentra presente. Estos resultados sugieren que efectivamente Hyd-1 no se encuentra en *E. aerogenes*.

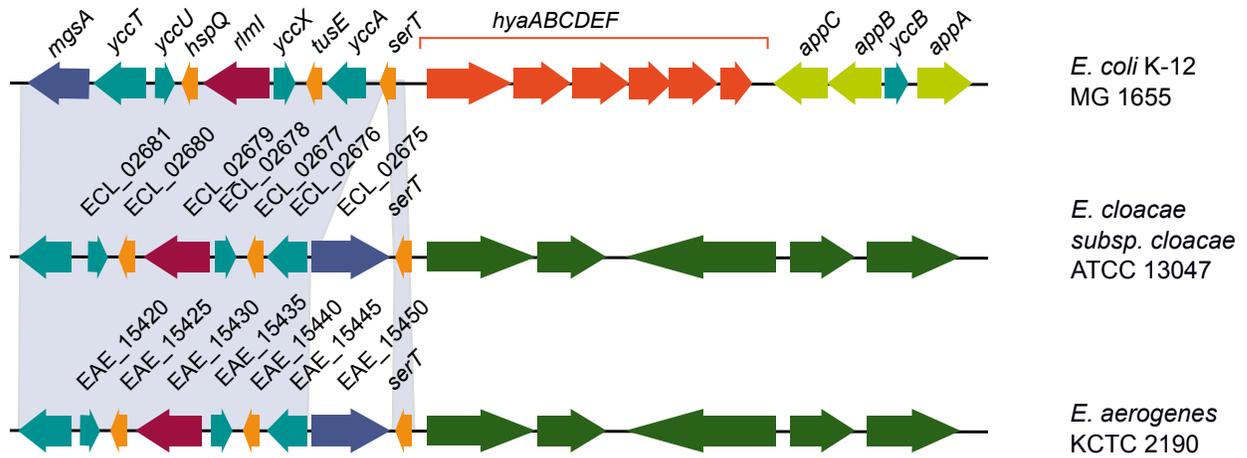
En el caso de la hidrogenasa-2 (Hyd-2, Figura 4.2 (b)), se puede observar que esta se encuentra presente en *E. coli* y sin embargo no se encuentra presente en las dos *Enterobacter* estudiadas. En relación a *textitE. cloacae*, en la región donde se debería encontrar hyd-2, se halla una región de tamaño similar, encontrándose genes sin relación al operón Hy-2 con proteínas hipotéticas o funciones hipotéticas. Debido a la cercanía filogenética entre estos microorganismos, se sugiere que esta región genómica sufrió una sustitución. En el caso de *E. aerogenes* se observa que en

Tabla 4.2: Patrones conservados encontrados en las diferentes clases de [Ni-Fe]-hidrogenasas, las cuales fueron utilizadas para el análisis en PHI-BLAST.

Clase	Patrón consenso en formato PROSITE	Resultado
1	1. XX[AVTCMS][EGQSM]R[IFVSTA]C[GR][VI]C[TPSGMA]XX[HT] 2. [AFGIKLMV][HMR]xx[HR][AS][AFLY][DN]PC[FILMV]xC[AGS]xH	Negativo
2a	1. PR[IVA]CGIC[GS][HTGA][ATS]HL 2. Vx[KR]S[FHY]D[LVPS]C[SL]VC[ST][TV][HK]	Negativo
2b	1. PR[IV]CGICS[IV][SA]Q[SG]xA 2. H[IV]VRSFDPCMVCT[AV]H	Negativo
3a	1. R[FIV]CG[IVL]C[PQ]x[APT]H[TCGA][LITS][AS][SGA] 2. R[ACS]YD[PI]C[VLA][AS]C[AS][TA][HQ][IMV]	Negativo
3b	1. R[IV]C[AGS][FIL]Cxxx[HY]xx[AST][ANS]xx[AS][AILV] 2. R[ANS][FHY]DPCISC[AS][ATV]H	Negativo
3c	1. Px[IFLV][TV][PSTNDA][RQRATH][IV]CG[IV]CxxxH[HNF]x[AC][AS]xxA 2. E[FMV][AGLV][FIV]Rx[FY]DPCX[AS]C[AS][ST]Hx[AILV]	Negativo
3d	1. Ex[AP]xxx[AQSP]R[ILT]CG[IL]C[PF][VI]SHx[IL][ACS][AGS][AGSVN][KR] 2. DPC[IL]SC[AS][TAS]H[TAV]x[AG]x[MCRE][PVA]	Negativo
4	1. C[GS][ILV]C[AGNS]xxH 2. [DE][PL]Cx[AGST]Cx[DE][RL]	Positivo

la región genómica donde debería estar Hyd-2, se encuentra sólo un marco genético que codifica para una proteína hipotética. En la [Figura 4.2 \(b\)](#), también se muestran las zonas conservadas del contexto genético que rodea a Hyd-2 y que se encuentra presente en las tres bacterias analizadas, sugiriendo debido a su cercanía filogenética con *E. coli*, que Hyd-2 sufrió una posible eliminación en *E. aerogenes*.

(a) Contexto genético del operón *hya* de la hidrogenasa 1 (Hyd-1)



(b) Contexto genético del operón *hyb* de la hidrogenasa 2 (Hyd-2)

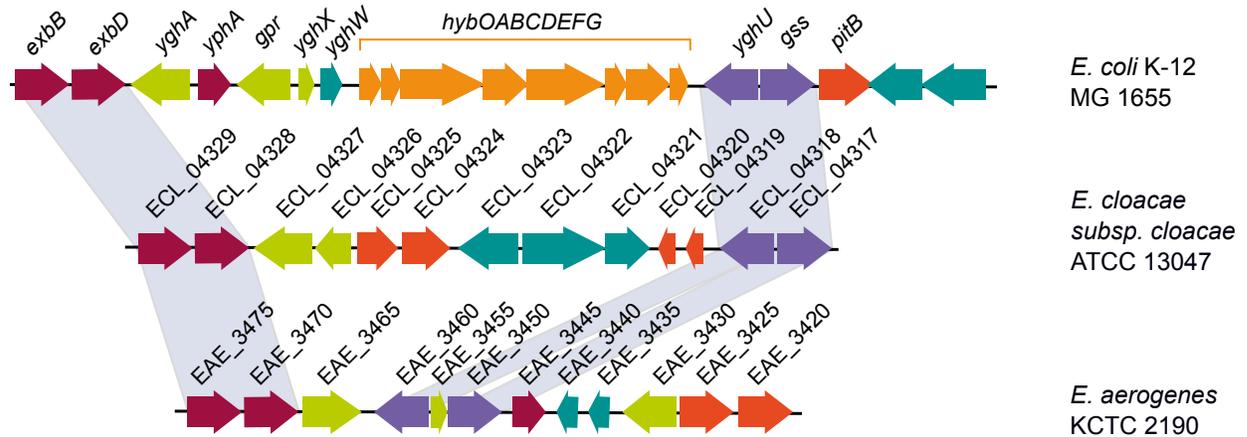


Figura 4.2: Comparación del contexto genético de los operones Hyd-1 y Hyd-2 en *E. coli*, *E. aerogenes* y *E. cloacae*. Los operones corresponden a *hya*(a) y *hyb* (b) que codifican para la hidrogenasa-1 (Hyd-1) e hidrogenasa-2 (Hyd-2), respectivamente. El fondo gris indica regiones idénticas o regiones que cumplen la misma función en estas bacterias. En la parte superior de cada gen, en ángulo y cursiva, se encuentra el nombre de cada gen.

La siguiente clase en ser analizada correspondió a [Ni-Fe]-hidrogenasas de la clase 4. Dentro de esta clase se encuentran la hidrogenasa-3 (Hyd-3, [Figura 4.3 \(a\)](#)) y la hidrogenasa-4 (Hyd-4 [Figura 4.3 \(b\)](#)). En el caso de Hyd-3, tanto el operón (*hyc*) como el contexto genético se

encuentra presente en *E. coli*, así como en las dos cepas de *Enterobacter* estudiadas (Figura 4.3 (a)), estos datos son confirmados por otras investigaciones [44, 45, 48, 46]. En el caso de la hidrogenasa-4 (Hyd-4), se observa que el operón de esta hidrogenasa sólo se encuentra presente en *E. coli* y no en las cepas de *Enterobacter*. Junto a lo anterior, el contexto genético de esta hidrogenasa se mantiene relativamente invariable en las cepas analizadas. Figura 4.3 (b).

El análisis bioinformático, tanto de las hidrogenasas mismas así como su contexto genético, sugiere que la única [Ni-Fe]-hidrogenasa presente en *E. aerogenes* es de la clase 4 representada por Hyc-3.

4.1.2 [Fe-Fe] Hidrogenasas

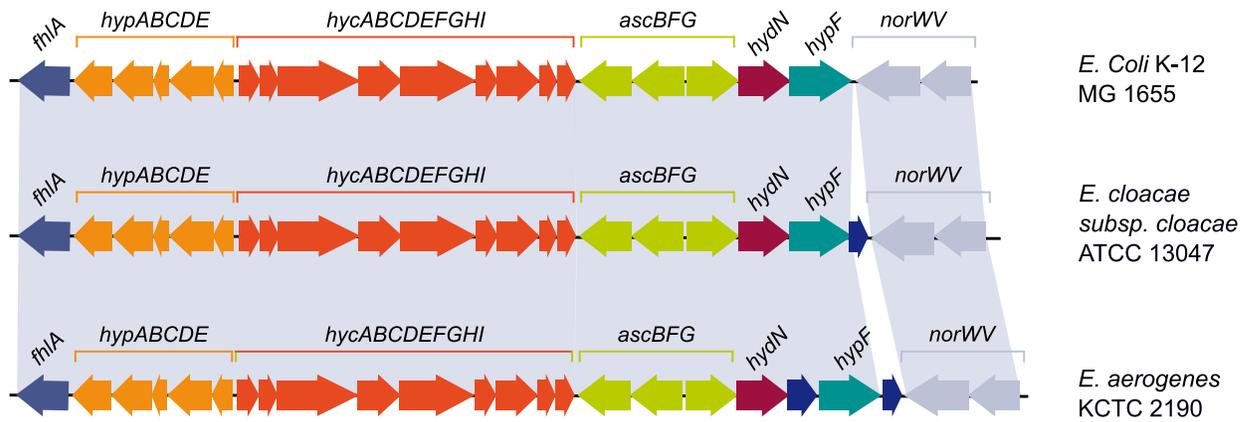
Como se señaló en la introducción, este tipo de hidrogenasas se encuentran presentes en microorganismos anaerobios estrictos como los pertenecientes al género *Clostridium* sp. tales como *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*, al igual que en organismos eucariontes, por ejemplo; algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella fusca* [27, 25, 28]. Junto con lo anterior, recientemente se describió una pequeña hidrogenasa perteneciente a esta familia en la bacteria Gram negativo y anaerobia facultativa *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, la cual se encuentra filogenéticamente más relacionada a *E. aerogenes* que *E. coli* [32]. Debido a esta cercanía filogenética, se decidió buscar este tipo de hidrogenasas en *E. aerogenes*.

Con el objetivo de encontrar secuencias similares a las que posee esta familia de hidrogenasas se realizó el mismo protocolo anteriormente utilizado para las [Ni-Fe]-hidrogenasas y descrito en Materiales y Métodos (Sección 3.3.2, Figura 3.1). Primero se realizó un análisis de secuencia con la herramienta BLASTp utilizando las secuencias P29166, Q59262, Q0TMV5, Q9FYU1, Q8VZZ0, P07598, O52683 y AAU11811 pertenecientes a *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Chlamydomonas reinhardtii* 21gr, *Desulfovibrio vulgaris* sub sp. *Vulgaris* str. *Hildenborough*, *Thermotoga maritima* ATCC 43578 y *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 respectivamente (Ver en Anexo A.10). Este análisis BLASTp no arrojó resultados positivos para ninguna de las secuencias analizadas, sugiriendo que ninguna de las secuencias buscadas se encuentra en el genoma de *E. aerogenes*.

Lo siguiente que se realizó fue analizar la traducción de los 6 marcos de lectura posibles, utilizando la herramienta tBLASTn para encontrar potenciales similitudes. Con este análisis se encontró algunas semejanzas con la enzima NADH deshidrogenasa codificada en el gen *hycE*

perteneciente al operón de Hyd-3 de las [Ni-Fe]-hidrogenasas. Estos resultados se deben a que esta proteína presenta dentro de su secuencia regiones conservadas para la unión de un centro [Fe-S] similar al dominio adicional que se encuentra dentro de la familia de las [Fe-Fe]-Hidrogenasas [27, 25].

(a) Contexto genético del operón *hyc* de la hidrogenasa 3 (Hyc-3)



(b) Contexto genético del operón *hyf* de la hidrogenasa 4 (Hyc-4)

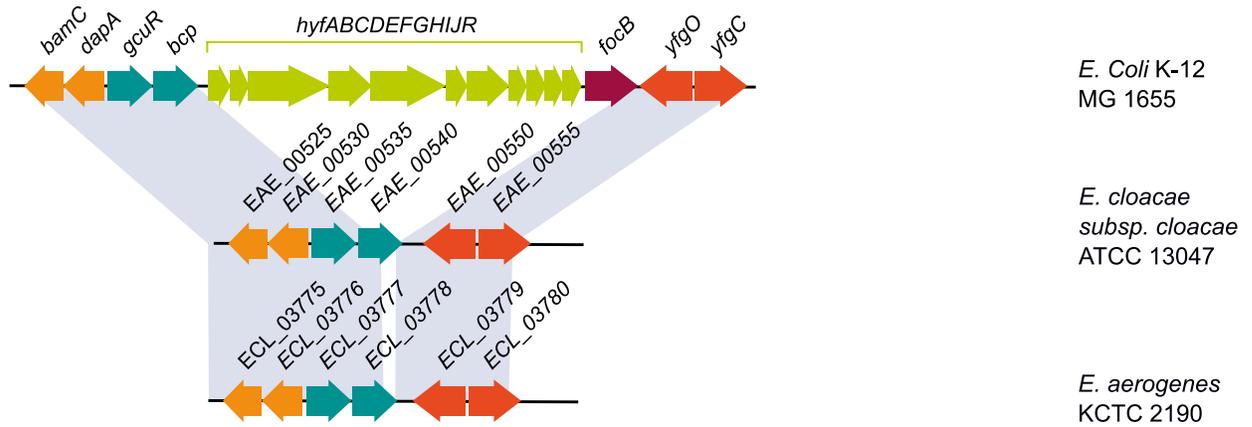


Figura 4.3: Comparación de las secuencias codificantes de las hidrogenasas Hyd-3 y hyd-4 en *E. coli*, *E. aerogenes* y *E. cloacae*. Los operones corresponden a *hyc* (a) y *hyf* (b) de la hidrogenasa-3 (Hyd-3) e hidrogenasa-4 (Hyd-4) respectivamente. El fondo gris indica regiones idénticas o regiones que cumplen la misma función entre estas bacterias.

El siguiente paso fue realizar un análisis con la herramienta PHI-BLAST, para esto se ge-

neró un alineamiento de secuencia con el programa gratuito Clustal-W y la secuencia de 126 [Fe-Fe]-hidrogenasas (Ver Anexo A.10). De esta forma se obtuvo secuencias conservadas dentro del dominio catalítico que fueron utilizadas como patrón de búsqueda. Debido a que no todas las hidrogenasas presentes en esta familia presentan el dominio adicional que puede coordinar un segundo enlace con otro centro de Fe-S (Figura 1.1), solo se tomó en cuenta los patrones necesarios para formar el *cluster*-H el cual se ha demostrado estar en todas las [Fe-Fe]-Hidrogenasas [29, 22].

Dentro del *cluster*-H se encuentran 3 regiones conservadas nombradas como H-1, H-2 y H-3 [29]. En la Figura 4.4 (a), se muestran las regiones del *cluster*-H y el alineamiento de 10 secuencias tomadas al azar, sólo para demostrar la concordancia entre este y el patrón consenso. También se muestra el patrón obtenido por columna en cada uno de las regiones del *cluster*-H (Figura 4.4 (b)), al igual que el patrón consenso acotado en formato PROSITE (Figura 4.4 (c)). En relación a los resultados entregados por la herramienta PHI-BLAST, estos no mostraron ninguna secuencia que presentara homología entre el *E. aerogenes* y las tres zonas buscadas del *cluster*-H. Estos resultados sugieren que las secuencias que codifican para el sitio activo de las [Fe-Fe]-Hidrogenasas no se encuentran presentes en el genoma de *E. aerogenes*.

Si bien los análisis bioinformático son útiles e informativos, estos sólo ayudan a un mejor entendimiento para realizar una caracterización experimental, buscando los genes a través de herramientas moleculares, que determinarán de forma más concreta la existencia de las secuencias buscadas.

4.2 Búsqueda de genes de hidrogenasas en *E. aerogenes* por métodos experimentales

De acuerdo a los resultados expuestos en esta tesis no fue posible encontrar similitudes de secuencia que indicaran la presencia de otro tipo de [Ni-Fe]-hidrogenasa o [Fe-Fe]-hidrogenasa en *E. aerogenes*. Sin embargo, cabe recordar que este tipo de análisis se realizan para orientar futuros experimentos de búsqueda. Si bien tanto el análisis de flujos metabólicos como la búsqueda bioinformática se realizó con el genoma de *E. aerogenes* 2190 como modelo de estudio, se decidió utilizar la cepa clínica de *Enterobacter aerogenes* (denominada en nuestro laboratorio como 2F) debido a que tiene una producción de hidrógeno mayor que la cepa secuenciada (datos

(a)

	H-1	H-2	H-3
AAU11811	DIRGAPCN - G V R ---	--- - - - - - - - - - - -	--- - - H A C P G G C - - - - -
P29166	FPMFTSCCPGWV ---	--- VT V M P C T S K K F E A ---	--- E V M A C H G G C V N G G G
Q59262	FPMFTSCCPAWV ---	--- VT I M P C N D K K Y E A ---	--- E V M A C P G G C I N G G G
QSQK1	FPMLTSCCPSWV ---	--- VT V M P C T S K K F E A ---	--- E V M A C P G G C V N G G G
Q0TMV5	FPMLTSCCPSWV ---	--- VT V M P C T S K K F E A ---	--- E V M A C P G G C V N G G G
Q9ZNE4	FPMLTSCCPSWV ---	--- VT V M P C T S K K F E A ---	--- E V M A C P G G C V N G G G
Q9RHU8	FPMLTSCCPSWV ---	--- VT V M P C T S K K F E A ---	--- E V M A C P G G C V N G G G
Q59261	FPMFTSCCPAWV ---	--- VT I M P C T A K K F E A ---	--- E V M A C P G G C V N G G G
Q6F4C7	FPMFTSCCPGWV ---	--- VT I M P C T A K K F E A ---	--- E V M T C P G G C V N G G G
Q46508	LPILTSCPCGWV ---	--- V S V M P C L A K K Y E C ---	--- E V M A C P G G C I G G G G

(b)

Patrón	RGACCVGV FSSPSPAF ITC SW L M MY T I V	Consenso	FMPCXXKKXE IG D V LT Q VV R S	MGCPGGC HA HY V N
--------	--	----------	---	----------------------------

(c)

H-1	H-2	H-3
[RFILT][GST][ASCM][CP][NP][GASMIV][VFWY]	[FILV][MGTV]PCXX[KDQRS]X[EV]	[MH][GA]C[PHVN][GY]GC

Figura 4.4: Identificación de secuencias consenso característicos de [Fe-Fe]-hidrogenasas. En (a) se muestra entre corchetes el rango de secuencia utilizado para generar el patrón consenso para cada columna (a). En (b) se muestra la secuencia consenso identificada. En la parte inferior se muestra el patrón consenso acotado en formato PROSITE (c). Se utilizó nomenclatura IUPAC para especificar los aminoácidos, X significa que en esa posición puede ir cualquier aminoácido. Para esta figura, se tomó la secuencia hidrogenasas de microorganismos al azar solo para demostrar la concordancia entre el alineamiento y el patrón consenso. *Enterobacter cloacae* (AAU11811); *C. pasteurianum* (P29166); *C. acetobutylicum* (Q59262); *C. perfringens* SM101 (Q0SQK1); *C. perfringens* ATCC13124 (Q0TMV5); *C. perfringens* (Q9ZNE4); *C. perfringens* (Q9RHU8); *C. saccharobutylicum* (Q59261); *C. paraputrificum* (Q6F4C7); *D. fructosivorans* (Q46508)

no mostrados).

4.2.1 [Ni-Fe]-hidrogenasas

De acuerdo a los antecedentes encontrados para la cepa de *E. aerogenes* este tipo de bacteria presentaría dos tipos de hidrogenasas, una de ellas es la previamente publicada Hyd-3 codificada en el operón *hycABCDEFGHI* [44, 45]. La segunda es una NADH dependiente cuya presencia ha

sido sugerida en *E. aerogenes*, sin embargo nada se sabe acerca de las enzimas que participan en esta reacción [18].

Un estudio que puede exponer con una mayor precisión la existencia de estas hidrogenasas es a través de la técnica de amplificación por PCR, seguido de un análisis de secuencia. En condiciones ideales, donde existen zonas altamente conservadas e invariables, se pueden generar partidores específicos que amplifican el gen problema. Estos partidores son bastante efectivos, siendo capaces de amplificar una sola región de ADN de forma específica [76]. Sin embargo en el caso de este estudio las secuencias de las hidrogenasas son bastante variables, aun dentro de las zonas conservadas (Tabla 4.1 y Figura 4.4). Para estos casos se utilizan partidores degenerados que llevan tripletes nucleotídicos ambiguos, lo que facilita la amplificación de una población heterogénea de secuencias, permitiendo la detección de genes homólogos en organismos poco relacionados filogenéticamente [77].

Para la generación de los partidores degenerados se utilizaron las secuencias encontradas en el sitio activo de la subunidad catalítica de cada hidrogenasa (Tabla 4.2 y Figura 4.4 (c).) junto con el uso de codones específico de *E. aerogenes* (Anexo A.1) de acuerdo al protocolo propuesto en Materiales y Métodos (Ver Sección 3.3.3, diagrama de flujo Figura 3.3.3). Cabe destacar que para estos experimentos, se utilizó ADN genómico de la cepa *E. aerogenes* 2F que posee una eliminación en el operón que codifica para la hidrogenasa Hyd-3 ya descrita. La utilización de esta cepa se realizó para obtener amplificadores de otras [Ni-Fe]-hidrogenasas de la clase 4 y evitar falsos positivos dentro de los resultado.

Una vez obtenidos los partidores degenerados se realizó una amplificación por PCR con gradiente de temperatura para determinar cuál era la temperatura de hibridación de los partidores donde se lograba obtener amplificado. Para esto se tomaron todos los partidores de [Ni-Fe]-hidrogenasas (Materiales y Métodos Sección 3.3) y se les realizó un PCR con gradiente de temperatura desde 42 °C a 70 °C (Datos no mostrados). En todas las temperaturas ensayadas se observó un débil amplificado, obteniéndose mejores resultados a los 52 °C (Figura 4.5 (a) PCR 1). Con esta temperatura de hibridación se logró obtener una clara amplificación en la clase 2b de las [Ni-Fe]-hidrogenasas (C2b) y algunas amplificaciones en las demás clases estudiadas. Sin embargo, en todos los casos se observó una amplificación tenue e inespecífica. Como paso siguiente se realizó una reacción de PCR, ocupando como templado la mezcla de PCR 1, además para promover una amplificación más específica se utilizó una temperatura de hibridación de 65

°C (Figura 4.5 (b) PCR 2). Sin embargo, esto sólo generó muchas bandas inespecíficas para las clases 2b (C2b), 3c (C3c) y 3d (C3d).

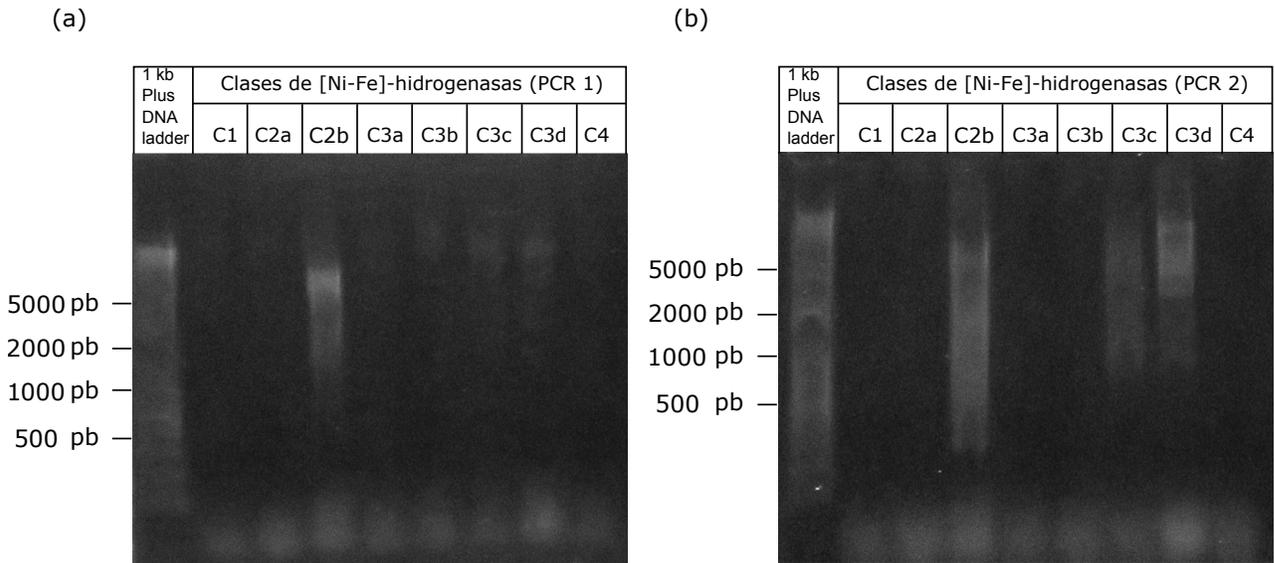


Figura 4.5: Amplificación de ADN genómico de *E. aerogenes* 2F $\Delta Hyd-3$ con partidores degenerados para distintas [Ni-Fe]-hidrogenasa. Los partidores utilizados están listados en la Tabla 3.3. En la Figura (a) PCR 1, como templado se utilizó genoma de la cepa *E. aerogenes* 2F $\Delta Hyd-3$, temperatura de *annealing* 52 °C. En la Figura (b) PCR 2, se utilizó como templado la mezcla de PCR 1 y una temperatura de *annealing* de 65 °C. Gel al 1% de agarosa.

La Figura 4.6 (a) muestra solo las clases de [Ni-Fe]-hidrogenasa con las que se obtuvo amplificado. Para eliminar las amplificaciones inespecíficas se realizó una nueva amplificación por PCR usando como templado la mezcla de PCR2, a esta mezcla de PCR se le agregó dimetil sulfóxido (DMSO) al 3%, este compuesto orgánico es conocido debido a que puede afectar la T_m de los partidores y la estabilidad térmica de la DNA polimerasa permitiendo amplificaciones más específicas [78], además se subió la temperatura de hibridación de los partidores a 70 °C (Figura 4.6 (b) PCR 2). Estos resultados muestran amplificaciones con bandas definidas para la clase 2b (C2b), 3c (C3c) y 3d (C3d).

Como paso siguiente a las amplificaciones por PCR se realizó la secuenciación de cada banda encontrada de [Ni-Fe]-hidrogenasa (clase 2b (C2b), Clase 3c (C3c) y clase 3d (C3d)). Las secuenciaciones se compararon con una base nucleotídica del genoma de *E. aerogenes* KCTC 2190. Para esto, se tomaron las secuencias aminoácidas de estas hidrogenasas putativas y se busca-

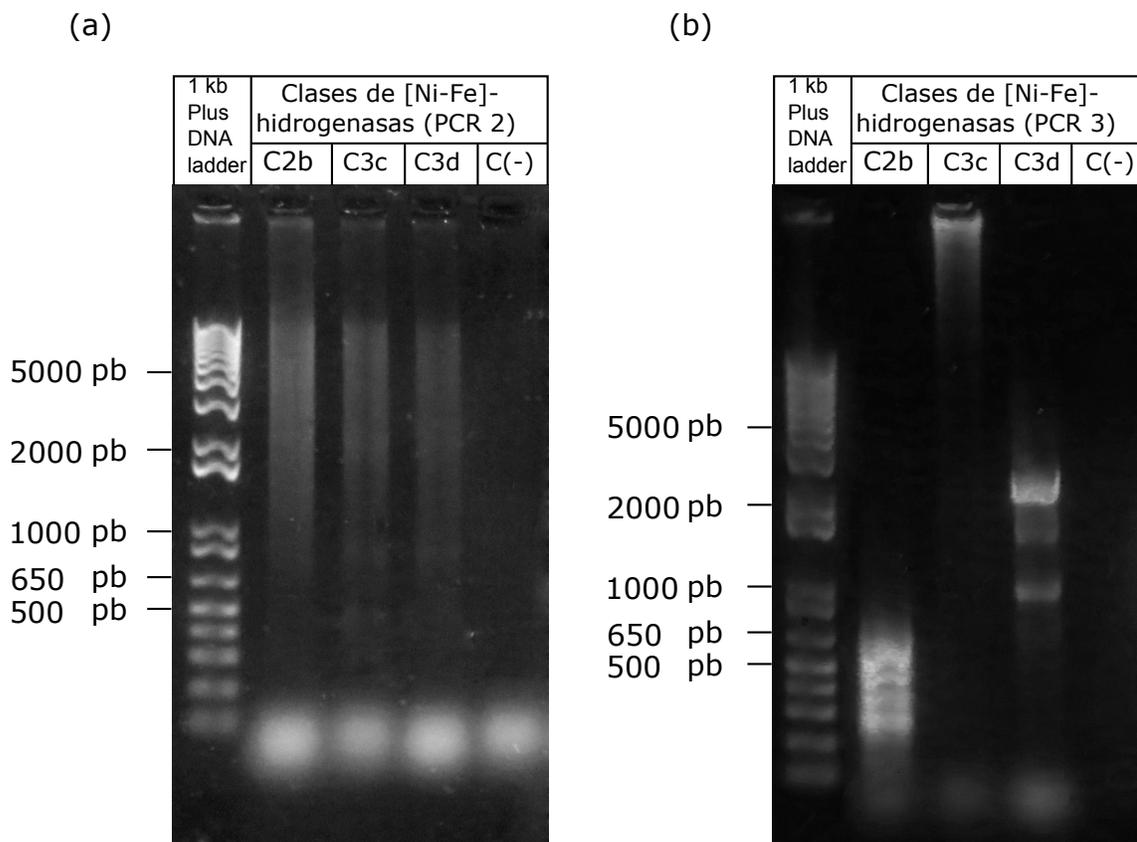


Figura 4.6: Segunda amplificación con partidores degenerados para cada clase de [Ni-Fe]-hidrogenasa. Los partidores utilizados están listados en la [Tabla 3.3](#). En la figura (a) PCR 1, como templado se utilizó la mezcla de PCR 1, temperatura de *annealing* 65 °C. En la figura (b) PCR 3, se utilizó como templado la mezcla de PCR 2, una temperatura de *annealing* 70 °C más DMSO. Gel al 1% de agarosa.

ron dominios proteicos de hidrogenasa utilizando las herramientas BLATP y ExPASy-PROSITE. El tamaño de las [Ni-Fe]-hidrogenasas varía dependiendo del microorganismo del que provienen, variando desde los ~1000 pb hasta los ~1500 pb. Estos valores fueron ocupados como criterio para seleccionar los genes de las hidrogenasas putativas. Los resultados se muestran en la [Tabla 4.3](#). En el caso de [Ni-Fe]-hidrogenasa clase 2b (C2b), el tamaño del gen es aproximadamente de 1200 pb, sin embargo sólo se amplificaron fragmentos de aproximadamente 650 pb. El resultado de la secuenciación demostró que ese fragmento corresponde a una fracción del gen hipotético EAE_02500 con identidad al gen *rcnA* descrito en *E. coli*, el cual codifica para una proteína encargada del transporte de níquel y cobalto [79]. Con respecto a la clase 3c, el tamaño esperado

se encuentra alrededor de los 1200 pb, sin embargo no se encontró una banda definida de ese tamaño. Finalmente, el grupo 3d mostró al menos 3 bandas definidas cercana a los ~ 2500 pb, ~ 1600 pb y ~ 1000 pb. Debido a que el tamaño de esta hidrogenasa se encuentra dentro de los ~ 1150 pb, se decidió purificar y clonar los fragmentos de ~ 1600 pb y ~ 1000 pb. A los clones seleccionados se les extrajo ADN plasmidial el cual fue posteriormente secuenciado. Los resultados muestran dos poblaciones diferentes de genes en la banda de ~ 1000 pb, uno corresponde a un fragmento del gen EAE_07005 que codifica para una lipoproteína de membrana externa con identidad al gen *amiD* presente en *E. coli* [80] (pC3d_{1000.1} en la Tabla 4.3). El otro (pC3d_{1000.2}) corresponde a un fragmento del gen EAE_00290 que codifica para una proteína de transporte de manganeso (MntH), el cual en *E. coli* se ha asociado a mecanismos de supervivencia dentro de los macrófagos [81]. Por otro lado, la banda de ~ 1500 pb tiene identidad de secuencia al gen *rnr* en *E. coli* que codifica para la exoribonucleasa R, implicada en la maduración y degradación de diferentes tipos de ARN [82]. Estos resultados demuestran que ninguna de las secuencias analizadas corresponde a proteínas que puedan realizar la función de [Ni-Fe]-hidrogenasa.

Tabla 4.3: Tabla con los resultados de la secuenciación de las [Ni-Fe]-hidrogenasas.

plásmido	Tamaño del fragmento	Nombre del gen	Función
pC2b ₆₅₀	~ 650 pb	EAE_02500 (<i>rcnA</i>)	Transporte de níquel
pC3d _{1000.1}	~ 1000 pb	EAE_07005 (<i>amiD</i>)	Lipoproteína de membrana
pC3d _{1000.2}	~ 1000 pb	EAE_002905 (<i>mntH</i>)	Transporte de manganeso
pC3d ₁₅₀₀	~ 1500 pb	EAE_09355 (<i>rnr</i>)	Maduración/Degradación de ARN

Estos resultados sugieren que efectivamente no hay otro gen dentro del genoma de *E. aerogenes* que codifique para alguna [Ni-Fe]-hidrogenasa. Por otro lado, Li y cols (2015) recomiendan diseñar partidores de PCR utilizando ciertos criterios de filtración, los que pueden ser utilizados para mejorar la búsqueda de genes. Como primer paso estos investigadores sugieren realizar un alineamiento múltiple de secuencia y obtener una identidad mayor al 88 %, de obtener un valor mayor, se dividen las secuencias en subpoblaciones hasta obtener la identidad buscada (ver Diagrama 3.2). Una vez obtenida la secuencia degenerada esta debe tener un porcentaje de ambigüedad menor al 10 % [83]. De acuerdo a esto, existe la posibilidad de que partidores con elevado grado de degeneraciones impidieran la correcta identificación de las hidrogenasas putativas, debido a que el aumento de degeneraciones incrementa el número de partidores posibles. En otras palabras, de existir un partidador que hibride correctamente, su concentración sería muy baja para

ser utilizada en esta técnica.

4.2.2 [Fe-Fe]-hidrogenasa

Como se mencionó anteriormente las [Fe-Fe]-hidrogenasa están presentes en procariontes anaeróbicos y bacterias reductoras de sulfato. Estas se encuentran en la mayoría de los casos en forma monomérica presentando una gran diversidad de tamaños [27, 25]. El sitio activo de estas hidrogenasas es conocido como *cluster-H* y presenta tres regiones conservadas (Figura 1.1) [29].

Junto con lo anterior, se ha descrito la presencia de una [Fe-Fe]-hidrogenasa en una cepa de *Enterobacter cloacae* [30]. *E. cloacae* es una bacteria filogenéticamente relacionadas a *E. aerogenes* por lo que existe la posibilidad de que este tipo de hidrogenasas también se pueda encontrar en *E. aerogenes*. Con el objetivo de encontrar este tipo de hidrogenasas de forma experimental, se generaron partidores degenerados para amplificar hidrogenasas hipotéticas que contengan el sitio activo o *cluster-H*.

El diseño de partidores degenerados partía de la base de un alineamiento de secuencia múltiple que se mejoraba y reducía de acuerdo a un parentesco filogenético. Sin embargo, de las 126 hidrogenasas presentes en esta familia, sólo una de ellas se encuentra genéticamente relacionado a *E. aerogenes* (*E. cloacae* [30]), todas las demás provienen de microorganismos que se encuentran alejados de *E. aerogenes*, por lo que agregar todas las secuencias genera muchas variaciones innecesarias. Debido a lo anterior se realizó un protocolo ligeramente diferente al anterior (ver [Materiales y Métodos Sección 3.3.3](#)). Para esto seleccionó diferentes microorganismos, de tal forma de representar a toda la población que microorganismos que poseen estas hidrogenasas, se realizó un alineamiento múltiple de secuencia, con el que se determinó las secuencias conservadas, para luego continuar de acuerdo al protocolo anteriormente planteado. Los partidores utilizados se muestran en la [Tabla 3.3](#) y sus características en la [Tabla 4.4](#).

Con los partidores degenerados se realizó de forma estándar un PCR con gradiente de temperatura de forma tal de determinar la temperatura adecuada donde se generaban amplificadas de manera específica. Se probaron diferentes combinaciones de partidores, varios de los cuales no arrojaron ningún tipo de amplificado (datos no mostrados). Las combinaciones que generaron amplificado fueron Ext H-2/Hyd-H3 y Hyd-H1/Hyd-H3. El partidore Ext H-2 fue ideado para alinear río arriba e inmediatamente junto al *cluster-H*. En cambio Hyd-H1 y Hyd-H3 fueron ideados para alinear dentro del *cluster-H* específicamente en la región H-1 y H-3 respectivamente (Figura

Tabla 4.4: Características de los partidores utilizados para encontrar las [Fe-Fe]-hidrogenasas. Se muestra el nombre de los partidores junto con la secuencia consenso de aminoácidos. Las letras mayúsculas en la secuencia consenso corresponde a los aminoácidos más representados en el alineamiento, en cambio las letras en el subíndice corresponden a los menos representados.

Partidor	secuencia consenso
Ext H-1	C _G G _P Q _E C _S V _I
Ext H-2	A P _S A _S V _I R _I V _G Q
Hyd-H1	F _T T _S S _C C _P C _S N _G A
Hyd-H2D	M _G P C T _I A _A K K _R
Hyd-H2R	M _G P C T _I A _A K K _R
Hyd H2-3D	F _Y G _A A _V T _S G G V
Hyd H2-3R	F _Y G _A A _V T _S G G V
Hyd-H3	M A _G C P _V G _A G C
Ext H-3	A H E _K L L H T

4.7 (a).). De acuerdo a las secuencias analizadas, las [Fe-Fe]-hidrogenasas presentan tamaños que varían de ~ 830 pb para la combinación Ext H-2/Hyd-H3 y ~ 630 pb para la combinación Hyd-H1/Hyd-H3 que hibridan dentro del *cluster-H*. Estas combinaciones de partidores generaron varias amplificaciones con tamaños definidos (Figura 4.7 (b).). Varios de los fragmentos se alejaban de los tamaños esperados por lo que se decidió analizar aquellos que se acercaban en mayor medida a los tamaños hipotéticos. De acuerdo a lo anterior, con la combinación de partidores Ext H-2/Hyd-H3 se eligieron los fragmentos de ~ 1300 pb, ~ 850 pb y ~ 750 pb. Por otro lado, con la combinación Hyd-H1/Hyd-H3 se tomaron los fragmentos de ~ 800 pb y ~ 650 pb. Todos los fragmentos fueron purificados, clonados y secuenciados.

Los resultados de la secuenciación se muestran en la Tabla 4.5. Como se nombró anteriormente, con la combinación de partidores Ext H-2/Hyd-H3 se decidió clonar los 3 fragmentos más cercanos al tamaño esperado de este tipo de hidrogenasas (~ 750 pb, ~ 850 pb y ~ 1200 pb). Los resultados muestran que el fragmento de ~ 750 pb corresponde a un transportador de glutatión cuyo nombre en *E. aerogenes* es EAE_14760 y posee identidad al gen *gsiD* de *E. coli* cumpliendo la misma función [84]. Con respecto al fragmento de ~ 850 pb, este corresponde a una exonucleasa de hebra simple (EAE_02805) con identidad a gen *recJ* en *E. coli* [85]. Por último, el fragmento de ~ 1200 pb corresponde a un segmento del gen EAE_1558 con identidad

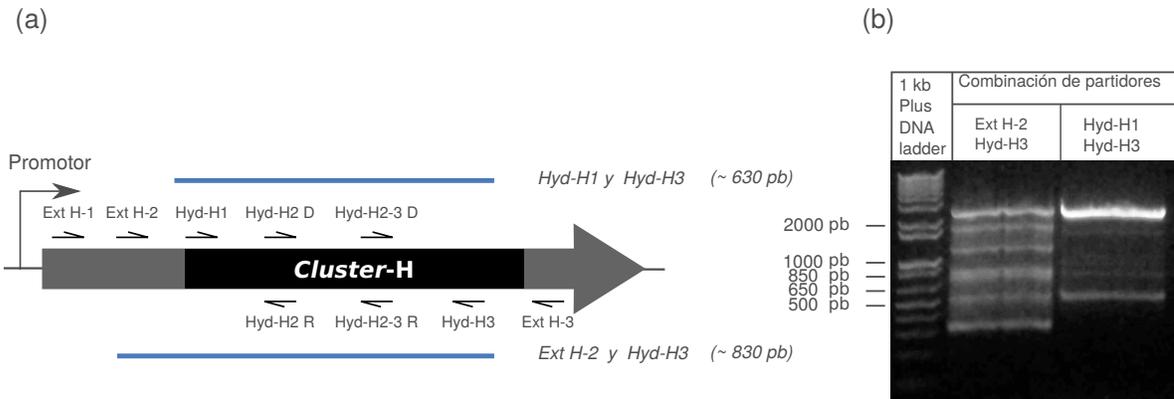


Figura 4.7: Diagrama y amplificación por PCR de las [Fe-Fe]-hidrogenasas. (a). Representación gráfica de una [Fe-Fe]-hidrogenasa y el *cluster-H*, además se muestra el lugar de hibridación de los partidores degenerados junto con sus nombres. Por otro lado en (b), se muestra las bandas obtenidas por amplificaciones de PCR, junto con la combinación de partidores utilizados.

al gen *flgN* que codifica para la proteína FlgN encargada de la síntesis de flagelo [86]. Por otro lado, con la combinación de partidores Hyd-H1/Hyd-H3 (región interna del *cluster-H*) se decidió clonar los fragmentos de ~ 650 pb, ~ 800 pb. El primer fragmento de ~ 650 pb corresponde a una porción del gen EAE_12950 que posee identidad al gen *acrB*, presente en *E. coli*, que codifica para una bomba transportadora de toxina perteneciente a la superfamilia de transportadores RND [87]. Finalmente, el fragmento de ~ 800 pb corresponde a una sección del gen EAE_01725 identificado en *E. aerogenes* como un transportador de zinc y manganeso, este posee identidad con el gen presente en *E. coli* *znuB* que codifica para una proteína de membrana transportadora de zinc y dependiente de ATP [88].

Los resultados experimentales realizados en *E. aerogenes* demuestran que ninguna de las secuencias analizadas corresponde a alguna [Ni-Fe]-hidrogenasa o [Fe-Fe]-hidrogenasas. Sugiriendo que *E. aerogenes* sólo posee el operón *hyc* que codifica para la hidrogenasa-3 (Hyd-3) formato dependiente.

Tabla 4.5: Tabla con los resultados de la secuenciación de las [Fe-Fe]-hidrogenasas.

plásmido	Tamaño del fragmento	Nombre del gen	Función
pGFe ₇₅₀	~750 pb	EAE_14760 (<i>gsiD</i>)	Transporte de glutatión
pGFe ₈₅₀	~850 pb	EAE_02805 (<i>recJ</i>)	Exonucleasa de hebra simple
pGFe ₁₂₀₀	~1200 pb	EAE_15580 (<i>flgN</i>)	Síntesis de flagelo
pGFe ₆₅₀	~650 pb	EAE_12950 (<i>acrB</i>)	Transporte de toxinas
pGFe ₈₀₀	~800 pb	EAE_01725 (<i>znuB</i>)	Transporte de zinc y manganeso

4.3 Aumento de NADH intracelular a través de manipulación genética

En la naturaleza se pueden encontrar una gran diversidad de organismos que tienen vías o productos metabólicos de interés. Sin embargo, limitaciones como bajas tasas de producción y crecimiento, altos requerimientos nutricionales, sensibilidad a estrés entre otros problemas generan limitaciones en el uso de estas cepas silvestres como productoras de productos de interés biotecnológico. Estas limitaciones han sido soslayadas con el avance de nuevas tecnologías. Un ejemplo de esto es la tecnología de ADN recombinante que ha adquirido gran importancia en el desarrollo de la biotecnología, el cual se ve reflejado en la producción de nuevos compuestos, nuevas enzimas, rutas metabólicas, elementos genéticos o nuevos microorganismos de importancia industrial [89, 90, 91, 92, 93]. Estas nuevas estrategias han dado paso para la utilización de fuentes de carbonos más simples o económicas como son los desechos industriales o azúcares fermentables provenientes de materiales complejos como los materiales lignocelulósico [94]. Esta tendencia ha requerido avances en áreas como la ingeniería metabólica, biología molecular e ingeniería genética.

Una de las técnicas utilizadas en ingeniería genética toma ventaja del sistema de reparación de ADN dañado que poseen los microorganismos [95], llamado recombinación homóloga, la cual es muy eficiente en muchos organismos. Se ha demostrado que regiones muy cortas de identidad (desde 25 a 50 pb) son suficientes para realizar una recombinación homóloga eficiente en este sistema [96]. Por otro lado, fragmentos de ADN lineales son degradados rápidamente por las exonucleasas en la mayoría de las bacterias, por lo que son considerados sustratos pobres para la recombinación, sin embargo, una recombinación eficiente entre estos fragmentos lineales

cortos y el cromosoma bacteriano pueden ser catalizados tomando ventaja de los sistemas de recombinación de fagos [97].

Datsenko y Wanner [53] utilizaron el *locus* λ *Red* el que codifica un sistema que promueve la recombinación homóloga, este *locus* λ *Red* incluye tres genes: *bet* (*aka* β), *exo* y *gam* (*aka* γ). *Exo* es una exonucleasa 5'-3' que degrada el término 5' de las moléculas de ADN lineal. *Bet* es una proteína de unión a ADN de hebra simple que se une a los términos 3' generados por *Exo* y promueve el apareamiento de ADNs complementarios favoreciendo de esta forma la recombinación homóloga. por otro lado, *Gam* se une al complejo RecBCD del hospedero e inhibe su actividad exonucleasa. Los sistemas que utilizan los genes λ *Red* se denominan genéricamente *intercambio Red* o en inglés "*Red-swap*". El sistema ideado por *Datsenko* y *Wanner* [53], expresa los genes λ *Red* desde el control de un promotor inducible por arabinosa ubicado en un plásmido termosensible de bajo número de copias (pKD46), lo que facilita la regulación de la inducción.

Con la utilización del sistema *Red-swap* es posible la recombinación de fragmentos cortos de ADN los cuales pueden ser seleccionados por métodos estándar de microbiología, como pérdida de un fenotipo o incluyendo un marcador dominante de selección (ej. un marcador de resistencia a antibiótico). Para generar fragmentos de PCR con algún marcador de selección se puede utilizar como templado el plásmido pKD3, que es un plásmido suicida dependiente de la proteína Pi (π), que carece de identidad con el cromosoma de *E. aerogenes*. La presencia de este origen de replicación condicional reduce el ruido de fondo generado por colonias resistentes al antibiótico que poseen productos de PCR aberrantes que sean homólogos a secuencias del plásmido [53]. Flanqueando el marcador de resistencia se encuentran sitios denominados FRT, los que facilitan la escisión del marcador de resistencia al expresar la recombinasa FLP desde un plásmido auxiliar fácilmente curable (pCP20). La remoción del marcador de resistencia genera una cicatriz FRT con codones de stop en los 6 marcos de lectura. Además contiene un sitio de unión a ribosoma (*Shine-Dalgarno*) y un codón de inicio para facilitar la creación de interrupciones génicas no polares. La [Figura 4.8](#) muestra un esquema general de las mutaciones generadas por intercambio alélico *Red-swap*.

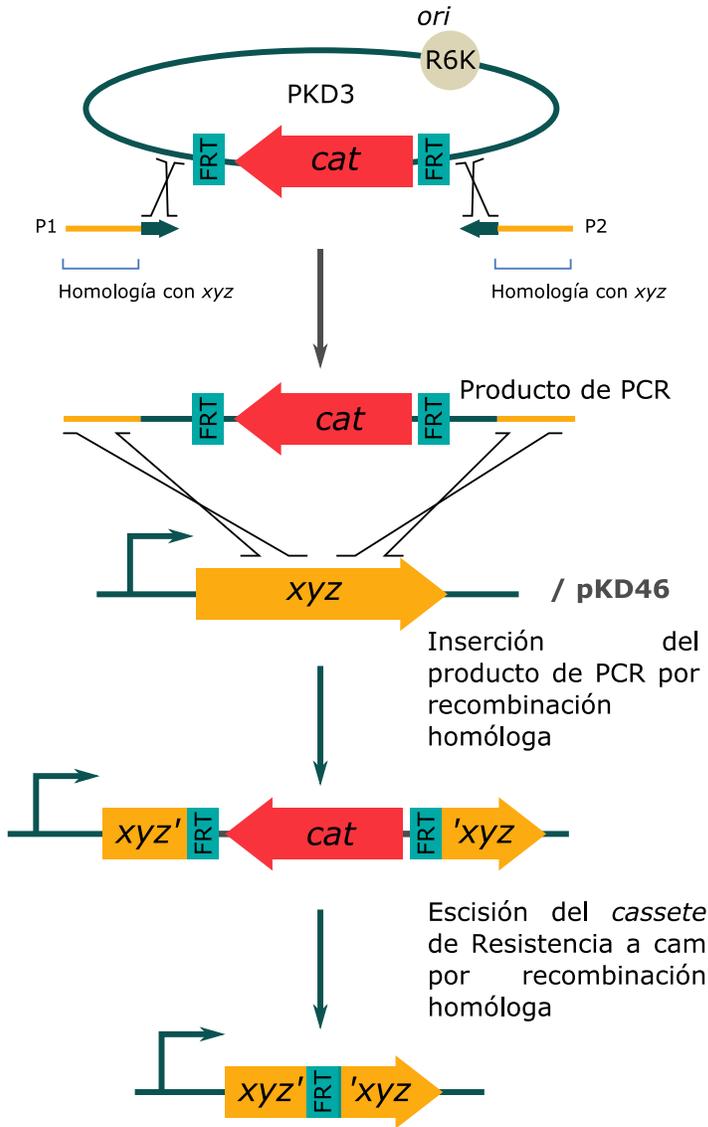


Figura 4.8: Representación de la generación de una mutación mediante el sistema de reemplazo alélico (*Red-Swap*) [53]. Brevemente, se utiliza el plásmido pKD3 que posee clonado el gen *cat* (que codifica para la cloranfenicol acetiltransferasa [Cam^R]) flanqueado por secuencias FRT (*Flp Recombinase Target*), además posee origen condicional dependiente de la proteína π como templado para realizar una amplificación de PCR. Los partidores (P1 y P2) alinean con regiones externas a *cat* y presentan segmentos de homología con el gen a mutar (*xyz*). El producto de PCR obtenido se introduce en una cepa silvestre previamente transformada con el plásmido auxiliar termosensible pKD46, lo que facilita el intercambio alélico (ver [Materiales y Métodos 3.3.10](#)). Posteriormente, es posible escindir el *cassette* de resistencia *cat* por la incorporación del plásmido auxiliar termosensible pCP20 el cual codifica para la recombinasa Flp que cataliza la recombinación sitio-específica de las secuencias FRT.

Una vez se ha obtenido la célula recombinante, es importante eliminar los genes *Red* debido a que pueden favorecer eventos de recombinación no deseados. Para esto, las bacterias se crecen a 42 °C en ausencia de selección, eliminado de esta forma el plásmido pKD46. Junto con lo anterior es recomendable realizar un *retrocruce* de las mutaciones a un fondo genético limpio mediante la técnica de ADN lineal (Figura 4.9). En este sistema se obtiene ADN de la célula recombinante y se fragmenta de forma mecánica, para luego ser introducido a una cepa parental y seleccionado

de acuerdo al marcador adecuado de selección, obteniendo de esta forma una cepa recombinante con una mutación estable [54].

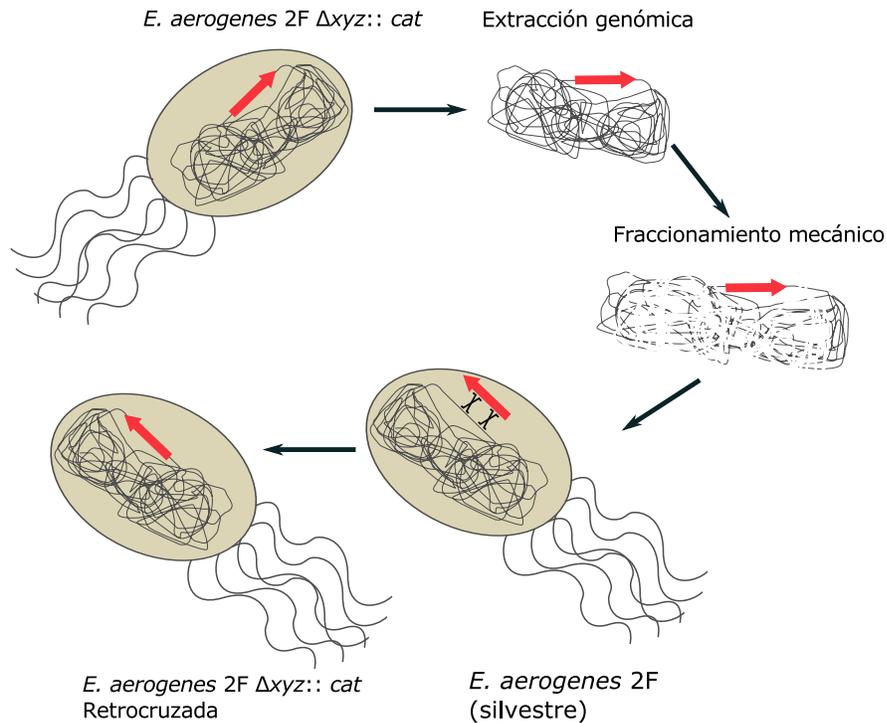


Figura 4.9: Técnica de retrocruce (*back cross*) por electrotransformación con ADN fragmentado mecánicamente según Toro y cols. [54]. Una vez obtenida la mutante por el método de *Red-swap* [53], se realiza una extracción de ADNg. Este ADN se fragmenta mecánicamente por vórtex y luego se introduce en una cepa silvestre por electrotransformación. El *cassette* (flecha roja) se inserta en el cromosoma por medio de recombinación homóloga, lo cual permite seleccionar a las mutantes retrocruzadas por medio de la resistencia a antibiótico. En el esquema de la figura se muestra la mutante Δxyz a la cual se le insertó el gen cloranfenicol acetil transferasa (*cat*).

Como se ha descrito anteriormente, *E. aerogenes* posee un operón que codifica para una [Ni-Fe]-hidrogenasa perteneciente a la clase 4 (Hyd-3). Por lo que con el objetivo de generar un fondo genético que permitiera estudiar la generación de bioH_2 por parte de la hidrogenasa hipotética (Hyd-3 independiente) y no por la acción de la ya descrita hidrogenasa Hyd-3, se generaron partidores para realizar una mutación por intercambio alélico *Red-Swap* para producir una delección de gran parte del operón, correspondiente a los genes *hycBCDEFG* (Figura 4.10). Los productos de estos genes, junto con FdhF, forman parte del complejo proteico unido a la

membrana plasmática (FHL) (Figura 1.2), los que son necesarios para la generación de bioH₂.

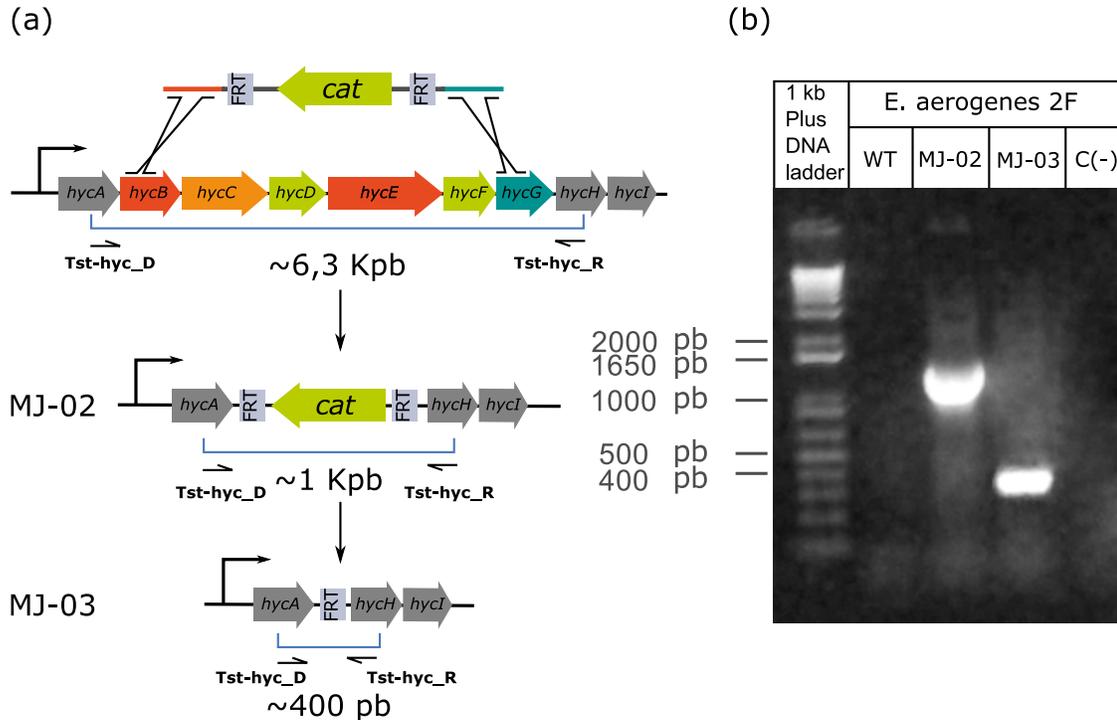


Figura 4.10: Representación de la confirmación de la mutación del operón de la hidrogenasa-3 por intercambio alélico *Red-Swap* (cepa MJ-02b). (a). Representación gráfica con los genes que componen el operón *hyc*, los genes que participan en la formación del complejo proteico unido a la membrana son los que fueron eliminados (*hycBCDEFG*), los que no participan se encuentran en color gris y se dejaron en esta nueva construcción (*hycAHI*). Además se muestran los tamaños esperados para cada una de las construcciones con la combinación de partidores Tst-*hyc_D* y Tst-*hyc_R*. Por otro lado en (b), se muestra las confirmaciones de la mutación por amplificaciones de PCR.

Para generar esta mutación, se utilizaron los partidores WhycBG-D y WhycBG-R los cuales hibridan en la región interna del gen *hycB* y gen *hycG*, respectivamente. El uso de estos partidores, genera la eliminación de una región de más de ~6300 pb dentro del operón *hycABCDEFGHI*, el cual es intercambiado por el *cassette* de resistencia a cloranfenicol (gen *cat* ~1100 pb). Para minimizar las posibilidades de que un fenotipo determinado se deba a alteraciones cromosomales debido a la presencia del sistema *Red* codificado por el plásmido auxiliar pKD46, y no al operón de estudio, se movieron todas las mutaciones que involucraran el uso de este plásmido a un fondo

genético limpio. Para ello, una vez obtenida la mutante *E. aerogenes* 2F $\Delta hyc-3::cat$ (MJ-02) mediante el intercambio alélico por *Red-Swap*, se realizó un retrocruce (*back-cross*) sobre una cepa *E. aerogenes* 2F silvestre. Este procedimiento se llevó a cabo según el esquema resumido en la [Figura 4.9](#). El resultado final fue la cepa mutante *E. aerogenes* 2F $\Delta hyc-3::cat$ retrocruzada (MJ-02b). Además se eliminó el *cassette* de resistencia para dejar una cicatriz FRT (cepa MJ-03), de manera que esta variante pueda ser utilizada como fondo genético para producir otras cepas mutantes. Todas las mutaciones fueron comprobadas por PCR, utilizando en este caso, la mezcla de partidores Tst-hyc_D y Tst-hyc_R, los cuales hibridan por fuera del *cassette* de resistencia insertado ([Figura 4.10](#)).

Una vez generada la cepa *E. aerogenes* 2F $\Delta hyc-3::cat$ (MJ-02b), se decidió aumentar la concentración de NADH intracelular para estimular la generación de bioH₂ por vía dependiente de NADH [35, 49, 50, 51]. Esta vía posee un gran potencial biotecnológico, debido a que tiene un rendimiento teórico de 4 moles de H₂ por mol de glucosa.

Para aumentar los niveles intracelulares de NADH, se utilizó como estrategia la eliminación de vías metabólicas que utilizan intermediarios reducidos. En la [Tabla 4.6](#) se pueden observar los genes seleccionados cuya eliminación se ha demostrado que aumenta los niveles de intermediarios reducidos [98]³.

Tabla 4.6: Genes de interés cuya delección genera un aumento en la concentración de NADH

Gen	EC N°	Reacción
EAE_10675 (<i>arcA</i>)	-	ArcA+ArcB ^{Phis292} → ArcA ^{Pasp54} +ArcB
EAE_24405 (<i>nuoG</i>)	1.6.5.3	NADH+ubiquinona+5 H ⁺ ↔ NAD ⁺ +ubiquinol+4 H ⁺
EAE_16455 (<i>hdh</i>)	1.6.99.3	NADH+ubiquinona+H ⁺ → NAD ⁺ +ubiquinol
EAE_20575 (<i>ldhA</i>)	1.1.1.28	Piruvato+NADH+H ⁺ → (R)-Lactato+NAD ⁺
EAE_23820 (<i>dld</i>)	1.1.1.28	(R)-Lactato+ubiquinona → Piruvato+ubiquinol
EAE_16895 (<i>adhE</i>)	1.1.1.1	Acetaldehido+NADH → Etanol+NAD ⁺ +CoA

Se ha descrito que en anaerobiosis que la mayor cantidad del NADH generado por la glicólisis es consumido para generar lactato por la enzima LdhA [99]. Esta enzima es llamada lactato

³Si bien la [Tabla 4.6](#) muestra los genes seleccionados, no todas las mutaciones se lograron (posiblemente por polimorfismos de secuencia que impidieron la correcta hibridación de los partidores de la técnica de mutación.)

deshidrogenasa A y es una proteína soluble dependiente de NADH que se encuentra presente en el citoplasma y es específica para la producción de D-lactato. Esta enzima, además, es el principal blanco de mutaciones en ingeniería metabólica para eliminar la producción de metabolitos no deseados [99]. Para generar la mutación en el gen *ldhA*, se utilizaron los partidores WldhA_F y WldhA_R, que hibridan en una región interna del gen *ldhA*. La utilización de estos partidores generan la eliminación de una región de ~ 800 pb y la inserción del *cassette* de resistencia a cloranfenicol (~ 1100 pb), lo que deja esta construcción con un tamaño esperado de ~ 2200 pb (Figura 4.11 (a)). En la Figura 4.11 (b) se observa la confirmación por amplificación de PCR de la mutación (cepa MJ-04).

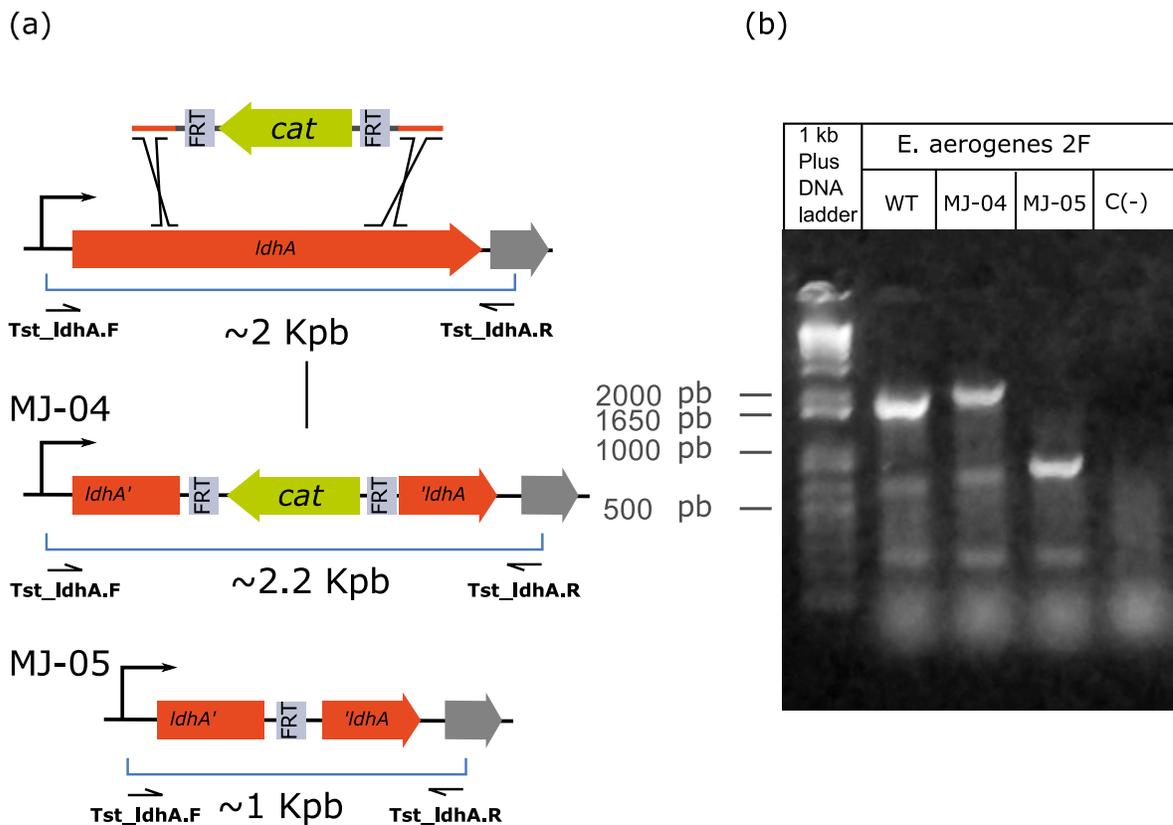


Figura 4.11: Representación de la confirmación de la mutación del gen *ldhA* por intercambio alélico *Red-swap* (cepa MJ-04b). (a). Representación gráfica con los tamaños esperados para cada una de las construcciones con la combinación de partidores Tst-*ldhA*_D y Tst-*ldhA*_R. Por otro lado en (b), se muestra las confirmaciones de la mutación por amplificaciones de PCR.

Una vez obtenida la variante defectuosa en el gen *ldhA* se midió la concentración de NADH y de NAD⁺ de acuerdo a lo indicado en los Materiales y Métodos (Sección 3.3.11). La Figura

4.12 muestra el cociente de NADH sobre NAD^+ , como comparación en esta figura se muestra el cociente NADH/NAD^+ de la cepa parental *E. aerogenes* 2F y la nueva variante MJ-04 defectuosa en el gen *ldhA* (cuyos valores son 1.01 y 1.89 unidades respectivamente). Estos resultados sugieren que la eliminación del gen *ldhA* eleva los niveles de NADH intracelulares en comparación a la cepa parental. Para mayor detalle de las concentraciones de cada metabolito y del total de $\text{NAD}(\text{H}/^+)$, ver Figura B.1 en el Anexo B.

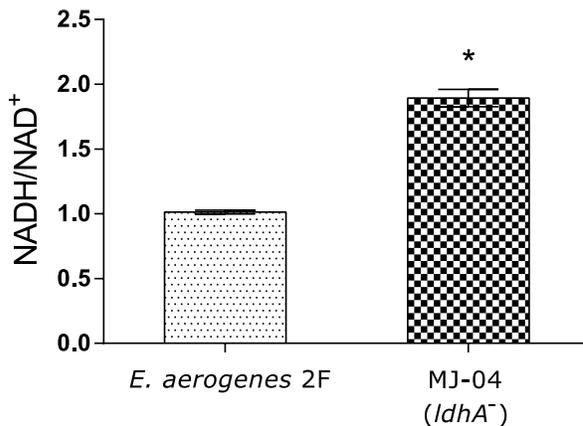


Figura 4.12: Cociente NADH/NAD^+ para la cepa MJ-04. Esta figura muestra la razón entre el NADH y NAD^+ intracelular para la cepa parental *E. aerogenes* 2F y la cepa mutante MJ-04. El incremento en los niveles intracelulares de NADH en la cepa MJ-04 fueron estadísticamente significativos (* $P < 0.05$). $n = 3$

Junto con *LdhA*, se propuso la eliminación de la D-Lactato deshidrogenasa (*Dld*) que es una deshidrogenasa dependiente de FAD unida a la membrana. Para generar la mutación en el gen *dld*, se utilizaron los partidores *Wdld_F* y *Wdld_R*. Estos hibridan en una región interna del gen, lo que produce la eliminación de ~ 1700 pb, generando un tamaño esperado de $\sim 2,2$ Kpb (Figura 4.13 (a)). En la Figura 4.13 (b) se ve la confirmación por amplificaciones de PCR de la mutación en el gen *dld*, se puede observar el tamaño esperado para la cepa silvestre y el tamaño del gen mutado en los clones 1, 2 y 3 (cepa *E. aerogenes* 2F $\Delta dld::cat$, MJ-06).

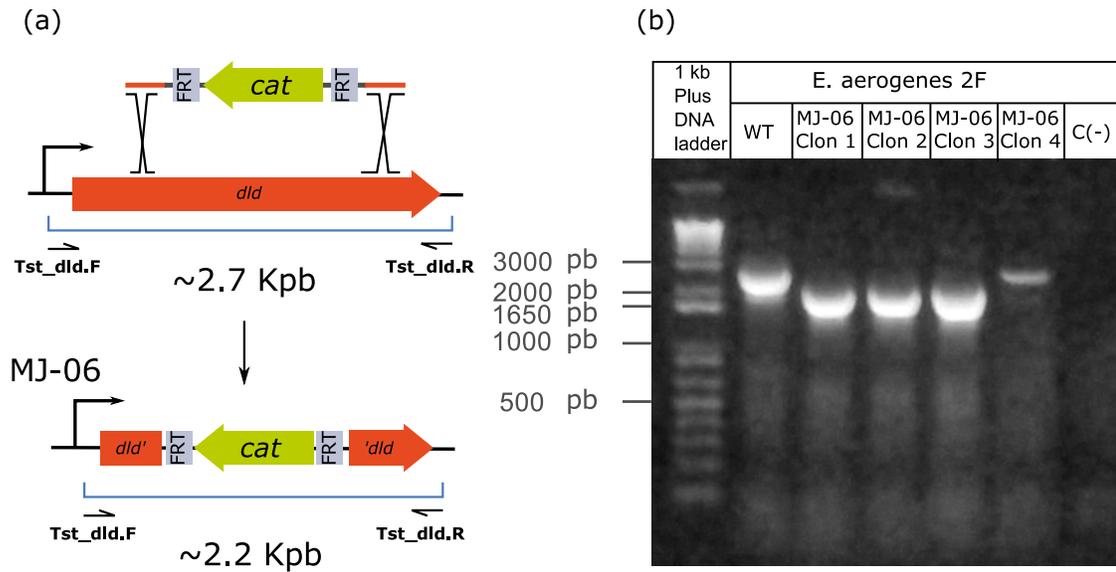


Figura 4.13: Representación de la confirmación de la mutación del gen *dld* por intercambio alélico *Red-swap* (cepa MJ-06b). (a). Representación gráfica con los tamaños esperados. (b) Confirmaciones de la mutación por amplificaciones de PCR.

Al igual que lo realizado con la variante MJ-04, se midieron las concentraciones intracelulares de NAD(H⁺) para determinar el cociente entre ellos y demostrar que se genera una diferencia entre la variante defectuosa en *dld* y la cepa parental *E. aerogenes* 2F (Figura 4.14). Esta figura confirma que la delección del gen *dld* (MJ-06) genera un aumento en la concentración intracelular de NADH en comparación a la cepa parental. Para mayor detalle de las concentraciones de cada metabolito y del total de NAD(H⁺), ver Figura B.1 en el Anexo B

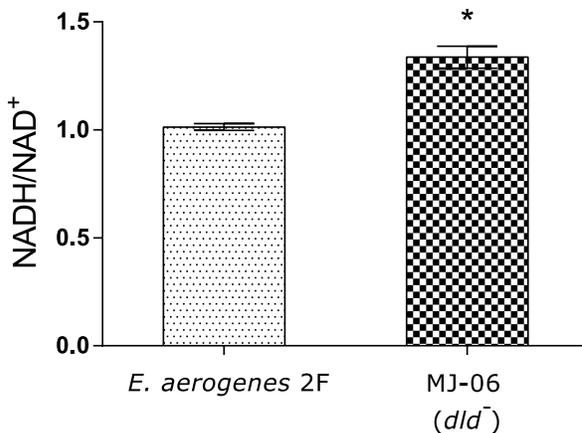


Figura 4.14: Cociente NADH/NAD⁺ para la cepa MJ-06. Esta figura muestra la razón entre el NADH y NAD⁺ intracelular para la cepa parental *E. aerogenes* 2F y la cepa mutante MJ-06. El incremento en los niveles intracelulares de NADH en la cepa MJ-04 fueron estadísticamente significativos (* P < 0.05). n = 3

La generación de las mutaciones simples en los genes *ldhA* y *dld* permitirá determinar el

efecto que tienen en la producción global de bioH_2 . Por otro lado, para determinar el efecto que tienen estos dos genes defectuosos por separado sobre la producción de hidrógeno por la vía del NADH (Hyd-3 independiente) se generaron dobles mutantes sobre un fondo genético carente de la hidrogenasa-3 (Hyd-3, cepa MJ-03) de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos (Sección 3.3.10.5). Como se señaló anteriormente y de acuerdo a la descripción de los Materiales y Métodos se generó variantes con mutaciones dobles, de esta forma se originó la cepa *E. aerogenes* 2F $\Delta\text{hyc-3::FRT } \Delta\text{ldhA::cat}$ (MJ-12) (Figura 4.15) y la cepa *E. aerogenes* 2F $\Delta\text{hyc-3::FRT } \Delta\text{dld::cat}$ (MJ-11) (Figura 4.16). Para esto, se utilizó como célula receptora la cepa MJ-03 que carece de los genes necesarios para la formación de la hidrogenasa-3 (Hyd-3) y en cuyo lugar se encuentra una cicatriz FRT. En esta cepa se introdujeron por separado las mutaciones simples $\Delta\text{ldhA::cat}$ y $\Delta\text{dld::cat}$, provenientes de las mutantes simples MJ-04b y MJ-06b respectivamente. En las Figuras 4.15 y 4.16 se muestra la confirmación de las mutaciones. Para el caso de la cepa MJ-12 (Figura 4.15) se observan clones positivos para 4 de los 5 (clon 1, 2, 3 y 4). Por otro lado, para la cepa MJ-11 (Figura 4.16), se distingue que los dos clones analizados resultaron positivos.

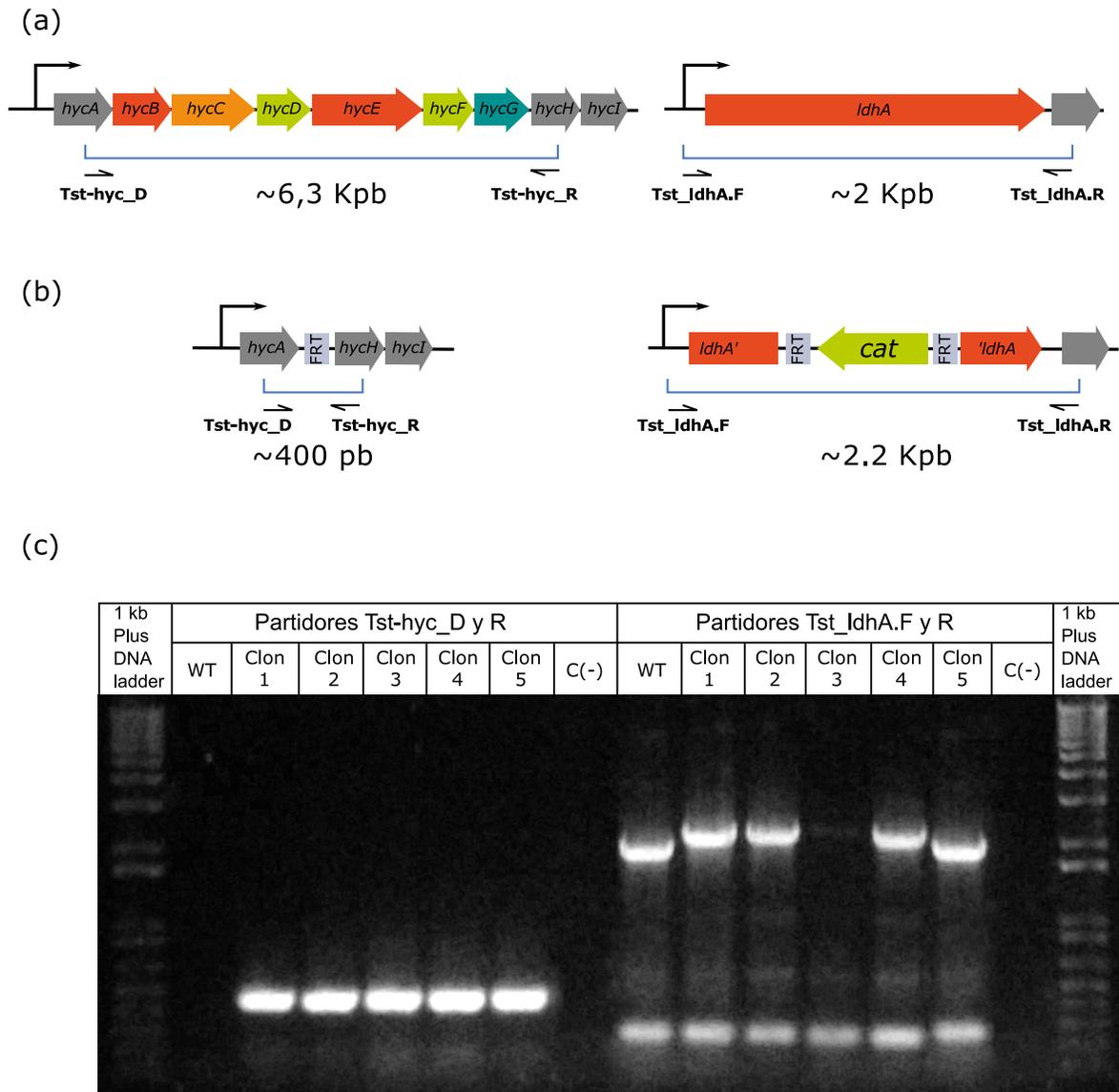


Figura 4.15: Representación de la confirmación de la doble mutante en el operón *hyd-3* y el gen *ldhA* por intercambio alélico *Red-swap* (cepa MJ-12). (a). Representación gráfica de los tamaños esperados para la cepa parental *E. aerogenes* 2F (WT). En (b) se muestra la representación gráfica con los tamaños esperados para cada una de las construcciones con la combinación de partidores Tst-hyc_D, Tst-hyc_R y Tst-ldhA_D, Tst-ldhA_R. Por otro lado en (c), se muestra las confirmaciones de la mutación por amplificaciones de PCR.

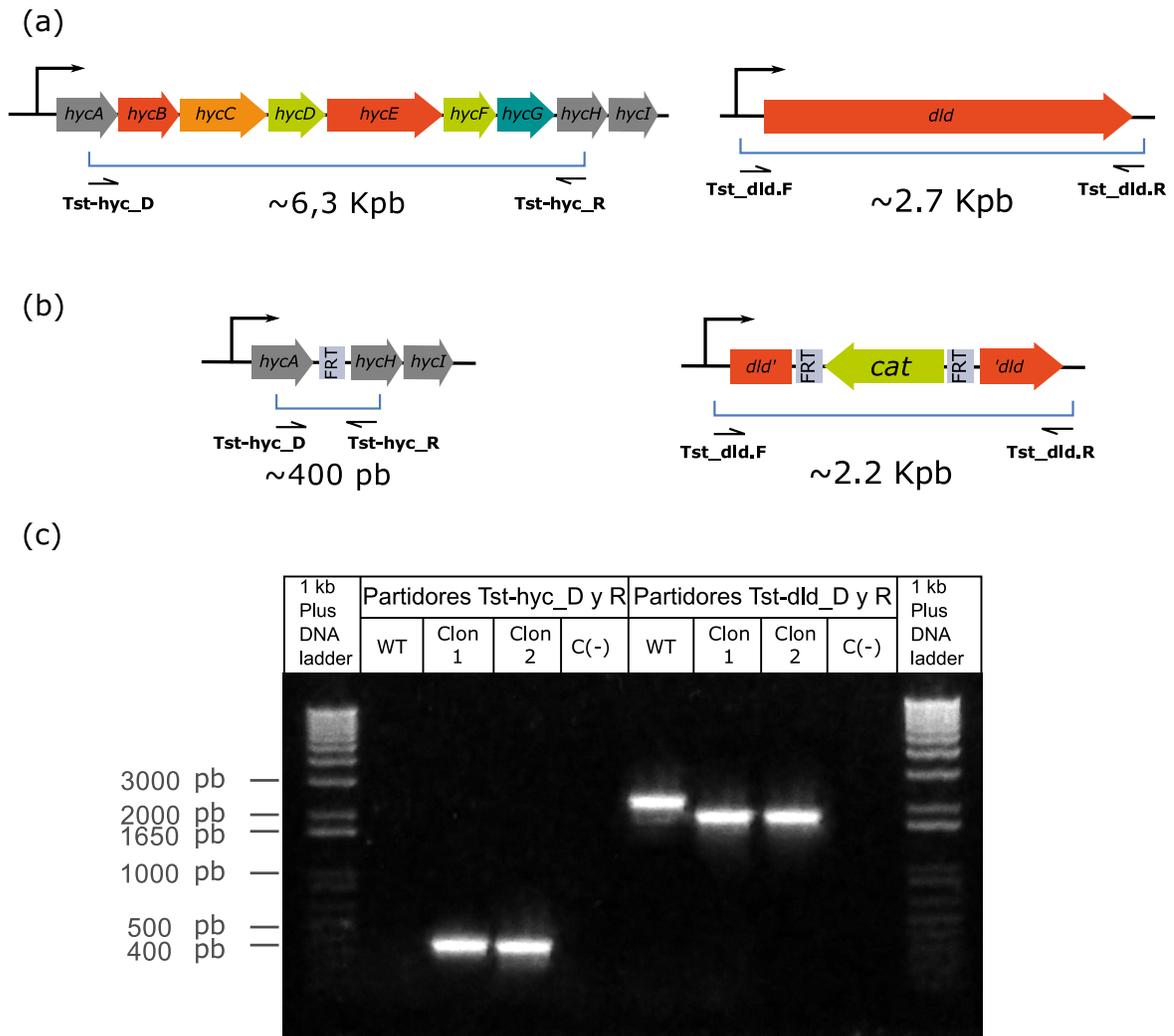


Figura 4.16: Representación de la confirmación de la doble mutante en el operón *hyd-3* y el gen *dld* por intercambio alélico *Red-swap* (cepa MJ-11). (a). Representación gráfica de los tamaños esperados para la cepa silvestre *E. aerogenes*. En (b) se muestra la representación gráfica con los tamaños esperados para cada una de las construcciones con la combinación de partidores Tst-hyc_D, Tst-hyc_R y Tst-dld_D, Tst-dld_R. Por otro lado en (c), se muestra las confirmaciones de la mutación por ampliaciones de PCR.

Una vez generadas estas mutaciones dobles con fondo genético *hyd-3⁻* se les midió la concentración de NADH y NAD⁺ para determinar si estas poseen diferencias con la cepa parental, las cuales se verían reflejadas en diferencias en los patrones de producción de bioH₂. La Figura 4.17 muestra los cocientes entre NADH y NAD⁺ para las variantes MJ-12 (*hyd-3⁻ ldhA⁻*) y MJ-11

(*hyd-3⁻ dld⁻*). Estas dobles mutantes muestran un leve aumento en los niveles intracelulares de NADH en comparación a la cepa parental, siendo estos estadísticamente significativos para las variantes MJ-02 y MJ-12 ($P < 0.05$). Los valores corresponden a 1.01, 1.16, 1.16 y 1.14, para la cepa parental, y variantes MJ-02, MJ-12 y MJ-11 respectivamente. Para mayor detalle de las concentraciones de cada metabolito y del total de NAD(H⁺), ver [Figura Anexa B.2](#).

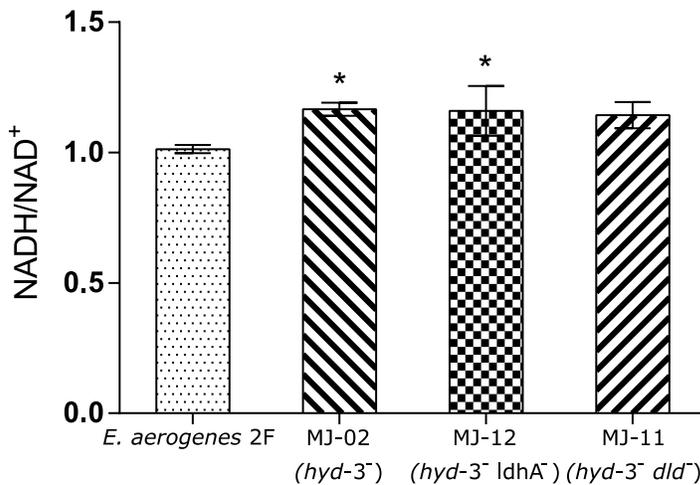


Figura 4.17: Cociente NADH/NAD⁺ para las variantes MJ-12 y MJ-11. Esta figura muestra la razón entre el NADH y NAD⁺ intracelular para la cepa parental *E. aerogenes* 2F, la variante MJ-12 (*hyd-3⁻ ldhA⁻*) y la variante MJ-11 (*hyd-3⁻ dld⁻*). Sólo las cepas MJ-02 y MJ-12 posee diferencias significativas con la cepa parental ($P < 0.05$). $n = 3$

Para determinar el efecto de estas dos mutaciones en conjunto sobre la producción global de bioH₂ se generó la mutante *E. aerogenes* $\Delta dld::FRT \Delta ldhA::cat$ ([Figura 4.18](#)). Para esto se eliminó el *cassette* de resistencia a cloranfenicol desde la variante MJ-06 ($\Delta dld::cat$) generando la variante *E. aerogenes* $\Delta dld::FRT$ (MJ-07). La variante anteriormente obtenida fue utilizada como fondo genético para introducir la construcción *ldhA::cat* proveniente de la variante MJ-04b (*ldhA⁻*). En la [Figura 4.18](#) se puede observar la obtención de sólo un clon con las construcciones buscadas (clon 1).

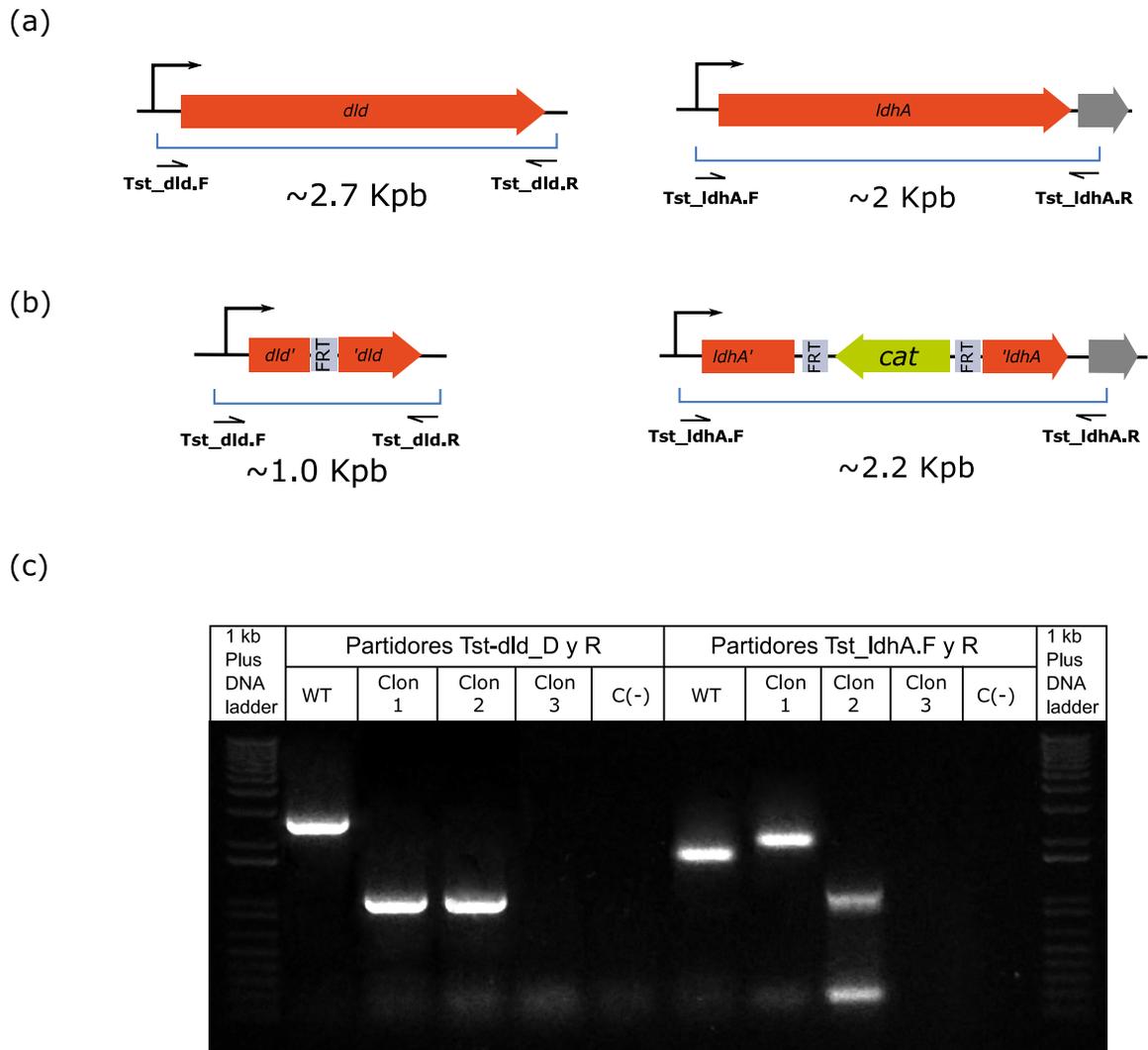


Figura 4.18: Representación de la confirmación de la doble mutante en los genes *ldhA* y *dld* por intercambio alélico *Red-swap* (variante MJ-09b). (a). Representación gráfica de los tamaños esperados para la cepa parental *E. aerogenes* 2F (WT). En (b) se muestra la representación gráfica con los los tamaños esperados para cada una de las construcciones con la combinación de partidores Tst-hyc_D, Tst-hyc_R y Tst-dld_D, Tst-dld_R. Por otro lado en (c), se muestra las confirmaciones de la mutación por ampliaciones de PCR.

Una vez generada la variante deficiente en los genes *ldhA* y *dld* (variante MJ-09), se le midió la concentración intracelular de NADH (Figura 4.19). Los resultados demuestran que la doble mutación (en los genes *ldhA* y *dld*) producen un aumento significativo en los niveles intracelulares de NADH ($P < 0.05$), en comparación a la cepa parental (1.01 y 1.79, cepa parental *E. aerogenes*

2F y MJ-09 respectivamente). Al comparar estos resultados con los cocientes encontrados para las variantes con sus mutaciones simples correspondientes 1.89 y 1.34 (MJ-04, [Figura 4.12](#) y MJ-06 [Figura 4.14](#), respectivamente), se observa que se obtienen valores similares a la mutante simple $ldhA^-$ (sin diferencias estadísticas entre ellos). Se observa además que el valor de la doble mutante MJ-09 ($ldhA^- dld^-$) es mayor que la variante MJ-06 (dld^- , $P < 0.05$).

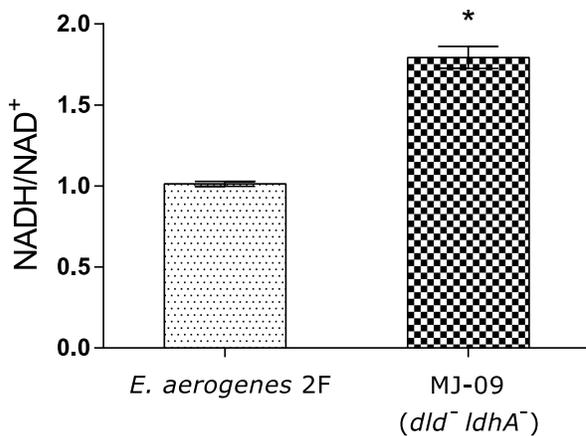
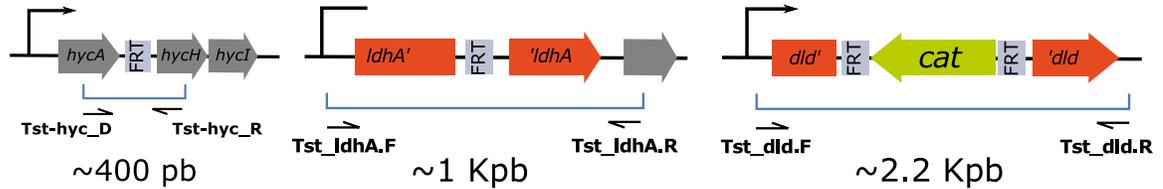


Figura 4.19: Cociente NADH/NAD⁺ para la variante MJ-09. Esta figura muestra la razón entre el NADH y NAD⁺ intracelular para la cepa parental *E. aerogenes* 2F y la mutante MJ-09 ($ldhA^- dld^-$). El incremento en los niveles intracelulares de NADH en la variante MJ-09 fueron estadísticamente significativos (* $P < 0.05$).

$n = 3$

Para determinar el efecto que las mutaciones en los genes *ldhA* y *dld* tienen sobre la producción de bioH₂ llevada a cabo por hidrogenasa Hyd-3 independiente, se generó una triple mutante. Para la generación de esta variante, se tomó la mutante MJ-12 (2F $\Delta hyc::FRT \Delta ldhA::cat$) y se le eliminó el *cassette* de resistencia a cloranfenicol (2F $\Delta hyc::FRT \Delta ldhA::FRT$, variante MJ-13). La mutante así generada se utilizó como fondo genético para introducir la construcción $\Delta dld::cat$ proveniente de la variante MJ-06b generando de esta forma la mutante *E. aerogenes* 2F $\Delta hyc::FRT \Delta ldhA::FRT \Delta dld::cat$ (MJ-14). La [Figura 4.20](#) muestra la confirmación de la cepa mutante MJ-14. Debido a que las cepas utilizadas tanto como fondo genético (cepa receptora) y como cepa dadora fueron las construcciones ya confirmados, se decidió no agregar la cepa parental, y sólo buscar los tamaños esperados para cada uno de estas construcciones. En esta figura se puede observar que en dos de los tres clones analizados se obtienen abundantes bandas con los tamaños deseados para cada una de las combinaciones de partidores.

(a)



(b)

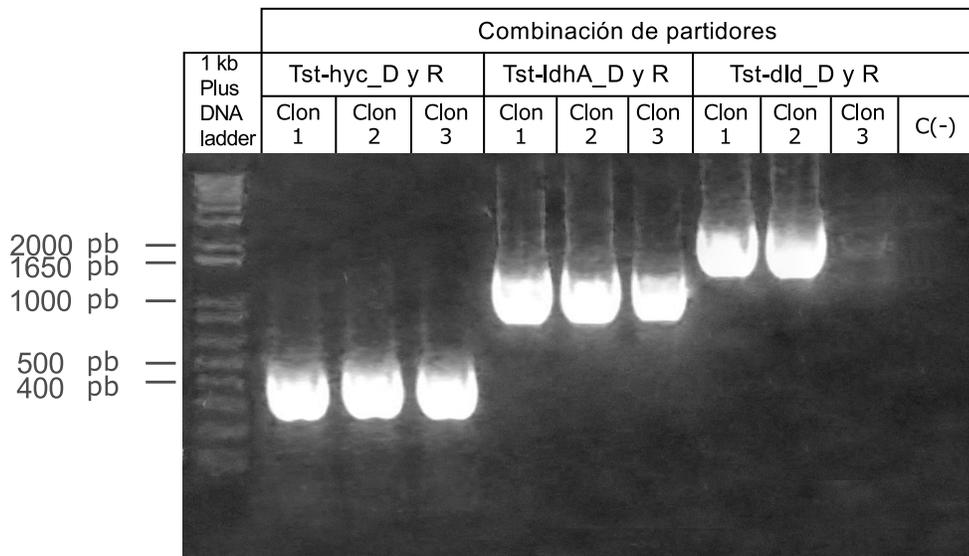


Figura 4.20: Confirmación de la triple mutante en el operón *hyd-3*, el gen *ldhA* y el gen *dld* por intercambio alélico *Red-swap* (variante MJ-14). En (a) se muestra la representación gráfica con los tamaños esperados para cada una de las construcciones con la combinación de partidores Tst-hyc_D, Tst-hyc_R; Tst-ldhA_D, Tst-ldhA_R y Tst-dld_D, Tst-dld_R. Por otro lado en (b), se muestra las confirmaciones de la mutación por ampliaciones de PCR.

Al igual que a las variantes anteriores, se determinó el cociente entre las concentraciones de NADH y NAD⁺ (para mayor detalle sobre estas concentraciones revisar [Figura Anexa B.2](#)). La [Figura 4.21](#) muestra el cociente para la variante MJ-14 (*hyd-3⁻ ldhA⁻ dld⁻*) y la cepa parental como control. En esta figura se puede observar que existe una pequeña diferencia significativa en el cociente de estas dos cepas debido a un aumento significativo de la concentración de NADH en la variante MJ-14 (1.01 y 1.16 para la cepa parental y MJ-14 respectivamente), confirmando que la ausencia del operón Hyd-3, junto con la falta de los genes *ldhA* y *dld* producen un aumento

en la concentración de NADH. La [Tabla 4.7](#), muestra todos los valores de la razón entre NADH y NAD⁺ para cada una de las variantes generadas en este trabajo.

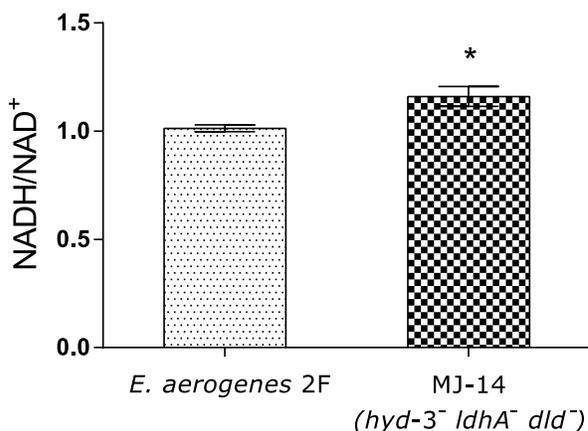


Figura 4.21: Cociente NADH/NAD⁺ para la variante MJ-14. Esta figura muestra la razón entre el NADH y NAD⁺ intracelular para la cepa parental *E. aerogenes* 2F y la mutante MJ-14 (*hyd-3⁻ ldhA⁻ dld⁻*). El incremento en los niveles intracelulares de NADH en la variante MJ-14 fueron estadísticamente significativos (* P < 0.05). n = 3

Tabla 4.7: Tabla resumen de los valores intracelulares de NADH/NAD⁺ para todas las variantes. En esta tabla se encuentran los genomas y la denominación de cada variante. 2F es *E. aerogenes* correspondiente al genotipo silvestre (WT).

Cepa/Variante	2F	<i>hyd-3⁻</i>						
		MJ-04b	MJ-06b	MJ-09	MJ-02	MJ-12	MJ-11	MJ-14
Genotipo	WT	<i>ldhA⁻</i>	(<i>dld⁻</i>)	<i>ldhA⁻</i> <i>dld⁻</i>		<i>ldhA⁻</i>	(<i>dld⁻</i>)	<i>ldhA⁻</i> <i>dld⁻</i>
NADH/NAD ⁺	1.01	1.89	1.34	1.79	1.16	1.16	1.14	1.16

4.4 Efecto que tienen las mutaciones en la producción de bioH₂.

4.4.1 Efecto que tienen las mutaciones en la producción de bioH₂ en medio rico LB.

Con el objetivo de estudiar cuál es el efecto en la producción de bioH₂ que tienen cada una de las mutantes generadas anteriormente; eliminación del operón *hyc* (*hyd-3⁻*), eliminación de la lactato deshidrogenasa A (*ldhA⁻*) y la D-Lactato deshidrogenasa (*dld⁻*), se realizaron fermentaciones de acuerdo a lo propuesto en Materiales y Métodos ([Sección 3.2.2](#)). Como primera

aproximación se realizaron cultivos en medio rico. Para esto, se llevaron a cabo fermentaciones en medio LB agregando cultivos de *E. aerogenes* 2F en estado logarítmico de tal forma de empezar los cultivos con la misma densidad celular. Estos cultivos fueron monitoreados continuamente durante el periodo de fermentación. Durante este tiempo, se tomaron muestras líquidas para determinar el pH y la densidad celular. Por otro lado, el gas generado fue colectado y medido continuamente a través del sistema de desplazamiento de una columna de agua. La composición del gas se caracterizó en un cromatógrafo de gases de acuerdo a lo planteado en Materiales y Métodos (Sección 3.3.16). En relación a la forma de presentar los resultados estos se separaron en la *producción global*, que corresponde a la generación de bioH₂ en las cepas que poseen la hidrogenasa-3 (Cepa parental, MJ-04b, MJ-06b y MJ-09), y la *producción Hyd-3 independiente*, que es independiente de la vía del formato y que corresponde a las variantes carentes de la hidrogenasa-3 (MJ-02b, MJ-11, MJ-12 y MJ-14).

4.4.1.1 Producción global de bioH₂ en medio rico.

Como primer acercamiento se analizó el efecto de las mutaciones en la producción general de bioH₂ (Figura 4.22). Esta figura muestra el crecimiento celular medido como OD₆₀₀, se puede observar que se tomaron muestras continuamente hasta el final de la fermentación, punto donde ya no existía crecimiento celular ni producción de gas. La cantidad de biomasa que se produce en las diferentes cepas es similar entre sí a lo largo de toda la fermentación, no existiendo diferencias significativas entre ellas ($P < 0.05$), por lo que tanto las mutación simples en los genes *ldhA*, *dld* y la doble mutante no tienen efecto en crecimiento celular en medio rico LB (Figura 4.22 (b), (c) y (d) respectivamente).

La cantidad de gas por hora que se produce durante la fermentación es similar en las cuatro cepas, mostrando un aumento en el estado logarítmico tardío de la curva de crecimiento. En este punto la variante MJ-06b (Figura 4.22 (c)) muestra una producción de gas levemente mayor, siendo significativamente diferente sólo a la variante MJ-09 (cuadrados sin relleno en la Figura 4.22 (d), $P < 0.05$).

En el caso de la producción de bioH₂, este comienza a ser detectado en fase logarítmica logrando un máximo en fase logarítmica tardía. El volumen de bioH₂ generado en cada medición se normalizó por el peso seco de bacterias y se asumieron condiciones ideales para la utilización de la fórmula de los gases ideales.

Como se mencionó anteriormente, la detección de bioH₂ comienza en fase logarítmica de crecimiento, en esta etapa las variantes MJ-04b (*ldhA*⁻) y MJ-06b (*dld*⁻) [(Figura 4.22 (b) y (c), respectivamente)] presentan mayor producción de bioH₂ en comparación a la cepa parental y la variante MJ-09 (*dld*⁻ *ldhA*⁻) ($P < 0.05$). Por otro lado, si bien entre la variante MJ-04b (*ldhA*⁻) y MJ-06b (*dld*⁻) no existen diferencias significativas en este punto, se aprecia que la variante MJ-06b (*dld*⁻) (Figura 4.22 (c) y Tabla 4.8) presenta la tendencia a una mayor producción de bioH₂.

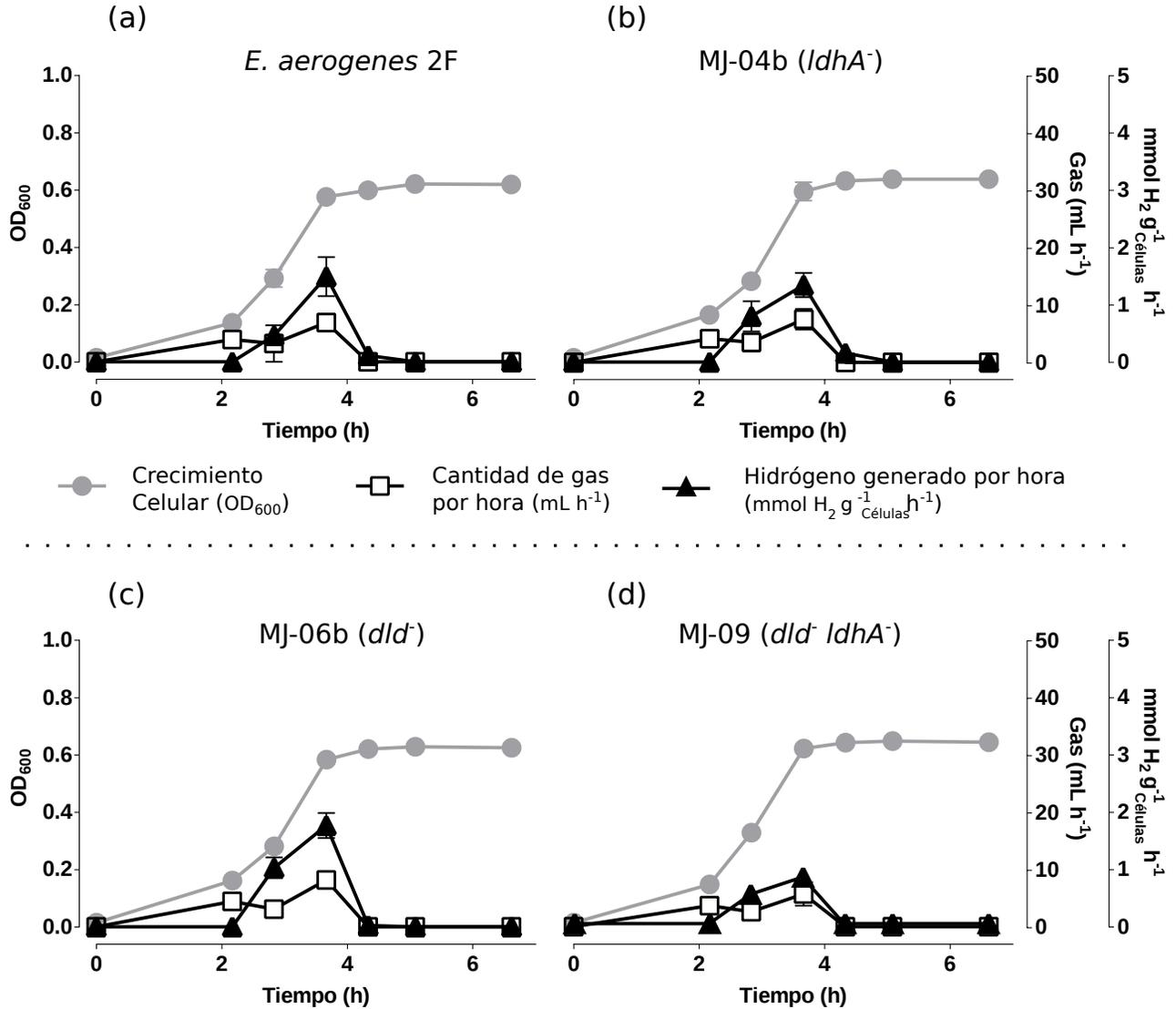


Figura 4.22: Efecto en la producción global de bioH₂ en medio LB. Se muestra la gráfica de la fermentación realizada en medio LB. Durante el tiempo de fermentación se tomaron muestras líquidas para medir la densidad óptica del cultivo (círculos grises), se midió el gas generado por hora (cuadrados blancos) y se caracterizó el gas que se generaba en un cromatógrafo de gases para determinar la cantidad de bioH₂ que se producía. La concentración de bioH₂ se encuentra expresado en mmoles de H₂ por gramo de peso seco de bacterias o células (g⁻¹ Células) por hora (triángulos negros).

En la fase logarítmica tardía se obtiene un máximo de producción de bioH₂. Las cepas que tiene mayor producción de bioH₂ es la variante MJ-06b (*dld*⁻), seguida de la cepa parental (sin tener diferencias estadísticamente significativas). Por otro lado, la modificación en el gen *ldhA* no genera diferencias con la cepa parental (P <0.05). Así mismo, al comparar las dos mutantes simples, la producción de bioH₂ de la variante MJ-06b (*dld*⁻) es estadísticamente mayor que la variante MJ-04b (*ldhA*⁻). El caso contrario ocurre con la variante MJ-09 (*ldhA*⁻ *dld*⁻) que presenta la menor producción de bioH₂ (Tabla 4.8). Estos resultados sugieren que cuando *E. aerogenes* se encuentra en medio LB, el posible aumento en otro intermediario reducido diferente a NADH, es preponderante en el aumento de la actividad hidrogenasa. Por otro lado, la presencia de las dos mutaciones (*ldhA*⁻ *dld*⁻, variante MJ-09) posiblemente genera niveles suficientemente elevados de NADH como para inhibir de forma alostérica la actividad de las pocas enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico que se encuentran funcionales en condiciones anaeróbicas [98], produciendo en consecuencia una menor producción de bioH₂.

Tabla 4.8: Producción global de bioH₂ en fase logarítmica en medio LB. Se muestran los valores obtenidos de la fermentación en medio LB. Estos valores fueron utilizados para la generación de los gráficos de la Figura 4.22. Representación de esta tabla en la Figura Anexa B.3.

Cepa (Genotipo)	Fase de crecimiento	
	Logarítmica	Logarítmica tardía
<i>E. aerogenes</i> 2F	0.46 ± 0.00	1.49 ± 0.34
MJ-04b (<i>ldhA</i> ⁻)	0.79 ± 0.19	1.36 ± 0.15
MJ-06b (<i>dld</i> ⁻)	1.03 ± 0.18	1.77 ± 0.22
MJ-09 (<i>dld</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	0.52 ± 0.00	0.81 ± 0.07

Las unidades corresponden a mmol H₂ g⁻¹ Células⁻¹ h⁻¹. n=3

4.4.1.2 Producción de bioH₂ por parte de la hidrogenasa Hyd-3 independiente en medio rico LB.

Con el objetivo de estudiar la existencia de la hidrogenasa Hyd-3 independiente, primero se realizaron fermentaciones con la variante carente de la hidrogenasa-3 (MJ-02b) y la cepa parental, para luego analizar la eliminación de *ldhA* y *dld* y su efecto en la producción de bioH₂ en las cepas carentes de Hyd-3.

En la (Figura 4.23) se muestra la comparación entre la cepa parental *E. aerogenes* 2F y la variante MJ-02b (*hyd-3*⁻). En esta figura se puede observar que en medio rico la eliminación del operón *hyc-3* no produce cambios en el crecimiento en comparación a la cepa parental. El cambio que se producen con la eliminación de Hyd-3 es la disminución drástica en la producción de gas (aproximadamente 1 mL h⁻¹), junto con una disminución de bioH₂ (cerca de 30 veces menos que la cepa parental). Cabe destacar que aún en la ausencia de Hyd-3, la variante MJ-02 es capaz de generar bioH₂. Estos resultados sugieren la presencia de una hidrogenasa distinta a Hyd-3 que es capaz de tener actividad en las condiciones estudiadas.

Para analizar el efecto que tienen la eliminación de los genes *ldhA* y *dld* en las variantes *hyd-3*⁻, se realizaron fermentaciones con las mutantes MJ-02b, MJ-11, MJ-12 y MJ-14 (Figura 4.24). En esta figura se puede observar que las cepas no muestran diferencias significativas en su crecimiento, el cual además es igual a la cepa silvestre, y las variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-09 (P <0.05) (Figura 4.22). En cuanto a la cantidad de gas generado por hora, todas las cepas mostraron una mayor producción cerca de las dos horas de cultivo, manteniéndose una limitada producción desde ese punto (aproximadamente 1 mL h⁻¹). La variante MJ-14 mostró una mayor producción de gas a las dos horas (8.97 mL h⁻¹, P <0.05) en comparación a las variantes MJ-02b (*hyd-3*⁻) (6.97 mL h⁻¹), MJ-12 (*hyd-3*⁻ *ldhA*⁻) (6.93 mL h⁻¹) y MJ-11 (*hyd-3*⁻ *dld*⁻) (6.86 mL h⁻¹), las cuales no tuvieron diferencias significativas entre ellas.

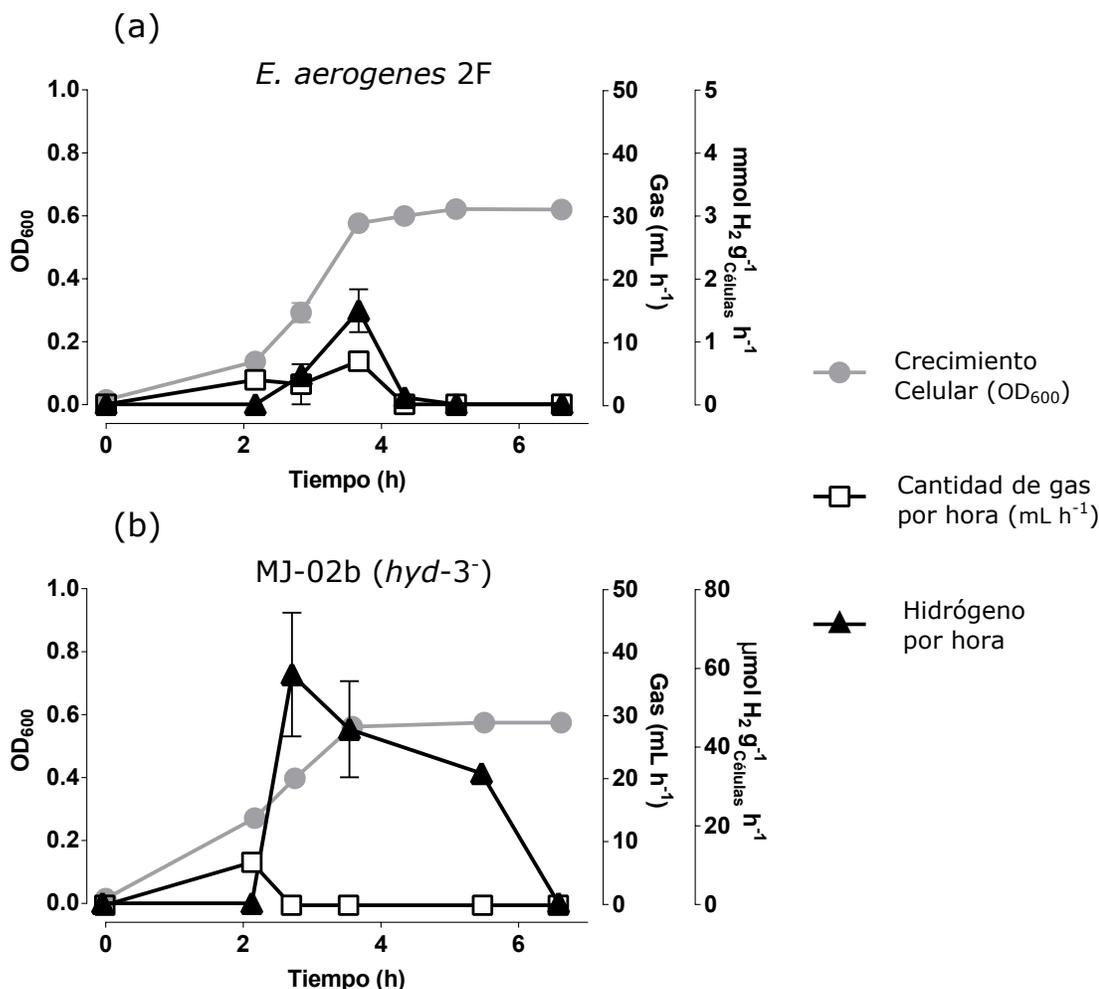


Figura 4.23: Efecto de la eliminación de Hyd-3 en la producción de bioH₂ en medio LB. Se muestra la gráfica de la fermentación realizada en medio LB. La concentración de bioH₂ se encuentra expresado en mmoles de H₂ por gramo de peso seco de bacterias ($\text{g}^{-1}_{\text{Células}}$) por hora.

La producción de bioH₂ de estas cepas se comienza a detectar en la fase logarítmica con un rendimiento mucho menor que la cepa silvestre, y las variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-09 (Figura 4.22). En este caso se producen bioH₂ en el orden de los μmoles de H₂ $\text{g}^{-1}_{\text{Células}}$ h^{-1} . En el punto de mayor producción (fase logarítmica), las variantes MJ-02b, MJ-11 y MJ-14 presentan valores similares en la cantidad de bioH₂ por hora (Figura 4.22 (a), (c) y (d), respectivamente), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$). En el caso de la variante MJ-12 (Figura 4.24 (b)) esta presenta una menor producción de bioH₂ en fase logarítmica ($P < 0.05$),

en cambio esta variante tiene un punto de mayor producción en estado estacionario cerca de las 6 horas de cultivo. Esta producción en estado estacionario no presenta diferencias con la producción de la variante MJ-02b a las mismas 6 horas de cultivo ($P < 0.05$) (Figura 4.24 y Tabla 4.9).

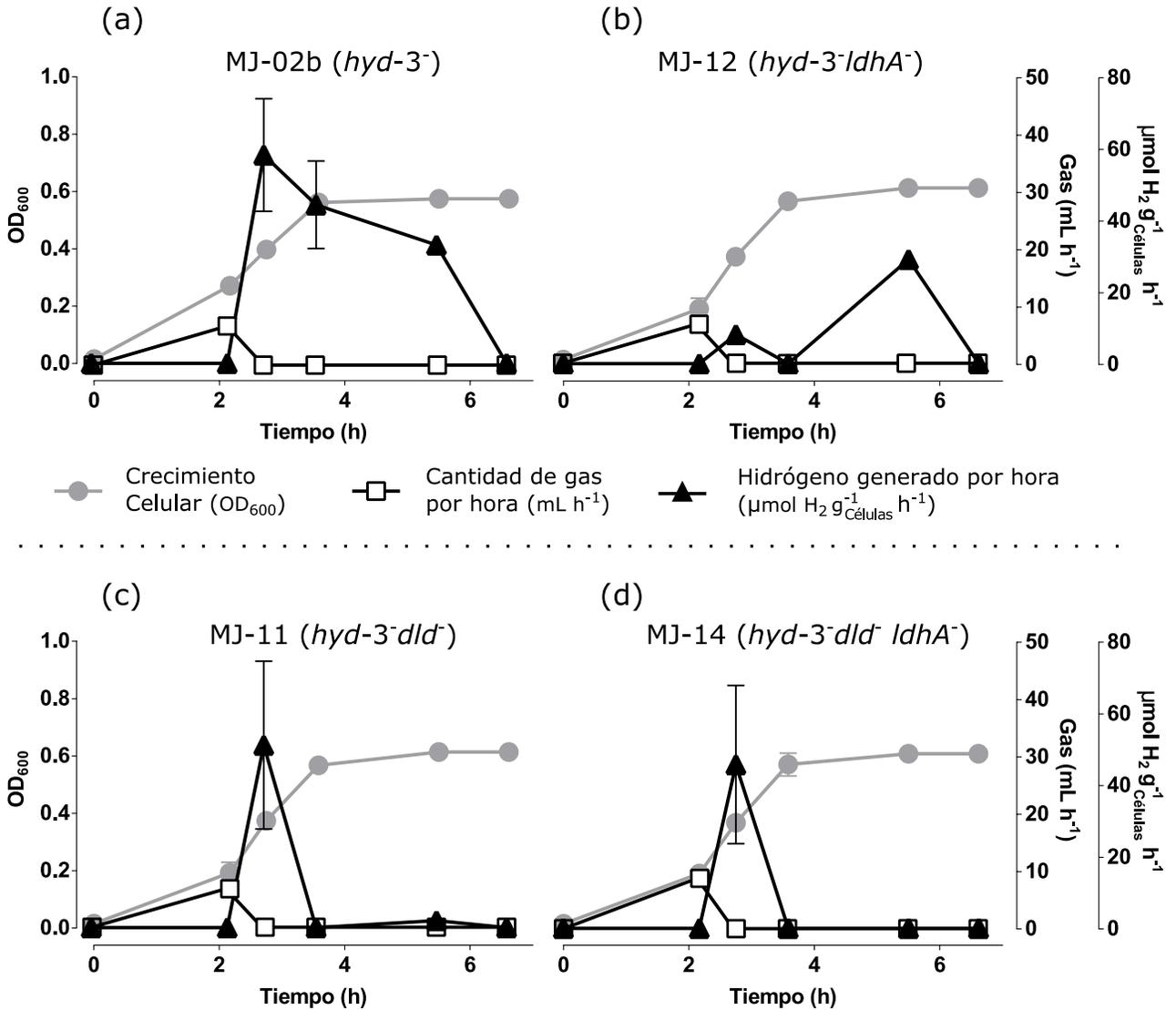


Figura 4.24: Efecto de la hidrogenasa Hyd-3 independiente en la producción de bioH₂ en medio LB. Se muestra la gráfica de la fermentación realizada en medio LB. Los círculos grises muestran densidad óptica del cultivo, los cuadrados blancos es el gas generado por hora y los triángulos negros muestran la cantidad de bioH₂ generado por hora. La concentración de bioH₂ se encuentra expresado en mmoles de H₂ por gramo de peso seco de bacterias (g⁻¹ Células) por hora.

Estos resultados sugieren la presencia de una hidrogenasa Hyd-3 independiente que es capaz de producir bioH₂ en las condiciones estudiadas. En relación al efecto que tiene la eliminación de los genes *ldhA* y *dld* en la producción de bioH₂, se desprende que ambos genes afectan la producción de forma negativa. En el caso de la eliminación de *dld* (variantes MJ-11 y MJ-14) la producción de bioH₂ es afectada durante las etapas logarítmica tardía y estacionaria. En cambio, la eliminación de *ldhA* (variante MJ-12) afecta negativamente la producción en la etapa logarítmica y logarítmica tardía.

Tabla 4.9: Producción de bioH₂ por la hidrogenasa Hyd-3 independiente en medio LB fondo genético *hyd-3*⁻. Estos valores fueron utilizados para la generación de los gráficos de la [Figura 4.22](#). Representación gráfica de esta tabla en la [Figura Anexa B.4](#).

Cepa	Fase de crecimiento		
	Logarítmica	Logarítmica tardía	Estacionaria
MJ-02b (<i>hyc-3</i> ⁻)	58.11 ± 15.71	44.23 ± 12.22	33.04 ± 0.00
MJ-12 (<i>hyc-3</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	8.16 ± 0.00	0.00 ± 0.00	28.89 ± 0.36
MJ-11 (<i>hyc-3</i> ⁻ <i>dld</i> ⁻)	50.99 ± 16.57	0.00 ± 0.00	1,99 ± 0,39
MJ-14 (<i>hyc-3</i> ⁻ <i>dld</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	45.71 ± 22,09	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Las unidades corresponden a $\mu\text{mol H}_2 \text{ g}_{\text{Células}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. n=3

4.4.1.3 Efecto de las mutaciones en el metabolismo central de *E. aerogenes* en medio rico LB

Cuando las células se encuentran en condiciones anaeróbicas y privadas de un aceptor de electrones exógeno, comienzan a producir la oxidación parcial de las fuentes de carbono presentes en el medio. El fenómeno anterior se denomina fermentación, y como resultado las células liberan diferentes productos al medio resultando en una mezcla de ácidos como lactato, acetato, formato, etanol, succinato, entre otros [100]. Cuando los niveles de formato extracelular alcanzan un nivel crítico y el pH disminuye, el formato es transportado de vuelta al citoplasma celular donde el complejo unido a la membrana (**F**ormato **H**idrógeno **L**iasa - FHL), es capaz de desprotonar este formato para producir CO₂ y H₂ [101].

Al analizar el efecto que tienen las mutaciones estudiadas en el pH de la muestra (Figura 4.25), se puede observar por un lado que las cepas utilizadas para el estudio del efecto en la producción global de bioH₂ (cepa parental, MJ-04b, MJ-06b y MJ-09) no presentan grandes variaciones de pH en el transcurso de la fermentación, manteniéndose en el orden de un pH 6.7. En cambio las cepas utilizadas para el estudio de la hidrogenasa Hyd-3 independiente (cepas MJ-02b, MJ-11, MJ-12 y MJ-14) presentan una disminución paulatina en el pH hasta llegar a un pH 6.2. Estos resultados se pueden explicar debido a la internalización del formato y su consiguiente oxidación. Esto genera productos finales volátiles que permiten una continua oxidación de formato, ayudando finalmente a controlar el pH. Este efecto que se ve en las cepas que poseen el complejo FHL unido a la membrana (cepa parental, MJ-04b, MJ-06b y MJ-09).

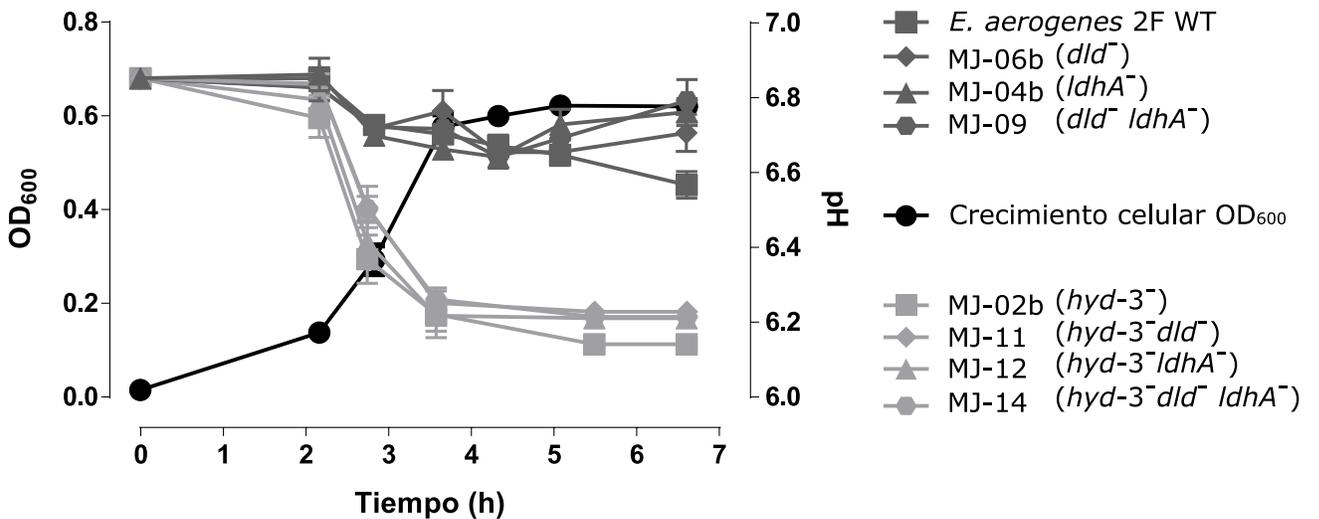


Figura 4.25: Efecto de las mutaciones en la variación de pH en medio LB. Durante el tiempo de fermentación se tomó muestras líquidas para medir la densidad óptica del cultivo (círculos grises) y determinar el pH (figuras grises oscuras y claras). Debido a que no existen diferencias significativas en el crecimiento entre las cepas, se graficó sólo una representativa. Las cepas utilizadas para estudiar el efecto en la producción global de bioH₂ se muestran en gris oscuro y se encuentran en la parte superior del gráfico. Por otro lado, las cepas con el fondo genético *hyd-3*⁻, para estudiar el efecto de la hidrogenasa Hyd-3 independiente en la producción de bioH₂, se muestran en gris claro y se encuentran en la parte inferior del gráfico. n=3.

Por otro lado, se analizó la concentración de metabolitos cuya formación ocurre en procesos fermentativos como etanol, formato, acetato, lactato y succinato. La concentración de estos se analizó en los puntos cercanos a la mayor producción de bioH₂ (Figura 4.26 y Figura 4.27). Para esto se tomaron muestras líquidas de los cultivos y se analizaron a través de HPLC de acuerdo a lo expuesto en [Materiales y Métodos Sección 3.3.15](#). En las [Figura 4.26](#) y [Figura 4.27](#) se muestran las curvas de crecimiento y la producción de bioH₂ mostrados con anterioridad para exponer el comportamiento que presentan los metabolitos analizados. Se puede observar que el *peak* en la generación de bioH₂ se ve acompañada de una disminución en la cantidad de formato en las variantes que poseen intacta la vía de utilización de formato para producir bioH₂ (cepa parental y variantes MJ-04b, MJ-06b, MJ-09 - [Figura 4.26](#) círculos verdes). Además se observa que el metabolito con mayor presencia es el acetato, siendo esta producción mayor en las cepas, MJ-4b (*ldhA*⁻), MJ-6b (*dld*⁻) y MJ-09 (*dld*⁻ *ldhA*⁻) ($P < 0.05$) ([Figura 4.26](#) (b), (c) y (d) respectivamente) logrando un máximo en estado estacionario. Además, las cepas carentes del gen *ldhA* (MJ-4b y MJ-09) presentan una pequeña producción de lactato siendo significativamente menor a las cepas parental y MJ-6b (*dld*⁻) ($P < 0.05$) ([Figura 4.26](#) y [Tabla 4.10](#)). Por otro lado, también se observa la producción de etanol, el cual es otro de los mayores productos metabólicos secundarios en las fermentaciones.

Al analizar los metabolitos en las cepas con el fondo genético carente de la hidrogenasa-3 ([Figura 4.27](#)), se puede ver que la pequeña producción de bioH₂ que se observa en estas variantes no se ve acompañada de una disminución en la cantidad de formato. Por otro lado, en estas cepas se produce una mayor producción de acetato en comparación a sus cepas parentales ([Figura 4.26](#)). Esta producción de acetato aumenta en fase logarítmica logrando un máximo al comienzo del estado estacionario, punto en el cual experimenta una disminución en su concentración. Al comienzo del estado estacionario, además de existir una disminución en la cantidad de acetato, ocurre una disminución en la concentración de formato y succinato, dando lugar a un aumento significativo en la cantidad de etanol (cuadrados naranjos). El aumento en la concentración de etanol se ve incrementado en las cepas MJ-12, MJ-11 y MJ-14, obteniendo concentraciones de ~12, ~25 y ~12 mM de etanol ([Figura 4.27](#) (b), (c) y (d) respectivamente).

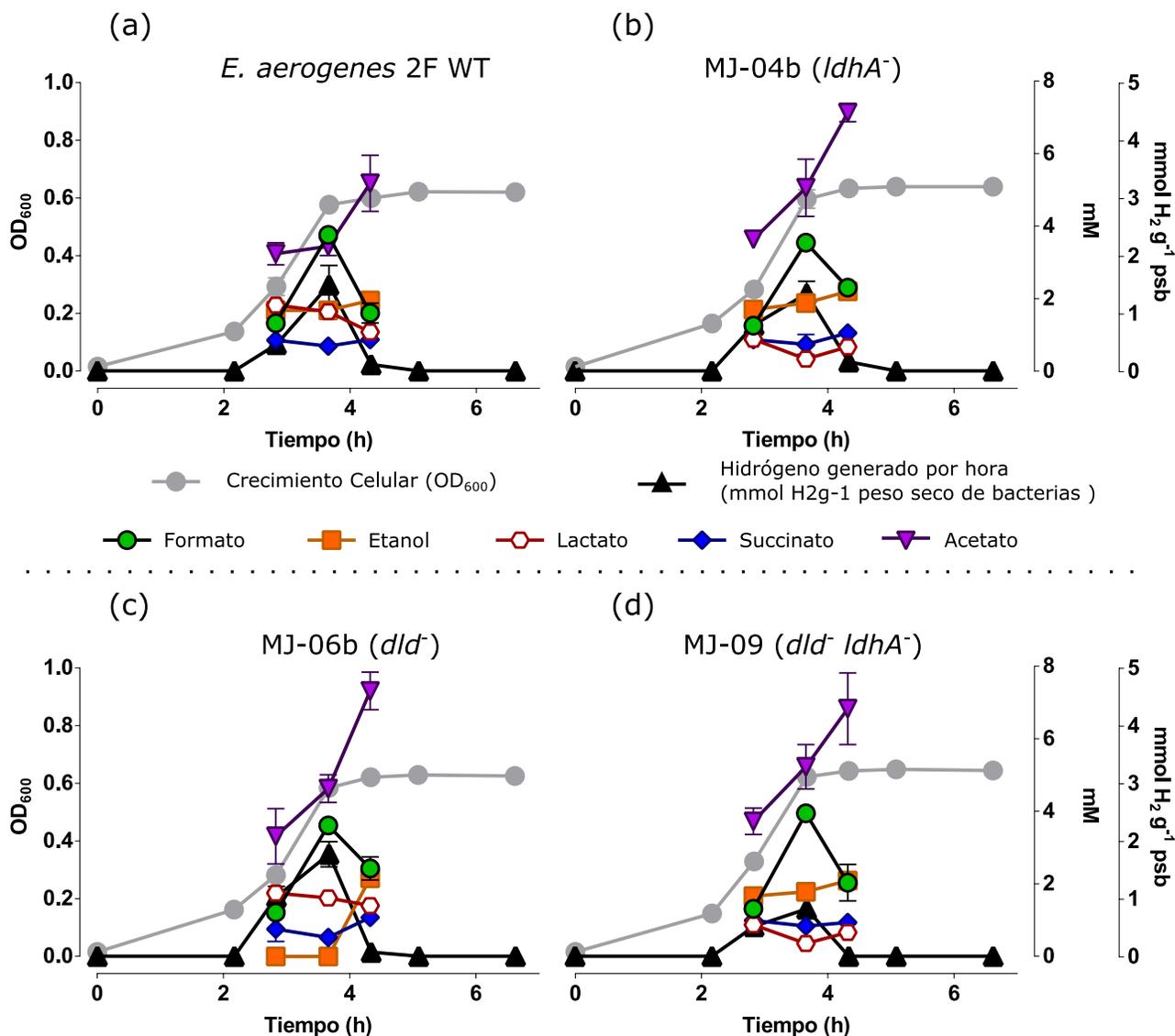


Figura 4.26: Productos metabólicos de la fermentación en medio LB con las cepas para el estudio de la producción global de bioH₂. Durante la fermentación se tomaron muestras líquidas las que fueron analizadas a través de HPLC. Las muestras corresponden a los productos metabólicos en las cercanías del punto con mayor producción de bioH₂. Tanto la curva de crecimiento como la producción de bioH₂ son las mismas de la Figuras 4.22 y fueron agregadas sólo como referencia. En la parte central de la figura se encuentra la notación para cada uno de los metabolitos cuya concentración se encuentra expresada en mM de metabolito. n=3.

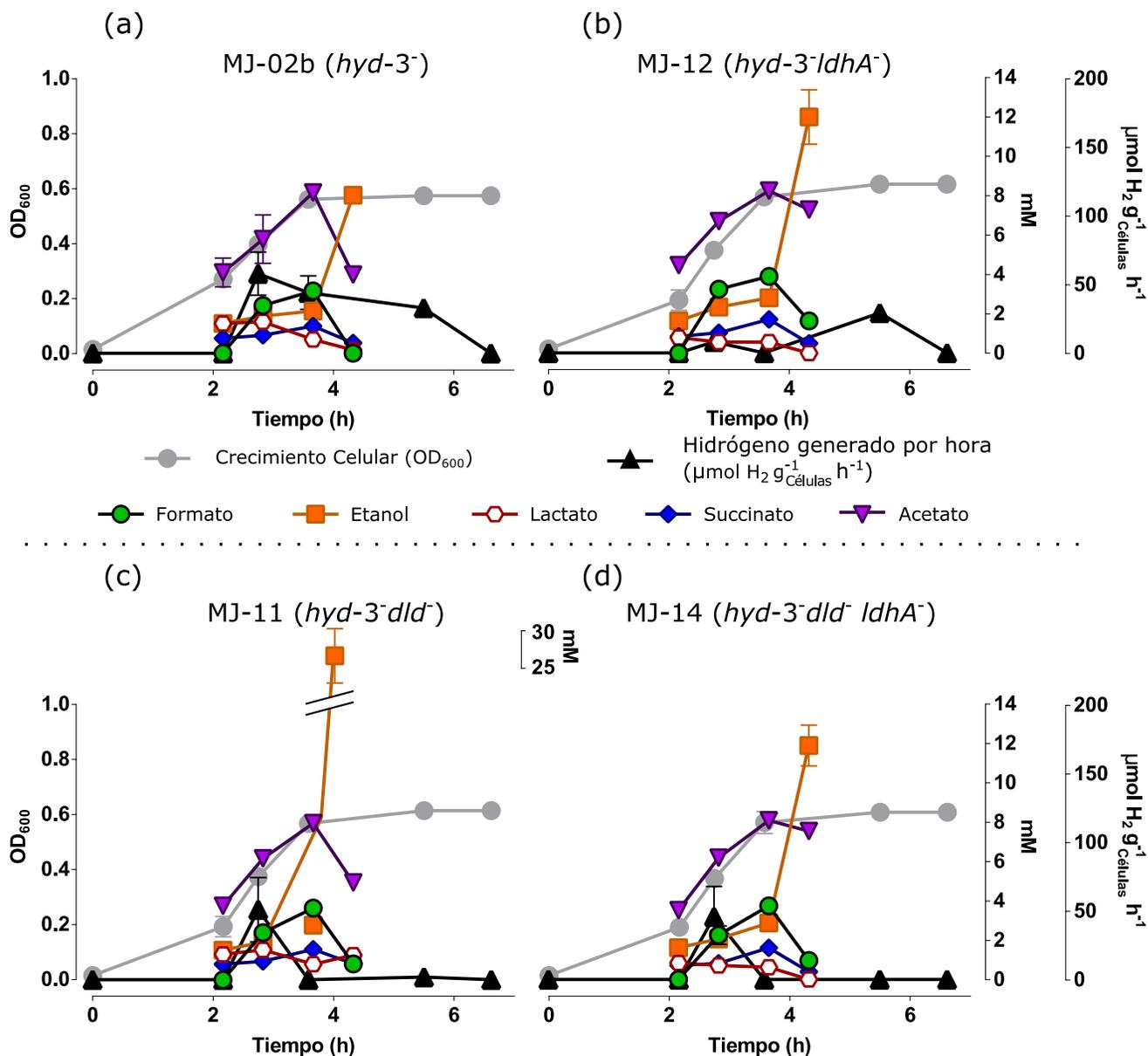


Figura 4.27: Productos metabólicos de la fermentación en medio LB con las cepas con fondo genético *hyd-3*⁻. Durante la fermentación se tomaron muestras líquidas las que fueron analizadas a través de HPLC (*high-performance liquid chromatography*). Las muestras analizadas corresponden a los productos metabólicos en las cercanías del punto con mayor producción de bioH₂. Tanto la curva de crecimiento como la producción de bioH₂ son las mismas de la Figuras 4.24 y fueron agregadas como referencia. En la parte central de la figura se encuentra la notación para cada uno de los metabolitos cuya concentración se encuentra expresada en mM de metabolito. n=3.

En la [Tabla 4.10](#) se muestran los mayores valores encontrados para los metabolitos analizados. Para el caso de succinato, las cepas con el fondo genético *hyd-3*⁻ no poseen diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($P < 0.05$), presentando además mayores concentraciones que sus cepas parentales (*E. aerogenes* 2F, MJ-04b, MJ-06b y MJ-09). Para el caso de lactato, la cepa parental y las variantes MJ-06b y MJ-02b muestran las mayores concentraciones, presentando alrededor de 5 veces más que las mutantes *ldhA* (MJ-04b y MJ-09). En el caso de las variantes con el fondo genético *hyd-3*⁻, la mutante MJ-02b es la que presenta las mayores concentraciones de lactato, siendo estos parecidos a la cepa parental. Junto con lo anterior se puede observar que los valores de lactato de la variante MJ-11 (*hyd-3*⁻ *dld*⁻) es menor que las variantes que tienen sus mutaciones simples por separado (MJ-06b y MJ-02b,) por lo que en MJ-11 el flujo metabólico fue dirigido a otro metabolito, generando en este caso una mayor producción de etanol. En el caso de formato, las variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-09 no presentan diferencias con la cepa parental. Por otro lado, la variante MJ-09 posee una concentración mayor que las variantes MJ-04b y MJ-06b (que son las variantes que poseen las mutaciones de la mutante MJ-09 por separado) ($P < 0.05$).

Por otro lado, las mutantes con el fondo genético *hyd-3*⁻ (MJ-12, MJ-11 y MJ-14) poseen mayor concentración de formato que la variante MJ-02b, y entre ellas la mutante MJ-12 (*hyc-3*⁻ *ldhA*⁻) posee la mayor concentración ($P < 0.05$). En el caso de acetato, todas las variantes generadas poseen valores mayores que la cepa parental, y las con mayores valores corresponden a las variantes con fondo genético *hyd-3*⁻ sin presentar diferencias significativas entre ellas ($P < 0.05$). Al analizar la concentración de etanol, las mutantes con el fondo genético *hyd-3*⁻ son las que poseen los mayores valores y entre estas es la variante MJ-11 la que posee la mayor producción de etanol, siendo esta 15.5 veces más que la cepa parental y más del doble que las siguientes variantes con mayor producción de (MJ-12 y MJ-14).

Los dos productos metabólicos con mayor presencia corresponden a acetato y etanol, ambos generados a partir de piruvato y acetyl-CoA, los cuales se ven fuertemente favorecidos al eliminar las vías principales que utilizan piruvato como base. Estas corresponden a las vías para el metabolismo del lactato (genes *ldhA* y *dld*) y la vía de utilización del formato (*hyd-3*). La eliminación de estos genes produce el aumento en los niveles de piruvato, formato y acetyl-CoA los cuales finalmente son utilizados para la producción de acetato y etanol. Es por lo anterior que las vías metabólicas involucradas en la generación de acetato y etanol son los principales blancos de mutaciones para aumentar la producción de metabolitos o proteínas de interés biotecnológico

Tabla 4.10: Comparación en la producción de metabolitos secundarios en la fermentación en medio LB.

Cepas (Genotipo)	Productos finales (mM)				
	Succinato	Lactato	Formato	Acetato	Etanol
<i>E. aerogenes</i> 2F	0.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1	4.4 ± 0.7	1.7 ± 0.1
MJ-04b (<i>ldhA</i> ⁻)	0.9 ± 0.0	0.3 ± 0.1	3.0 ± 0.2	6.0 ± 0.2	1.9 ± 0.1
MJ-06b (<i>dld</i> ⁻)	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1	6.2 ± 0.4	1.8 ± 0.0
MJ-09 (<i>dld</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	5.8 ± 0.8	1.2 ± 0.2
MJ-02b (<i>hyd-3</i> ⁻)	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1	3.2 ± 0.0	8.2 ± 0.3	8.1 ± 0.0
MJ-12 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	1.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	3.9 ± 0.0	8.3 ± 0.1	12.0 ± 1.9
MJ-11 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>dld</i> ⁻)	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	7.9 ± 0.1	25.6 ± 1.7
MJ-14 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>dld</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	1.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	3.8 ± 0.1	8.1 ± 0.1	11.9 ± 1.0

[102].

4.4.2 Producción de bioH₂ en medio definido con glucosa.

Como segunda aproximación del efecto sobre la producción de bioH₂ que tienen las mutaciones que fueron generadas en *E. aerogenes*, se utilizó glucosa como sustrato debido a su amplio uso como modelo en la comparación de resultados. Para esto se realizaron fermentaciones de acuerdo a lo planteado en los Materiales y Métodos (Sección 3.2.2) y lo visto anteriormente. Durante el tiempo de fermentación, los cultivos fueron monitoreados para la determinación de densidad celular y pH. El gas generado fue colectado y medido a través del desplazamiento de una columna con agua. La composición del gas se caracterizó en un cromatógrafo de gases de acuerdo a lo planteado en [Materiales y Métodos 3.3.16](#).

4.4.2.1 Producción global de bioH₂ con glucosa.

Lo primero que se analizó fue el efecto en la producción general de bioH₂ en la cepa parental y las variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-09 ([Figura 4.28](#)). Los cultivos fueron iniciados con células frescas en estado logarítmico crecidas con glucosa como fuente de carbono, estas fueron agregadas a viales que contenían 75 mL de medio mínimo R suplementado con glucosa como única fuente de carbono hasta OD₆₀₀ de 0.015 unidades. Se creó un ambiente anaerobio purgando con nitrógeno

y se incubó a 37 °C con agitación constante durante 16 horas.

Las cuatro cepas analizadas en la [Figura 4.28](#) mostraron tasas de crecimiento similares ([Tabla 4.11](#), $P < 0.05$), alcanzando densidades celulares sin diferencias significativas en estado estacionario ($P < 0.05$), por lo que las mutación simples en los genes *ldhA* ([Figura 4.28 \(b\)](#)) y *dld* ([Figura 4.28 \(c\)](#)), así como la doble mutante ([Figura 4.28 \(d\)](#)) no tienen efecto sobre el crecimiento celular en las condiciones estudiadas. En esta figura, además, se puede observar que el gas generado por hora, comienza a ser detectado en fase logarítmica, llegando a un máximo en la fase logarítmica tardía de crecimiento, punto donde empieza a disminuir paulatinamente. Las diferencias en la producción de gas por hora en cada cepa no difieren en gran medida, sin embargo estas pequeñas diferencias en la producción se ven reflejadas en la acumulación total de gas ([Figura 4.29 \(a\)](#)). Al final de la fermentación, la variante MJ-09 (*dld*⁻ *ldhA*⁻) es la que genera más gas ([Figura 4.29](#)) esta diferencia fue estadísticamente significativa si se le compara con las otras tres cepas ($p < 0.05$). Las producciones finales de gas fueron, 163.5, 171.0, 162.7 y 183 mL para la cepa parental *E. aerogenes* 2F, las variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-09, respectivamente.

Para caracterizar el gas generado se tomó 1 mL de gas de forma constante durante la fermentación con una jeringa al vacío desde la parte superior de los viales y se inyectó en un cromatógrafo de gases ([Materiales y Métodos Sección 3.3.16](#)). En cuanto a la producción de bioH₂ ([Figura 4.28](#)), se observa el mismo comportamiento registrado para el medio LB, en donde el bioH₂ se comienza a detectar desde la fase logarítmica. En este punto se puede diferenciar que la mayor producción de bioH₂ se encuentra en diferentes etapas de crecimiento dependiendo de la cepa. Las cepa parental *E. aerogenes* 2F y la variante MJ-06b producen de forma paulatina y creciente, llegando al máximo de producción cerca del final de la fase logarítmica o principio de la fase estacionaria (cerca las 12 horas de cultivo, [Figura 4.28 \(a\), \(c\)](#)), en cambio para las mutantes que carecen del gen para la lactato deshidrogenasa (*ldhA*⁻), variantes MJ-04b y MJ-09, la mayor producción de bioH₂ ocurre en fase logarítmica, presentando en este punto un aumento repentino en la producción (cerca de las 9 horas de cultivo, [Figura 4.28 \(b\), \(d\)](#)). Esta formación de bioH₂ disminuye paulatinamente hasta llegar a estado estacionario punto en el cual las células dejan de producir bioH₂. Junto con lo anterior, se determinó la cantidad de bioH₂ total producido por cepa ([Figura 4.29 \(b\)](#)). De las cepas analizadas, las que mayor cantidad de bioH₂ producen corresponden a aquellas variantes que no poseen el gen de la lactato deshidrogenasa (MJ-04b y MJ-09), estas además de tener la mayor acumulación de bioH₂ también poseen la mayor producción por

hora normalizado por el peso seco de bacterias (Figura 4.28).

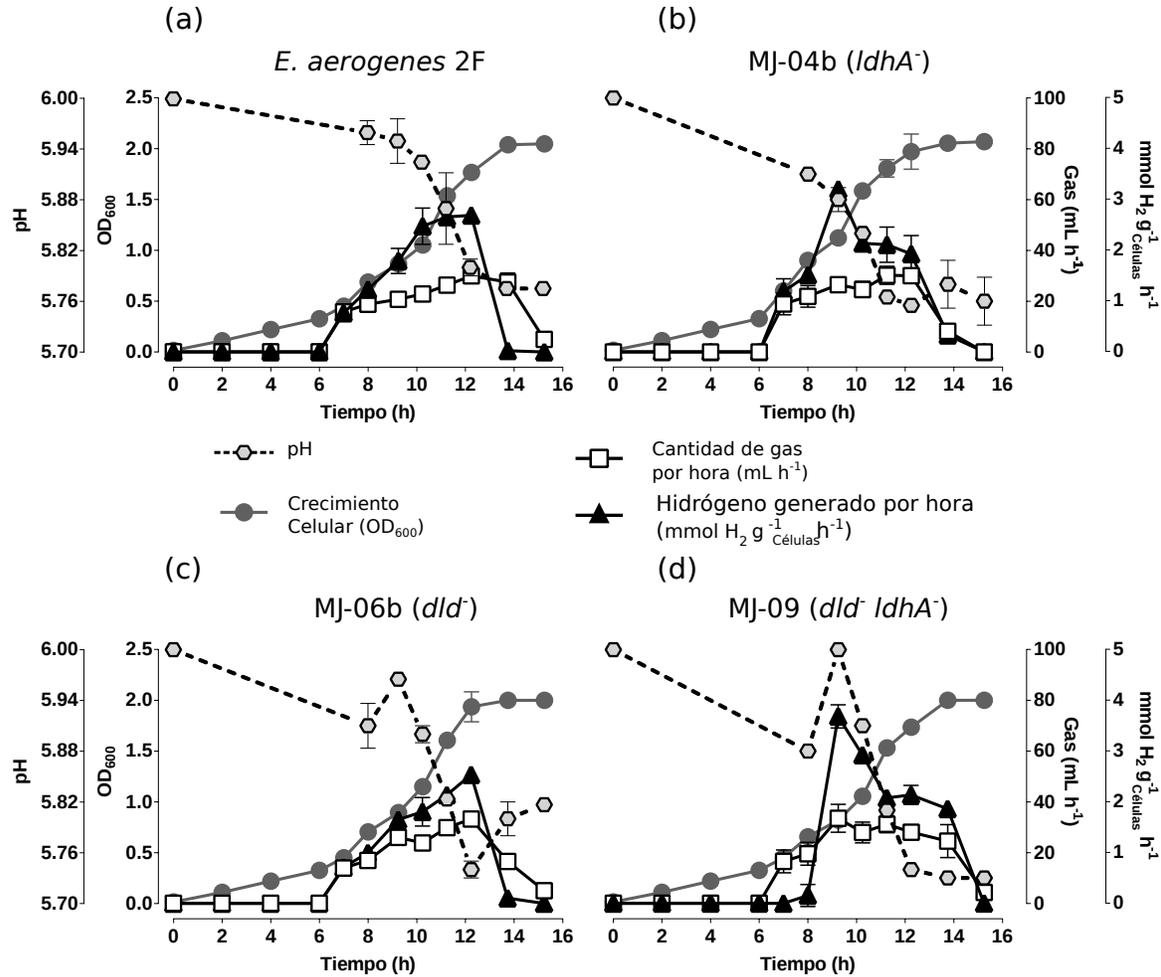


Figura 4.28: Producción global de bioH₂ en medio definido con glucosa. Se muestra la gráfica de la fermentación realizada en medio R suplementado con glucosa. Durante el tiempo de fermentación se tomaron muestras líquidas para medir la densidad óptica del cultivo (círculos grises), el pH del medio (hexágonos grises), se midió el gas generado por hora (cuadrados blancos) y se caracterizó el gas que se producía en un cromatógrafo de gases para determinar la cantidad de bioH₂ que se producía (Sección 3.3.16). La concentración de bioH₂ se encuentra expresado en mmoles de H₂ por gramo de peso seco de bacterias (g⁻¹ Células) por hora (triángulos negros). n=3.

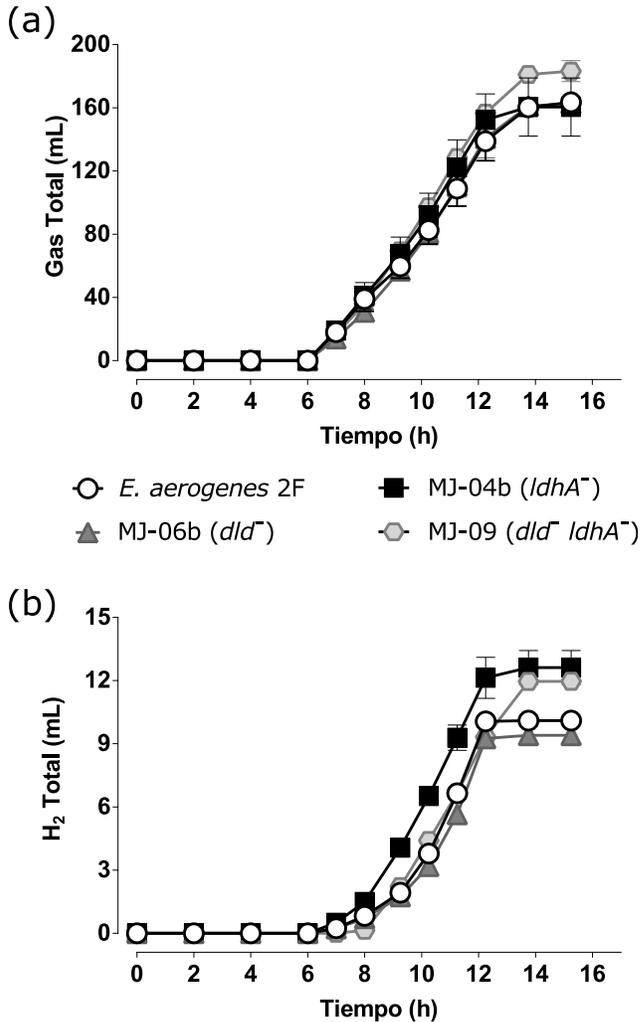


Figura 4.29: Acumulación de gases en medio definido con glucosa por las diferentes mutantes utilizadas en el estudio del efecto global en la producción de bioH₂. En (a) se muestra la gráfica de la acumulación total de gas generado durante la fermentación. Este gas sin caracterizar fue medido continuamente por el desplazamiento de una columna graduada con agua. Se caracterizó la composición de 1 mL del gas formado en cada tiempo y se determinó la abundancia de bioH₂. En (b) se muestra la cantidad de bioH₂ que generaron las 4 cepas estudiadas. El significado de los símbolos se encuentra de forma gráfica en el centro de la figura. n=3.

Por otro lado, en la [Figura 4.28](#) también se puede observar los valores de pH durante la fermentación, el cual fue constantemente evaluado. En estas gráficas tanto la cepa parental *E. aerogenes* 2F como la variante MJ-04b (*ldhA*⁻) muestran un patrón de disminución leve y constante, partiendo desde unidades de pH de 6.0 hasta valores cercanos a los 5.7 unidades. Las variantes MJ-06b (*dld*⁻) y MJ-09 (*dld*⁻ *ldhA*⁻) presentan una conducta un poco diferente en el pH, estas en fase logarítmica disminuyen y luego aumentan para luego comenzar a disminuir nuevamente. Si bien la diferencia entre los valores de este descenso e incremento es pequeño (0.12 unidades) los análisis estadísticos muestran significancia. Otra particularidad es que la variante MJ-06b después de las 12 horas de cultivo comienza a aumentar nuevamente su pH haciéndolo levemente más básico. En todas las cepas se observa que la estabilización del pH parece estar asociado a la generación de bioH₂, al igual que lo observado en medio LB.

4.4.2.2 Producción de bioH₂ por parte de la hidrogenasa Hyd-3 independiente en medio definido con glucosa

Al igual que lo realizado en medio rico LB para el estudio de la producción de bioH₂ por parte de la hidrogenasa Hyd-3 independiente se utilizaron las cepas que carecen de la hidrogenasa-3 como fondo genético (encargada de la producción de bioH₂ por la vía del formato) (Figura 4.30). Lo primero que se puede observar es que en medio mínimo R suplementado con glucosa, la cepa MJ-02b (*hyd-3*⁻) logra alcanzar biomasa menor que las demás cepas, en cuanto a las velocidades de crecimiento, la cepa MJ-02b (*hyc-3*⁻) alcanza 3.35 ([1 min⁻¹] · 10⁻³) valor estadísticamente menor que las demás cepas estudiadas (6.05, 4.92, 6.36, para las cepas MJ-12, MJ-11 y MJ-14 respectivamente) entre estas últimas no existen diferencias significativas (P < 0.05).

Al comparar las cepas con el fondo genético *hyd-3*⁻ con las utilizadas para el estudio de la producción global de bioH₂ se puede observar que todas estas cepas tienen diferencias significativas con MJ-02b (*hyc-3*⁻) y además la cepa MJ-06b (*dld*⁻) tiene una velocidad de crecimiento estadísticamente mayor que la cepa MJ-11 (*hyc-3*⁻ *dld*⁻) aunque alcanzan biomasa similares. Estos resultados sugieren que la eliminación del complejo proteico que codifica para la hidrogenasa-3 deriva en problemas de crecimiento en medio mínimo R suplementado con glucosa, además la posterior eliminación del gen *ldhA* restituye las facultades de crecimiento parental mejor que la eliminación del gen *dld* posiblemente por permitir un aumento en la cantidad de piruvato el que será ocupado para otros productos metabólicos que permiten obtener mayor energía que es ocupada para la producción de biomasa, posiblemente etanol o acetato.

En relación a la abundancia de gas, se detectó muy pequeñas cantidades debido a que las bacterias generaban lo suficiente para ser medido en el cromatógrafo de gases. Sólo al comienzo de la fermentación se acumula una pequeña cantidad de gas, donde la composición es únicamente CO₂ (datos no mostrados). A partir de la fase logarítmica se obtuvo un mililitro de gas en cada una de las mediciones siguientes, los cuales fueron utilizados para ser inyectados al cromatógrafo de gases y conocer su composición. En relación a la cantidad de bioH₂, este se produjo en el orden de los μmol al comienzo de la fase logarítmica para todas las cepas en estudio, y sólo se logró detectar en dos de los tiempos iniciales. La mayor producción se logró con la cepa MJ-12 (*hyd-3*⁻ *ldhA*⁻) con 39.83 μmol de bioH₂ por gramo de peso seco de bacterias cerca, de las 8 horas de cultivo (Figura 4.30). En relación a las demás cepas estudiadas, estas generaron 35.80,

34.96 y 32.11 μmol de bioH₂ por gramo de peso seco de bacterias (MJ-02, MJ-11 y MJ-14 respectivamente) (Tabla 4.11). Si bien se puede observar un pequeño aumento en la producción de bioH₂, ninguna de las cepas mostraron diferencias estadísticamente significativas.

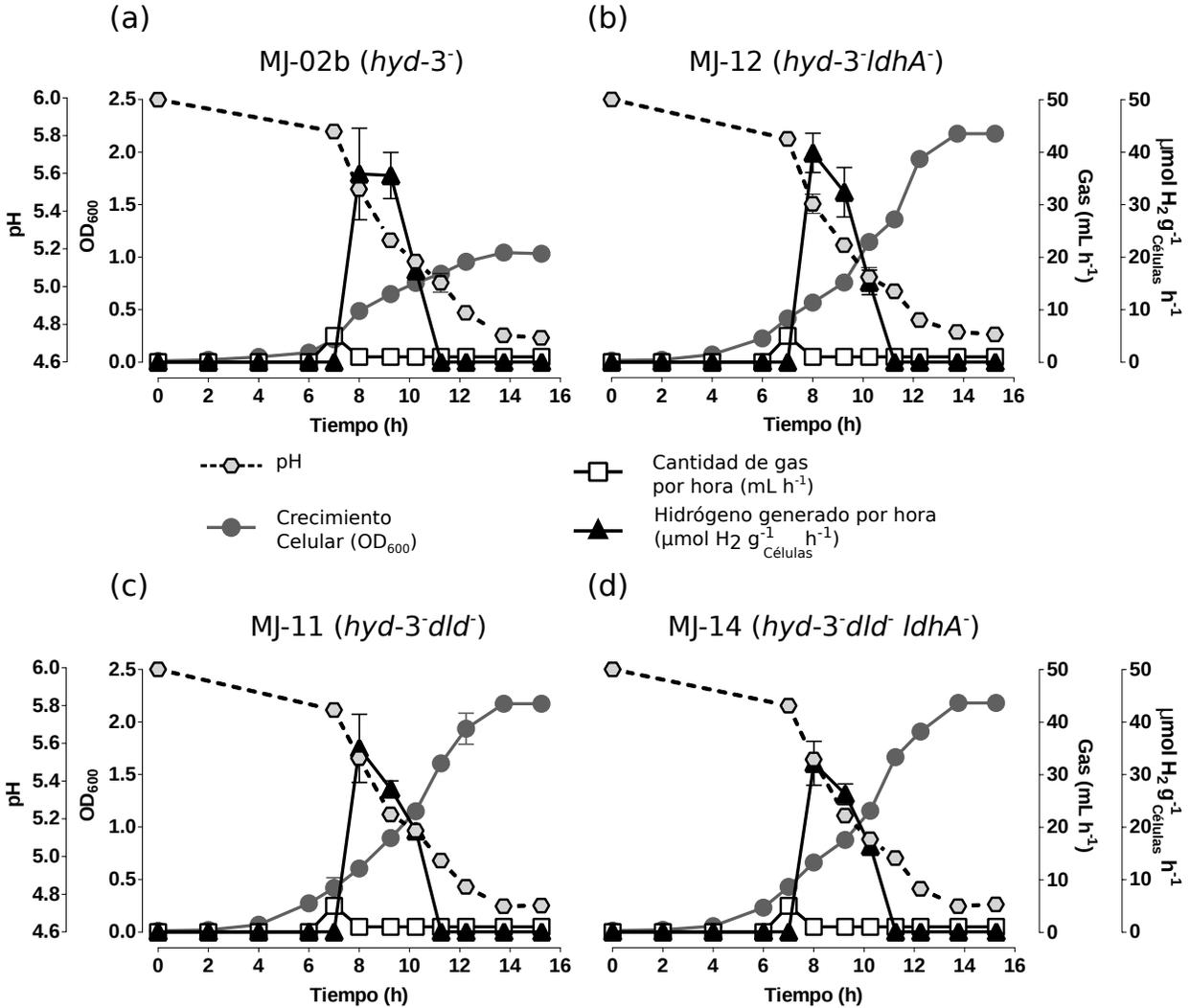


Figura 4.30: Producción de bioH₂ debido a la hidrogenasa Hyd-3 independiente en medio definido con glucosa. Se muestra la gráfica de la fermentación realizada en medio R suplementado con glucosa. Durante el tiempo de fermentación se tomaron muestras líquidas para medir la densidad óptica del cultivo (círculos grises), el pH del medio (hexágonos grises), se midió el gas generado por hora (cuadrados blancos) y se caracterizó el gas que se producía en un cromatógrafo de gases para determinar la cantidad de bioH₂ que se producía (Sección 3.3.16). La concentración de bioH₂ se encuentra expresado en mmoles de H₂ por gramo de peso seco de bacterias ($\text{g}^{-1} \text{ Células}$) por hora (triángulos negros).

En esta figura también se muestra la variación del pH (Figura 4.30). Con respecto a estos resultados, se observa una disminución constante en el pH y esta reducción es mayor que las observadas en la producción global Figura 4.28 llegando a valores de pH del orden de 4.7 unidades.

Como se mencionó anteriormente en la Sección 4.4.1.3, cuando el pH disminuye, el formato extracelular en enviado de vuelta al citoplasma para ser desprotonado y convertido a CO₂ y H₂ por el complejo Formato Hidrógeno Liasa (FHL) lo que ayuda a mantener el pH [101], que es lo que se observa en la Figura 4.28. Debido a la falta de la hidrogenasa-3 (hyd-3) en las cepas de la Figura 4.30 (complejo con actividad hidrogenasa presente en FHL), estas cepas no son capaces de transformar el formato a H₂ por lo que se sigue acumulando disminuyendo así el pH de las fermentaciones.

Por otro lado, dentro del desarrollo de bioprocesos, el escalamiento es uno de los pasos más importantes. Para este punto, es necesario tener conocimiento previo de las condiciones y parámetros de optimización, los cuales generalmente se llevan a cabo en sistemas *batch* no controlados [103]. Teniendo como premisa lo anterior, para optimizar la producción bioH₂ es necesario conocer en qué punto se puede obtener la mayor producción. De los experimentos realizados se desprende que en el punto de mayor producción se obtiene 2.66, 3.21, 2.54 y 3.69 (mmol H₂ g⁻¹ Células), para la cepa parental *E. aerogenes* 2F, y las variantes MJ-04b; MJ-06b y MJ-09 respectivamente (Tabla 4.11). Es decir, las cepas carentes del gen *ldhA*⁻ son las que poseen la mayor producción de bioH₂ y entre estas la doble mutante (MJ-09 *dld*⁻ *ldhA*⁻) es la mayor productora (P < 0.05).

Otra forma de optimizar la producción de bioH₂ es determinando el punto de mayor rendimiento, es decir la cantidad de moles de bioH₂ que se forman por la cantidad de moles de sustrato consumido. El rendimiento teórico calculado en anaerobiosis para la formación de bioH₂ por la vía del formato es de 2 mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa}, y el rendimiento para la vía del NADH es de 4 mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa}. Hasta ahora el mayor rendimiento obtenido para *E. aerogenes* corresponde a 1.58 mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa} [43]. Existen además otros reportes donde se alcanzan rendimientos de ~ 1.4 mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa} [46]. La clave para obtener mayores rendimientos es que el consumo de glucosa se concentre casi exclusivamente para la producción del metabolito de interés, y no para la generación de otros metabolitos o la formación de biomasa. Para aclarar este punto, los mayores rendimientos reportados en la producción de bioH₂ para *E. aerogenes* se lograron cuando las cepas estaban en estado estacionario, y en algunos casos la producción de bioH₂ comenzaba

en estado estacionario [46, 104], a diferencia de lo observado en los resultados de este trabajo y otras publicaciones [105].

Los resultados de este trabajo demuestran que para la cepas de *E. aerogenes* 2F parental así como para las variantes analizadas, la detección de bioH₂ comienza en fase logarítmica y en la mayoría de los casos tienen un máximo en la fase logarítmica tardía, y por el contrario cuando las células se encuentran en estado estacionario la formación de bioH₂ es indetectable. Junto con lo anterior se observa que los rendimientos logrados en fase logarítmica son menores a los que se obtienen cerca del estado estacionario debido a que en fase logarítmica la mayor cantidad de glucosa se utiliza para la generación de biomasa. Es por esta razón que la mayor producción y el mayor rendimiento ocurren en etapas diferentes durante la fermentación (Tabla 4.11), así por ejemplo para el caso de la cepa parental *E. aerogenes* 2F, el mayor rendimiento es de 0.17 (mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa}) y ocurre cerca de las 12 horas de cultivo (último punto detectable de formación de bioH₂) y su mayor producción ocurre entre las 10 y 12 horas sin diferencias entre ellas (P < 0.05). Para el caso de la variante que carece el gen de la lactato deshidrogenasa (MJ-04b *ldhA*⁻), se obtiene un rendimiento de 0.61 (mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa}) y se alcanza cerca de las 12 horas de cultivo (cuando el crecimiento celular es menor), siendo este rendimiento el mayor logrado en este trabajo. Por otro lado, el punto de mayor producción de bioH₂ ocurre cerca de las 9 horas de cultivo, en fase logarítmica.

La variante MJ-06b (*dld*⁻) es la única que posee ambos parámetros (rendimiento y producción) en la misma etapa de fermentación y crecimiento. Si bien la variante MJ-06b no posee diferencias significativas en la producción de bioH₂ con la cepa parental (2.54 y 2.66, variante MJ-06b y *E. aerogenes* 2F, respectivamente - P < 0.05), al presentar su mayor producción cuando las células están cerca de la fase estacionaria y tener una tasa de crecimiento menor, poseen un rendimiento superior a la cepa parental en un 47.1% (0.17 y 0.25 mol H₂ g⁻¹_{Células} para *E. aerogenes* 2F y MJ-06b, respectivamente).

Al analizar los resultados obtenidos con la variante MJ-09 (*dld*⁻ *ldhA*⁻), podemos ver que esta es la que mayor producción de bioH₂ posee (3.69 mol H₂ g⁻¹_{Células} cerca de las 9 h de cultivo), sin embargo, posee un rendimiento bajo (0.17 mol H₂ mol⁻¹_{Glucosa} a las 13 horas de cultivo) si se le compara con las simples mutantes que la conforman, logrando un valor igual al de la cepa parental (Tabla 4.11).

Al analizar los resultados de las variantes de fondo genético *hyd-3*⁻ (parte inferior de la Tabla

4.11) se puede observar que los rendimientos se encuentran en valores del orden de los μmol de H₂, mil veces menor que sus cepas parentales (analizadas anteriormente) y al igual que lo observado anteriormente, los mayores rendimientos se observan cuando las células alcanzan menores tasas de crecimiento, cerca de la fase estacionaria. Junto a lo anterior y como se mencionó, entre estas variantes no existe diferencia en la producción de bioH₂ por gramo de peso seco de bacterias, pero sí en sus tasas de crecimiento. Los resultados muestran que la variante la MJ-02 (que tiene menor tasa de crecimiento -Figura 4.30 y Tabla 4.11-) posee el mayor rendimiento, debido a que el consumo de sustrato no se concentra en la generación de biomasa, sino posiblemente en la producción de metabolitos para la generación de energía.

Tabla 4.11: Resumen de las tasas de crecimiento, producción y rendimiento de bioH₂ en medio mínimo R suplementado con glucosa para todas las variantes en estudio.

Cepas (Genotipo)	μ Crecimiento ([1 min ⁻¹] · 10 ⁻³)	Producción (mmol H ₂ g ⁻¹ Células)	Rendimiento (mol H ₂ g ⁻¹ Glucosa)
<i>E. aerogenes</i> 2F	7.08 ± 0.55	2.66 ± 0.04 (T11)	0.17 ± 0.00 (T12)
MJ-04b (<i>ldhA</i> ⁻)	6.73 ± 0.96	3.21 ± 0.06 (T9)	0.61 ± 0.11 (T12)
MJ-06b (<i>dld</i> ⁻)	7.45 ± 0.13	2.54 ± 0.00 (T12)	0.25 ± 0.00 (T12)
MJ-09 (<i>dld</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	6.31 ± 0.01	3.69 ± 0.16 (T9)	0.17 ± 0.00 (T13)
		($\mu\text{mol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ Células}$)	(mmol H ₂ g ⁻¹ Glucosa)
MJ-02b (<i>hyd-3</i> ⁻)	3.35 ± 0.49	35.80 ± 8.71 (T8)	0.183 ± 0.011 (T10)
MJ-12 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	6.05 ± 0.25	39.83 ± 3.74 (T8)	0.099 ± 0.012 (T9)
MJ-11 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>dld</i> ⁻)	4.92 ± 0.50	34.96 ± 6.50 (T8)	0.106 ± 0.009 (T9)
MJ-14 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>dld</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	6.36 ± 1.60	32.11 ± 4.18 (T8)	0.093 ± 0.009 (T9)

Como se mencionó brevemente en la introducción, la principal vía para la formación de bioH₂ tanto en *E. coli* como en *E. aerogenes* es la vía del formato. La formación se lleva a cabo por el complejo enzimático Formato Hidrógeno Liasa, que se encuentra conformado por la formato deshidrogenasa H (FdhF, codificada en *fdhF*) y por la hidrogenasa-3 (Hyd-3) codificada en el operón *hyc* (Figura 4.31) [44, 45, 46, 47]. Hasta ahora se han descrito en *E. coli* y *E. aerogenes* al menos dos reguladores FhIA y HycA, donde FhIA es el activador transcripcional y HycA el represor. FhIA no sólo regula la formación de bioH₂, sino que es el encargado de activar todo el regulón de formato, conformado por el gen *fdhF* y los operones *hyc*, *hyp* y *hydN-hypF* [106].

FhIA es el producto del último gen presente en el operón *hyp* y su transcripción depende de dos promotores más además del presente en el operón *hyp* (P_{hyp}) [107]. Se ha descrito que la transcripción de *fhIA* se lleva a cabo bajo su propio promotor (P_{fhIA}) el cual ha sido referido como constitutivo y débil [108]. Junto con los dos promotores anteriores, en la transcripción de *fhIA* se encuentra involucrado un promotor dependiente de FNR (regulador pleiotrópico, encargado de regular de forma positiva varios genes necesarios para sobrevivir en ambientes anaeróbicos), este promotor se encuentra dentro del marco de lectura del gen *hypA* presente en el operón *hyp* (P_{hypB} en la Figura 4.31). Es por esta razón que, para que se produzca FhIA es necesario que las células se encuentren en un ambiente anaeróbico [108].

Una vez que se genera la enzima FhIA es necesaria la presencia de formato para que esta se una a las Secuencias de Activación Río arriba (SAR) de sus genes blanco (Figura 4.31) [109]. Una vez que FhIA se encuentra activa, se une al factor σ^{54} que reconoce las secuencias TGC[AT][TA] alrededor -12 pb y [CT]TGGCA[CT][GA] alrededor de -24 pb río arriba del inicio de la transcripción de sus genes blanco. Por otro lado, FhIA se encuentra regulado negativamente por el la proteína HycA, cuyo gen se encuentra presente en el operón *hyc*. Se ha descrito que la regulación de HycA sobre FhIA se lleva a cabo posiblemente debido al cambio conformacional que produce su unión [45]. Junto a lo anterior, la traducción de FhIA es inhibida por un ARN con actividad reguladora llamado OxyS que impide el acceso al sitio de unión al ribosoma [110].

Es debido a estos antecedentes que la detección y producción de bioH₂ desde etapas tempranas en la fase de crecimiento, demostrados en este trabajo, se encuentra sustentado debido a que desde los inicios de la fermentación se crea un ambiente anaeróbico purgando con nitrógeno estéril. La eliminación de oxígeno de las muestras permite la activación de FNR y consecuentemente, la transcripción de *fhIA* que a su vez activará el regulón de formato encargado de la producción de bioH₂.

Los resultados de las Figuras 4.28, donde se analizan las cepas que tiene presente el complejo FHL (necesario para generar bioH₂ desde formato), demuestran que la mutación en el gen *ldhA* (el cual causa la eliminación de la vía de producción de lactato con un consiguiente aumento en los niveles intracelulares de NADH, Figura 4.12) produce un incremento tanto en la producción de bioH₂ por gramo de biomasa como un aumento en el rendimiento de bioH₂ generado por mol de sustrato consumido, y que la adición de una segunda mutación, en el gen *dld* (el que también aumenta los niveles de NADH intracelular) acrecienta la producción de bioH₂ aún más, llegando

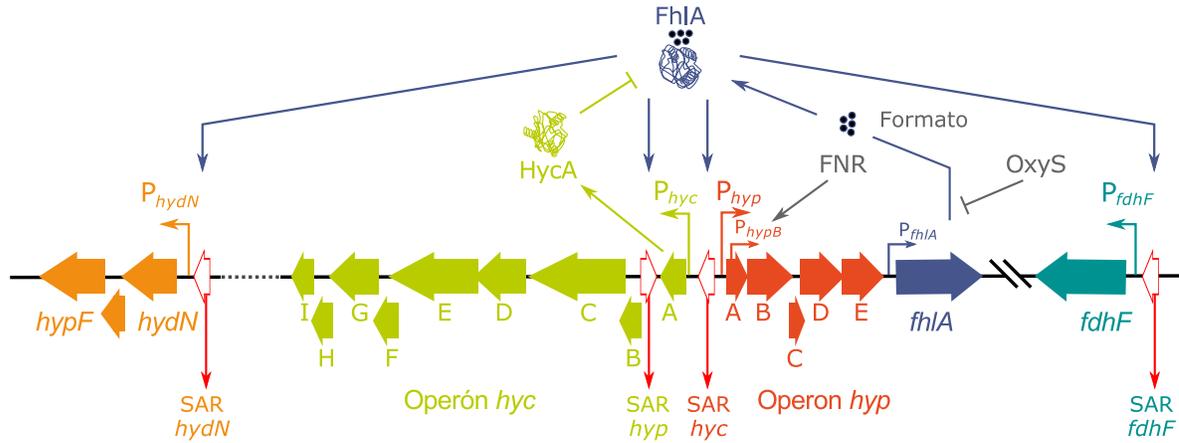


Figura 4.31: Mapa de las unidades transcripcionales activadas por FhlA. Las regiones codificantes están representadas por flechas gruesas y las unidades transcripcionales asociados a un promotor particular están representadas por colores. Las zonas promotora -12/-24 se encuentran indicados río arriba de cada unidad transcripcional por flechas delgadas con el nombre de casa promotor y el color de la unidad transcripcional. El promotor FNR-dependiente (P_{hypB}) se encuentra dentro de la región codificante del operón *hyp*. Las Secuencias de Activación Río arriba (SAR) se encuentran representadas por flechas blancas con bordes rojos con sus respectivos nombres y dirección. FhlA unido a formato es capaz de activar sus genes blanco por unión a SAR, además FhlA es regulado negativamente por HycA y por OxyS.

cerca de un 40 % por sobre la cepa parental *E. aerogenes* 2F. Estos resultados sugieren (al igual en lo observado que en medio rico LB), que estas mutaciones ayudan a aumentar los niveles de bioH₂ posiblemente por el aumento en los valores intracelulares de NADH. Junto con los resultados anteriores, el análisis de las variantes carentes de la hidrogenasa-3 (*Hyd-3*) (Figura 4.30) sugieren la presencia de otro tipo de hidrogenasa independiente de la vía del formato que es estimulada tenuemente por el aumento en los niveles intracelulares de NADH (representado por la variante MJ-12 (*hyd-3⁻ ldhA⁻*)). Sin embargo, los niveles de bioH₂ encontrados en los experimentos con las variantes *Hyd-3⁻* no se corresponden con el aumento logrado con las mutantes MJ-04b (*ldhA⁻*) y MJ-09 (*ldhA⁻ dld⁻*) en las mismas condiciones. Esto se podría explicar debido a que si bien las células *Hyd-3⁻* presentan niveles intracelulares de NADH mayores que la cepa parental (Figura 4.17 y 4.21), este se está utilizando para la producción de otros metabolitos que utilicen NADH como cofactor (esta hipótesis deberá ser probada midiendo los metabolitos secundarios formados durante la fermentación). Una segunda hipótesis puede ser la activación, no descrita, del complejo FHL por parte del aumento en los niveles de NADH. Una tercera hipótesis es una

activación por una hidrogenasa dependiente de NADH que esté asociada al complejo FHL y que juntos aumenten los niveles de bioH₂.

4.4.2.3 Efecto de las mutaciones en el metabolismo central de *E. aerogenes* en medio mínimo con glucosa.

Para estudiar el comportamiento del uso de la fuente de carbono en relación a los metabolitos secundarios, se tomaron muestras líquidas de los cultivos durante la fermentación para luego ser analizados a través de HPLC ([Materiales y Métodos Sección 3.3.15](#)). Estas muestras se adquirieron en torno a las mayores tasas de producción de bioH₂ por gramo de biomasa ([Figuras Anexas B.5 y B.6](#) para las cepas utilizadas para el estudio de la producción global y para las variantes con fondo genético *Hyd-3*⁻ respectivamente). Al igual que lo observado en medio rico LB, las cepas empleadas para el estudio de la producción global muestran una disminución en la concentración de formato a medida que se produce bioH₂. Junto con lo anterior, el metabolito con mayor presencia es etanol con una concentración promedio de ~20 mM, dentro de estas variantes, la MJ-09 mostró la mayor concentración final de etanol (23.75 mM, $P < 0.05$), las demás variantes en estudio no mostraron diferencias estadísticamente significativas. A diferencia de lo observado en medio rico LB, en medio mínimo glucosa el metabolito más representado corresponde al etanol, seguido de acetato. Este último metabolito se encuentra en una concentración promedio de 3.37 mM y la variante MJ-09 es la que mayor concentración obtiene con 5.00 mM ($P < 0.05$), sin existir diferencias entre las demás cepas estudiadas ([Tabla 4.12](#)). Otra observación interesante es que a diferencia de lo observado en medio rico LB, en las variantes carentes del gen *ldhA* no se detectó la presencia de lactato ([Figura Anexa B.5 y Tabla 4.12](#)).

En relación a las variantes con fondo genético *Hyd-3*⁻, estas muestran que la pequeña producción de bioH₂ no depende de formato, al no ser consumido durante la producción de bioH₂. Al igual que las cepas anteriores, estas poseen como metabolito representativo el etanol seguido de acetato, siendo etanol el que se encuentra en mayor concentración ([Figura Anexa B.6](#)) llegando en promedio a 29.41 mM entre todas las variantes *Hyd-3*⁻. Asimismo, MJ-11 es la variante que ostenta la mayor producción con 35.97 mM de etanol ($P < 0.05$). En el caso de acetato, todas las variantes mostraron concentraciones similares sin diferencias significativas entre ellas. Y al igual que lo observado anteriormente, en las variantes MJ-12 y MJ-14 (ambas *ldhA*⁻, además de poseer fondo genético *Hyd-3*⁻) no fue posible detectar la presencia de lactato ([Figura Anexa B.6 y Tabla 4.12](#)).

Tabla 4.12: Tabla de metabolitos para la fermentación en medio mínimo con glucosa.

Cepas (Genotipo)	Productos finales (mM)				
	Succinato	Lactato	Formato	Acetato	Etanol
<i>E. aerogenes</i> 2F	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.4	2.9 ± 0,7	21.3 ± 1.1
MJ-04b (<i>ldhA</i> ⁻)	0.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	3.2 ± 0.3	21.2 ± 3.9
MJ-06b (<i>dld</i> ⁻)	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.4 ± 0.5	17.9 ± 1.9
MJ-09 (<i>dld</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	0.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	23.7 ± 0.0
MJ-02b (<i>hyd-3</i> ⁻)	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	1.3 ± 0.1	3.5 ± 0.2	27.0 ± 1.6
MJ-12 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	27.6 ± 0.9
MJ-11 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>dld</i> ⁻)	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.3 ± 0.2	3.4 ± 0.1	36.0 ± 0.9
MJ-14 (<i>hyd-3</i> ⁻ <i>dld</i> ⁻ <i>ldhA</i> ⁻)	0.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.0	3.5 ± 0.0	27.0 ± 0.0

4.5 Análisis de Flujos Metabólicos.

Una vez realizada las fermentaciones y obtenidas las concentraciones finales de los mayores productos metabólicos, se propuso analizar el comportamiento de los flujos metabólicos internos. La importancia de la medición de estos metabolitos radica en la identificación de puntos críticos en la red metabólica [111], permitiendo determinar la plasticidad y tolerancia que tienen estos puntos en el control cinético que influirán en la selección de futuros blancos de modificaciones. Otra de las ventajas de la medición de estos metabolitos es poder definir rendimientos teóricos máximos en redes complejas y comportamientos inusuales en las vías metabólicas de microorganismos menos caracterizados [111, 112].

4.5.1 Principales reacciones utilizadas en el Análisis de Flujos Metabólicos.

El metabolismo fermentativo descrito para *E. aerogenes* posee gran similitud con el encontrado en *E. coli*. En condiciones anaeróbicas y en ausencia de un aceptor de electrones alternativo, *E. aerogenes* convierte glucosa en una mezcla de ácidos orgánicos típico de procesos fermentativos, datos mostrados por *Converti y cols.*, 2002 [113] y los resultados previamente expuestos en este trabajo. Debido a lo anterior, para el análisis de flujos metabólicos se consideró las vías centrales del metabolismo celular. El modelo para *E. aerogenes* fue desarrollado con experimentos realiza-

dos en esta tesis y datos publicados [66] y está formado por 32 compuestos y 29 reacciones. Se asumió un estado pseudo estacionario (*pseudo-steady state*) para 23 metabolitos intracelulares resultando en un modelo con 6 grados de libertad. El número de condicionamiento de la matriz fue de 22 indicando un modelo numéricamente robusto [114]. Para resolver el sistema de ecuaciones se midieron 7 flujos, resultando en un sistema de ecuaciones sobredeterminado el cual fue resuelto empleando regresión lineal de mínimos cuadrados utilizando la pseudoinversa de *Moore-Penrose* (para más detalles de las consideraciones asumidas para realizar el modelo, revisar [Materiales y Métodos Sección 3.3.17](#)). En la [Figura 4.32](#) muestra un diagrama de las principales reacciones utilizadas para el modelo junto con los genes. En el caso de que en alguna vía existieran muchos genes involucrados sólo se puso la identificación de las reacciones involucradas. Para más información acerca del nombre de las enzimas, las reacciones, genes, metabolitos involucrados y las abreviaciones ver [Tablas C.1](#) a la [C.11](#) en el [Anexo C](#).

4.5.2 Efecto de las mutaciones en los flujos internos de *E. aerogenes*.

Con el objetivo de estudiar el efecto que generan las mutaciones realizadas en el comportamiento de los metabolitos internos en el punto de mayor rendimiento de bioH₂, se realizó un análisis de flujos metabólicos (MFA). La tasa en el consumo de glucosa fue utilizada para comprobar la consistencia entre el modelo y los datos experimentales. Las [Figuras 4.33](#) y [4.34](#) muestran la representación gráfica del cálculo de los flujos, los datos fueron tomados de los experimentos llevados a cabo en modo *batch* y descritos anteriormente ([Sección 4.4.2](#) de los resultados).

4.5.2.1 Efecto de las mutaciones en los flujos internos de las variantes utilizadas para el estudio de la producción global de bioH₂.

En la [Figura 4.33](#) se puede observar los resultados del análisis de flujos metabólicos para las cepas utilizadas para estudiar la producción global de bioH₂, variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-09, las cuales fueron comparadas con la cepa silvestre *E. aerogenes* 2F (abreviada como 2F). En esta figura se puede observar que los cálculos estimados para la tasa de utilización de glucosa en la cepa silvestre fue de $14.61 \text{ mmol g}_{\text{Células}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, esta utilización es sólo 0.80 veces la observada en cepas relacionadas como *E. coli* en condiciones anaeróbicas ($18.3 \text{ mmol g}_{\text{Células}}^{-1} \text{ h}^{-1}$)⁴ [115, 116].

⁴Esta es una comparación que se realizó dividiendo el valor calculado de *E. aerogenes* 2F por el calculado para *E. coli*.

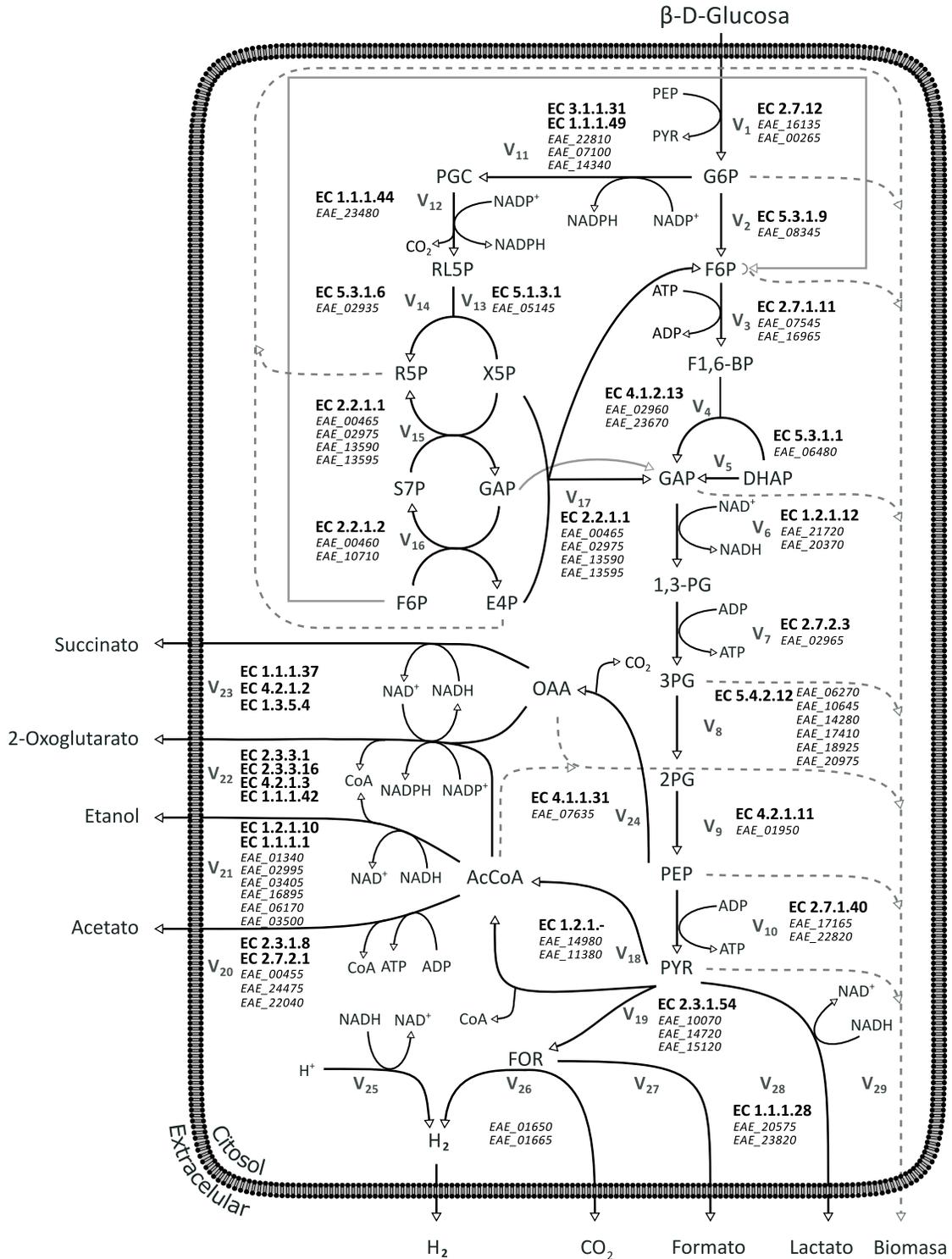


Figura 4.32: Diagrama de las reacciones y genes usados para el MFA. En negrita se encuentra el número de identificación de las reacciones (EC N°) y en cursiva el nombre de los genes que participan en esa reacción. Las líneas grises y punteadas indican los metabolitos utilizados para la generación de biomasa.

Para el caso de la variante MJ-04b, la eliminación del gen *ldhA* genera una tasa de utilización de glucosa de $11.86 \text{ mmol g}_{\text{Células}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ siendo este 0.81⁵ veces la tasa calculada para la cepa *E. aerogenes* 2F parental. Junto con lo anterior, en la variante MJ-06b se puede observar que la eliminación del gen *dld* produce una disminución en la tasa de utilización de glucosa, correspondiente a $10.19 \text{ mmol g}_{\text{Células}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ siendo este valor 0.70 veces el valor de la cepa 2F parental. Por otro lado, la eliminación de los dos genes anteriores (variante MJ-09) genera un aumento en la utilización de glucosa de 1.15 veces el valor obtenido para la cepa 2F parental, llegando a los $16.77 \text{ mmol g}_{\text{Células}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Las vías que se ven más afectadas son las del metabolismo de succinato (V_{23}), la piruvato deshidrogenasa (V_{18} EC N° 1.2.1.-) que junto con la vía del formato acetiltransferasa (V_{19} EC N° 2.3.1.54) son las que aportan principalmente intermediarios importantes como acetil coenzima A. Estas vías contribuyen con los metabolitos necesarios para generar diferentes productos finales como succinato, 2-oxoglutarato, etanol y acetato. Sin embargo, de acuerdo los cálculos del modelo y a datos experimentales, no fue posible encontrar 2-oxoglutarato por HPLC ni GC-MS (datos no mostrados). Debido a lo anterior los productos finales que se ven favorecidos, y que reflejan principalmente las diferencias encontradas en la tasa de consumo de glucosa, son succinato, etanol y acetato. Al analizar con más detalle cada cepa, se puede observar que la eliminación del gen *ldhA* (variantes MJ-04b y MJ-09) produce un re-direccionamiento paulatino de flujos en la glicólisis, principalmente para la formación de biomasa, este re-direccionamiento es especialmente interesante entre los puntos de fosfoenolpiruvato y piruvato (V_9 y V_{10}) los que se van a las vías de producción de oxalacetato (OAA) y Acetil Coenzima A (AcCoA) (V_{18} y V_{24}).

Al analizar los datos con la premisa de que la entrada de glucosa para cada cepa es del 100 % y que el flujo metabólico sigue el comportamiento de la cepa silvestre, se puede indicar que la variante MJ-04b (*ldhA*⁻) experimenta una formación de succinato de un 12 % por sobre lo esperado. El comportamiento anterior es consistente con la existencia de vías anapleróticas presentes en condiciones anaeróbicas para equiparar el desbalance *redox*, catalizado por la enzima Fosfoenolpiruvato carboxilasa (gen: EAE_07635; EC N°: 4.1.1.31; V_{24}) [117], el cual se puede observar para esta variante en la [Figura 4.12](#) presente en la [Sección 4.3](#) de los resultados. Junto con lo anterior, la nula generación de lactato y una producción de acetato con un 22 % por sobre lo esperado pudo ser el responsable del aumento de equivalentes reducidos visto en esta variante ([Figura 4.12](#)) y el consiguiente aumento en la producción de succinato.

⁵Este y los siguientes valores se obtuvieron de la división del valor calculado para cada una de las mutantes por el valor calculado de la cepa de *E. aerogenes* 2F silvestre.

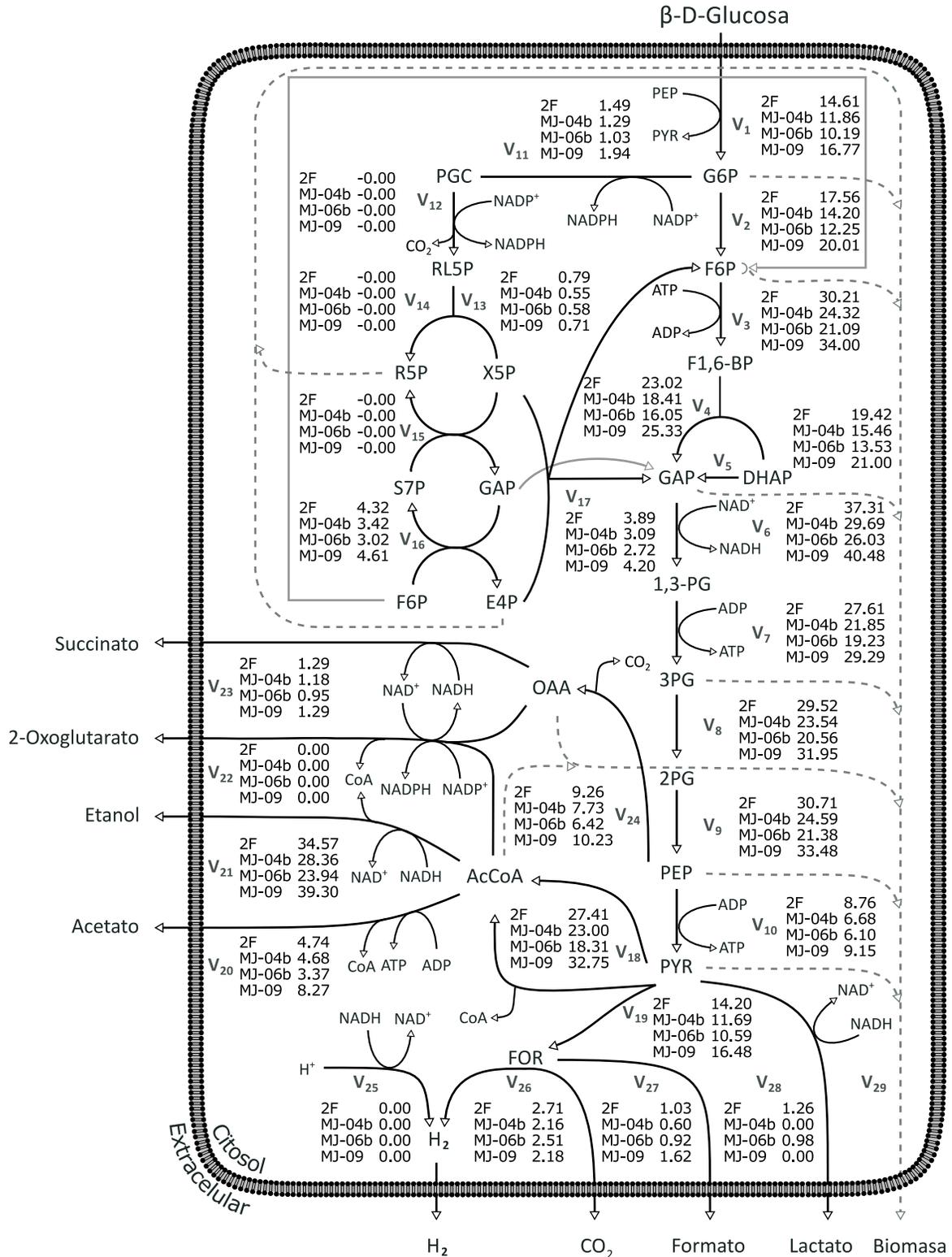


Figura 4.33: Distribución de flujos metabólicos para la producción global de bioH₂. Los Datos se encuentran expresados en mmol de metabolito g⁻¹ células h⁻¹.

Por otro lado, la adición de una segunda mutación (variante MJ-09 *ldhA*⁻ *dld*⁻) produce una disminución en la producción de succinato cercana al 13 % del valor esperado y un aumento en la producción de acetato en más del 52 %, que junto con la nula generación de lactato podrían nuevamente estar aportando con el desbalance *redox* observado en la [Figura 4.19](#) para esta variante.

Al analizar la variante MJ-06b (*dld*⁻) se puede indicar que la vía principal de la glicólisis se comporta igual que la cepa parental, encontrando una diferencia en el metabolismo de piruvato. Esta variante presenta una disminución cercana al 5 % en la vía de la piruvato deshidrogenasa (V₁₈ EC N° 1.2.1.-) en relación a lo esperado, y un aumento del 7 % con respecto a lo esperado para la vía de la formato acetiltransferasa (V₁₉ EC N° 2.3.1.54) lo que conlleva a un aumento cercano al 30 % en la cantidad de formato traduciendo en un aumento del 33 % en la cantidad de bioH₂. Por otro lado, para contrapesar el pequeño desbalance *redox* que generó la eliminación del gen *dld* ([Figura 4.14 Sección 4.3](#) de los resultados), se produjo aumento del 5 % y del 10 % en la producción de succinato y lactato, respectivamente.

4.5.2.2 Efecto de las mutaciones en los flujos internos de las variantes con fondo genético *hyd-3*⁻.

En la [Figura 4.34](#) se puede observar los resultados del análisis de flujos metabólicos para las variantes con fondo genético *Hyd-3*⁻ utilizadas para estudiar la producción de bioH₂ por parte de la hidrogenasa *Hyd-3* independiente. En esta figura se puede observar que la eliminación del operón que codifica para la hidrogenasa *Hyd-3* (variante MJ-02b) produce un aumento en la tasa de utilización de glucosa de 2.48 veces más que la cepa parental (2F) con 36.20 mmol g⁻¹ Células⁻¹ h⁻¹. Esta gran tasa de utilización se traduce principalmente en la generación de metabolitos secundarios y posiblemente para el suministro de los requerimientos del mantenimiento energético y de forma secundaria para la asimilación y crecimiento energético que se convertirá en biomasa, debido a que esta variante es la que menor biomasa genera. Al introducir mutaciones en los genes *ldhA* y *dld* el consumo de glucosa disminuye cerca de los niveles descritos para otro tipo de *Enterobacterias* (18.5 mmol g⁻¹ Células⁻¹ h⁻¹) [116], logrando tasas de consumo de 18.19, 23.34 y 17.99 mmol g⁻¹ Células⁻¹ h⁻¹ para las variantes MJ-12 (*Hyd-3*⁻ *ldhA*⁻), MJ-11 (*Hyd-3*⁻ *dld*⁻) y MJ-14 (*Hyd-3*⁻ *dld*⁻ *ldhA*⁻) respectivamente. Si bien los valores anteriores se encuentran cercano a lo descrito en la literatura, estos siguen siendo mayores que los calculados para *E. aerogenes* 2F con 1.25, 1.6 y 1.23 veces por sobre la tasa de consumo.

Al analizar con mayor detalle los resultados, y asumiendo que la entrada de glucosa para cada variante es del 100 % y que los flujos se deberían comportar como la cepa parental, se puede observar que los flujos calculados para la vía de las pentosas fosfato se encuentran 30 % por debajo lo esperado por lo que la principal función de esta vía es proveer precursores que serán utilizados para el crecimiento celular, función que ha sido descrita en *E. coli* [115]. Junto con lo anterior, se puede observar un aumento en los flujos calculados para la vía de la piruvato deshidrogenasa (V_{18} EC N° 1.2.1.-) cercano al 5.5 %, 8.5 %, 8.9 % y 8.6 % para las variantes MJ-02, MJ-12, MJ-11 y MJ-14 respectivamente. La vía de la enzima Fosfoenolpiruvato carboxilasa (gen: EAE_07635; EC N°: 4.1.1.31; V_{24}) también posee valores por sobre lo esperado con porcentajes de 4.3 %, 9.7 %, 11 %, y 9.6 % para las variantes MJ-02, MJ-12, MJ-11 y MJ-14 respectivamente. Debido a que estas mutantes carecen de los genes necesarios para metabolizar el formato y transformarlo a bioH_2 y CO_2 , era de esperar una acumulación de este metabolito.

Por otro lado, en cuanto a los principales productos metabólicos (acetato, etanol formato), estos si bien se encuentran en mayor proporción que en la cepa silvestre, la cantidad de glucosa destinada a la producción de estos fue menor a lo esperado de acuerdo a la cantidad de glucosa consumida. Esto se pudo deber a un mayor consumo de acetil coenzima A para reacciones de mantenimiento energético (para el caso de la variante MJ-02) o la generación de biomasa (para el caso de las MJ-12, MJ-11 y MJ-14). Es así como la cantidad de acetato se encuentra por debajo de lo esperado en un 10 %, 15 %, 32 % y 8.9 % y la cantidad de succinato en un 32.0 %, 33.9 %, 53.6 % y 26.4 % para las variantes MJ-02, MJ-12, MJ-11 y MJ-14 respectivamente. Esto mismo ocurre para el caso de etanol con un promedio de 4,4 % por debajo lo esperado para cada variante.

4.5.3 Balance de Carbono y Balance de Energético.

Para determinar los efectos de los estudios de ingeniería metabólica llevada a cabo en este trabajo, primero se determinó el funcionamiento de la red metabólica interna a través de análisis de flujos metabólicos midiendo los principales productos finales encontrados en los procesos fermentativos. Para evaluar la veracidad de estas mediciones experimentales se decidió estudiar el balance de carbonos y el balance de energía, las cuales además aportan información de las particularidades que producen las mutaciones en cada una de las cepas en estudio.

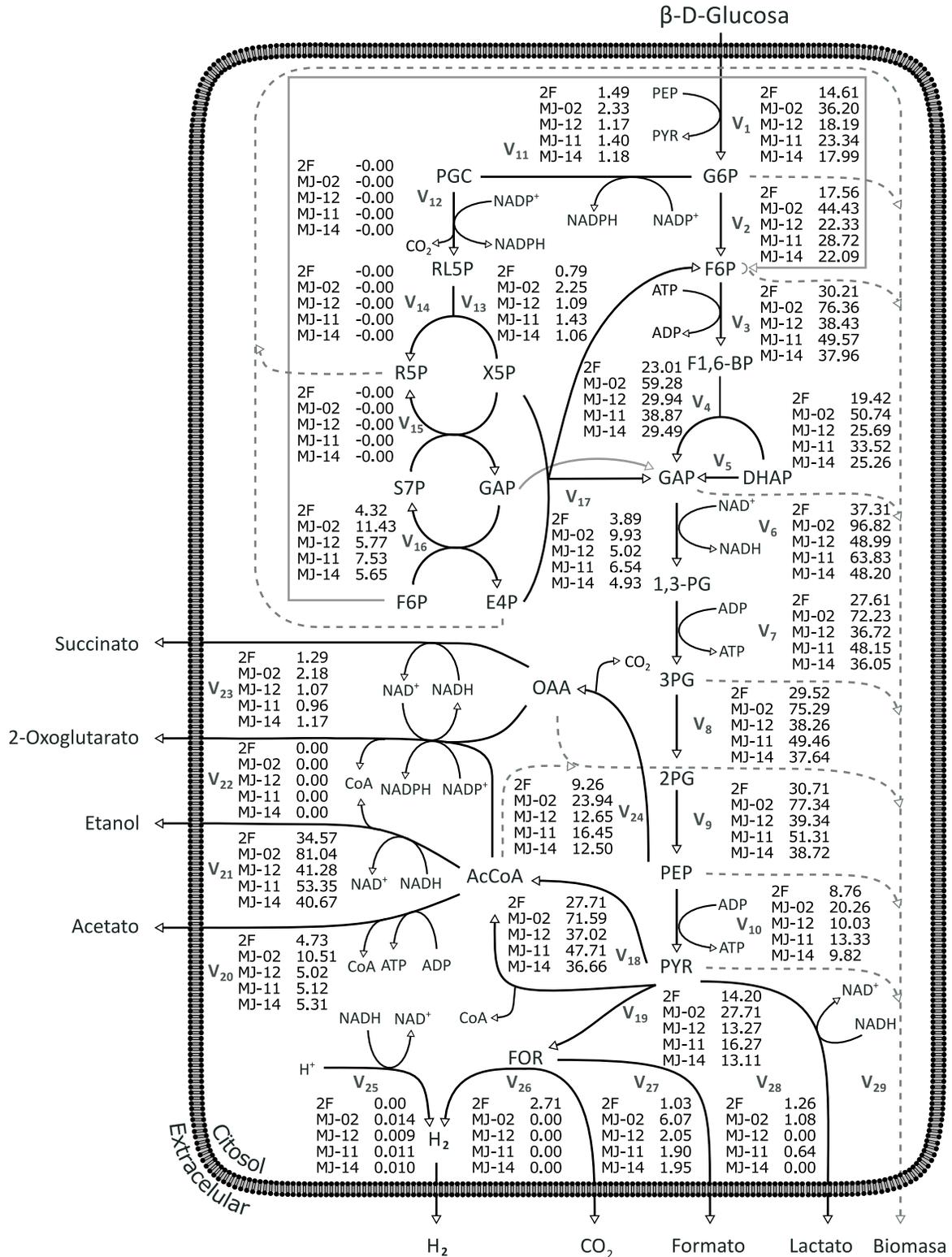


Figura 4.34: Distribución de flujos metabólicos para las variantes con fondo genético Hyd-3⁻. Los Datos se encuentran expresados en mmol de metabolito g⁻¹ Células h⁻¹.

4.5.3.1 Coeficientes estequiométricos experimentales

La [Tabla 4.13](#) muestra los coeficientes estequiométricos experimentales de las fermentaciones anaeróbicas llevadas a cabo en modo *batch* para la cepa parental y cada una de las variantes en el punto de mayor rendimiento de bioH₂. Estos coeficientes se encuentran descritos en el metabolismo anaeróbico de *E. aerogenes* representados en las ecuaciones (C.1) a la (C.17) en el [Anexo C](#), en las que se asumió que la fracción de sustrato consumido para crecimiento celular puede ser estimada asumiendo una composición de biomasa seca de CH_{1,78}N_{0,24}O_{0,33} [66]. En la [tabla 4.13](#) se muestran los rendimientos molares de los productos finales por mol de glucosa consumida (mol mol_G⁻¹). Los resultados muestran que las mutaciones generadas en *E. aerogenes* 2F tienen variados efectos en el metabolismo de esta bacteria, reflejado en cambios en los rendimientos molares de los productos finales. En particular, el rendimiento de formato (α) presenta una disminución en la variante MJ-04b (*ldhA*⁻) cercana al 20 % con respecto a la cepa parental 2F. Por otro lado, las variantes MJ-06b (*dld*⁻) y MJ-09 (*ldhA*⁻ *dld*⁻) presentan un aumento del 40 % con respecto a la cepa parental. Resultados similares se encontraron al analizar las mutantes con fondo genético (*Hyd-3*⁻) donde las variantes MJ-02b, MJ-12 (*Hyd-3*⁻ *ldhA*⁻) y MJ-14 (*Hyd-3*⁻ *ldhA*⁻ *dld*⁻) presentaron en promedio un aumento del 70 % en la cantidad de formato, a excepción de la variante MJ-11 (*Hyd-3*⁻ *dld*⁻) que sólo presenta un aumento del 25 % con respecto a la cepa parental.

Junto con los resultados anteriores, el rendimiento de bioH₂ (α_1) se vio aumentado con la eliminación del gen *ldhA* (variante MJ-04b $-0.61 \text{ mol H}_2 \text{ g}_{\text{Glucosa}}^{-1}$) en un 258 % por sobre la cepa parental (3.5 veces más que lo que se obtiene con la cepa parental $-0.17 \text{ mol H}_2 \text{ g}_{\text{Glucosa}}^{-1}$), este aumento es superior al que había sido descrito para la eliminación del mismo gen (*ldhA*) en otra cepa de *E. aerogenes* en el que lograron un aumento de 1.5 veces el rendimiento alcanzado por la cepa parental [104]. Por otro lado, la variante MJ-06b presentó un aumento del 47 % de bioH₂ (1.5 veces más), en cambio la variante MJ-09 presentó el mismo rendimiento que la cepa parental. En relación a las mutantes con fondo genético (*Hyd-3*⁻), estas presentan una disminución del 99.9 % en el rendimiento de bioH₂ en comparación a la cepa parental.

Como se observó en los resultados de flujos metabólicos, los flujos para acetato presentaban un aumento en las variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-09 esto se tradujo en un aumento del rendimientos de acetato (α_2) de 2.1 %, 12.9 % y 53.3 % respectivamente. Junto con lo anterior, los rendimientos de acetato en las variantes MJ-02, MJ-12, MJ-11 tuvieron una disminución del 35.1 %, 10.5 %

Tabla 4.13: Coeficientes estequiométricos y rendimientos molares de los productos finales (mol mol⁻¹) del metabolismo anaeróbico de *E. aerogenes* en medio mínimo con glucosa. Los datos están expresados en referencia al consumo de 1 mol de glucosa.

	Cepas							
	2F	MJ-04b	MJ-06b	MJ-09	MJ-02b	MJ-12	MJ-11	MJ-14
<i>Coefficientes Experimentales</i>								
α	0.04	0.03	0.06	0.06	0.08	0.07	0.05	0.07
α_1	0.17	0.61	0.25	0.17	$8.2 \cdot 10^{-5}$	$9.9 \cdot 10^{-5}$	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$9.3 \cdot 10^{-5}$
α_2	0.20	0.21	0.23	0.31	0.13	0.18	0.15	0.20
α_3	1.47	1.67	1.61	1.46	1.01	1.48	1.53	1.56
β	0.05	0.00	0.07	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00
γ	0.05	0.07	0.06	0.05	0.03	0.04	0.03	0.04
δ	0.07	0.07	0.07	0.08	0.04	0.08	0.07	0.07

y 26.7% con respecto a la cepa parental *E. aerogenes* 2F. La única cepa mutante con fondo genético *Hyd-3⁻* que presentó un aumento en el rendimiento de acetato, fue la variante MJ-14 (*Hyd-3⁻ IdhA⁻ dld⁻*) con un 1.2% más que la cepa parental. Si nos referimos al rendimiento de etanol (α_3), la variante MJ-04b presenta un aumento del 14%, así mismo la variante MJ-06b exhibe un aumento del 9.9% por sobre la cepa parental. Por otro lado, la variante MJ-09 (*ldhA⁻ dld⁻*) presenta valores de rendimiento similares a la cepa parental con sólo un 0.22% por debajo de esta. En cuanto a las mutantes con fondo genético *Hyd-3⁻*, la variante MJ-02 es la única que posee un rendimiento por debajo de la cepa parental (31.5%), en cambio las variantes MJ-12, MJ-11 y MJ-14 muestran rendimientos de 0.87%, 4.6% y 6.2% por sobre la cepa parental respectivamente. En cuanto a los rendimientos de lactato (β), estos sólo se encontraron de forma positiva en la cepa *E. aerogenes* 2F, y en las variantes MJ-06b, MJ-02 y MJ-11, es decir, sólo en aquellas que poseían en su genoma el gen *ldhA* intacto. De estas variantes, MJ-06b (*dld⁻*) posee un rendimiento de 22% por sobre la cepa parental, en cambio las variantes MJ-02 y MJ-11 tienen un rendimiento de 75% y 65.5% menos que la cepa parental respectivamente. De acuerdo lo expuesto anteriormente, con respecto al rendimiento en la producción de succinato (γ) se observa un aumento en las variantes MJ-04b y MJ-06b. Por otro lado las demás variantes en estudio mostraron rendimientos menores que la cepa parental en un 12.5%, 50.8%, 30.5%, 50% y 18.2% (variantes MJ-09, MJ-02, MJ-12, MJ-11 y MJ-14, respectivamente), favoreciendo el flujo de carbonos hacia otros metabolitos.

4.5.3.2 Balance de carbonos

Para entender de mejor manera el flujo de carbonos que ocurre en la cepa parental y cada una de las variantes, en la [Tabla 4.14](#) (parte superior de esta tabla) se muestra el balance de carbonos entre el sustrato utilizado y los principales productos presente en las fermentaciones llevadas a cabo en modo *Bath*. Estos resultados demuestran que la recuperación de carbonos para la cepa parental, y las variantes MJ-4b, MJ-06b y MJ-09 fue de 97,80 %, 99.10 %, 104.23 % y 95.08 % del máximo teórico para el sustrato utilizado. Debido a que las mediciones poseen un rango de error menor al 5 % se desprende que los metabolitos evaluados pertenecen a los principales productos metabólicos y además fueron debidamente medidos y cuantificados. En cambio las mutantes que se escapan del rango de confiabilidad son las variantes con fondo genético *Hyd-3⁻* (MJ-02b, MJ-12, MJ-11 y MJ-14), estos valores se pueden deber a una posible producción de algún metabolito secundario que no fue considerado dentro de las mediciones de la mutantes, un ejemplo de esto es el 2,3-butanediol que ha sido descrito como uno de los metabolitos principales en algunas cepas de *E. aerogenes* llegando a utilizar el 35 % del máximo teóricos de carbonos del sustrato [113]. La suposición anterior se basa en que se ha descrito que el aumento en las concentraciones de etanol afectan de forma lineal el crecimiento de *E. aerogenes* [118] y se ha sugerido que aun concentraciones menores a las encontradas en las fermentaciones de *E. aerogenes* podrían ser responsables de la inhibición en la generación de algunos metabolitos importantes como la producción de 2,3-butanediol [113]. Sin embargo más análisis son necesarios, lo que demuestra lo intrincado y complejo de las regulaciones metabólicas.

Tomando todos estos resultados se puede apreciar que bajo condiciones anaeróbicas la mayor cantidad de carbono es consumido para la producción de etanol (cerca de un promedio del 50 % del carbono total disponible se utiliza para este fin en la mayoría de las cepas, ver parte media de la [Tabla 4.14](#)), así por ejemplo la variante MJ-04b (*ldhA⁻*) ocupa 55.81 % del sustrato consumido sólo para la formación de etanol, siendo CO₂ el segundo mayor producto con un promedio cercano al 20 %.

Tabla 4.14: Balance de carbono y grado de reducción en medio mínimo con glucosa.

	Cepas							
	2F	MJ-04b	MJ-06b	MJ-09	MJ-02b	MJ-12	MJ-11	MJ-14
<i>Balance de carbonos</i>								
Reactivo (C-mol)								
Glucosa	6	6	6	6	6	6	6	6
Productos (C-mol)								
Succinato	0.44	0.56	0.51	0.38	0.22	0.31	0.22	0.36
Lactato	0.32	0.00	0.39	0.00	0.08	0.00	0.11	0.00
Formato	0.09	0.07	0.12	0.12	0.15	0.15	0.11	0.15
Acetato	0.40	0.41	0.45	0.62	0.26	0.36	0.29	0.41
Etanol	2.93	3.35	3.22	2.93	2.01	2.96	3.07	3.11
Biomasa	0.43	0.43	0.42	0.47	0.23	0.49	0.42	0.43
CO ₂ ^a	1.25	1.13	1.12	1.19	0.21	0.21	0.20	0.21
Total (%)	97.80	99.10	104.23	95.08	52.57	74.41	73.81	77.80
Error (%)	-2.20	-0.90	4.23	-4.92	-47.43	-25.59	-26.19	-22.20
Productos (%) ^b								
Succinato	7.33	9.26	8.55	6.41	3.61	5.09	3.68	5.99
Lactato	5.36	0.00	6.57	0.00	1.34	0.00	1.85	0.00
Formato	1.46	1.19	2.06	2.01	2.51	2.44	1.82	2.50
Acetato	6.70	6.84	7.56	10.27	4.35	5.99	4.90	6.78
Etanol	48.89	55.81	53.74	48.78	33.51	49.31	51.13	51.90
Biomasa	7.24	7.16	7.08	7.77	3.79	8.10	7.05	7.15
CO ₂	20.83	18.83	18.67	19.83	3.5	3.5	3.4	3.5

^a El CO₂ en la fase líquida fue ignorado

^b Distribución del porcentaje de carbono en los productos

Junto con la mayor producción de etanol, el aumento de flujos para succinato, responde de forma consistente con la presencia de vías anapleróticas en condiciones anaeróbicas que ayudan a equiparar el desbalance *redox* [117]. Es debido a lo anterior que un aumento en la producción de acetato y una disminución en la producción de lactato podrían reflejar el aumento de equivalentes reducidos los cuales pueden ser regenerados por el aumento de vías alternativas como la producción de succinato o la producción de bioH₂ por la independiente de formato. Estos efectos se pueden observar en la variante MJ-04b (*ldhA*⁻) que no posee producción de lactato y se ob-

serva un leve aumento en la formación de acetato que conlleva a un incremento en el consumo de carbono para la producción de succinato, llegando a 9.26 % del carbono total (Tabla 4.14) y un aumento en la producción de bioH₂ (Tabla 4.11). Resultados similares se observan en la variante MJ-06b (*dld*⁻), la diferencia radica en que esta mutante adquiere además un aumento en la cantidad de lactato, lo que posiblemente ayude a equiparar el desbalance *redox* explicando la diferencia en la cantidad de NADH/NAD⁺ observado en estas dos variantes (Figuras 4.12 [*ldhA*⁻] y 4.14 [*dld*⁻], para más detalle ver Figura B.1 del Anexo B). Por otro lado, los resultados observados en la variante MJ-09 sugieren que debido a la nula producción de lactato y el reducido rendimiento de etanol y succinato, para regular el balance *redox*, causan un aumento en el rendimiento de acetato para aumentar la producción de ATP dentro de la célula.

Con respecto a los resultados obtenidos con las mutantes utilizadas para el análisis de la producción de bioH₂ por la hidrogenasa Hyd-3 independiente, se puede observar que la eliminación del gen *ldhA* de las variantes con fondo genético *Hyd-3*⁻ generan los mismos cambios en comparación a su cepa parental inicial (MJ-02b). En este caso las variantes MJ-12 (*Hyd-3*⁻ *ldhA*⁻) y MJ-14 (*Hyd-3*⁻ *ldhA*⁻ *dld*⁻) presentan nula producción de lactato con un aumento en la cantidad de acetato y etanol, además de un incremento en el rendimiento de succinato. Sin embargo en la variante MJ-14 el desbalance *redox* no refleja un cambio significativo en la producción de bioH₂ (Tabla 4.11). Por otro lado, la variante MJ-11 posee un leve aumento en el rendimiento de lactato y el importante incremento en el rendimiento de etanol encontrado en la mayoría de las cepas estudiadas, principalmente debido a un leve incremento en el flujo metabólico hacia la producción de piruvato (Piruvato kinasa, V₁₀) y de acetyl Coenzima A (piruvato deshidrogenasa, V₁₈) (Figura 4.34). Estos resultados sugieren que los datos observados se deben a la intención de las células de restablecer el balance *redox*, al igual que lo visto en los resultados de las cepas utilizadas para analizar la producción global de bioH₂.

4.5.3.3 Rendimiento experimental y grado de reducción

Una vez realizado el balance de carbonos y determinado los coeficientes experimentales es posible estimar el rendimiento experimental de ATP durante el proceso fermentativo (para mayor detalle ver ecuación (C.17) en el Anexo C). En la Tabla 4.15 se puede observar que la producción molar de ATP $Y_{ATP/G}$ para cada una de las cepas se encuentra dentro de los valores típicos observados en fermentaciones anaeróbicas ($\sim 2 \text{ mol}_{ATP} \text{ mol}_G^{-1}$). En cuanto al rendimiento molar de biomasa generada por sustrato consumido ($Y_{X/G}$), se encuentra en promedio con un valor de

0.44 C-mol_{Células} mol_G⁻¹ (a excepción de la variante MJ-02 que muestra un menor rendimiento de biomasa por sustrato consumido). Al comparar los resultados con otros reportes de fermentaciones anaeróbicas en modo *batch* y con concentraciones de sustrato iniciales similares, se observa que los resultados de $Y_{X/G}$ son levemente mayores que los valores reportados para otras cepas de *E. aerogenes* (0.27 - 0.32 C-mol_{Células} mol_G⁻¹) [113, 119] y también levemente mayores para otras bacterias facultativas como *Citrobacter amalonaticus* Y19 (0.36 C-mol_{Células} mol_G⁻¹) [120]. Por otro lado los resultados de $Y_{X/G}$ se encuentran por debajo a otras cepas facultativas productoras de H₂ como *Klebsiella aerogenes* (0.52 - 0.68 C-mol_{Células} mol_G⁻¹) [121] y *E. coli* (0.76 C-mol_{Células} mol_G⁻¹) [115]. Con respecto a esto se ha descrito que altos valores de $Y_{X/G}$ son el resultado de cultivos en condiciones limitantes de sustrato y por el contrario bajos valores de $Y_{X/G}$ son consecuencia de cultivos en condiciones de exceso de sustrato debido a un fenómeno de derroche energético (*Overflow Metabolism*) [113, 120, 122],

Bajo las condiciones de estado estacionario que se asumieron anteriormente no es posible la acumulación de ATP y por lo tanto la producción de este debe ser consumida a través del anabolismo bacteriano. Debido a lo anterior, los valores de $Y_{ATP/G}$ y $Y_{X/G}$ se utilizaron para determinar el rendimiento asociado a la cantidad de ATP utilizado para la formación molar de biomasa ($Y_{ATP/X}$) o dicho de otra forma, el rendimiento molar de biomasa producido por ATP consumido ($Y_{X/ATP}$). La interpretación de estos datos reflejan que a mayores valores de $Y_{ATP/X}$ (o menores valores de $Y_{X/ATP}$) es necesaria mayor energía para la generación de biomasa. En la [Tabla 4.15](#) se puede observar que los resultados de $Y_{ATP/X}$ se encuentran entre 4.04 y 6.17 mol_{ATP} C-mol_{Células}⁻¹. Estos resultados son comparables a los obtenidos para *E. aerogenes* bajo condiciones similares de cultivo (6.09 mol_{ATP} C-mol_{Células}⁻¹). De igual forma, los valores de $Y_{X/ATP}$ se encuentran por debajo del rango encontrado para fermentaciones anaeróbicas llevadas a cabo en quimiostato con *E. aerogenes* como modelo de estudio (0.35 - 1.0 C-mol_{Células} mol_{ATP}⁻¹) y otros microorganismos (0.48 C-mol_{Células} mol_{ATP}⁻¹) [123]. Por lo tanto, estos resultados surgieron que la eliminación por separado de los genes *ldhA*, *dld* y *Hyd-3* (variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-02b, respectivamente) suponen un requerimiento energético mayor para la generación de biomasa.

Por otro lado, En la [Tabla 4.15](#) se muestra también el balance de grado de reducción del sustrato utilizado y los productos finales. El grado de reducción (ϵ) corresponde al número de equivalentes de electrones disponibles por gramo de átomo de carbono y se calcula de acuerdo a

Tabla 4.15: Grado de reducción en medio mínimo con glucosa.

	Cepas							
	2F	MJ-04b	MJ-06b	MJ-09	MJ-02b	MJ-12	MJ-11	MJ-14
<i>Grado de reducción</i>								
Succinato	1.54	1.94	1.80	1.35	0.76	1.07	0.77	1.26
Lactato	1.29	0.00	1.58	0.00	0.32	0.00	0.44	0.00
Formato	0.18	0.14	0.25	0.24	0.30	0.29	0.22	0.30
Acetato	1.61	1.64	1.81	2.46	1.04	1.44	1.18	1.63
Etanol	17.60	20.09	19.35	17.56	12.06	17.75	18.41	18.68
H ₂	0.34	1.22	0.50	0.34	1.6·10 ⁻⁴	2.0·10 ⁻⁴	2.0·10 ⁻⁴	1.9·10 ⁻⁴
O ₂ ^a	-0.22	-0.21	-0.21	-0.23	-0.11	-0.24	-0.21	-0.21
Biomasa	1.91	1.89	1.87	2.05	1.00	2.14	1.86	1.89
Total (%)	101.00	111.32	112.24	99.05	64.07	93.53	94.44	98.09
Error (%)	1.00	11.32	12.24	-0.95	-35.93	-6.47	-5.56	-1.91
<i>Rendimientos Experimentales</i>								
Y _{ATP/G}	2.04	2.16	2.29	2.07	1.41	1.96	1.95	2.07
Y _{X/G}	0.43	0.43	0.42	0.47	0.23	0.49	0.42	0.43
Y _{X/ATP}	0.21	0.20	0.19	0.23	0.16	0.25	0.22	0.21
Y _{ATP/X}	4.71	5.03	5.40	4.43	6.17	4.04	4.62	4.83

^a Determinado de acuerdo a la ecuación (C.16) en el Anexo C.

la siguiente fórmula:

$$\varepsilon = 4 \cdot C + H - 2 \cdot O - 3 \cdot N \quad (4.1)$$

donde C, H O y N en la fórmula (4.1) corresponde a los coeficientes atómicos para carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno respectivamente. Se introdujo el término -3·N para prescindir del consumo de amonio en los cálculos [124, 115]. En la Tabla 4.15, se muestra la suma del grado de reducción de los productos principales y el porcentaje de error. De acuerdo a esta tabla, se observa que la mayoría de las cepas estudiadas se encuentran bien balanceadas con un error cercano al 5%. Por otro lado, el desbalance encontrado en las variantes MJ-04b, MJ-06b y MJ-02b pueden ser el reflejo del desbalance NADH/NAD⁺ presente en estas, cuyo principal importe corresponde al rendimiento de etanol.

Como se nombró anteriormente al final de la Sección 4.4.2.2 de los resultados, el hecho que la eliminación de los genes necesarios para la formación de la hidrogenasa-3 (variantes *Hyd-3*⁻)

generen una drástica disminución en la producción de bioH₂ aún con mayores concentraciones de NADH en comparación a la cepa parental (Tabla 4.11 y Figuras 4.17 y 4.21), y que la presencia de la hidrogenasa-3 (Hyd-3) en un ambiente con altas concentraciones de NADH (mayores que la cepa parental) genera mayor cantidad de bioH₂ (Tabla 4.11 cepa parental y variante MJ-04b *ldhA*⁻; Figura 4.12), asociado principalmente al consumo de formato (Tabla 4.14 variante MJ-04b), sugieren una relación entre las dos vías de producción descritas en *E. aerogenes*. Por otro lado, estos resultados se pueden explicar debido a que la hidrogenasa-3 (Hyd-3) por si sola sea activada por un aumento en la concentración de NADH intracelular.

La posible existencia de una relación entre las dos vías de producción de bioH₂ fue recientemente sugerida en otra cepa de *E. aerogenes* (CCTCC AB91102) por Pi j. y cols, 2016 [125] donde analizaron la eliminación de varios genes presentes en el operón *hyc* necesarios para la formación de la hidrogenasa-3 y examinaron su efecto en la producción de bioH₂ comparándola con la cepa parental. En sus resultados ellos describen un rendimiento de 0.886 mol de H₂ por mol de glucosa para la cepa parental ⁶, y no detectan producción de H₂ en las cepas mutantes aún con altos niveles de NADH, llegando a conclusiones similares a las de este trabajo.

Por otro lado en el trabajo de esta tesis se demostró que, aún sin poseer ningunos de los genes necesarios para la formación de la hidrogenasa-3, *E. aerogenes* es capaz de producir bioH₂ en pequeñas cantidades por una vía diferente a la de formato, por lo que es necesario realizar más experimentos para determinar si la hidrogenasa-3 presente en estas bacterias por si sola es activada por un aumento en la concentración de NADH.

⁶Este valor no es comparable a los de este trabajo debido a que en sus medios de cultivo utilizaron triptona y extracto de levadura, los que se han descrito que aumentan los niveles de producción de H₂ [126, 127]

4.6 Utilización de hidrolizado de paja de trigo para la producción de bioH₂ con *E. aerogenes*.

4.6.1 Antecedentes par el uso de hidrolizado de paja de trigo para la producción de bioH₂ con *E. aerogenes*.

Como se explicó en la introducción el hidrógeno molecular es considerado el combustible del futuro que reemplazará a los de origen fósil debido a que es amigable con el medio ambiente, tiene una densidad energética mayor que cualquier otro combustible (142 KJ g⁻¹) y porque que su combustión produce sólo vapor de agua [128]. La producción de H₂ se lleva a cabo principalmente por el reformado de gas natural el cual es un proceso energéticamente demandante, no amigable con el medio ambiente y debido a que para su funcionamiento se utilizan combustibles de origen fósil, es una forma de producción no-renovable [12]. Por otro lado, se ha descrito que dentro de las formas de producción de H₂, la biológica es la más sustentable, limpia y ambientalmente amigable [16, 14]. El bioH₂ generado de esta forma puede ser producido por microorganismos tanto no-fotosintéticos como fotosintéticos, facultativos o anaerobios estrictos [129]. Dentro de esta forma de producción se encuentra la fermentación independiente de luz conocida como *dark fermentation* la cual es considerada la más económica y sustentable de dentro de esta categoría [130].

Dentro de los recursos renovables que pueden ser utilizados para la producción de bioH₂ se encuentra la biomasa. Este recurso es considerado una fuente primaria, virtualmente inagotable y ampliamente distribuido. Existen diferentes tipos de biomasa [94], dentro de esta se encuentra la biomasa lignocelulósica que últimamente ha recibido una creciente atención debido a que es una materia prima *carbono-neutral* para la producción de diferentes plataformas de energía [6, 7, 8, 131, 132] que sumado a un bajo costo, una amplia distribución y disponibilidad, hacen a esta biomasa una de las más atractivas para su utilización [16, 6]. Dentro de las biomásas lignocelulósicas se encuentra el desecho de la industria del trigo conocido como paja trigo, donde se ha descrito que para la obtención de un kilogramo de trigo se consiguen 1.3 - 1.4 kilos de paja de trigo con una producción mundial de 529 millones de toneladas/año [133].

La biomasa lignocelulósica consiste principalmente en hemicelulosa, celulosa y lignina [5]. El proceso para poder utilizar este tipo de biomasa y generar bioH₂ es un gran desafío debido a

su naturaleza intrincada y recalcitrante. Debido a lo anterior, son necesarios al menos tres pasos secuenciales para poder aprovechar esta biomasa: i) pretratamiento físico-químico, ii) hidrólisis enzimática y iii) fermentación anaeróbica. Existen diferentes tipos de pretratamientos cuyo objetivo principal es desbaratar, descomponer y disociar la organización de la lignina, incrementando el área superficial de la biomasa y su porosidad, junto con reducir la estructura cristalina de la celulosa y permitir un mejor acceso de enzimas capaces de degradar la celulosa (celulasas, hemicelulasas y proteínas auxiliares). Estas enzimas son las encargadas de llevar a cabo la segunda etapa, este proceso de hidrólisis enzimática libera los azúcares desde la celulosa dejándolos en solución. Finalmente, estos azúcares en solución son utilizados por microorganismos para la generación de bioH_2 .

Como se nombró anteriormente, existen diferentes tipos de pretratamientos donde destacan los físicos y los químicos. Entre los pretratamientos químicos, se encuentra la utilización de métodos básicos, ácidos, oxidativos entre otros [134]. Entre los pretratamientos con bases se destaca la utilización de NaOH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, KOH y $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Entre estos el hidróxido de sodio (NaOH) es una de las bases más populares, que ha sido utilizado tanto en la industria papelera como para el pretratamiento de paja de trigo en la producción de biogás [135, 136, 137] donde se ha descrito que el uso de 2% de NaOH es suficiente para pretratar de forma eficiente la paja de trigo [138]. Por otro lado, entre los pretratamientos oxidativos se encuentra el uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en condiciones básicas, donde se ha descrito diferentes condiciones de operación para obtener una biomasa eficientemente pretratada [139]. Junto con lo anterior, se ha demostrado que la utilización de estos pretratamientos sobre materiales lignocelulósicos genera diferentes productos secundarios tóxicos (como furfural o hidróxi-metil-furfural [HMF]) que pueden inhibir el crecimiento celular, causar daño al ADN, inhibir enzimas de la glicólisis y producir daños en la membrana celular [140, 141], además se ha descrito que la naturaleza de estos productos secundarios como su concentración dependen tanto del tipo de material lignocelulósico, del pretratamiento, así como de las condiciones de operación [142, 143].

Por otro lado, la paja de trigo ha sido utilizado para la generación de diferentes formas de energía, utilizando distintos pretratamientos, así por ejemplo se ha empleado para la producción de bioetanol con pretratamiento alcalino [138], una mezcla entre alcalino y ácido [133] y utilizando peróxido de hidrógeno [144, 145]. Para la producción de bioH_2 se ha utilizado paja de trigo pretratada con ácido y fermentada con estiércol de vaca [146]. Junto con lo anterior, este

material lignocelulósico ha sido utilizado dentro del concepto de biorefinería para la producción de hidrógeno, acetona, butanol y etanol partiendo de biomasa sin pretratamiento [147], o pretratado de forma hidrotérmica para la producción de etanol, hidrógeno y biogás [148]. Sin embargo poco se sabe del efecto que tienen el uso de pretratamientos básicos y de básicos con peróxido de hidrógeno sobre paja de trigo y su posterior utilización para la producción de hidrógeno. Junto con lo anterior, no hay información del uso de estos pretratamientos y su efecto en la cepa *E. aerogenes*.

De acuerdo a los antecedentes planteados anteriormente, se propuso como objetivo principal estudiar sobre el efecto que tienen los pretratamientos alcalino y alcalino con peróxido de hidrógeno sobre la paja de trigo y su posterior fermentación para la producción de hidrógeno con cultivos puros de *E. aerogenes* 2F.

La Figura 4.35 muestra una representación esquemática del procedimiento experimental utilizado para analizar el efecto que tiene cada pretratamiento y sus consecuencias en la producción de bioH₂.

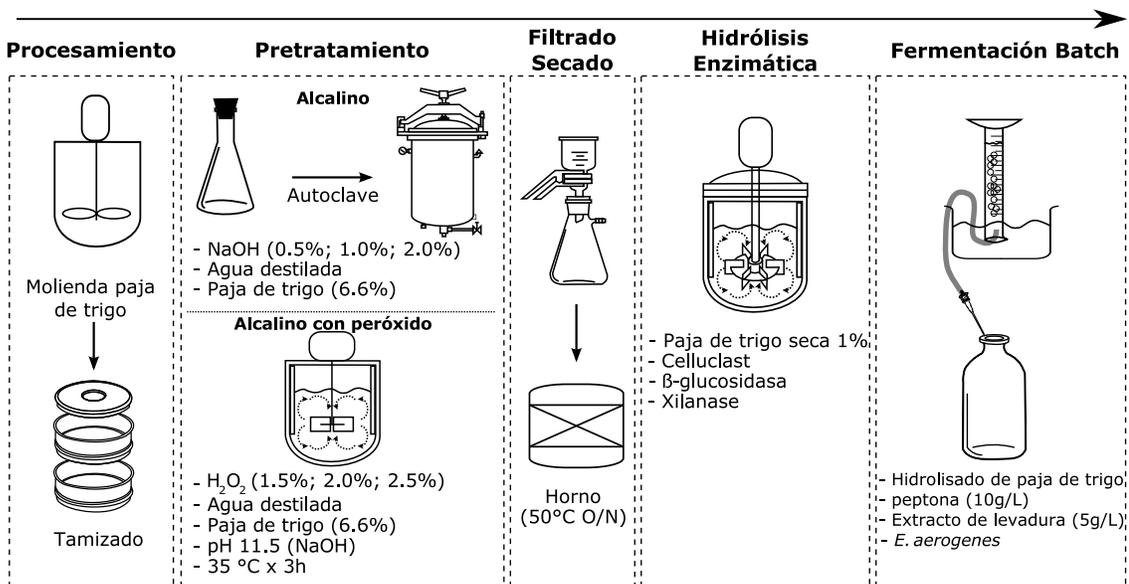


Figura 4.35: Representación gráfica del procedimiento experimental para obtener bioH₂ a partir de paja de trigo. En esta figura se muestra de manera secuencial (de izquierda a derecha) cada uno de los procesos comenzando con el procesamiento de molienda y tamizado para finalizar en la fermentación anaeróbica en modo *batch*. Cada proceso fue analizado para cuantificar y determinar el efecto en cada una de las etapas.

Efecto de los pretratamientos sobre la paja de trigo

La paja de trigo con un tamaño de partícula de $500\mu\text{m}$ fue sometida a dos tipos de pretratamientos diferentes, el primero correspondió a uno llevado a cabo bajo condiciones básicas utilizando NaOH a tres diferentes concentraciones finales (0.5 %, 1.0 % y 2.0 %) para luego ser autoclavado. El segundo pretratamiento correspondió a uno llevado a cabo en tres condiciones de estrés oxidativo en medio básico. El estrés oxidativo sobre la paja de trigo se logró agregando peróxido de hidrógeno a tres concentraciones diferentes (1.5 %, 2.0 % y 2.5 %) y ajustando el pH a 11.5. Para determinar y cuantificar los componentes que predominan antes y después de cada pretratamiento, se realizó una caracterización de la paja de trigo de acuerdo a los protocolos propuestos por NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) *Laboratory Analytical procedure* (LAP) [60]. Para esto, el contenido de azúcares y lignina en cada muestra fue analizada a través de HPLC. En la [Tabla 4.16](#) se muestra el efecto de ambos pretratamientos en función de la recuperación de azúcar y lignina y en la [Tabla 4.17](#) se muestra el porcentaje de recuperación de biomasa después del cada pretratamiento (etapa de filtrado y secado en la [Figura 4.35](#)).

Efecto en la cantidad azúcares

Azúcar total. En la [Tabla 4.16](#) se puede observar que los pretratamientos con 1.0 % y 2.0 % de NaOH muestran los mayores niveles de azúcares totales (sin mostrar entre ellos diferencias significativas), correspondientes a 85.0 % y 85.1 % de la masa total respectivamente. La siguiente concentración de azúcares totales más alta corresponde al pretratamiento con 0.5 % de NaOH con 75.5 % en masa. Los pretratamientos con H_2O_2 muestran los menores niveles de azúcares totales con 63.7 %, 58.7 % y 59.6 % en masa para las concentraciones de 1.5 %, 2.0 % y 2.5 % de H_2O_2 respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre ellos.

Glucosa y hemicelulosas Al analizar los azúcares por separado se puede ver que al aplicar el tratamiento alcalino con NaOH, la concentración de glucosa se incrementa conforme aumenta la concentración de NaOH. Este aumento en la concentración de glucosa se puede deber a que esta es menos susceptible a la degradación en este tipo de medios [149]. Por otro lado, con respecto a las hemicelulosas (xilosa y arabinosa) al aumentar la concentración de NaOH se advierte una disminución en su concentración asociada a pérdidas por reacciones de degradación que ocurren en este tipo de medios debido al *peeling reaction* [150] En el caso del pretratamiento con H_2O_2 ,

la concentración de 1.5 % muestra los mejores resultados para glucosa, obteniendo 47.4 % en masa de la paja de trigo pretratada, siendo esta diferencia significativamente diferente a las otras dos concentraciones utilizadas. La diferencia antes observada posiblemente se deba a una mejor degradación de la lignina al estar más cerca de la razón peróxido/biomasa ideal (0.22, 0.30 y 0.34 para las concentraciones 1.5 %, 2.0 % y 2.5 % respectivamente) [151].

Tabla 4.16: Composición porcentual de la paja de trigo antes y después del pretratamiento. Los valores se encuentran expresados como porcentajes del peso total.

Componente	Control	Pretratamientos					
		NaOH			H ₂ O ₂		
		0.5 %	1.0 %	2.0 %	1.5 %	2.0 %	2.5 %
Glucosa	32.0±0.0	45.1±0.0	52.7±1.9	57.7±0.6	47.4±0.9	43.7±2.0	43.7±1.5
Xilosa	13.9±0.3	27.1±0.1	29.3±1.2	24.9±0.2	13.5±1.4	12.2±1.4	13.1±0.3
Arabinosa	1.79±0.0	3.24±0.0	2.96±0.1	2.54±0.0	2.82±0.0	2.86±0.1	2.75±0.0
Lignina ácido Insoluble ^a	22.9±0.2	17.4±0.3	11.3±0.4	9.50±0.1	21.4±0.1	21.9±0.1	21.3±0.2
Lignina ácido Soluble ^b	2.46±0.0	0.74±0.1	0.55±0.1	0.51±0.0	1.27±0.1	1.24±0.1	1.29±0.0
Lignina Total ^c	25.4	18.1	11.8	10.0	22.7	23.1	22.6
Azúcar Total ^d	47.7±0.3	75.5±0.1	85.0±3.2	85.1±0.6	63.7±1.7	58.7±2.9	59.6±1.7

^a Ácido insoluble corresponde a la fracción de lignina que no se disolvió por el tratamiento ácido.

^b Ácido soluble corresponde a la fracción de lignina que fue disuelta por el tratamiento ácido.

^c Corresponde a la suma de lignina soluble e insoluble.

^d Corresponde a la suma de todos los azúcares determinados.

Efecto en la cantidad de lignina

En la [Tabla 4.16](#) se puede observar, que los dos pretratamientos muestran una disminución en la cantidad de lignina recuperada en comparación al control sin tratar ($P < 0.05$). Las menores concentraciones de lignina se observan en el pretratamiento alcalino con NaOH (0.5 %, 1.0 %, 2.0 %), donde se logran ligninas totales de 18.1 %, 11.8 % y 10 % del peso total respectivamente ($p < 0.05$), estos valores corresponden a pérdidas del 28.4 %, 53.4 % y 60.6 % de la lignina presente en la misma masa del control sin tratar. Por lo tanto, a mayor concentración de NaOH menos lignina se recupera, posiblemente debido a una mayor exposición de las fibras de celulosa [138]. Tomando en consideración la biomasa que se pierde durante el proceso ([Tabla 4.17](#)), las mediciones corresponden al 39.4 %, 19.9 % y 14.5 % de la lignina presente antes del pretratamiento

Tabla 4.17: Porcentaje de biomasa recuperada después del pretratamiento (etapa de filtrado y secado), de acuerdo a la cantidad de biomasa inicial. $n = 3$

Pretratamiento	Recuperación
NaOH	
0.5 %	55.1 %
1.0 %	42.8 %
2.0 %	36.7 %
H ₂ O ₂	
1.5 %	64.4 %
2.0 %	64.7 %
2.5 %	64.3 %

con NaOH al 0.5 %, 1.0 % y 2.0 % respectivamente.

Por otro lado, como se nombró anteriormente, en el pretratamiento alcalino con H₂O₂, se utilizaron tres concentraciones (1.5 %, 2.0 % y 2.5 %) para obtener razones de peróxido/biomasa cercanas o superiores a 0.25 en peso, para obtener de esta forma deslignificaciones eficientes [151]. En la [Tabla 4.16](#) se puede observar que las concentraciones estudiadas muestran valores relativamente altos de lignina similares al control ($P < 0.05$), estos valores correspondieron a 22.7 %, 23.1 % y 22.6 % para las concentraciones de H₂O₂ 1.5 %, 2.0 % y 2.5 % respectivamente. La cantidad de lignina hallada corresponde a pérdidas de 10.5 %, 8.9 % y 10.7 % comparando la misma masa del control sin tratar. Al analizar los resultados de estas concentraciones juntas no se aprecian diferencias significativas entre ellas. Por consiguiente, tomando en consideración la biomasa que se pierde durante el proceso ([Tabla 4.17](#)), implica que las concentraciones halladas [Tabla 4.16](#) corresponden al 57.6 %, 58.9 % y 57.4 % de lignina presente antes del pretratamiento con H₂O₂ para las concentraciones 1.5 %, 2.0 %, 2.5 %, respectivamente. Sin embargo, si bien con este pretratamiento se observan altas concentración de lignina, estos análisis no entrega información sobre el efecto que tiene el estrés oxidativo en la organización de la lignina, el cual se observa al realizar los experimentos de sacarificación y poner la paja de trigo en contacto con las enzimas hidrolíticas.

Sacarificación.

La liberación de azúcares fermentables, llevado a cabo en la etapa de la hidrólisis enzimática, es uno de los factores más importantes para determinar el éxito de un pretratamiento y su futura utilización. Con el objetivo de determinar el efecto de cada pretratamiento en la hidrólisis enzimática, las muestras fueron puestas en contacto con tres diferentes enzimas comerciales (celulasa, glucosidasa y xilanasas) (Figura 4.36). Durante la realización de la hidrólisis enzimática se tomaron muestras de manera constante para determinar y cuantificar la liberación de azúcares durante el proceso. Las muestras obtenidas fueron analizadas por HPLC para determinar y cuantificar su composición, de manera adicional se midió la cantidad de azúcares totales realizando un ensayo de DNS para determinar la cantidad total de extremos reductores. En la Figura 4.36 se observa el análisis realizado a las 74 horas de comenzada la hidrólisis (punto donde se detuvo el proceso debido a que una de las muestras había alcanzado el 100 % de conversión de azúcares). Como se puede observar en esta figura, el pretratamiento que libera mayor cantidad de azúcares es el alcalino y se advierte que a mayor concentración de NaOH se produce una mayor liberación de azúcar a los tiempos estudiados, logrando azúcares totales de 6.0, 8.0 y 8.7 mg mL⁻¹ para 0.5 %, 1.0 % y 2.0 % de NaOH respectivamente. Los porcentajes de conversión de azúcar experimental en comparación a la teórica corresponden al 79.9 %, 94.3 % y 100 % para el pretratamiento alcalino a 0.5 %, 1.0 % y 2.0 % de NaOH respectivamente. Los azúcares totales liberados desde la pajas de trigo tratada con H₂O₂ en medio alcalino, corresponden a 4.2, 4.0 y 4.2 mg mL⁻¹ para 1.5 %, 2.0 % y 2.5 % de H₂O₂ respectivamente. En comparación al azúcar teórica, los porcentajes de conversión corresponden a 61 %, 62.6 % y 65.2 % para las concentraciones de 1.5 %, 2.0 % y 2.5 % de H₂O₂ respectivamente.

Junto con determinar la cantidad total de azúcar, se determinó la naturaleza de estos. En la Figura 4.36 se puede observar que los azúcares que se encuentran en esta sacarificación corresponden a glucosa y xilosa, siendo glucosa la más abundante en cada pretratamiento. En relación a estos resultados, se ha descrito que la presencia de lignina en estos procesos actúa como una barrera que restringe el acceso de las enzimas a la celulosa [152], y por lo tanto, es de esperar que aquellos pretratamientos que generan mayor eliminación de lignina presenten una mayor hidrólisis enzimática, conjuntamente a una mayor liberación de azúcares. Lo anterior se observa en el pretratamiento alcalino con NaOH donde se obtiene una mayor eliminación de lignina (Figura 4.16).

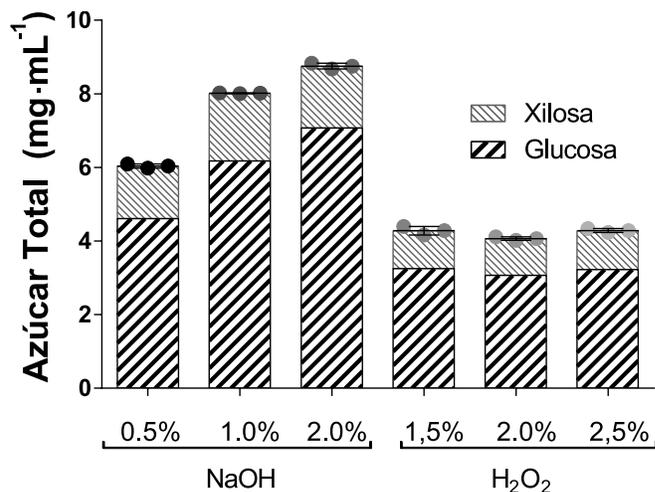


Figura 4.36: Hidrólisis enzimática de la paja de trigo. Se muestra la concentración de azúcares (mg mL^{-1}) y su abundancia a 74 horas de iniciada la hidrólisis para cada pretratamiento. Los círculos representan la dispersión de datos del experimento para la medición de azúcares totales.

Producción de bioH_2 a partir de hidrolizado de paja de trigo

Los experimentos fueron llevados a cabo en modo batch a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 16 horas, conteniendo 1% en masa de hidrolizado de paja trigo como sustrato. El pH fue ajustado al inicio de la fermentación a 6.3 unidades y no fue controlado durante el experimento. Los cultivos fueron monitoreados continuamente para cuantificar metabolitos finales y densidad celular. Por otro lado, el gas generado fue colectado y medido a través del sistema de desplazamiento de una columna de agua. La composición del gas generado se caracterizó en un cromatógrafo de gases de acuerdo a lo planteado en materiales y métodos.

En la [Figura 4.37](#) se puede observar la curva de crecimiento (OD_{600}), el gas generado por hora (mL h^{-1}) y la cantidad de bioH_2 ($\text{mmol H}_2 \text{ g}_{\text{Células}}^{-1}$). En esta figura se observa que en las fermentaciones realizadas con paja de trigo pretratada con NaOH se obtiene una mayor densidad celular en comparación al pretratamiento con H_2O_2 ($p < 0.05$), siendo las concentraciones de 1.0% y 2.0% de NaOH donde se logran las mayores densidades celulares, no existiendo diferencias significativas entre ellas. Por otro lado, las densidades celulares alcanzadas para cada una de las concentraciones probadas del pretratamiento con H_2O_2 no mostraron diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$). De estos resultados se puede desprender que el comportamiento en la densidad celular es consistente con la cantidad de azúcares presentes en las fermentaciones y es necesario analizar la presencia de inhibidores que estén influyendo en el crecimiento celular.

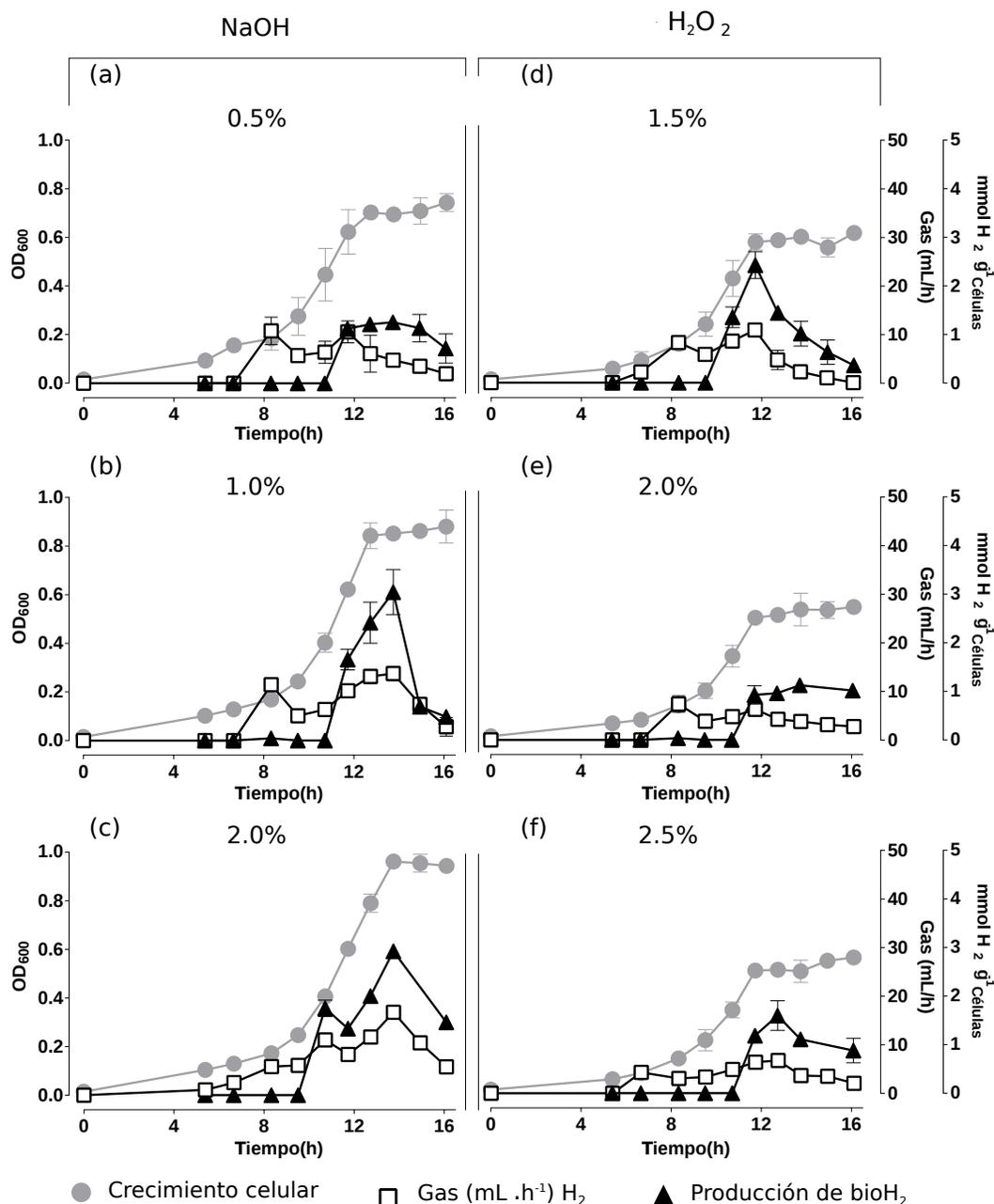


Figura 4.37: Efecto de los pretratamientos analizados en la producción de bioH₂. A la izquierda se encuentran los resultados para el pretratamiento alcalino y a la derecha para el pretratamiento con H₂O₂ alcalino. En la parte inferior se encuentra la nomenclatura utilizada.

La mayor producción de bioH₂ se obtiene en la fase logarítmica tardía o a principio de la fase estacionaria de crecimiento a partir de donde paulatinamente va disminuyendo, estos resultados

son consistentes con las fermentaciones realizadas en medio rico LB y medio mínimo suplementado con glucosa (datos no mostrados) y resultados en otras publicaciones [105]. En el caso de las fermentaciones utilizando paja de trigo pretratada con NaOH tanto las concentraciones 1.0 % y 2.0 % de NaOH exhiben la mayor producción de bioH₂ (3.06 y 2.97 mmol H₂ g⁻¹_{Células} por hora, respectivamente) no mostrando diferencias significativas entre ambos ($p < 0.05$). En el caso del pretratamiento con H₂O₂, la mayor producción de bioH₂ se observa en las fermentaciones llevadas a cabo con paja de trigo pretratada con 1,5 % de H₂O₂ (2.50 mmol H₂ g⁻¹_{Células} por hora), la producción en esta concentración es significativamente mayor que en las otras dos condiciones probadas de H₂O₂ ($p < 0.05$). La comparación de las producciones de bioH₂ entre los pretratamientos con mayor producción de bioH₂ (1.0 %, 2.0 % de NaOH y 1.5 % de H₂O₂), evidencia que entre estos valores no existe diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Como se nombró anteriormente, se ha visto que la presencia de productos secundarios generados durante el pretratamiento pueden tener diferentes efectos negativos en el proceso de fermentación, entre estos destacan la disminución del crecimiento celular, daño al ADN, inhibición de enzimas de la glicolisis y daños en la membrana [140, 141]. Para analizar la posibilidad de que la presencia de estas moléculas estuviese generando las diferencias observadas en las fermentaciones con el hidrolizado de las pajas de trigo, se buscó la presencia de furfural y 5-hidroxi-metil-furfural (HMF), los cuales derivan de la degradación de xilosa y glucosa respectivamente [153]. Las muestras fueron analizadas a través de HPLC mostrando resultados negativos para las moléculas buscadas, estos resultados posiblemente se deban a que las moléculas se encuentran fuera del rango de detección o por su metabolización a compuestos furfúricos menos tóxicos [154, 155]. Las hipótesis anteriores deberán ser probada, no obstante cabe destacar que se ha sugerido que algunas bacterias productoras de H₂ podrían ser más sensibles a estos productos secundarios que otros microorganismos [156], por lo que es posible que la presencia en concentraciones traza genere la diferencias encontradas. Por otro lado, se ha visto que en presencia de estos inhibidores las bacterias son capaces de degradar la fuente de carbono del medio para producir otros productos como lactato, etanol y propionato en perjuicio de la vía de producción de bioH₂ [157, 158, 159, 160]. Para analizar esta posibilidad se analizaron las concentraciones de metabolitos secundarios generados en las fermentaciones realizadas anteriormente.

Análisis de productos metabólicos secundarios en las fermentaciones con hidrolizado de paja de trigo

Para analizar el estado fisiológico que tenían las bacterias en las fermentaciones con el hidrolizado de paja de trigo, se tomaron alícuotas de los cultivos y se analizaron por HPLC para la detección y cuantificación de productos metabólicos secundarios. Los resultados de este análisis se muestran en la [Tabla 4.18](#), expresados como la concentración de metabolitos (mM) encontrados al final de la fermentación. Por otro lado, en la [Figura 4.38](#) se muestra un gráfico de los principales metabolitos desde que comienza el proceso de producción de bioH₂ (flechas horizontales), indicando además el punto de mayor producción de bioH₂ (flechas verticales).

En relación al comportamiento de *E. aerogenes* 2F en los hidrolizados provenientes de la paja de trigo pretratada con NaOH, la producción de succinato es similar en las tres concentraciones utilizadas y no muestran diferencias estadísticamente significativas. Este comportamiento también se observó en los cultivos bacterianos cultivados con hidrolizados provenientes del pretratamiento con H₂O₂ ($P < 0.05$).

En relación a la producción de lactato, al final de la fermentación, no se observa diferencias entre los hidrolizados de paja de trigo pretratadas con las tres concentraciones de NaOH ([Tabla 4.18](#), $P < 0.05$). Durante la fermentación en este medio, el lactato aumenta conforme avanza la fermentación con una leve acentuación durante la producción de bioH₂, en este punto los pretratamientos con 1% y 2% de NaOH son los que muestran mayores niveles producción de lactato ($P < 0.05$) ([Figura 4.38](#)), sin embargo estas diferencias se acortan al final de la fermentación y como se nombró anteriormente, las tres concentraciones de NaOH utilizadas muestran valores de lactato similares ([Tabla 4.18](#)). Por otro lado, con respecto a los resultados obtenidos los hidrolizados provenientes del pretratamiento con H₂O₂, se observa una mayor abundancia de lactato con el pretratamiento de 1.5% en comparación a 2% y 2.5% de H₂O₂ ($p < 0.05$) ([Tabla 4.18](#)). Durante el proceso fermentativo, en cambio, con el hidrolizado que se logra mayor producción de lactato (durante el punto de mayor producción de bioH₂), es el de 2.5% de H₂O₂ ([Figura 4.38](#)), por lo que la mayor acumulación de lactato observado en la [Tabla 4.18](#) se debe a que este se produce en tiempos más tempranos de la fermentación anaeróbica.

En el caso del formato, este presenta el comportamiento visto en otras fermentaciones donde inicialmente se acumula para luego empezar a ser consumido, lo que conlleva un aumento en la producción de bioH₂ y un cambio en el pH (datos no mostrados). Los resultados muestran que

realizando fermentaciones con paja de trigo pretratada con 2% NaOH se acumula más formato (Tabla 4.18) el cual puede estar disponible para la generación de bioH₂. Sin embargo, se observa en este pretratamiento que las bacterias consumen menos formato en comparación a las otras dos concentraciones de NaOH utilizadas. Este efecto se observa en el punto de mayor producción de bioH₂ (flechas verticales en la Figura 4.38) es por esta razón que se logra una mayor concentración final de formato (Tabla 4.18). Las condiciones que permiten a *E. aerogenes* consumir más formato son 1% seguido de 0.5% de NaOH. Estos resultados sugieren que las fermentaciones realizadas con hidrolizados de paja de trigo pretratada con 2% de NaOH se promueve la producción de bioH₂ por una vía diferente a la de formato, debido a que por unidad de peso seco de bacterias se genera la misma cantidad de bioH₂ tanto con el pretratamiento de 1% y 2% de NaOH (Figura 4.37 $P < 0.05$).

Tabla 4.18: Productos metabólicos finales de la fermentación con paja de trigo para cada uno de los pretratamientos.

Pretratamiento	Metabolito (mM)					
	Succinato	Lactato	Formato	Acetato	Propionato	Isobutirato
NaOH [%]						
0.5	0.49±0.04	2.64±0.07	1.72±0.06	1.80±0.06	3.40±0.3	1.40±0.19
1.0	0.48±0.02	2.75±0.00	1.79±0.17	1.74±0.01	3.53±0.12	1.59±0.15
2.0	0.47±0.03	2.64±0.07	2.05±0.27	1.64±0.07	3.09±0.05	1.80±0.04
H₂O₂ [%]						
1.5	0.48±0.01	2.46±0.00	1.55±0.00	1.77±0.00	4.49±0.00	1.76±0.00
2.0	0.46±0.02	2.16±0.12	1.52±0.02	1.44±0.01	3.42±0.00	1.91±0.30
2.5	0.49±0.01	2.18±0.09	1.90±0.04	1.72±0.02	3.32±0.04	1.85±0.16

Por otro lado, al analizar el formato generado en las fermentaciones con los pretratamientos con H₂O₂, se puede ver que con 2.5% de H₂O₂ se produce una mayor abundancia de este metabolito en comparación a las otras dos concentraciones (Tabla 4.18, $p < 0.05$). Junto con lo anterior, en esta concentración se produce el mayor consumo de formato durante la producción de bioH₂ en comparación a las otras dos concentraciones que sin embargo no se ve reflejado en una mayor producción de bioH₂, debido a que la mayor producción por unidad de masa de células se logra con los hidrolizados tratados con 1.5% de H₂O₂ (Figura 4.37). Estos resultados sugieren

que en las fermentaciones llevadas a cabo con la paja de trigo pretratada con 1.5 % de H_2O_2 se promueve en mayor medida la producción de $bioH_2$ por una vía diferente a la vía del formato.

En relación a la abundancia de acetato para los experimentos realizados con el hidrolizado proveniente del pretratamiento con NaOH, se observa en la [Tabla 4.18](#) que las tres concentraciones usadas logran abundancias similares ($p < 0.05$) y además se observa en la [Figura 4.38](#) que durante el desarrollo de la fermentación el acetato acumulado es consumido en el periodo de producción de $bioH_2$. Al comparar las tres concentraciones de NaOH empleadas, El mayor consumo de este metabolito se logra en las fermentaciones realizadas con los pretratamientos de 1 % y 2 % de NaOH ($p < 0.05$). Por otro lado, para el caso de las fermentaciones llevadas a cabo con paja de trigo pretratada con H_2O_2 , tanto la biomasa expuesta a 1.5 % como con 2.5 % de H_2O_2 muestran las mayores abundancia de acetato en comparación al 2 % ($p < 0.05$). Al igual que lo sucedido con el pretratamiento de NaOH, al comenzar a generar el $bioH_2$, el acetato se comienza a consumir. Los resultados obtenidos con el uso de hidrolizado de paja de trigo con ambos pretratamientos muestran que el acetato se empieza a consumir en etapa logarítmica tardía y estacionaria, posiblemente debido a que a estos tiempos de crecimiento celular se consumió todo el azúcar presente en el medio de cultivo y es necesario realizar un *switch* metabólico para comenzar el consumo de acetato [161], consiguiendo de esta forma obtener energía de mantenimiento aun en etapa estacionaria, permitiendo la obtención de $bioH_2$ sin crecimiento celular asociado.

En cuanto a la producción de propionato, tanto 0.5 % como 1 % de NaOH exhiben mayor concentración en comparación al 2 % de NaOH ($p < 0.05$). En relación al comportamiento presentado durante la fermentación, el propionato se acumula paulatinamente mientras se genera $bioH_2$. Junto con lo anterior, en la [Figura 4.38](#) se puede apreciar que para las fermentaciones realizadas con biomasa pretratada con NaOH (1.0 % y 2.0 %), en el punto de mayor producción de $bioH_2$ (flechas verticales) se logra un máximo de generación de propionato, en cambio con 0.5 % de NaOH el máximo de propionato se logra en el momento en que se comienza a generar $bioH_2$. Por otro lado, en los experimentos realizados con H_2O_2 , se observa que con la concentración de 1.5 % de H_2O_2 se logra una abundancia de propionato mayor en comparación a las otras dos concentraciones ($p < 0.05$). Si bien la acumulación de propionato es importante durante la etapa de producción de $bioH_2$, este se acumula durante toda la curva de crecimiento. Cabe destacar que luego de alcanzar la máxima producción de propionato se observa paralelamente una correspondiente reducción en la producción de $bioH_2$. Estos resultados concuerdan con previos

reportes donde se ha descrito que la producción de propionato se relaciona con un efecto adverso en la generación de bioH_2 [158, 162] o donde baja producción de propionato se relaciona con una mayor producción de bioH_2 [163].

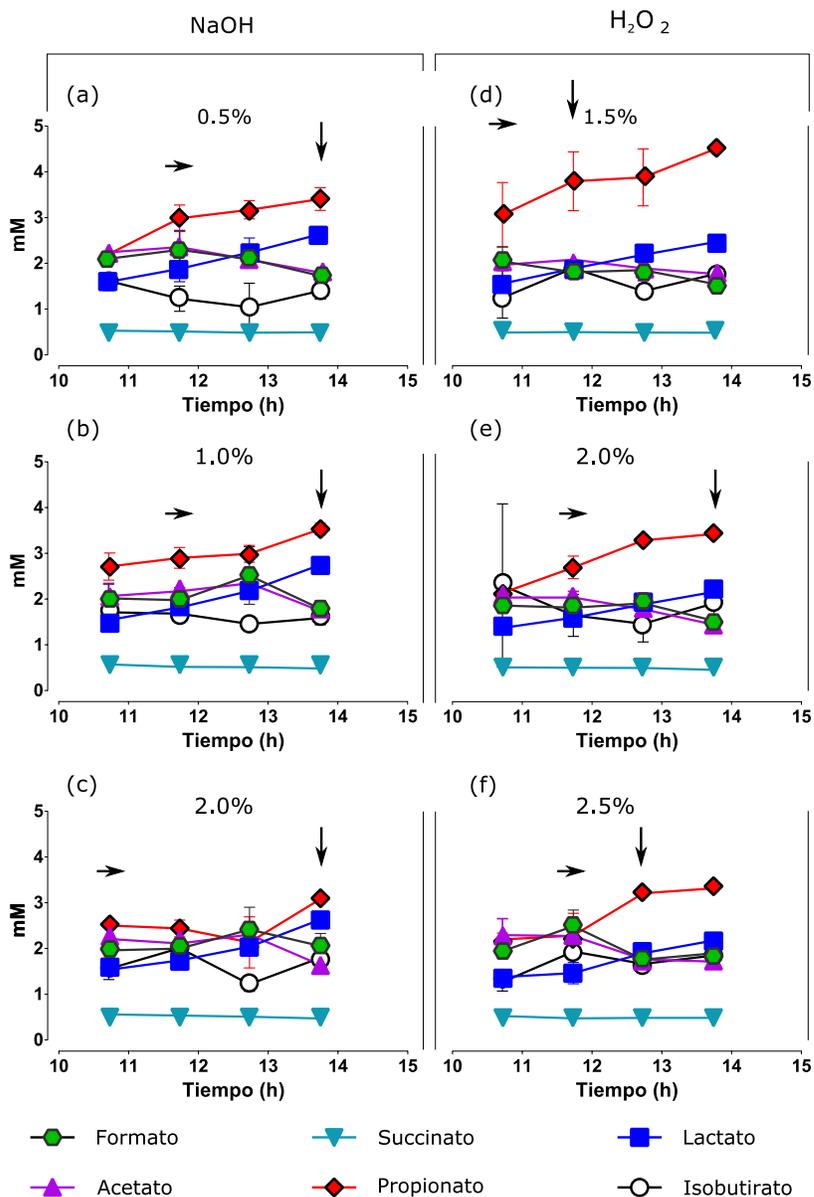


Figura 4.38: Efecto de los pretratamientos analizados en los metabolitos presentes en la fermentación anaeróbica con hidrolizado de paja de trigo. A la izquierda se encuentran los resultados para el pretratamiento alcalino y a la derecha para el pretratamiento con H_2O_2 alcalino. En la parte inferior se encuentra la nomenclatura utilizada. La flecha horizontal simboliza el inicio de la detección de bioH_2 , por otro lado, la flecha vertical indica el punto de mayor producción de bioH_2 .

En relación a la producción de isobutirato, este presenta un comportamiento similar en todas las fermentaciones independiente del tipo de sustrato utilizado y se consume durante la fase logarítmica, para luego acumularse en la fase estacionaria. En el caso del pretratamiento alcalino se logra una mayor concentración con 2 % de NaOH. Por otro lado, para el pretratamiento con H₂O₂ la concentración de isobutirato es similar para todas las concentraciones usadas ($p < 0.05$).

Por último se analizó la presencia de etanol (Tabla 4.19). Para esto se realizó el análisis en la producción volumétrica o productividad de etanol ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$). En esta tabla se observa que con el uso de hidrolizado de paja de trigo pretratado con 1.0 % y 2.0 % de NaOH se obtienen valores de 0.20 ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) para las dos concentraciones de NaOH (sin diferencias entre ellos, $P < 0.05$), siendo estos valores además, estadísticamente diferentes a los obtenidos con paja de trigo pretratada con 0.5 % de NaOH. En cuanto a la productividad volumétrica obtenida con el pretratamiento con H₂O₂, se observa que con 1.5 % de H₂O₂ se obtienen los mayores valores ($0.15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y que entre 2.0 % y 2.5 % de H₂O₂ no existen diferencias significativas con valores de 0.10 y $0.08 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente.

Las productividades de etanol obtenidas en este trabajo, utilizando *E. aerogenes* 2F, presentan valores similares a otras publicaciones donde también utilizan hidrolizado de paja de trigo como sustrato para la producción de etanol, pero utilizando microorganismos y pretratamientos diferentes. Así por ejemplo con el uso de bacterias (*Thermoanaerobacter* BG1L1) y *wet-oxidation* como pretratamiento se obtienen $0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [164]. Junto con lo anterior, la utilización de levaduras en la fermentación aumenta la productividad a 0.25 utilizando pretratamiento biológico con *Trichoderma viride* y *Pachysolen tannophylus* para la fermentación [165]. Nigam, 2001 [166] obtuvo $0.27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ utilizando un pretratamiento ácido seguido de uno alcalino para luego fermentar con *Pichia stipitis*. Por otro lado, con la utilización de un pretratamiento hidrotermal y *S. cerevisiae* para la fermentación se pueden obtener $1.16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [167].

En la Tabla 4.19 también se muestran dos diferentes tipos de unidades para representar la producción de H₂ para cada uno de los pretratamientos analizados. La primera corresponde al volumen de H₂ que se genera por gramo de paja de trigo en un litro de cultivo ($\text{mL H}_2 \text{ g}_{\text{Paja-trigo}}^{-1} \text{ L}^{-1}$). Al analizar los resultados utilizando este tipo de unidad se observa que la utilización de paja de trigo proveniente del pretratamiento con NaOH genera el mayor volumen de H₂. Entre estos pretratamientos el uso de 1.0 % y 2.0 % de NaOH ayudan a obtener los mayores valores, con 190.63 y 211.69 $\text{mL H}_2 \text{ g}_{\text{Paja-trigo}}^{-1} \text{ L}^{-1}$ sin mostrar diferencias significativas entre ellos ($P <$

Tabla 4.19: Producción de etanol de la fermentación con paja de trigo para cada uno de los pretratamientos. En esta tabla se muestra la tasa de producción volumétrica o productividad de etanol, este valor fue calculado tomando la mayor concentración en la producción de etanol en un intervalo de tiempo.

Pretratamiento	Producción		
	Etanol (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Producción de hidrógeno (mL H ₂ g ⁻¹ _{Paja-trigo} L ⁻¹) (mmol H ₂ h ⁻¹ L ⁻¹)	
NaOH [%]			
0.5	0.12±0.02	106.83±9.46	0.051±0.002
1.0	0.20±0.02	190.63±6.82	0.151±0.021
2.0	0.20±0.00	211.69±5.74	0.166±0.004
H ₂ O ₂ [%]			
1.5	0.15±0.02	97.20±3.64	0.081±0.005
2.0	0.10±0.01	72.01±0.09	0.035±0.004
2.5	0.08±0.00	69.97±2.14	0.047±0.008

0.05). Junto con lo anterior con el uso de 0.5 % de NaOH se obtienen volúmenes de H₂ similares a los que se logran con el pretratamiento de 1.5 % de H₂O₂, los que corresponden a 106.83 y 97.20 mL H₂ g⁻¹_{Paja-trigo} L⁻¹ respectivamente (P < 0.05). Por otro lado, con la utilización de paja de trigo pretratada con 2.0 % y 2.5 % de H₂O₂ se obtienen los menores volúmenes de H₂ con 72.01 y 69.97 mL H₂ g⁻¹_{Paja-trigo} L⁻¹ respectivamente. Los resultados que se obtienen con la utilización de paja de trigo con cada uno de los pretratamientos y la posterior fermentación con *E. aerogenes* 2F derivan en volúmenes de H₂ mayores que otros trabajos que también utilizan paja de trigo como sustrato para la producción de H₂. *Zelun Zhi y Hui Wang* (2014) [168] utilizan pretratamiento biológico con hidrólisis y fermentación simultánea con *Clostridium perfringens* para la producción de H₂ y obtienen 78.5 mL H₂ g⁻¹_{Paja-trigo} L⁻¹. Nima Nasirian (2011) [169] lograron 141 mL H₂ g⁻¹_{Paja-trigo} L⁻¹ utilizando pretratamiento ácido seguido de hidrólisis y fermentación simultánea con una mezcla de microorganismos.

La segunda forma de mostrar la producción de H₂ corresponde a los mmol de H₂ que se generan en un litro de cultivo en una hora (mmol H₂ h⁻¹ L⁻¹). En la [Tabla 4.19](#) se muestra el mejor de los rendimientos para cada uno de los pretratamientos. En estos resultados se observa

un comportamiento similar a lo encontrado anteriormente, los mejores rendimientos por hora se obtienen con 1.0 % y 2.0 % de NaOH correspondiente a 0.151 y 0.166 $\text{mmol H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ (sin diferencias significativas, $P < 0.05$). junto con lo anterior, con la utilización de paja de trigo pretratada con 0.5 % de NaOH para la fermentación se logran 0.051 $\text{H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$, este valor no muestra diferencias significativas con los valores que se obtienen con los pretratamientos con H_2O_2 que corresponden a 0.081, 0.035 y 0.047 $\text{H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ para las concentraciones de 1.5 %, 2.0 % y 2.5 % respectivamente. Al comparar los resultados de este trabajo con otros que también utilizan hidrolizados de paja de trigo como sustrato para las fermentaciones, se puede mencionar que con la utilización de hidrólisis y fermentación simultánea empleando bacterias termofílicas se obtiene una tasa de producción de 0.11 $\text{mmol H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ [105].

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Sólo la hidrogenasa-3 de las [Ni-Fe]-hidrogenasas se encuentra presente en la cepa *E. aerogenes*.
- Existe producción de bioH₂ por una vía diferente a la vía de formato (formato independiente) que no guarda dependencia con aumento intracelular de NADH.
- La hidrogenasa-3 (Hyd-3) de las [Ni-Fe]-hidrogenasas es responsable de la mayor producción de bioH₂.
- Los resultados sugieren una relación no descrita hasta el momento entre NADH y el complejo proteico Hyd-3 (formato dependiente).
- Las modificaciones genéticas activan las vías anapleróticas para restaurar el balance *redox*, lo que se traduce en una mayor producción de succinato y un incremento de acetato y etanol.
- Las mayores producciones de bioH₂ se logran con el uso de hidrolizados de paja de trigo provenientes de los pretratamiento con 1.0 % y 2.0 % de NaOH y 1.5 % de H₂O₂.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ENERDATA. World Energy Statistics | World Energy Consumption & Stats, 2014.
- [2] A. Seal and C. Vasudevan. Climate change and child health. *Archives of Disease in Childhood*, 96:1162–1166, 2011.
- [3] J. O M Bockris. The origin of ideas on a Hydrogen Economy and its solution to the decay of the environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:731–740, 2002.
- [4] E. Ministerio. Ministerio de Energía de Chile - Energía 2050. available at http://www.energia2050.cl/uploads/libros/libro_energia_2050.pdf, 2015.
- [5] Shijie Liu, Houfang Lu, Ruofei Hu, Alan Shupe, Lu Lin, and Bin Liang. A sustainable woody biomass biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30:785–810, 2012.
- [6] C O Tuck, E Perez, I T Horvath, R a. Sheldon, and M Poliakoff. Valorization of Biomass: Deriving More Value from Waste. *Science*, 337:695–699, 2012.
- [7] B E Logan and K Rabaey. Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies. *Science*, 337:686–690, 2012.
- [8] G. C. Premier, J. R. Kim, J. Massanet-Nicolau, G. Kyazze, S. R R Esteves, B. K V Penu-mathsa, J. Rodríguez, J. Maddy, R. M. Dinsdale, and a. J. Guwy. Integration of biohydrogen, biomethane and bioelectrochemical systems. *Renewable Energy*, 49:188–192, 2013.
- [9] H.S. Lee, M.B. Salerno, and B.E. Rittmann. Thermodynamic evaluation on H₂ production in glucose fermentation. *Environmental Science and Technology*, 42:2401–2407, 2008.
- [10] a. J. Guwy, R. M. Dinsdale, J. R. Kim, J. Massanet-Nicolau, and G. Premier. Fermentative biohydrogen production systems integration. *Bioresource Technology*, 102:8534–8542, 2011.

- [11] Enis Örüçü, Mustafa Karakaya, Ahmet K Avci, and Z Ilse Önsan. Investigation of ethanol conversion for hydrogen fuel cells using computer simulations. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80:1103–1110, oct 2005.
- [12] U.S. Department of Energy. Hydrogen and Fuel Cells. In *Hydrogen and Fuel Cells*, chapter Chapter 2, pages 2009–2010. U.S. Department of Energy, 2010.
- [13] J.D. Holladay, J. Hu, D.L. King, and Y. Wang. An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today*, 139:244–260, jan 2009.
- [14] D Das and T.N. Veziroglu. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26:13–28, jan 2001.
- [15] Elif Kirtay. Recent advances in production of hydrogen from biomass. *Energy Conversion and Management*, 52:1778–1789, apr 2011.
- [16] Ayhan Demirbas. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49:2106–2116, 2008.
- [17] David B. Levin, Lawrence Pitt, and Murray Love. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:173–185, 2004.
- [18] Chong Zhang, Feng Xiang Lv, and Xin Hui Xing. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 102:8344–8349, 2011.
- [19] Péter Bakonyi, Nándor Nemestóthy, and Katalin Bélafi-Bakó. Comparative Study of Various *E. coli* Strains for Biohydrogen Production Applying Response Surface Methodology. *The Scientific World Journal*, 2012:1–7, 2012.
- [20] Marjory Stephenson and Leonard Hubert Stickland. Hydrogenase. II. The reduction of sulfate to sulphide by molecular hydrogen. *Biochem. J.*, 25:215–220, 1931.
- [21] M Stephenson and Leonard Hubert Stickland. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *The Biochemical journal*, 25:205–214, 1931.

- [22] Paulette M. Vignais and Bernard Billoud. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chemical Reviews*, 107:4206–4272, 2007.
- [23] D G Lindmark and M Müller. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 248:7724–8, nov 1973.
- [24] Roberto Danovaro, Antonio Dell'Anno, Antonio Pusceddu, Cristina Gambi, Iben Heiner, and Reinhardt Møbjerg Kristensen. The first metazoa living in permanently anoxic conditions. *BMC Biology*, 8:30, 2010.
- [25] Paulette M Vignais, Bernard Billoud, and Jacques Meyer. Classification and phylogeny of hydrogenases 1. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 2001.
- [26] Philippe Constant, Soumitra Paul Chowdhury, Laura Hesse, Jennifer Pratscher, and Ralf Conrad. Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H₂-oxidizing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 77:6027–35, sep 2011.
- [27] Yvain Nicolet, Christine Cavazza, and J C Fontecilla-Camps. Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *Journal of inorganic biochemistry*, 91:1–8, jul 2002.
- [28] Brant K J Pohorelic, Johanna K Voordouw, Elisabeth Lojou, Alain Dolla, Jens Harder, and Gerrit Voordouw. Effects of deletion of genes encoding Fe-only hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough on hydrogen and lactate metabolism. *Journal of bacteriology*, 184:679–86, feb 2002.
- [29] M W Adams. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochimica et biophysica acta*, 1020:115–45, nov 1990.
- [30] J. Mishra, N. Kumar, a. K. Ghosh, and D. Das. Isolation and molecular characterization of hydrogenase gene from a high rate of hydrogen-producing bacterial strain *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:1475–1479, 2002.
- [31] Kaushik Nath, Anish Kumar, and Debabrata Das. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. *Canadian journal of microbiology*, 52:525–32, jun 2006.

- [32] Jong Hwan Shin, Jong Hyun Yoon, Eun Kyoung Ahn, Mi Sun Kim, Sang Jun Sim, and Tai Hyun Park. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:192–199, 2007.
- [33] S. Tanisho, N. Wakao, and Y. Kosako. Biological hydrogen-production by *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 16:529–530, 1983.
- [34] Tanisho S. A strategy for improving the yield of hydrogen by fermentation. *Hydrogen Energy Progress XIII, Vols 1 - 2, Proceedings*, pages 370–375, 2000.
- [35] Y Nakashimada, M a. Rachman, T Kakizono, and N Nishio. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:1399–1405, 2002.
- [36] H Giamarellou. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11 Suppl 4:1–16, jul 2005.
- [37] Fida A Khan. Meningitis due to *Enterobacter aerogenes* subsequent to resection of an acoustic neuroma and abdominal fat graft to the mastoid. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 8:386–8, oct 2004.
- [38] Kanokhathai Buranasilp and Jittima Charoenpanich. Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand. *Journal of Environmental Sciences*, 23:396–403, 2011.
- [39] Jinmi Han, Dohoon Lee, Jinku Cho, Jeewon Lee, and Sangyong Kim. Hydrogen production from biodiesel byproduct by immobilized *Enterobacter aerogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35:151–157, 2012.
- [40] Moo Young Jung, Bu Soo Park, Jinwon Lee, and Min Kyu Oh. Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. *Bioresource Technology*, 139:21–27, 2013.

- [41] Sang Jun Lee, Sung Bong Kim, Seong Woo Kang, Sung Ok Han, Chulhwan Park, and Seung Wook Kim. Effect of crude glycerol-derived inhibitors on ethanol production by *Enterobacter aerogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35:85–92, 2012.
- [42] a. P. Das, L. B. Sukla, N. Pradhan, and S. Nayak. Manganese biomining: A review. *Bioresource Technology*, 102:7381–7387, 2011.
- [43] Tanisho S. Hydrogen production by facultative anaerobe *Enterobacter aerogenes*. *Biohydrogen*, pages 273–279, 1998.
- [44] Viviana Sanchez-Torres, Toshinari Maeda, and Thomas K Wood. Protein engineering of the transcriptional activator FhlA to enhance hydrogen production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:5639–5646, 2009.
- [45] M Sauter, R Böhm, and A Böck. Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 6:1523–32, jun 1992.
- [46] Hongxin Zhao, Kun Ma, Yuan Lu, Chong Zhang, Liyan Wang, and Xin Hui Xing. Cloning and knockout of formate hydrogen lyase and H₂-uptake hydrogenase genes in *Enterobacter aerogenes* for enhanced hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:186–194, 2009.
- [47] Yuan Lu, Hongxin Zhao, Chong Zhang, Qiheng Lai, and Xin Hui Xing. Perturbation of formate pathway for hydrogen production by expressions of formate hydrogen lyase and its transcriptional activator in wild *Enterobacter aerogenes* and its mutants. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:5072–5079, 2009.
- [48] Tatsuo Kurokawa and Shigeharu Tanisho. Effects of formate on fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Marine Biotechnology*, 7:112–118, 2005.
- [49] Chong Zhang, Kun Ma, and Xin Hui Xing. Regulation of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD⁺. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:1226–1232, 2009.
- [50] Yuan Lu, Hongxin Zhao, Chong Zhang, Qiheng Lai, Xi Wu, and Xin Hui Xing. Alteration of hydrogen metabolism of *ldh*-deleted *Enterobacter aerogenes* by overexpression of NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86:255–262, 2010.

- [51] Yuan Lu, Chong Zhang, Qiheng Lai, Hongxin Zhao, and Xin Hui Xing. Improved hydrogen production under microaerophilic conditions by overexpression of polyphosphate kinase in *Enterobacter aerogenes*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48:187–192, 2011.
- [52] Jeffrey D Orth, Ines Thiele, and Bernhard Ø Palsson. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 28:245–248, 2010.
- [53] K a Datsenko and B L Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:6640–6645, 2000.
- [54] C S Toro, G C Mora, and N Figueroa-Bossi. Gene transfer between related bacteria by electrotransformation: mapping *Salmonella typhi* genes in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 180:4750–2, sep 1998.
- [55] BLAST. Basic local alignment search tool (BLAST).
- [56] Sang Heum Shin, Sewhan Kim, Jae Young Kim, Soojin Lee, Youngsoon Um, Min Kyu Oh, Young Rok Kim, Jinwon Lee, and Kap Seok Yang. Complete genome sequence of *enterobacter aerogenes* KCTC 2190. *Journal of Bacteriology*, 194:2373–2374, 2012.
- [57] S F Altschul, T L Madden, A A Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, and D J Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25:3389–402, sep 1997.
- [58] E Michael Gertz, Yi-kuo Yu, Richa Agarwala, Alejandro A Schäffer, and Stephen F Altschul. Composition-based statistics and translated nucleotide searches : Improving the TBLASTN module of BLAST. *BMC Biology*, 14:1–14, 2006.
- [59] Toshiyuki Oda, Lim Kyungtaek, and Kentaro Tomii. Simple adjustment of the sequence weight algorithm remarkably enhances PSI-BLAST performance. *BMC bioinformatics2*, 288, 2017.
- [60] Amie Sluiter, Bonnie Hames, Raymond O Ruiz, Christopher Scarlata, Justin Sluiter, David Templeton, and Department of Energy. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure*, 2011:1–14, 2004.

- [61] Reductor Cadmium Detns, Silver Taken, Fisher Scientific Co, Frederick Smith, Chemical Co, and Fisher Titrim. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426–428, 1959.
- [62] Peter D. Karp, Suzanne M. Paley, Markus Krummenacker, Mario Latendresse, Joseph M. Dale, Thomas J. Lee, Pallavi Kaipa, Fred Gilham, Aaron Spaulding, Liviu Popescu, Tomer Altman, Ian Paulsen, Ingrid M. Keseler, and Ron Caspi. Pathway Tools version 13.0: Integrated software for pathway/genome informatics and systems biology. *Briefings in Bioinformatics*, 11:40–79, 2009.
- [63] Joseph M Dale, Liviu Popescu, and Peter D Karp. Machine learning methods for metabolic pathway prediction. *BMC bioinformatics*, 11:15, 2010.
- [64] Ron Caspi, Tomer Altman, Richard Billington, Kate Dreher, Hartmut Foerster, Carol a. Fulcher, Timothy a. Holland, Ingrid M Keseler, Anamika Kothari, Aya Kubo, Markus Krummenacker, Mario Latendresse, Lukas a. Mueller, Quang Ong, Suzanne Paley, Pallavi Subhraveti, Daniel S Weaver, Deepika Weerasinghe, Peifen Zhang, and Peter D Karp. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research*, 42:623–631, 2014.
- [65] Ron Caspi, Richard Billington, Luciana Ferrer, Hartmut Foerster, Carol A Fulcher, Ingrid M Keseler, Anamika Kothari, Markus Krummenacker, Mario Latendresse, Lukas A Mueller, Quang Ong, Suzanne Paley, Pallavi Subhraveti, Daniel S Weaver, and Peter D Karp. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic acids research*, 44:D471–80, jan 2016.
- [66] James Bailey and David Ollis. *Biochemical engineering fundamentals*. second edition, 1986.
- [67] Gönül Vardar-Schara, Toshinari Maeda, and Thomas K Wood. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial biotechnology*, 1:107–25, mar 2008.
- [68] Toshinari Maeda, Viviana Sanchez-Torres, and Thomas K. Wood. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microbial Biotechnology*, 1:30–39, 2008.
- [69] M Chippaux, M C Pascal, and F Casse. Formate hydrogenlyase system in Salmonella typhimurium LT2. *European journal of biochemistry / FEBS*, 72:149–55, jan 1977.

- [70] G Schön and H Voelskow. Pyruvate fermentation in *Rhodospirillum rubrum* and after transfer from aerobic to anaerobic conditions in the dark. *Archives of microbiology*, 107:87–92, feb 1976.
- [71] S F Baron and J G Ferry. Reconstitution and properties of a coenzyme F420-mediated formate hydrogenlyase system in *Methanobacterium formicicum*. *Journal of bacteriology*, 171:3854–9, jul 1989.
- [72] J D Thompson, D G Higgins, and T J Gibson. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22:4673–80, nov 1994.
- [73] A Volbeda, M H Charon, C Piras, E C Hatchikian, M Frey, and J C Fontecilla-Camps. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 373:580–7, feb 1995.
- [74] A J Pierik, W Roseboom, R P Happe, K A Bagley, and S P Albracht. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂. *The Journal of biological chemistry*, 274:3331–7, feb 1999.
- [75] Yuan Lu, Hongxin Zhao, Chong Zhang, Qiheng Lai, Xi Wu, and Xin Hui Xing. Expression of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase in *Enterobacter aerogenes* and its involvement in anaerobic metabolism and H₂ production. *Biotechnology Letters*, 31:1525–1530, 2009.
- [76] Kelvin Li, Anushka Brownley, Timothy B Stockwell, Karen Beeson, Tina C McIntosh, Dana Busam, Steve Ferriera, Sean Murphy, and Samuel Levy. Novel computational methods for increasing PCR primer design effectiveness in directed sequencing. *BMC Bioinformatics*, 9:191, 2008.
- [77] Courtney E. Lane, Daniel Hulgan, Kelly O'Quinn, and Michael G. Benton. CEMAsuite: Open source degenerate PCR primer design. *Bioinformatics*, 31:3688–3690, 2015.
- [78] Cyntia R Flores-Juárez, Eva González-Jasso, Anaid Antaramian, and Reynaldo C Pless. PCR amplification of GC-rich DNA regions using the nucleotide analog N⁴-methyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate. *BioTechniques*, 61:175–182, oct 2016.

- [79] Milton H Saier Jr, Vamsee S Reddy, Dorjee G Tamang, and Åke Västermark. The Transporter Classification Database. 42:251–258, 2014.
- [80] Tsuyoshi Uehara and James T Park. An Anhydro- N -Acetylmuramyl- L -Alanine Amidase with Broad Specificity Tethered to the Outer Membrane of Escherichia coli. 189:5634–5641, 2007.
- [81] Klaus Hantke and Mikrobiologie Membranphysiologie. Dual Repression by Fe²⁺-Fur and Mn²⁺-MntR of the mntH Gene , Encoding an NRAMP-Like Mn²⁺ Transporter in Escherichia coli. 183:4806–4813, 2001.
- [82] Vladimir R Kaberdin, Dharam Singh, and Sue Lin-chao. Composition and conservation of the mRNA-degrading machinery in bacteria. *Journal of Biomedical Science*, 18:23, 2011.
- [83] Kelvin Li, Susmita Shrivastava, and Timothy B Stockwell. Degenerate primer design for highly variable genomes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1275:103–15, 2015.
- [84] Hideyuki Suzuki, Takashi Koyanagi, Shunsuke Izuka, Akiko Onishi, and Hidehiko Kumagai. The yliA , - B , - C , and - D Genes of Escherichia coli K-12 Encode a Novel Glutathione Importer with an ATP-Binding Cassette. 187:5861–5867, 2005.
- [85] Eugene S Han, Deani L Cooper, Nicole S Persky, Vincent A Sutera, Richard D Whitaker, Melissa L Montello, and Susan T Lovett. RecJ exonuclease : substrates , products and interaction with SSB. 34:1084–1091, 2006.
- [86] Robert M Macnab. GENETICS AND BIOGENESIS OF BACTERIAL FLAGELLA. *Annual Review of Energy and the Environment*, 26:131 – 158, 1992.
- [87] Thomas Eicher, Lorenz Brandstätter, and Klaas M. Pos. Structural and functional aspects of the multidrug efflux pump AcrB. *Biol. Chem.*, 390:693–699, 2009.
- [88] Silke I Patzer and Klaus Hantke. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 28:1199–1210, 1998.
- [89] C. E. CLIFTON. LARGE-SCALE PRODUCTION OF PENICILLIN. *Science*, 98:69–70, jul 1943.

- [90] SHUKUO KINOSHITA. Amino-acid Production by the Fermentation Process. *Nature*, 240:211–211, nov 1972.
- [91] Jean Franco Castro, Valeria Razmilic, Juan Pablo Gomez-Escribano, Barbara Andrews, Juan A Asenjo, and Mervyn J Bibb. Identification and Heterologous Expression of the Chaxamycin Biosynthesis Gene Cluster from *Streptomyces leeuwenhoekii*. *Applied and environmental microbiology*, 81:5820–31, sep 2015.
- [92] Oscar A Iribarren, Jorge M Montagna, Aldo R Vecchiatti, Barbara Andrews, Juan A Asenjo, and José M Pinto. Optimal process synthesis for the production of multiple recombinant proteins. *Biotechnology progress*, 20:1032–43, 2004.
- [93] Vida Rodríguez, Juan A Asenjo, and Barbara A Andrews. Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides. *Microbial cell factories*, 13:65, may 2014.
- [94] Anuj K Chandel and Om V Singh. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: Advancing the generation of 'Biofuel'. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89:1289–1303, 2011.
- [95] Claire Wyman and Roland Kanaar. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual review of genetics*, 40:363–83, 2006.
- [96] Qiang Q Que and Elizabeth A Winzeler. Large-scale mutagenesis and functional genomics in yeast. *Functional & integrative genomics*, 2:193–8, sep 2002.
- [97] Donald L Court, James A Sawitzke, and Lynn C Thomason. Genetic engineering using homologous recombination. *Annual review of genetics*, 36:361–88, 2002.
- [98] Yu Matsuoka and Kazuyuki Shimizu. Metabolicregulation of *Escherichia coli* cultivated under anaerobic and aerobic conditions in response to the specific pathway gene knockouts. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 04:455–468, 2013.
- [99] Y T Yang, K Y San, and G N Bennett. Redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* with fermentative lactate dehydrogenase overexpression and deletion. *Metabolic engineering*, 1:141–52, apr 1999.

- [100] K Bagramyan and a. Trchounian. Structural and functional features of formate hydrogen lyase, an enzyme of mixed-acid fermentation from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)*, 68:1159–1170, 2003.
- [101] G Sawers. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 66:57–88, 1994.
- [102] G.N. Vemuri, T.A. Minning, E. Altman, and M.A. Eiteman. Physiological response of central metabolism in *Escherichia coli* to deletion of pyruvate oxidase and introduction of heterologous pyruvate carboxylase. *Biotechnology and Bioengineering*, 90:64–76, apr 2005.
- [103] Ralf Hortsch and Dirk Weuster-Botz. Milliliter-scale stirred tank reactors for the cultivation of microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 73:61–82, 2010.
- [104] Hongxin Zhao, Yuan Lu, Liyan Wang, Chong Zhang, Cheng Yang, and Xinhui Xing. Disruption of lactate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase for increased hydrogen production and its effect on metabolic flux in *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource technology*, 194:99–107, oct 2015.
- [105] Guang-li Cao, Lei Zhao, Ai-jie Wang, Zhen-yu Wang, and Nan-qi Ren. Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderately thermophilic bacteria. 7:1–13, 2014.
- [106] I Korsá and A Böck. Characterization of *fhlA* mutations resulting in ligand-independent transcriptional activation and ATP hydrolysis. *Journal of bacteriology*, 179:41–5, jan 1997.
- [107] V Schlenzog and A Böck. Identification and sequence analysis of the gene encoding the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 4:1319–27, aug 1990.
- [108] R Rossmann, G Sawers, and A Böck. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Molecular microbiology*, 5:2807–14, nov 1991.
- [109] S Hopper and A Böck. Effector-mediated stimulation of ATPase activity by the sigma 54-dependent transcriptional activator FHLA from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177:2798–803, may 1995.

- [110] L Argaman and S Altuvia. fhIA repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *Journal of molecular biology*, 300:1101–12, jul 2000.
- [111] Gregory N Stephanopoulos, Aristos a Aristidou, and Jens Nielsen. *Metabolic Engineering*. pages 535–557, 1998.
- [112] Benjamin M Woolston, Steven Edgar, and Gregory Stephanopoulos. *Metabolic Engineering : Past and Future*. 2013.
- [113] A. Converti and P. Perego. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:303–309, 2002.
- [114] Gregory Stephanopoulos, Aristos a Aristidou, and Jens Nielsen. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. chapter CHAPTER 8, pages 309–351. 1998.
- [115] Seohyoung Kim, Eunhee Seol, You-Kwan Oh, G.Y. Wang, and Sunghoon Park. Hydrogen production and metabolic flux analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:7417–7427, 2009.
- [116] Amit Varma and Bernhard Palsson. Stoichiometric Flux Balance Models Quantitatively Predict Growth and Metabolic By-Product Secretion in Wild-Type *Escherichia coli* W3110. 60:3724–3731, 1994.
- [117] Robert J. Magee and Naim Kosaric. *The Microbial Production of 2,3-Butanediol*. pages 89–161. 1987.
- [118] An-Ping Zeng and Wolf-Dieter Deckwer. A model for multiproduct-inhibited growth of *Enterobacter aerogenes* in 2,3-butanediol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, apr 1991.
- [119] Attilio Converti, Patrizia Perego, and Marco Del Borghi. Effect of specific oxygen uptake rate on *Enterobacter aerogenes* energetics: Carbon and reduction degree balances in batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 82:370–377, 2003.
- [120] You Kwan Oh, Sunghoon Park, Eun Hee Seol, Seo Hyung Kim, Mi Sun Kim, Jae Woong Hwang, and Dewey D Y Ryu. Carbon and energy balances of glucose fermentation with

- hydrogenproducing bacterium *Citrobacter amalonaticus* Y19. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18:532–538, 2008.
- [121] J. J. Heijnen and J. A. Roels. A macroscopic model describing yield and maintenance relationships in aerobic fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 23:739–763, apr 1981.
- [122] Rumana Islam, Nazim Cicek, Richard Sparling, and David Levin. Effect of substrate loading on hydrogen production during anaerobic fermentation by *Clostridium thermocellum* 27405. *Applied microbiology and biotechnology*, 72:576–83, sep 2006.
- [123] J. A. Roels. Energetics and kinetics in biotechnology. *Elsevier Biomedical*, pages 99–128, 1983.
- [124] L Gustafsson, K Larsson, C Larsson, and L Adler. Maintenance Energy Requirements Under Stress Conditions. 65:1893–1898, 1993.
- [125] Jian Pi, Muhammad Jawed, Jun Wang, Li Xu, and Yunjun Yan. Mutational analysis of the *hyc* -operon determining the relationship between hydrogenase-3 and NADH pathway in *Enterobacter aerogenes*. 82:1–7, 2016.
- [126] S Kim, E Seol, S Mohanraj, S Park, Y Oh, and D Ryu. Various hydrogenases and formate-dependent hydrogen production in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:1509–1515, mar 2008.
- [127] You-Kwan OH, Eun Hee Seol, Eun Yeol Lee, and Sunghoon Park. Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas Palustris* P4. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:1373–1379, nov 2002.
- [128] Aldo Vieira da Rosa. *Fundamentals of Renewable Energy Processes*. 2009.
- [129] Simon Rittmann and Christoph Herwig. A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production. *Microbial Cell Factories*, 11:115, 2012.
- [130] Nanqi Ren, Wanqian Guo, Bingfeng Liu, Guangli Cao, and Jie Ding. Biological hydrogen production by dark fermentation: Challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22:365–370, 2011.

- [131] Wen Wei Li and Guo Ping Sheng. Microbial fuel cells in power generation and extended applications, 2012.
- [132] M. H. Osman, a. a. Shah, and F. C. Walsh. Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 26:3087–3102, 2011.
- [133] Sai Prashanthi Govumoni, Sravanthi Koti, Srilekha Yadav Kothagouni, and S Venkateshwar. Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. *Carbohydrate Polymers*, 91:646–650, 2013.
- [134] Yi Zheng, Jia Zhao, Fuqing Xu, and Yebo Li. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42:35–53, 2014.
- [135] Spyros G Pavlostathis and James M Gossett. Alkaline Treatment of Wheat Straw for Increasing Anaerobic Biodegradability. XXVII:334–344, 1985.
- [136] R. Chandra, H. Takeuchi, T. Hasegawa, and R. Kumar. Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. *Energy*, 43:273–282, jul 2012.
- [137] C Sambusiti, E Ficara, M Rollini, M Manzoni, and F Malpei. Sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage and wheat straw to increase methane production. pages 2447–2452, 2012.
- [138] D N Barman, M A Haque, T H Kang, M K Kim, J Kim, H Kim, and H D Yun. Alkali Pretreatment of Wheat Straw (*Triticum aestivum*) at Boiling Temperature for Producing a Bioethanol Precursor. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 76:2201–2207, 2012.
- [139] J M Fang, R C Sun, D Salisbury, P Fowler, and J Tomkinson. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. 66:423–432, 1999.
- [140] Eva Palmqvist and Bärbel Hahn-Hägerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74:25–33, 2000.
- [141] João R M Almeida, Magnus Bertilsson, Marie F. Gorwa-Grauslund, Steven Gorsich, and Gunnar Lidén. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82:625–638, 2009.

- [142] Solange Inês Mussatto and Inês Conceição Roberto. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Biore-source technology*, 93:1–10, may 2004.
- [143] Bowen Du, Lekh N Sharma, Christopher Becker, Shou-Feng Chen, Richard A Mowery, G Peter van Walsum, and C Kevin Chambliss. Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. *Biotechnology and bioengineering*, 107:430–40, oct 2010.
- [144] Badal C. Saha and Michael a. Cotta. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnology Progress*, 22:449–453, 2006.
- [145] Jingwen Qiu, Lunjie Ma, Fei Shen, Gang Yang, Yanzong Zhang, Shihuai Deng, Jing Zhang, Yongmei Zeng, and Yaodong Hu. Pretreating wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide for enzymatic saccharification and ethanol production at high solid loading. *Bioresource Technology*, 238:174–181, aug 2017.
- [146] Yao-Ting Fan, Ya-Hui Zhang, Shu-Fang Zhang, Hong-Wei Hou, and Bao-Zeng Ren. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology*, 97:500–505, feb 2006.
- [147] Idania Valdez-vazquez, Marisol Pérez-rangel, Adán Tapia, Germán Buitrón, Carlos Molina, Gustavo Hernández, and Lorena Amaya-delgado. Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. *Fuel*, 159:214–222, 2015.
- [148] Prasad Kaparaju, María Serrano, Anne Belinda, Prawit Kongjan, and Irini Angelidaki. Bioresource Technology Bioethanol , biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 100:2562–2568, 2009.
- [149] I. Janker-Obermeier, V. Sieber, M. Faulstich, and D. Schieder. Solubilization of hemicellulose and lignin from wheat straw through microwave-assisted alkali treatment. *Industrial Crops and Products*, 39:198 – 203, 2012.
- [150] Sehoon Kim and Mark T. Holtzapple. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 96:1994–2006, 2005.

- [151] J Michael Gould. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and bioengineering*, 26:46–52, 1984.
- [152] Tina Jeoh, Claudia I Ishizawa, Mark F Davis, Michael E Himmel, William S Adney, and David K Johnson. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnology and bioengineering*, 98:112–22, sep 2007.
- [153] Helene B. Klinke, Birgitte K. Ahring, Anette S. Schmidt, and Anne Belinda Thomsen. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bio-resource Technology*, 82:15–26, 2002.
- [154] Yan Zhang, Bei Han, and Thaddeus Chukwuemeka Ezeji. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *New Biotechnology*, 29:345–351, 2012.
- [155] Jesus Zaldivar, Alfredo Martinez, and Lonnie O. Ingram. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65:24–33, 1999.
- [156] F. Monlau, C. Sambusiti, A. Barakat, M. Quéméneur, E. Trably, J. P. Steyer, and H. Carrère. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 32:934–951, 2014.
- [157] Prawit Kongjan, Sompong O-Thong, Meher Kotay, Booki Min, and Irimi Angelidaki. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 105:899–908, 2010.
- [158] Marianne Quéméneur, Jérôme Hamelin, Abdellatif Barakat, Jean-Philippe Steyer, Hélène Carrère, and Eric Trably. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37:3150–3159, feb 2012.
- [159] Jeong Hoon Park, Jeong Jun Yoon, Hee Deung Park, Yong Jin Kim, Dong Jung Lim, and Sang Hyoun Kim. Feasibility of biohydrogen production from *Gelidium amansii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36:13997–14003, 2011.

- [160] Florian Monlau, Quentin Aemig, Eric Trably, Jérôme Hamelin, Jean Philippe Steyer, and Hélène Carrere. Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38:12273–12282, 2013.
- [161] Alan J Wolfe. The Acetate Switch. 69:12–50, 2005.
- [162] Chin-Hung Cheng, Chun-Hsiung Hung, Kuo-Shing Lee, Pei-Yu Liao, Chih-Ming Liang, Lee-Hao Yang, Ping-Jei Lin, and Chiu-Yue Lin. Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:5242–5249, oct 2008.
- [163] Zhen-Peng Zhang, Kuan-Yeow Show, Joo-Hwa Tay, David Tee Liang, Duu-Jong Lee, and Wen-Ju Jiang. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*, 41:2118–2123, oct 2006.
- [164] Tania I Georgieva, Marie J Mikkelsen, and Birgitte K Ahring. Ethanol production from wet-exploded wheat straw hydrolysate by thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1 in a continuous immobilized reactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 145:99–110, mar 2008.
- [165] G Zayed and O Meyer. The single-batch bioconversion of wheat straw to ethanol employing the fungus *Trichoderma viride* and the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 45:551–5, may 1996.
- [166] J N Nigam. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of biotechnology*, 87:17–27, apr 2001.
- [167] Henning Jørgensen. Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 153:44–57, may 2009.
- [168] Zelun Zhi and Hui Wang. White-rot fungal pretreatment of wheat straw with *Phanerochaete chrysosporium* for biohydrogen production: Simultaneous saccharification and fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37:1447–1458, 2014.

-
- [169] Nima Nasirian, Morteza Almassi, Saeid Minaei, and Renatus Widmann. Development of a method for biohydrogen production from wheat straw by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36:411–420, jan 2011.
- [170] G Stephanopoulos. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 1:1–11, jan 1999.

A.1 Biología de sistemas y MFA

Para realizar un análisis de flujos metabólicos es necesario generar en primera instancia una representación matemática de las reacciones metabólicas en forma de una matriz numérica con los coeficientes estequiométricos balanceados de cada reacción. La información contenida en los coeficientes estequiométricos se representa de tal forma que se genera una matriz de m metabolitos (columnas) y n reacciones (filas).

La medición del balance de metabolitos en el tiempo se puede representar de manera vectorial, con una matriz estequiométrica definida en la ecuación (A.1) de la siguiente forma:

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot \nu - b \quad (\text{A.1})$$

Donde x es un vector de dimensión \mathbf{m} , que corresponde a la concentración de los metabolitos dentro de la célula. Por otro lado ν es un vector de \mathbf{n} flujos metabólicos, S representa la matriz estequiométrica de dimensión $\mathbf{m} \cdot \mathbf{n}$, y b es el vector de intercambio que representa el transporte neto dentro y fuera del sistema metabólico [52].

Las reacciones intracelulares poseen una alta tasa de intercambio, por lo que si existen perturbaciones en el sistema, estas se ajustarán rápidamente a nuevos niveles. Debido a esto se puede suponer que la concentraciones de los metabolitos no cambia en el tiempo y se encuentran en un pseudo-estado estacionario [170]. Bajo esta suposición, el balance de masa de cada metabolito, se puede describir como un sistema de ecuaciones lineales homogéneo de la forma:

$$S \cdot \nu - b = 0 \quad (\text{A.2})$$

$$S \cdot \nu = b \quad (\text{A.3})$$

La matriz S obtenida para los MFA es del tipo dispersa (gran parte de sus elementos son ceros), debido a que la mayoría de las reacciones involucran solo a unos pocos metabolitos. Además, en un modelo metabólico realista hay más reacciones que metabolitos ($\mathbf{n} > \mathbf{m}$), es decir, hay más variables desconocidas y por lo tanto no existe una única solución. Para resolver un MFA, es necesario definir los grados de libertad de la matriz (GL), que se definen como la resta entre el número de reacciones y los metabolitos. Luego se deben comparar los GL con la cantidad de especies medidas experimentalmente (ME), esto permite determinar si el sistema se encuentra *determinado* (GL = ME), *sobredeterminado* (ME > GL) o *subdeterminado* (ME < GL). Esta clasificación es importante para determinar qué tipo de estrategia se debe utilizar para resolver el sistema de ecuaciones. Los sistemas *determinados* se resuelven multiplicando el vector de intercambio con la inversa de la matriz estequiométrica (ecuación A.4).

$$\nu = S^{-1} \cdot b \quad (\text{A.4})$$

No obstante, la mayoría de las matrices estequiométricas no son cuadradas (igual número de filas y columnas). En este caso la ecuación (A.4) queda de la siguiente forma:

$$\nu = \{[S^T \cdot S]^{-1} \cdot S^T\} \cdot b \quad (\text{A.5})$$

En el caso de los sistemas *sobredeterminados* la resolución se realiza multiplicando los dos lados de la ecuación por una pseudoinversa de la matriz estequiométrica (regresión lineal de mínimos cuadrados). Para los sistemas *subdeterminados* se utiliza programación lineal, y para conocer estos resultados es necesario introducir restricciones con un criterio de optimización como por ejemplo maximizar la producción de biomasa o la producción de un producto particular.

Tabla A.1: Código de los nucleótidos usados para el desarrollo de partidores degenerados.

Código nucleotídico IUPAC	Base
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T (o U)	Timina (o Uracilo)
R	A o G
Y	C o T
S	G o C
W	A o T
K	G o T
M	A o C
B	C o G o T
D	A o G o T
H	A o C o T
V	A o C o G
N	Cualquier base
. o -	gap

Tabla A.2: Lista de la subunidad mayor de las de [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1.

Microorganismo	Nº Acceso ¹	Anotación ²	Largo ³
<i>Acidianus ambivalens</i> DSM3772	Q8NKV3	hydL	628
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	Q2DD50	AcryDRAFT_1976	598
<i>Acidobacteria bacterium</i> Ellin345	Q1IIR0	Acid345_4240	563
<i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z	Q3EIG1	AsucDRAFT_1390	569
<i>Alcaligenes hydrogenophilus</i>	P33374	hupL	621
<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i> MLHE-1	Q0A717	Mlg_2028	595

Continúa en la siguiente hoja

¹Nº acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.

²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.

³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.2 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Allochromatium vinosum</i>	Q4KVK0	hydL	576
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	Q2IN69	Adeh_0478	577
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	O66895	mbhL1	633
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	O67092	mbhL2	564
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> ATCC 49558/VC-16/DSM 4304/JCM 9628/NBRC 100126	O28891	AF_1380	569
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571	Q6PTB5	hupL	604
<i>Azotobacter chroococcum</i> str. mcd1	P18191	hupL	601
<i>Azotobacter vinelandii</i> ATCC 13705/OP1/DSM 366/NCIB 11614/LMG 3878/UW	P21949	hoxG	602
<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP	Q4IUQ0	AvinDRAFT_1759	602
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	P12636	hupB	596
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Q9ANQ9	hupL	596
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	Q35NX1	BradDRAFT_6908	596
<i>Bradyrhizobium</i> sp. UPM1029 Z89	Q1KZV6	hupL	596
<i>Bradyrhizobium</i> sp. UPM1167 M5	Q1KZX4	hupL	596
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	Q4BRM7	Bcep1808DRAFT_7154	618
<i>Campylobacter coli</i> RM2228	Q4HHS1	CCO0676	571
<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC 11168	Q0P8Z0	hydB	571
<i>Campylobacter jejuni</i> RM1221	Q5HTJ7	hydB	571
<i>Campylobacter lari</i> RM2100	Q4HKM1	CLA1081	571
<i>Campylobacter upsaliensis</i> RM3195	Q4HQM6	CUP0085	571
<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> Z-2901	Q3ABV7	CHY_1545	475
<i>Chlorobium ferrooxidans</i> DSM 13031	Q0YQ63	CferDRAFT_0348	572
<i>Chlorobium limicola</i> DSM 245	Q44R93	ClimDRAFT_2250	572

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.2 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> BS1	Q4AM63	Cphamn1DRAFT_2779	572
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> DSM 266	Q43JF6	Cpha266DRAFT_2300	572
<i>Citrobacter freundii</i>	Q46046	hyaB	597
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824/DSM 792/JCM 1419/LMG 5710/VKM B-1787	Q9AMN5	hupL	428
<i>Clostridium beijerincki</i> NCIMB 8052	Q2WRL8	CbeiDRAFT_3283	486
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ATCC 700971/NCTC 13129/biotype gravis	Q6NIU3	DIP0673	581
<i>CupriaVidus necator</i> ATCC 17699/H16/DSM 428/NCIB 10442/Stanier 337	P31891	hoxG	617
<i>CupriaVidus necator</i> H16	Q7WXQ3	PHG065	603
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	Q478L6	Daro_3988	598
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	Q478N3	Daro_3971	570
<i>Dehalococcoides ethenogene</i> 195	Q3ZA88	DET0110	526
<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	Q2DW84	DehaBAV1DRAFT_1260	526
<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	Q3ZWL5	hupL	526
δ -proteobacterium MLMS-1	Q1NRB8	MldDRAFT_4184	504
δ -proteobacterium MLMS-1	Q1NM23	MldDRAFT_2844	515
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Q9RPI2	hydB	516
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q191Z3	Dhaf_2516	570
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q194H5	Dhaf_1984	518
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q192I7	Dhaf_2430	517
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q18R73	Dhaf_0609	465
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24VB4	DSY2239	573
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24VQ3	DSY2100	517
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24ZF8	DSY0795	478

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.2 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24X55	DSY1598	518
<i>Desulfomicrobium baculatum</i> DSM 1743	P13065	none	513
<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54/DSM 12343	Q6AQR9	hynA	566
<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54/DSM 12343	Q6ARY7	DP0159	499
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q9AM32	hynA	554
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q30ZG4	Dde_2135	488
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q30ZG1	Dde_2138	568
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q30UU7	Dde_3756	554
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> ATCC 49200/DSM 3604/VKM B-1801/JJ	P18188	hydB	563
<i>Desulfovibrio gigas</i>	P12944	hydB	550
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> str. Miyazaki	P21852	hydB	567
<i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris</i> DP4	Q0EP67	DvulDRAFT_2626	488
<i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris</i> DP4	Q0ELC8	DvulDRAFT_1772	549
<i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris</i> DP4	Q0EP70	DvulDRAFT_2623	566
<i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris</i> str. Hildenborough	Q72AS0	hynA-1	566
<i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris</i> str. Hildenborough	Q728S7	hynA-2	549
<i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris</i> str. Hildenborough	Q72AS3	hysA	510
<i>Escherichia coli</i> 536	Q0TDB6	ECP_3080	567
<i>Escherichia coli</i> 536	Q0TJ88	ECP_0978	597

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.2 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Escherichia coli</i> K12	P0ACE0	hybC	566
<i>Escherichia coli</i> K12	P0ACD8	hyaB	597
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Q8XC37	hyaB	597
<i>Escherichia coli</i> O6 O6:H1	Q8CVQ8	hybC	567
<i>Escherichia coli</i> O6 O6:H1	Q8FJ64	hyaB	597
<i>Escherichia coli</i> UTI89	Q1R701	hybC	567
<i>Escherichia coli</i> UTI89	Q1RDN9	hyaB	597
<i>FlaVobacterium johnsoniae</i> UW101	Q1XS81	FjohDRAFT_2101	578
<i>Frankia alni</i> ACN14A	Q0RN50	hupL1	597
<i>Frankia</i> sp. CcI3	Q2JBM5	Francci3_1942	597
<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	Q3W6M1	Franean1DRAFT_3143	573
<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	Q3W428	Franean1DRAFT_2066	596
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Q39QD0	Gmet_3331	566
<i>Geobacter sulfurreducens</i> ATCC 51573/DSM 12127/PCA	Q74GX2	GSU0122	564
<i>Geobacter sulfurreducens</i> ATCC 51573/DSM 12127/PCA	Q74F24	GSU0785	560
<i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4	Q2DLI7	GuraDRAFT_1652	569
<i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4	Q2DR34	GuraDRAFT_3055	560
<i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4	Q2DNV7	GuraDRAFT_2493	566
<i>Halothermothrix orenii</i> H 168	Q2AI40	HoreDRAFT_1955	484
<i>Helicobacter acinonychis</i> Sheeba	Q17XT4	hyaB	578
<i>Helicobacter hepaticus</i> ATCC 51449/3B1	Q7VK35	hyaB	576
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 700392/26695	O25349	HP_0632	578
<i>Helicobacter pylori</i> HPAG1	Q1CTP0	HPAG1_0615	578
<i>Helicobacter pylori</i> J99	Q9ZLK4	hyaB	578

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.2 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Lawsonia intracellularis</i> PHE/MN1-00	Q1MR82	hyaB	602
<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1	Q3XNT0	Mmc1DRAFT_1091	567
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	Q2W6S4	amb1647	567
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> MBEL55E	Q65PZ2	hyaB	569
<i>Methanosarcina acetivorans</i> ATCC 35395/DSM 2834/JCM 12185/C2A	Q8TRM8	vhtA	596
<i>Methanosarcina acetivorans</i> ATCC 35395/DSM 2834/JCM 12185/C2A	Q8TRN3	vhtA	595
<i>Methanosarcina barkeri</i> str. fusaro	Q46BG1	Mbar_A1840	596
<i>Methanosarcina barkeri</i> str. fusaro	Q46BF5	Mbar_A1846	591
<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	Q8PV02	MM_2176	596
<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	Q50226	vhtA	591
<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	Q50249	vhoA	591
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath/NCIMB 11132	Q8RJI6	hupL	597
<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	Q1U3G7	MjlsDRAFT_5003	598
<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	Q1TED4	MkmsDRAFT_1998	598
<i>Mycobacterium</i> sp. MCS	Q1BA33	Mmcs_2143	598
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	Q25UN9	MvanDRAFT_1367	532
<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92	Q2BLI4	MED92_11099	602
<i>Oligotropha carboxidoVorans</i> OM5	O33406	hoxL	603
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	Q3PJ20	PdenDRAFT_3944	597
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI 1043/ATCC BAA-672	Q6D7U7	hybC	564
<i>Pelodictyon luteolum</i> DSM 273	Q3B2X5	Plut_1447	572
<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i> BU-1	Q3VLH1	PphaDRAFT_2214	572
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI	Q1X4F5	none	482

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.2 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Photobacterium</i> sp. SKA34	Q2C4Z8	SKA34_13050	567
<i>Prosthecochloris aestuarii</i> DSM 271	Q3VUY3	PaesDRAFT_1548	572
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i> 38846	Q51862	hupL	622
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	Q1LNU4	Rmet_1297	619
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. ViViae 128c53	P18636	hupL	596
<i>Rhodobacter capsulatus</i> ATCC 33303/B10	P15284	hupL	597
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	Q3J0L7	hupL	596
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	O86468	hupL	596
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	Q0S7U6	RHA1_ro04604	597
<i>Rhodoferax ferrireducens</i> DSM 15236	Q21R14	Rfer_4091	568
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	Q20ZY0	RPC_3771	597
<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	Q3NNK2	SfriDRAFT_1339	567
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Q8EF87	hyaB	567
<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32	Q2ZP62	Sputcn32DRAFT_0512	567
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	Q36FL3	Shewana3DRAFT_2724	567
<i>Shewanella</i> sp. MR-4	Q0HJ72	Shewmr4_1821	567
<i>Shewanella</i> sp. MR-7	Q0HUR1	Shewmr7_2156	567
<i>Shewanella</i> sp. PV-4	Q33TI7	ShewDRAFT_1286	568
<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1	Q2WXF2	Sputw3181DRAFT_0450	567
<i>Shigella boydii</i> Sb227	Q31X21	hybC	567
<i>Shigella boydii</i> Sb227	Q31YN5	hyaB	597
<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	Q32HT4	hyaB	568
<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	Q32C60	hybC	567
<i>Shigella flexneri</i> 5 8401	Q0T0Q3	hybC	567
<i>Shigella flexneri</i> 5 8401	Q0T663	hyaB	597

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.2 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 1

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 700930/2457T/serotype 2a	P0ACE2	hybC	566
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 700930/2457T/serotype 2a	P0ACD9	hyaB	597
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	Q3YXN9	hybC	567
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	Q3Z3E8	hyaB	597
<i>Solibacter usitatus</i> ellin 6076	Q43Z08	AcidDRAFT_4001	598
<i>Solibacter usitatus</i> ellin 6076	Q44B06	AcidDRAFT_7272	566
<i>Streptomyces avermitilis</i> ATCC 31267/DSM 46492/JCM 5070/NCIMB 12804/NRRL 8165	Q93HH5	hydB	594
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	Q3N6G	SfumDRAFT_3272	546
<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	Q0Y597	TpenDRAFT_0047	596
<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	Q3SJ42	Tbd_1375	596
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	Q56360	hupL	596
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS	O51823	hydL	576
<i>Thiomicrospira crunogena</i> XCL-2	Q31DZ6	Tcr_2037	568
<i>Thiomicrospira denitrificans</i> ATCC 33889	Q30QL9	Tmden_1435	577

Tabla A.3: Lista de la subunidad mayor de las de [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 2a.

Microorganismo	N° Acceso ¹	Anotación ²	Largo) ³
<i>Anabaena siamensis</i> TISTR8012	Q84GM3	hupL	531

Continúa en la siguiente hoja

¹N° acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.3 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 2a

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Q44216	hupL	531
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Q9ZAK2	hupL	531
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Q3M494	Ava_4595	531
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	O66988	mbhL3	416
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	Q35L01	BradDRAFT_5526	532
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl	Q3E284	CaurDRAFT_0072	545
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	Q4BUZ7	CwatDRAFT_0516	531
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	Q0ZA86	hupL	531
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	Q47C12	Daro_2889	505
<i>Frankia alni</i> ACN14A	Q0RPQ1	hupL2	537
<i>Frankia</i> sp. CcI3	Q2JE34	Francci3_1076	535
<i>Gloeotheca</i> sp. PCC 6909	Q841J7	hupL	531
<i>Lynngbya aestuarii</i> CCY 9616	Q2EJS7	hupL	537
<i>Lynngbya majuscula</i> CCAP 1446/4	Q846P6	hupL	537
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	Q2W8A7	amb1114	512
<i>bacterium vanbaalenii</i> PYR-1	Q25UT7	MvanDRAFT_1321	536
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102	O68307	S/N	531
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Q8YZ11	hupL	531
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7422	Q3C1T8	hupL	531
<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92	Q2BJK9	MED92_09451	500
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	Q1J422	Sala_3198	547
<i>Thiomicrospira denitrificans</i> ATCC 33889	Q30QL7	Tmden_1437	417
<i>Trichodesmium erythaeum</i> IMS101	Q10Z54	Tery_3368	534

Tabla A.4: Lista de la subunidad mayor de las de [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 2b.

Microorganismo	N° Acceso ¹	Anotación ²	Largo ³
<i>Alcaligenes hydrogenophilus</i> M50	P94155	hoxC	485
<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i> MLHE-1	Q0A735	Mlg_2010	482
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571	Q6PTB8	hupV	490
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Q45255	hupV	479
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	Q35NX3	BradDRAFT_6906	479
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	Q4LG94	Bcen2424DRAFT_0065	274
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	Q4BRP3	Bcep1808DRAFT_7139	485
<i>Cupriavidus necator</i> H16 PLASMID = megaplasmid pHG1	P95604	hoxC	485
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	Q478P4	Daro_3960	472
<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1	Q3XNU0	Mmc1DRAFT_1082	484
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	Q2W5X9	amb1942	481
<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92	Q2BN59	MED92_03293	386
<i>Oligotropha carboxidoVorans</i> OM5	Q6LB90	hoxV	484
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	Q3PJ17	PdenDRAFT_3947	477
<i>Rhodobacter capsulatus</i> ATCC 33303/B10	O86457	hupV	476
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	Q3J0M0	hupV	475
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	Q53164	hupV	475
<i>Rhodoferax ferrireducens</i> DSM 15236	Q21QY4	Rfer_4121	496
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	Q20ZX7	RPC_3774	480
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS	Q3MKN9	hupV	481
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> Py2	Q26N49	XautDRAFT_1556	485

¹N° acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.5: Lista de la subunidad mayor de las de [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3a.

Microorganismo	N° Acceso ¹	Anotación ²	Largo ³
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> ATCC 43067/DSM 2661/JAL-1/JCM 10045/NBRC 100440	Q60338	frhA	415
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> ATCC 43067/DSM 2661/JAL-1/JCM 10045/NBRC 100440	Q58137	MJ0727	298
<i>Methanococcus maripaludis</i> S2/LL	Q6LXG9	fruA	414
<i>Methanococcus maripaludis</i> S2/LL	Q6LZ09	frcA	410
<i>Methanococcus voltae</i> DSM 1537/PS	Q00390	frhA	398
<i>Methanococcus voltae</i> DSM 1537/PS	Q00394	fruA	411
<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	Q0YCN1	MemarDRAFT_1795	455
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19/DSM 6324/JCM 9639/NBRC 100938	Q8TWW0	MK0931	416
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19/DSM 6324/JCM 9639/NBRC 100938	Q8TXX2	MK0537	370
<i>Methanosarcina acetivorans</i> ATCC 35395/DSM 2834/JCM 12185/C2A	Q8TS32	frhA	456
<i>Methanosarcina barkeri fusaro</i> DSM 804	O33161	Frh	456
<i>Methanosarcina barkeri</i> str. Fusaro	P80489	frhA	455
<i>Methanosarcina barkeri</i> str. Fusaro	Q46A81	Mbar_A2287	456
<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	Q8PSN4	MM_3045	455
<i>Methanosphaera stadtmanae</i> DSM 3091	Q2NES4	frhA	406
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	Q2FTG5	Mhun_2332	469

Continúa en la siguiente hoja

¹N° acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.5 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3a

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H	P19496	frhA	404
Arquea metanogénica RC-I	Q0W2B4	frhA	417
Arquea metanogénica RC-I	Q0W2X7	frhA	410

Tabla A.6: Lista de la subunidad mayor de las de [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3b.

Microorganismo	N° Acceso ¹	Anotación ²	Largo ³
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	Q2DXK0	AcelDRAFT_1300	431
<i>Azotobacter vinelandii</i> AvOP	Q4J218	AvinDRAFT_7310	429
<i>Chlorobaculum tepidum</i> ATCC 49652/DSM 12025/TLS	Q8KB95	hydA	424
<i>Chlorobium chlorochromatii</i> CaD3	Q3AU04	Cag_0245	426
<i>Chlorobium ferrooxidans</i> DSM 13031	Q0YRW5	CferDRAFT_1021	424
<i>Chlorobium limicola</i> DSM245	Q44QJ8	ClimDRAFT_2181	424
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> BS1	Q4AJV9	Cphamn1DRAFT_1760	439
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> DSM 266	Q43IL8	Cpha266DRAFT_2143	424
<i>Frankia</i> sp. CcI3	Q2J4F0	Francci3_4496	430
<i>Geobacter</i> sp. FRC-32	Q0YHC8	GeobDRAFT_1310	425
<i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4	Q2DLA5	GuraDRAFT_2091	425
<i>Legionellap neumophila</i> str. Lens	Q5WTY6	lpl2387	430
<i>Legionella pneumophila</i> str. Paris	Q5X261	lpp2532	430
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str. Philadelphia 1	Q5ZSQ0	hydA	430

Continúa en la siguiente hoja

¹N° acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.6 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3b

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1	Q3XRU8	Mmc1DRAFT_2191	434
<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	Q1TZL9	MjlsDRAFT_4065	430
<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	Q1TFD9	MkmsDRAFT_2429	430
<i>Mycobacterium</i> sp. MCS	Q1B6G1	Mmcs_3416	430
<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92	Q2BRA2	MED92_07391	428
<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i> BU-1	Q3VQC1	PphaDRAFT_0760	424
<i>Prosthecochloris aestuarii</i> DSM 271	Q3VWY7	PaesDRAFT_2205	458
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5/Orsay	Q9V0C5	PYRAB08650	428
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5/Orsay	Q9V043	PYRAB09550	415
<i>Pyrococcus furiosus</i> ATCC 43587/DSM 3638/JCM 8422/Vc1	Q59670	Hyd	428
<i>Pyrococcus furiosus</i> ATCC 43587/DSM 3638/JCM 8422/Vc1	Q9P9M4	shyA	412
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	O59011	PH1294	429
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	Q0SKR7	RHA1_ro00033	422
<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	Q2LYD7	SYNAS_01260	441
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	Q8NKS2	hydA	428
<i>Thermococcus litoralis</i> DSM 4573	Q9UWQ6	hydA	426
<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	Q3SJE8	Tbd_1263	433

Tabla A.7: Lista de la subunidad mayor de las de [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3c.

Microorganismo	N° Acceso ¹	Anotación ²	Largo ³
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	Q2IH67	Adeh_4162	494

Continúa en la siguiente hoja

¹N° acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.7 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3c

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> ATCC 49558/VC-16/DSM 9628/NBRC 100126	O28899	AF_1372	458
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	Q3Z8U2	DET0615	479
<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	Q2DUV5	DehaBAV1DRAFT_0363	479
<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	Q3ZWZ1	cbdbA597	479
<i>δ-proteobacterium</i> MLMS-1	Q1NJF1	MldDRAFT_2072	496
<i>δ-proteobacterium</i> MLMS-1	Q1NPA7	MldDRAFT_3744	496
<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54/DSM 12343	Q6API2	DP1013	456
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Q39QE1	Gmet_3320	473
<i>Geobacter sulfurreducens</i> ATCC 51573/DSM 12127/PCA	GSU2419	Q74AF7	473
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> ATCC 43067/DSM 2661/JAL-1/JCM 10045/NBRC 100440	Q58592	vhua	418
<i>Methanococcus maripaludis</i> S2/LL	Q6LZ06	vhcA	471
<i>Methanococcus maripaludis</i> S2/LL	Q6LWL5	vhua	418
<i>Methanococcus voltae</i> DSM 1537/PS	Q00407	vhua	420
<i>Methanococcus voltae</i> DSM 1537/PS	Q00404	vhcA	474
<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	Q0Y7I5	MemarDRAFT_0072	455
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19/DSM 6324/JCM 9639/NBRC 100938	Q8TYW3	MK0178	434
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19/DSM 6324/JCM 9639/NBRC 100938	Q8TYN0	MK0266	482
<i>Methanosphaera stadtmanae</i> DSM 3091	Q2NI05	mvhA	476
<i>Methanothermobacterthermautotrophicus</i> DeltaH	Q50783	mvhA	472

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.7 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3c

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Methanothermus fervidus</i>	Q49179	mvhA	472
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	Q3MXR1	SfumDRAFT_0476	482
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	Q3N422	SfumDRAFT_2527	469
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	Q3N1L8	SfumDRAFT_1617	449
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	Q3NR5	SfumDRAFT_1698	449
Arquea metanogénica RC-I	Q0W6J7	mvhA	471
Arquea metanogénica RC-I	Q0W6U1	mvhA	467

Tabla A.8: Lista de la subunidad mayor de las de [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3d.

Microorganismo	N° Acceso ¹	Anotación ²	Largo ³
<i>Acetomicrobium flavidum</i> DSM20663	Q59114	S/N	475
<i>Allochromatium vinosum</i>	Q2KJQ2	hoxH	349
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Q44517	hoxH	487
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Q3M428	Ava_4661	487
<i>Burkholderiaceno cepacia</i> HI2424	Q4LGC8	Bcen2424DRAFT_0023	237
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	Q13HK8	Bxe_C0531	504
<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl	Q3E4S7	CaurDRAFT_0836	485
<i>CupriaVidus necator</i> ATCC 17699/H16/DSM 428/NCIB 10442/Stanier 337	P22320	hoxH	487
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	Q47HE3	Daro_0982	487
<i>δ-proteobacterium</i> MLMS-1	Q1NQY3	MldDRAFT_4738	473
<i>Desulfotalea sychrophila</i> LSv54/DSM 12343	Q6AL34	DP2212	471

Continúa en la siguiente hoja

¹N° acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.8 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3d

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Q39WM1	Gmet_1113	476
<i>Geobacter sulfurreducens</i> ATCC 51573/DSM 12127/PCA	Q749M4	hoxH	478
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	Q2SQP8	HCH_00105	490
<i>Lynngbya majuscula</i> CCAP 1446/4	Q6JB17	hoxH	476
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	Q2W1S5	amb3396	496
<i>Mariprofundus ferrooxydans</i> PV-1	Q0EZV0	SPV1_09573	486
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath/NCIMB 11132	Q60CJ2	MCA0114	494
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	Q261I0	MvanDRAFT_5544	489
<i>Nitrospira multiformis</i> ATCC 25196	Q2Y8F0	Nmul_A1673	493
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Q8YYT0	hoxH	483
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7422	Q3C1T3	hoxH	482
<i>Prochlorothrix hollandica</i> ACC 42415	O05932	hoxH	482
<i>Psychromonas ingrahamii</i> 37	Q1FZ32	PingDRAFT_3294	499
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	Q1LN68	Rmet_1525	488
<i>Rhodobacter capsulatus</i> ATCC 33303/B10	Q9XBW8	hoxH	503
<i>Rhodococcus opacus</i> 1b	P72307	hoxH	488
<i>Rhodoferax ferrireducens</i> DSM 15236	Q21RP9	Rfer_3855	507
<i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076	Q43RZ3	AcidDRAFT_2091	474
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301 1402-1	P94159	hoxH	476
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	Q31K34	Synpcc7942_2555	476
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Q8KX24	hoxH	474
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Q79A10	hoxH	474
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	P74018	hoxH	474
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	Q3MYG7	SfumDRAFT_0632	479

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.8 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 3d

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS	Q6XQK1	hoxH	475

Tabla A.9: Lista de la subunidad mayor de las de [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 4.

Microorganismo	N° Acceso ¹	Anotación ²	Largo ³
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	Q2ZEI5	CSACDRAFT_2574	83
<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	Q1PZL4	hycE	531
<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i> Z-2901	Q3AB37	cooH	360
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	Q1FP28	CPHYDRAFT_3346	359
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Q4CDJ6	CtheDRAFT_1261	359
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	Q3Z856	DET0867	359
<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	Q2DW05	DehaBAV1DRAFT_0784	359
<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	Q3ZXP4	cbdbA850	359
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q18YX2	Dhaf_3333	507
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24ST8	hycE	554
<i>Desulfovibrio gigas</i>	Q7WT78	echE	358
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i> DP4	Q0EJG1	DvulDRAFT_1454	366
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i> DP4	Q0EK43	DvulDRAFT_1678	358
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i> str. Hildenborough	Q72EY8	DVU_0430	358

Continúa en la siguiente hoja

¹N° acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.9 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 4

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i> str. Hildenborough	Q729Q8	DVU_2291	366
<i>Escherichia coli</i> 536	Q0TEF6	ECP_2684	569
<i>Escherichia coli</i> K12	P16431	hycE	569
<i>Escherichia coli</i> K12	P77329	hyfG	555
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Q8X833	hycE	569
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Q7ABB8	ECs3577	569
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Q8XBC0	hyfG	571
<i>Escherichia coli</i> O6 O6:H1	Q8CVS6	hycE	569
<i>Escherichia coli</i> UTI89	Q1R7X8	hycE	569
<i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4	Q2DR95	GURADRAFT_3339	359
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> ATCC 43067/DSM 2661/JAL-1/JCM 10045/NBRC 100440	Q57935	MJ0515	380
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> ATCC 43067/DSM 2661/JAL-1/JCM 10045/NBRC 100440	Q58433	MJ1027	377
<i>Methanococcus maripaludis</i> S2/LL	Q6LX90	ehaO	375
<i>Methanococcus maripaludis</i> S2/LL	Q6LY40	ehbN	375
<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	Q0Y9V9	MemarDRAFT_0807	362
<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	Q0YAS5	MEMARDRAFT_1086	359
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19/DSM 6324/JCM 9639/NBRC 100938	Q8TY43	ehaO	409
<i>Methanosarcina barkeri</i> Fusaro DSM 804	O59656	echE	358
<i>Methanosarcina barkeri</i> str. fusaro	Q46G59	MBAR_A0148	358
<i>Methanosarcina mazei</i> Go1	Q8PUL0	echE	358
<i>Methanosphaera stadtmanae</i> DSM 3091	Q2NED9	ehbN	383

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.9 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 4

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	Q2FLL4	Mhun_2105	361
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	Q2FL36	MHUN_1745	359
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	Q2FTW4	Mhun_2590	409
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H	O27306	MTH1238	381
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Delta H	O26498	MTH398	370
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Marburg	Q9V2X7	ehbN	376
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> Marburg	Q9UXP4	ehaO	370
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	Q2RGG4	Moth_2186	574
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI 1043/ATCC BAA-672	Q6D7T4	hyfG	578
<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	Q3G8L2	PPRODRAFT_3515	409
<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	Q3FYM9	PproDRAFT_0600	557
<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	Q3G5A5	PPRODRAFT_2593	409
<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK	Q1Z850	P3TCK_26857	584
<i>Photobacterium</i> sp. SKA34	Q2C1Q7	SKA34_09553	577
<i>Psychromonas</i> sp. CNPT3	Q1ZGN9	PCNPT3_00371	577
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5/Orsay	Q9V0R8	PYRAB07210	426
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5/Orsay	Q9UYN4	PYRAB14730	588
<i>Pyrococcus furiosus</i> ATCC 43587/DSM 3638/JCM 8422/Vc1	Q8U0Z6	PF1434	427
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	O59107	PH1437	427
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	Q20XP4	RPC_4570	571
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	Q20XW2	RPC_4501	361
<i>Shigella boydii</i> Sb227	Q31Y03	hyfG	571
<i>Shigella boydii</i> Sb227	Q31X85	hycE	569

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.9 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 4

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	Q32D79	hyfG	571
<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	Q32CK9	hycE	569
<i>Shigella flexneri</i> 5 8401	Q0T1E8	hycE	569
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 700930/2457T/serotype 2a	Q83QF5	hycE	569
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 700930/2457T/serotype 2a	Q7UBT6	hycE	569
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	Q3YZ65	hyfG	571
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	Q3YYE0	hycE	565
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> DSM 15242/JCM 11007/NBRC 100824/MBR	Q8RDB4	NuoD	360
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> DSM 15242/JCM 11007/NBRC 100824/MBR	Q8R9B5	HycE	576
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	Q5JIL3	TK2091	426
<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	Q0Y631	TpenDRAFT_0800	537
<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5	Q0Y441	TPENDRAFT_1636	567
uncultured methanogenic archaeon RC-I	Q0W6T4	echE	486
<i>Vibrio angustum</i> S14	Q1ZUB9	VAS14_14279	584
<i>Wolinella succinogenes</i> DSMZ 1740	Q7M872	nuoD	579
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	Q2D7H1	AcryDRAFT_0193	476
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	Q2E2H0	AcelDRAFT_0345	499
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Q89GK2	blr6343	503
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	Q3JMD7	hyfG	567
<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	Q63L65	BPSS1143	551
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Q2T5T8	BTH_II1265	559
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	Q13JW8	Bxe_B0325	515

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.9 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 4

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	Q13II9	Bxe_C0175	522
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	Q3Z681	DET1571	526
<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	Q2DUH6	DehaBAV1DRAFT_0413	526
<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	Q3ZW31	hycE	526
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Q39SF8	Gmet_2597	506
<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	Q39YR0	Gmet_0371	502
<i>Geobacter sulfurreducens</i> ATCC 51573/DSM 12127/PCA	Q74F66	GSU0743	505
<i>Leptospira interrogans</i> 56601/serogroup icterohemorrhagiae/serovar lai	Q8EYD9	hycE	466
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni Fiocruz L1-130	Q72LX0	hycE	466
<i>Methanosarcina acetivorans</i> ATCC 35395/DSM2834/CM 12185/C2A	Q8THY6	MA_4372	545
<i>Methanosarcina mazei</i> ATCC BAA-159/DSM 3647/Goe1/o1/JCM 11883/OCM 88	Q8PY03	MM_1063	530
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	Q2FKT5	Mhun_1818	519
<i>Mycobacterium bovis</i> ATCC BAA-935/AF2122/97	Q7U2V6	hycE	492
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC 25618/H37Rv	Q10884	hycE	492
<i>Nocardioides</i> sp. JS614 JS614	Q3H216	NocaDRAFT_3178	567
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	Q1LE97	Rmet_4667	514
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Q21AT3	RPC_0933	502
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53	Q07T22	RPEDRAFT_2017	502
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	Q132B7	RPD_3851	503

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.9 – Continuación de las [Ni-fe] hidrogenasas del grupo 4

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ATCC 35092/DSM 1617/JCM11322/P2	Q97ZA7	hycE	391
<i>Thermoplasma volcanium</i> ATCC 51530/DSM4299/IFO 9571/GSS1 15438/CM	Q978D6	TV1481	389
Arquea metanogénica RC-I	Q0W2B9	hycE	524

Tabla A.10: Lista de las [Fe-fe] hidrogenasas.

Microorganismo	N° Acceso ¹	Anotación ²	Largo ³
<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYMF	Q3C9E8	AmetDRAFT_2889	582
<i>Alkaliphilus metalliredigenes</i> QYMF	Q3C5M2	AmetDRAFT_1287	591
<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	Q5L986	BF3662	489
<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	Q64PE7	BF3892	489
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29148/DSM 10582/E50/VPI-5482 2079/NCTC	Q8A6P3	BT_1834	482
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29148/DSM 10582/E50/VPI-5482 2079/NCTC	Q8ABI6	BT_0124	588
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	Q2ZJ38	CsacDRAFT_1631	579
<i>Chlamydomonas moewusii</i> SAG 24.91	Q56UD8	hydA1	458
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 21gr	Q9FYU1	hyd1	497

Continúa en la siguiente hoja

¹N° acceso, corresponde al número de acceso proteico en nomenclatura UniProt.²Anotación, corresponde al nombre del gen en nomenclatura UniProt.³Largo, corresponde al número de aminoácidos

Tabla A.10 – Continuación de las [Fe-fe] hidrogenasas

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 21gr, and Cc425	Q8VZZ0	hydA2	505
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> SE	Q6T533	S/N	505
<i>Chlorella fusca</i>	Q8VX03	hydA	436
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824/DSM 792/JCM 1419/LMG 5710/VKM B-1787	Q59262	hydA	582
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824/DSM 792/JCM 1419/LMG 5710/VKM B-1787	Q97E85	CA_C3230	450
<i>Clostridium beijerincki</i> NCIMB 8052	Q2WI78	CbeiDRAFT_0272	644
<i>Clostridium beijerincki</i> NCIMB 8052	Q2WK96	CbeiDRAFT_0932	449
<i>Clostridium beijerincki</i> NCIMB 8052	Q2WUD6	CbeiDRAFT_3964	461
<i>Clostridium beijerincki</i> NCIMB 8052	Q2WVX8	CbeiDRAFT_4712	567
<i>Clostridium difficile</i> 630	Q180F8	hydA	461
<i>Clostridium difficile</i> 630	Q180A2	CD3258	478
<i>Clostridium difficile</i> 630	Q180Q5	hymC	593
<i>Clostridium paraputrificum</i>	Q6F4C7	hydA	582
<i>Clostridium pasteurianum</i> ATCC 6013/DSM 525/NCIB 9486/VKM B-1774/W5	P29166	S/N	574
<i>Clostridium perfringens</i> 13/type A	Q8XNQ6	CPE0276	449
<i>Clostridium perfringens</i> 13/type A	Q9RHU8	hydA	572
<i>Clostridium perfringens</i> 13/type A	Q8XHB0	CPE2575	490
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Q0TUF9	CPF_0270	449
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Q0TM76	CPF_2900	490
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Q0TMV5	hydA	572
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Q0TS68	CPF_1076	696
<i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8237	Q9ZNE4	hydA	572

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.10 – Continuación de las [Fe-fe] hidrogenasas

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Clostridium perfringens</i> SM101	Q0SWA8	CPR_0261	449
<i>Clostridium perfringens</i> SM101	Q0SPY1	CPR_2579	490
<i>Clostridium perfringens</i> SM101	Q0SQK1	hydA	572
<i>Clostridium perfringens</i> SM101	Q0SUE5	CPR_0938	696
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	Q1FJL3	CphyDRAFT_2333	567
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	Q1FJL6	CphyDRAFT_2330	484
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	Q1FHS1	CphyDRAFT_0997	644
<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	Q1FFT8	CphyDRAFT_0772	582
<i>Clostridium saccharobutylicum</i> P262	Q59261	hydA	574
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	Q5MIB2	HupA	562
<i>Clostridium</i> sp. OhILAs	Q1F047	ClosDRAFT_0965	567
<i>Clostridium tetani</i> Massachusetts/E88	Q899J2	CTC_00184	448
<i>Clostridium tetani</i> Massachusetts/E88	Q891G1	CTC_02417	494
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Q9XC55	hydA	579
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Q4CDI0	CtheDRAFT_1275	644
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Q4CGI4	CtheDRAFT_2180	566
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	Q4CDK8	CtheDRAFT_1129	582
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	Q3ZA52	DET0147	573
<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	Q2DWB9	DehaBAV1DRAFT_1225	573
<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	Q3ZWM9	hymC	573
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q18XD7	Dhaf_4051	1150
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q18R81	Dhaf_0601	425
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q18RP8	Dhaf_0459	454

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.10 – Continuación de las [Fe-fe] hidrogenasas

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	Q18T66	Dhaf_1708	527
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24ZF0	DSY0803	425
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24PC7	DSY4326	460
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24N91	DSY4712	555
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Q24Z17	DSY0936	1150
<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54/DSM 12343	Q6AR16	DP0479	471
<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSv54/DSM 12343	Q6AKL7	DP2379	483
<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	Q2D600	DredDRAFT_2292	429
<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	Q2CZF6	DredDRAFT_3054	520
<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	Q2D1M4	DredDRAFT_0478	593
<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	Q2D1M7	DredDRAFT_0475	659
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q9AM36	hydA	421
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q30Z18	Dde_2281	439
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q314X0	Dde_0725	483
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q315X0	Dde_0475	458
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	Q317L4	Dde_0081	421
<i>Desulfovibrio fructosoVorans</i>	Q46508	none	585
<i>Desulfovibrio fructosoVorans</i> DSM 3604	O08311	hydA	421
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	Q46606	hydC	606
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>oxamicus</i> str. Monticello	P13629	hydA	421
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DP4	Q0ENS8	DvulDRAFT_2756	606
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DP4	Q0ENS6	DvulDRAFT_2758	421

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.10 – Continuación de las [Fe-fe] hidrogenasas

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> str. Hildenborough	P07598	hydA	421
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> str. Hildenborough	Q72B67	hydC	606
<i>Entamoeba histolytica</i>	Q9GTX0	S/N	468
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	Q51EJ9	9.t00061	468
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	Q50YQ4	131.t00027	472
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	Q511D6	103.t00038	504
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	Q869B1	S/N	504
<i>Eubacterium acidaminophilum</i>	Q93SF7	hymC	578
<i>Giardia intestinalis</i>	Q9BKJ3	S/N	474
<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803 WB C6	Q7QXP8	S/N	474
<i>Halothermothrix orenii</i> H 168	Q2AFL4	HoreDRAFT_105	456
<i>Halothermothrix orenii</i> H 168	Q2AFM5	HoreDRAFT_1043	570
<i>Halothermothrix orenii</i> H 168	Q2AE40	HoreDRAFT_0394	578
<i>Halothermothrix orenii</i> H 168	Q2AG82	HoreDRAFT_1681	666
<i>Heliobacillus mobilis</i>	Q1MSH5	hydA	606
<i>Megasphaera elsdenii</i> ATCC25940	Q9RGN3	hydA	484
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	Q2RHA6	Moth_1883	460
<i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073	Q2RHS0	Moth_1717	573
<i>Neocallimastix frontalis</i>	Q8TFP2	HydL2	636
<i>Neocallimastix frontalis</i> L2	Q86ZE7	Hyd	389
<i>Nyctotherus ovalis</i>	Q5DM85	HDG	1198
<i>Nyctotherus ovalis</i>	O96948	S/N	1206
<i>Pelobacter carbinolicus</i> DSM 2380	Q3A1L6	Hyd	598
<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	Q3G7B5	PproDRAFT_3331	601
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI	Q1WWT1	S/N	548
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI	Q1X1Z8	S/N	624

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.10 – Continuación de las [Fe-fe] hidrogenasas

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Piromyces</i> sp. E2	Q8TG63	S/N	555
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Q8EAI2	hydA	410
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	Q364V4	Shewana3DRAFT_4172	410
<i>Shewanella</i> sp. MR-4	Q0HF49	Shewmr4_3250	410
<i>Spironucleus barkhanus</i> ATCC50380	Q9GTP1	S/N	467
<i>Symbiobacterium thermophilum</i> T/IAM 14863	Q67J76	STH3293	456
<i>Symbiobacterium thermophilum</i> T/IAM 14863	Q67JF9	STH3209	596
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	Q3MXY8	SfumDRAFT_0499	417
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> MPOB	Q3MXZ2	SfumDRAFT_0495	574
<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i> Goettingen	Q0AVN2	Swol_1925	387
<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i> Goettingen	Q0AU79	Swol_2436	563
<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i> Goettingen	Q0AY73	Swol_1017	574
<i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB	Q2LSB7	SYNAS_10950	605
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> ATCC 33223	Q3CJE2	Teth39DRAFT_0375	581
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> DSM 15242/JCM 11007/NBRC 100824/MBR	Q8RBC8	NuoG	581
<i>Thermotoga maritima</i> ATCC 43578/MSB8/DSM 3109/JCM10099	Q9WY44	TM_0201	608
<i>Thermotoga maritima</i> ATCC 43578/MSB8/DSM 3109/JCM10099	O52683	hydA	645
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405/CIP 103919/DSM 14222	Q73N78	TDE_1277	493

Continúa en la siguiente hoja

Tabla A.10 – Continuación de las [Fe-fe] hidrogenasas

Microorganismo	N° acceso	Anotación	Largo
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405/CIP 103919/DSM 14222	Q73MB6	TDE_1593	596
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Q27096	TvhydB	449
<i>Trichomonas vaginalis</i> ATCC 30001	Q27094	TvhydA	468
Hidrogenasa, putativa [<i>Thermotoga maritima</i> MSB8]	AAD36491	S/N	301
Hierro hidrogenasa putativa [<i>Trichomonas vaginalis</i>]	AAG31037	S/N	589
<i>Enterobacter cloacae</i> IT-BT 08	AAU11811	S/N	147

F (Phe)	S (Ser)	Y (Tyr)	D (Asp)	K (Lys)	V (Val)
UUU (9.2)	AGC (20.8)	UAU (9.9)	UUU (9.2)	AAA (19.5)	GUG (27.5)
UUC (24.7)	UCG (13.9)	UAC (20.6)	UUC (24.7)	AAG (27.5)	GUC (19.8)
L (Leu)	P (Pro)	H (His)	C (Cys)	G (Gly)	A (Ala)
CUG (52.6)	CCC (10.1)	CAU (6.3)	UGU (1.8)	GGC (47.9)	GCC (49.4)
CUC (13.8)	CCG (24.9)	CAC (12.6)	UGC (5.7)	GGU (14.7)	GCG (40.9)
I (Ile)	T (Thr)	Q (Gln)	R (Arg)	E (Glu)	N (Asn)
AUC (33.3)	ACC (27.6)	CAG (40.3)	CGU (11.9)	GAA (25.5)	AAU (7.3)
AUU (12.4)	ACG (15.4)	CAA (10.6)	CGC (29.1)	GAG (31.6)	AAC (28.1)
			CGG (11.3)		

Figura A.1: Uso de codones utilizados normalmente por *E. aerogenes* durante la traducción. Esta tabla muestra las abreviaciones del nombre de los aminoácidos. En paréntesis se encuentra el valor del uso relativo para cada uno de los codones.

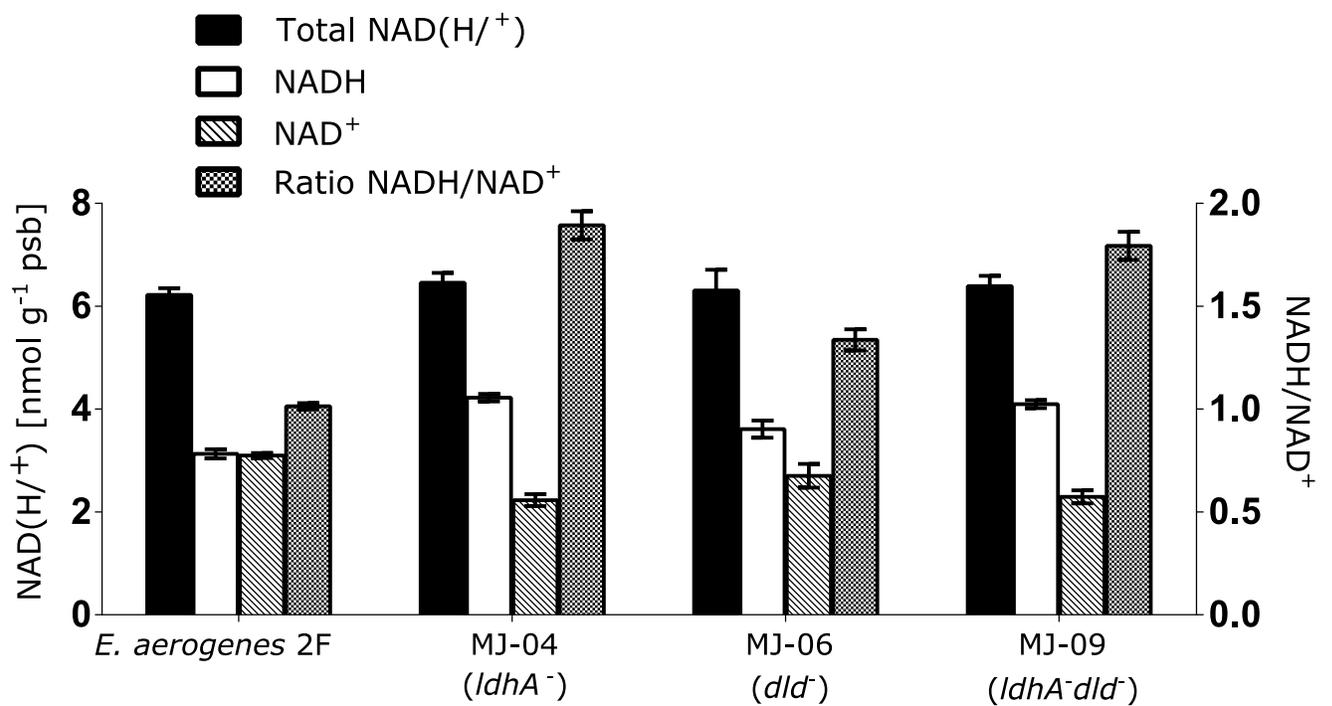


Figura B.1: Esta figura muestra la concentración total de NAD(H/+) y las concentraciones de NADH y NAD⁺ intracelular (expresado como nmol de NAD(H/) por gramo de peso seco de bacterias -psb-) y sus razones para la cepa parental *E. aerogenes* 2F y las cepas mutantes MJ-04, MJ-06 y MJ-09. $n = 3$

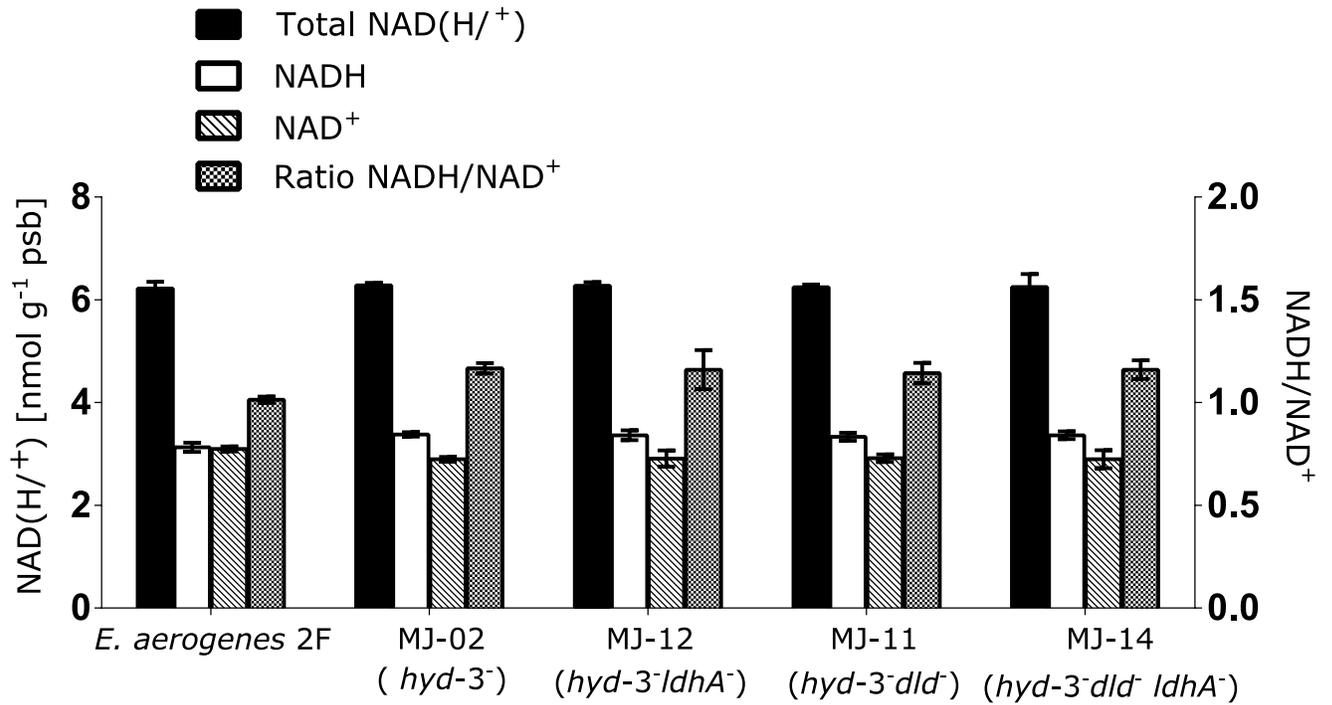


Figura B.2: Esta figura muestra la concentración total de NAD(H⁺) y las concentraciones de NADH y NAD⁺ intracelular (expresado como nmol de NAD(H/)) por gramo de peso seco de bacterias -psb-) y sus razones para la cepa parental *E. aerogenes* 2F y las cepas mutantes MJ-02, MJ-12, MJ-11 y MJ-14. $n = 3$

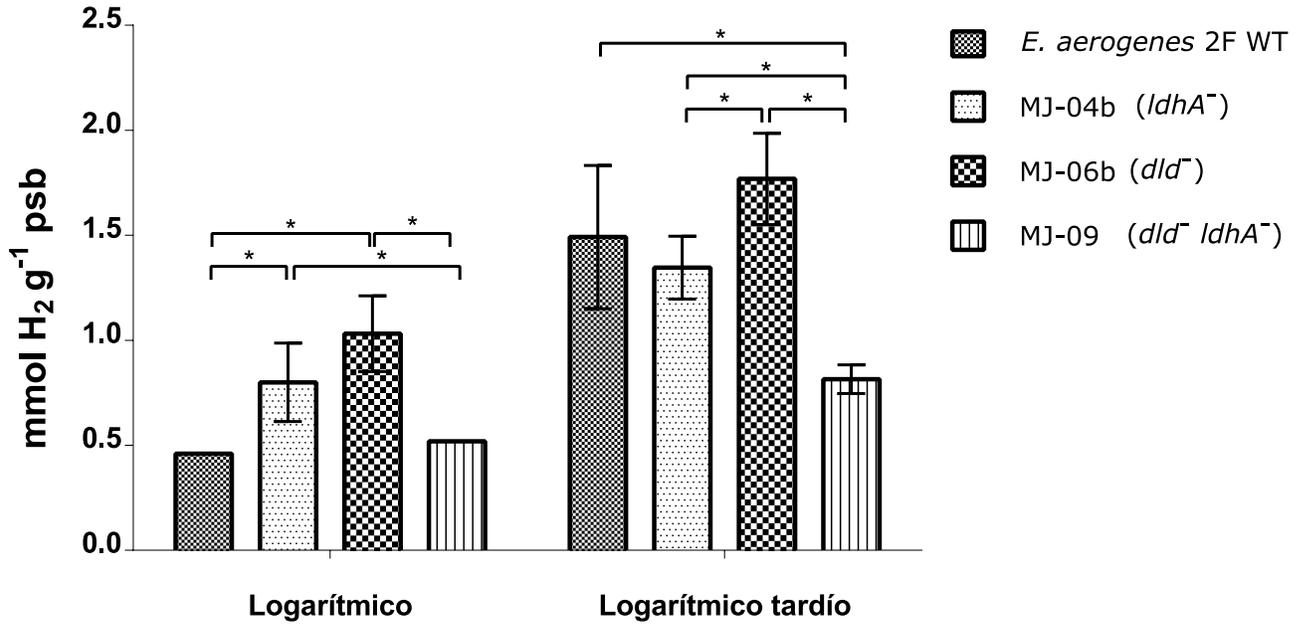


Figura B.3: Producción global de hidrógeno en fase logarítmica medio LB. Esta es una representación gráfica de la Tabla 4.8.

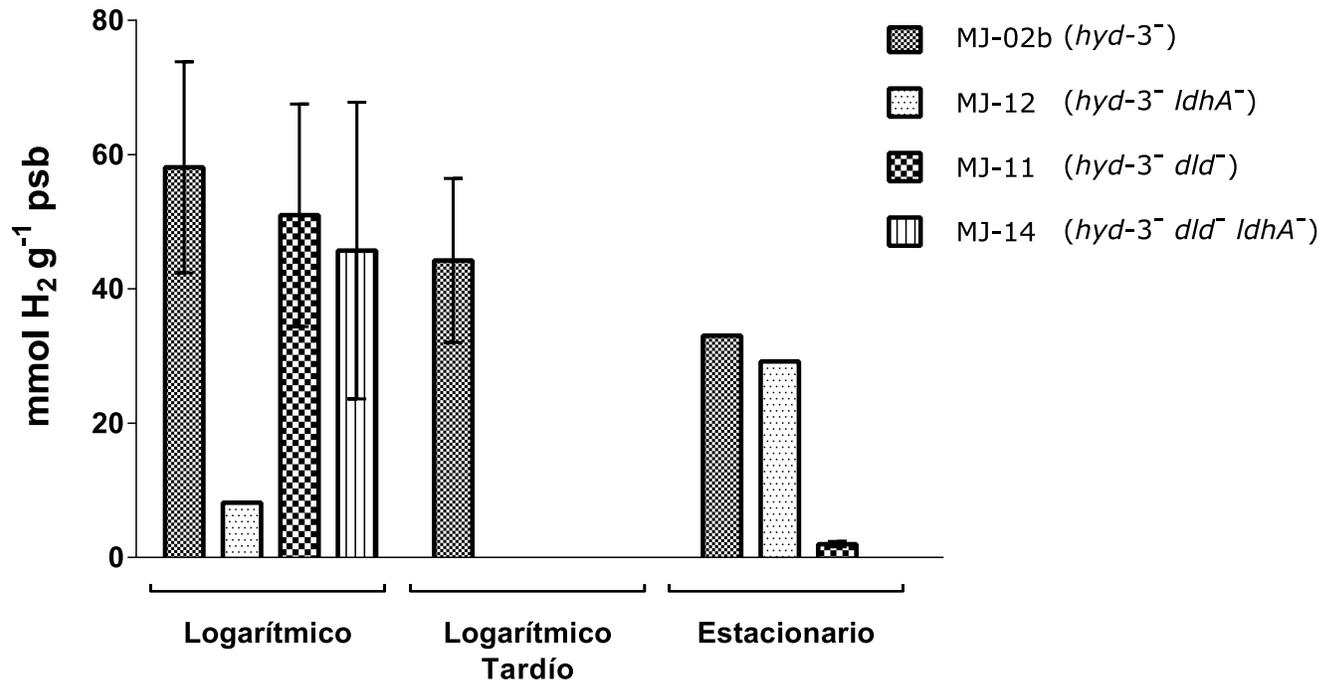


Figura B.4: Producción de hidrógeno en fase logarítmica medio LB y fondo genético *hyd-3⁻*. Esta es una representación gráfica de la Tabla 4.9.

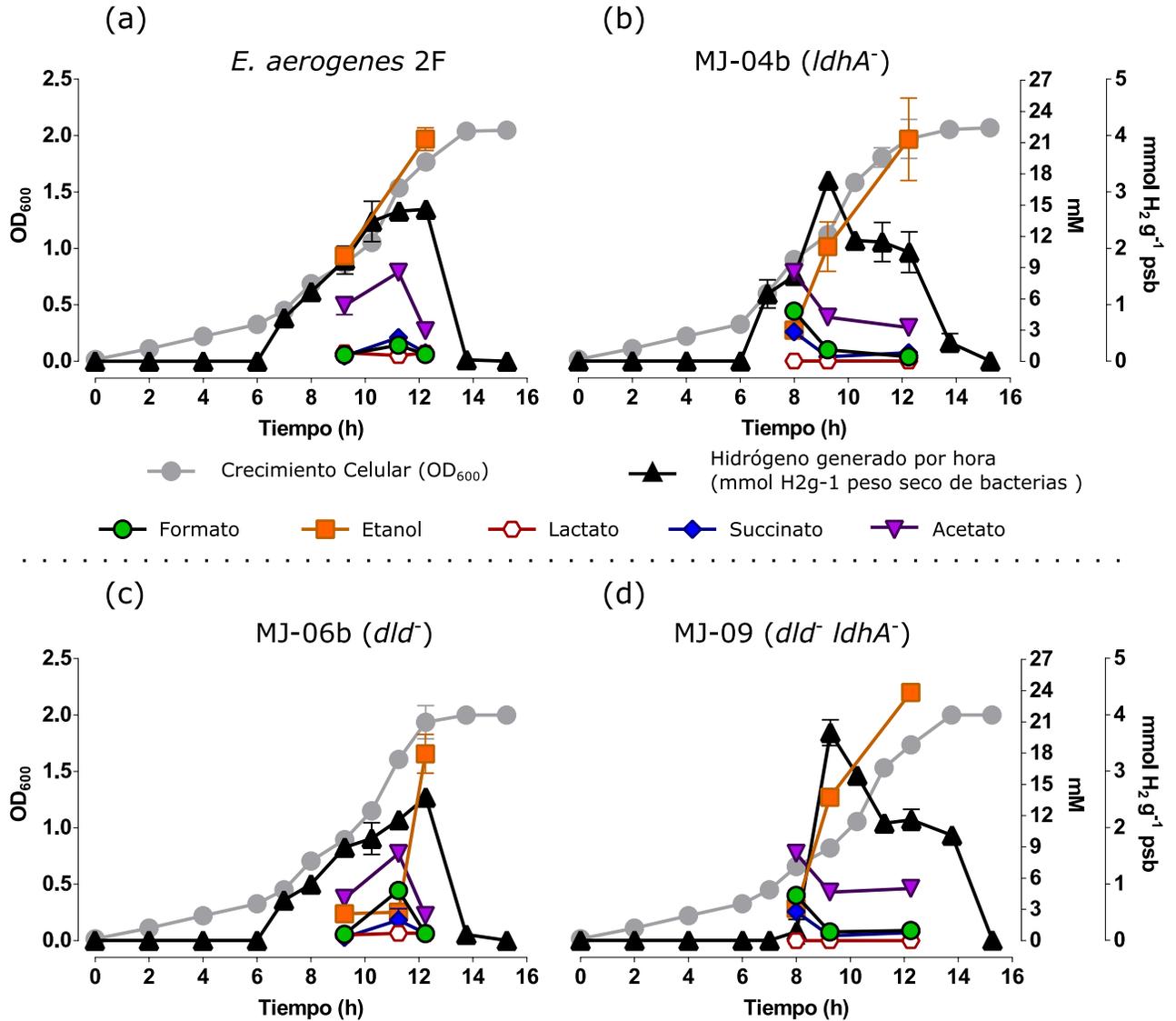


Figura B.5: Productos metabólicos de la fermentación en medio mínimo suplementado con glucosa con las cepas para el estudio de la producción global de bioH₂. Durante la fermentación se tomaron muestras líquidas las que fueron analizadas a través de HPLC (*high-performance liquid chromatography*). Las muestras analizadas corresponden a los productos metabólicos en las cercanías de los puntos con mayor producción de bioH₂. Tanto la curva de crecimiento como la producción de bioH₂ son las mismas de la Figuras 4.28 y fueron agregadas como referencia. En la parte central de la figura se encuentra la notación para cada uno de los metabolitos cuya concentración se encuentra expresada en mM de metabolito.

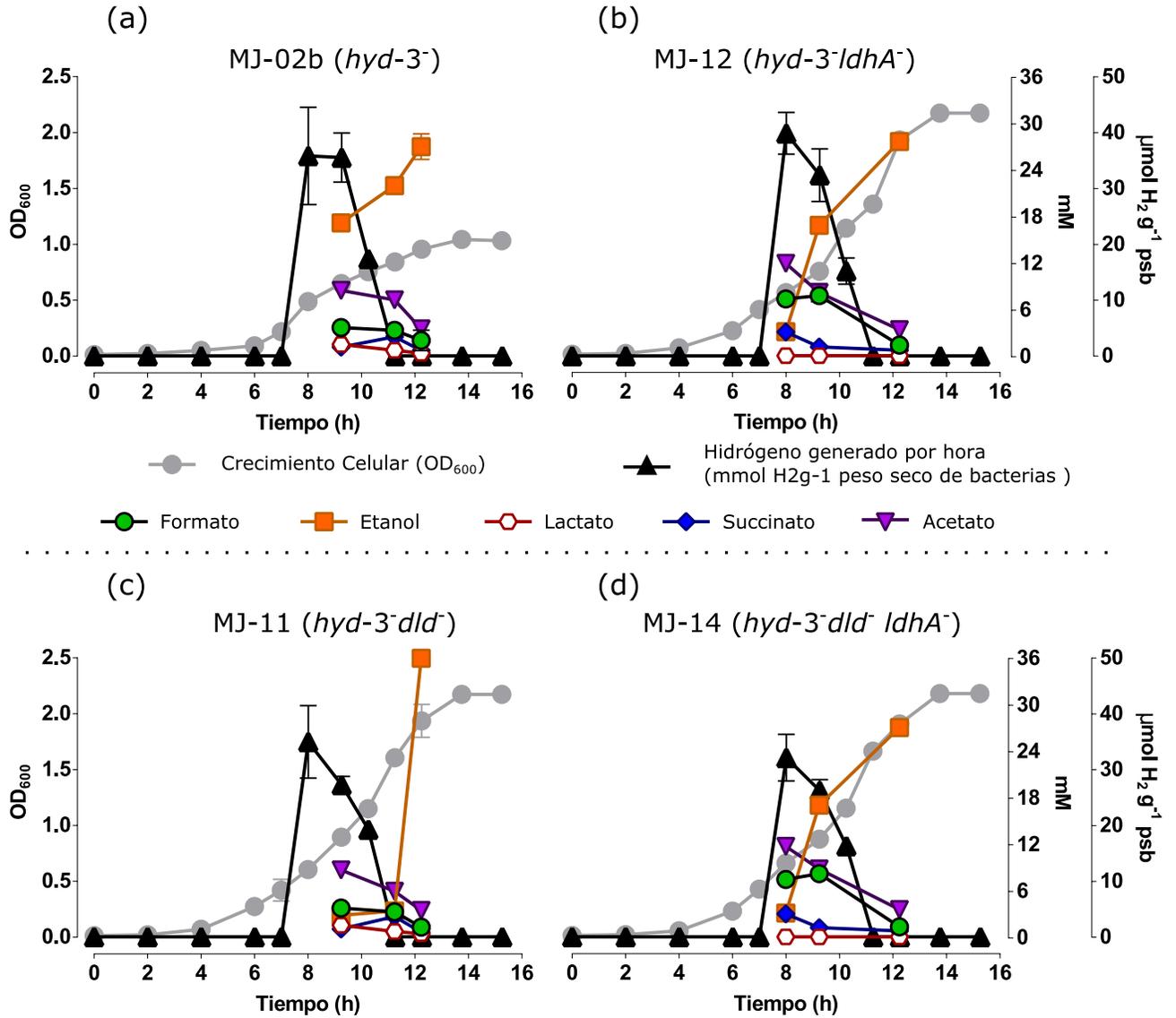


Figura B.6: Productos metabólicos de la fermentación en medio mínimo suplementado con glucosa para las cepas con fondo genético *hyd-3⁻*. Durante la fermentación se tomaron muestras líquidas las que fueron analizadas a través de HPLC (*high-performance liquid chromatography*). Las muestras analizadas corresponden a los productos metabólicos en las cercanías de los puntos con mayor producción de bioH₂. Tanto la curva de crecimiento como la producción de bioH₂ son las mismas de la Figuras 4.30 y fueron agregadas como referencia. En la parte central de la figura se encuentra la notación para cada uno de los metabolitos cuya concentración se encuentra expresada en mM de metabolito.

Tabla C.1: Tabla de metabolitos involucrados en la glicólisis

Metabolito	Abreviación
β -D-glucosa 6-fosfato	G6P
D-fructosa 6- fosfato	F6P
Fructosa-1,6-bisfosfato	F1,6BP
Dihidroxiacetona fosfato	DHAP
D-gliceraldehido 3- fosfato	GAP
1,3-bisfosfo-D-glicerato	1,3 PG
3-fosfoglicerato	3PG
2-fosfoglicerato	2PG
Fosfoenolpiruvato	PEP
Piruvato	PYR
Coenzima A	CoA
Acetil Coenzima A	AcCoA
Oxalacetato	OAA
Formato	FOR

Tabla C.2: Tabla de metabolitos involucrados en la glicólisis especificando

Enzima	EC N°	Gen	Reacción
Glucosa 6-fosfato isomerasa	5.3.1.9	EAE_08345	G6P ↔ F6P
6-fosfofructokinasa	2.7.1.11	EAE_07545 EAE_16965	F6P+ATP → F16BP+ADP
Fructosa 1,6-bisfosfatasa	3.1.3.11	EAE_06460 EAE_09580	F16P → F6P+Pi
Fructosa-bisfosfatoaldolasa	4.1.2.13	EAE_02960 EAE_23670	F16P ↔ DHAP+GAP
Aldolasa putativa		EAE_18680	
Triosa-fosfato isomerasa	5.3.1.1	EAE_06480	GAP ↔ DHAP
Gliceraldehido 3-fosfato Dehidrogenasa	1.2.1.12	EAE_21720 EAE_20370	GAP+Pi+NAD ⁺ ↔ NADH+1,3PG
Fosfoglicerato kinasa	2.7.2.3	EAE_02965	1,3PG+ADP ↔ 3PG+ATP
Fosfoglicerato mutasa	5.4.2.1	EAE_17410 EAE_18925 EAE_20975 EAE_10645 EAE_06270 EAE_14280	3PG ↔ 2PG
Enolasa	4.2.1.11	EAE_01950	2PG ↔ PEP+H ₂ O
Piruvato kinasa	2.7.1.40	EAE_17165 EAE_22820	PEP+ADP ↔ PYR+ATP
Fosfoenolpiruvato sintasa	2.7.9.2	EAE_17080	PYR+ATP+H ₂ O → PEP+AMP+Pi+2H ⁺
Piruvato dehidrogenasa	1.2.4.1 2.3.1.12 1.8.1.4	EAE_14980 EAE_11380 EAE_11385 EAE_11390	PYR+CoA+NAD ⁺ → NADH+CO ₂ +AcCoA
Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	4.1.1.49	EAE_05235	OAA+ATP → PEP+CO ₂ +ADP
Fosfoenol piruvato carboxilasa	4.1.1.31	EAE_07635	PEP+CO ₂ → OAA+Pi
Formato acetiltransferasa	2.3.1.54	EAE_10070 EAE_14720 EAE_15120	CoA+PYR → AcCoA+FOR

Tabla C.3: Tabla de metabolitos involucrados en vía de las pentosas fosfato

Metabolito	Abreviación
6-fosfo D-gluco-1,5-lactona	PGL
6-fosfo D-gluconato	PGC
D-Ribulosa 5-fosfato	RL5P
D-Ribulosa 5-fosfato (isómero)	R5P
D-Eritrosa 4-fosfato	E4P

Tabla C.4: Tabla de metabolitos involucrados en vía de las pentosas fosfato

Enzima	EC N°	Gen	Reacción
Glucosa 6-fosfato 1-dehidrogenasa	1.1.1.49	EAE_22810	$G6P + NADP^+ \rightarrow PGL + NADPH + H^+$
6-Fosfoglucono lactonasa	3.1.1.31	EAE_07100 EAE_14340	$PGL + H_2O \rightarrow PGC + H^+$
6-fosfogluconate dehidrogenasa	1.1.1.44	EAE_23480	$PGC + NADP^+ \rightarrow RL5P + NADPH + CO_2$
Ribosa 5-fosfato isomerasa	5.3.1.6	EAE_02935	$RL5P \leftrightarrow R5P$
Ribulose 5-fosfato-3-epimerasa	5.1.3.1	EAE_05145	$RL5P \leftrightarrow X5P$
Transketolasa	2.2.1.1	EAE_13590 EAE_13595 EAE_00465 EAE_02975	$R5P + X5P \leftrightarrow S7P + GAP$
Transaldolasa	2.2.1.2	EAE_00460 EAE_10710	$GAP + S7P \leftrightarrow E4P + F6P$
Transketolasa	2.2.1.1		$X5P + E4P \leftrightarrow F6P + GAP$

Tabla C.5: Tabla de metabolitos involucrados en el ciclo ácido tricarboxílico

Metabolito	Abreviación
Citrato	CIT
D-treo-isocitrato	TICT
2-Oxoglutarato	OXG
Succinil-CoA	SUCCoA
Succinato	SUC
Fumarato	FUM
Glioxilato	GLX
(S)- Malato	MAL

Tabla C.6: Tabla de metabolitos involucrados en el ciclo ácido tricarboxílico

Enzima	EC N°	Gen	Reacción
Citrato sintasa tipo II	2.3.3.1	EAE_14145	AcCoA+OAA+H ₂ O → CoA+CIT+H ⁺
Aconitasa hidratasa	4.2.1.3	EAE_11410 EAE_21330	CIT ↔ TICT
Isocitratodehidrogenasa	1.1.1.42	EAE_16590	TICT+NADP ⁺ ↔ CO ₂ +NADPH+OXG
2-Oxoglutarato dehidrogenasa	1.2.4.2	EAE_10355	OXG+NAD ⁺ +CoA → CO ₂ + NADH +SUCCoA
		EAE_10360	
		EAE_14170	
		EAE_14175	
	2.3.1.61	EAE_14175	
	1.8.1.4	EAE_11390	
Succinil-CoAsintetasa	6.2.1.5	EAE_14180 EAE_14185	SUCCoA+ADP ⁺ +Pi ↔ ATP+CoA+SUC
Succinato dehidrogenasa	1.3.99.1	EAE_14160 EAE_14165	SUC+FAD ⁺ → FADH+FUM
Fumarato reductasa	1.3.99.1	EAE_09225	FUM+FADH → SUC+FAD ⁺
		EAE_09230	
		EAE_09235	
Fumarato hidratasa	4.2.1.2	EAE_18045 EAE_18205	FUM+H ₂ O ↔ MAL
Malato dehidrogenasa	1.1.1.37	EAE_04590	MAL+NAD ⁺ ↔ NADH+OAA+H ⁺
Isocitrato liasa	4.1.3.1	EAE_08260	TICT → GLX+SUC
Malato sintasa	2.3.3.9	EAE_08255	GLX+AcCoA+H ₂ O → MAL+CoA+ H ⁺

Tabla C.7: Tabla de metabolitos involucrados en el metabolismo del piruvato

Metabolito	Abreviación
Acetaldehido	ACD
Etanol	ETOH
Acetilfosfato	ACTP
Acetato	ACT
(R)-Lactato	LAC
Dióxido de carbono	CO ₂

Tabla C.8: Tabla de metabolitos involucrados en el metabolismo del piruvato

Enzima	EC N°	Gen	Reacción
Aldehído dehidrogenasa		EAE_01340 EAE_02995 EAE_03405 EAE_10085	
Aldehído dehidrogenasa (putativa)	1.2.1.10	EAE_10240 EAE_10400 EAE_13415	AcCoA+NADH+H ⁺ ↔ ACD+CoA+NAD ⁺
Acetaldehído dehidrogenasa		EAE_17425 EAE_20525	
Alcohol dehidrogenasa	1.1.1.1	EAE_16895 EAE_06170 EAE_03500	ACD+NADH → ETOH+ NAD ⁺ +CoA
Fosfato acetiltransferasa	2.3.1.8	EAE_24475	AcCoA+Pi ↔ ACTP+CoA
Acetato kinasa	2.7.2.1	EAE_24470	ACTP+ADP ↔ ATP+ACT
Fomato hidrogeno liasa		EAE_01665	FOR → CO ₂ +H ₂
Lactato dehidrogenasa	1.1.1.28	EAE_20575 EAE_23820	NADH+PYR → LAC+NAD ⁺
Malato dehidrogenasa	1.1.1.37	EAE_04590	NADH+OAA ↔ MAL+NAD ⁺
Fumarasa	4.2.1.2	EAE_18045 EAE_18205 EAE_18060	MAL ↔ FUM+H ₂ O
Fumurato reductasa	1.3.99.1	EAE_09230 EAE_09225	FUM+NADH → NAD ⁺ +SUC

Tabla C.9: Tabla de metabolitos involucrados en el metabolismo energético

Metabolito	Abreviación
Nicotinamida adenín dinucleótido reducido	NADH
Nicotinamida adenín dinucleótido Oxidado	NAD ⁺
Aceptor de electrones oxidado	OEAC
Aceptor de electrones reducido	REAC
Flavín adenín dinucleótido reducido	FADH ₂
Flavín adenín dinucleótido Oxidado	FAD
Adenosín trifosfato	ATP
Adenosín difosfato	ADP
Fosfato	Pi

Tabla C.10: Tabla de metabolitos involucrados en el metabolismo energético

Enzima	EC N°	Gen	Reacción
NADH dehidrogenasa	1.6.5.3	EAE_01655 EAE_04195 EAE_24380 EAE_24430	$\text{NADH} + \text{OEAC} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{REAC} + 2 \text{H}^+ \text{Ex}$
Putativa Citocromo oxidasa	1.10.3.10	EAE_12730 EAE_12725 EAE_12720 EAE_12715	$2\text{REAC} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{OEAC} + 4\text{H}^+ \text{Ex}$
Transhidrogenasa	1.6.1.1	EAE_07665	$\text{NADPH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{NADH}$
Succinatodehidrogenasa (complejo)			$\text{FADH}_2 + \text{OEAC} \rightarrow \text{FAD}^+ + \text{REAC}$
Transhidrogenasa	1.6.1.1	EAE_07665	$\text{NADP} + \text{NADH} + 2\text{H}^+ \text{Ex} \rightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}$
F0F1-ATPase	3.6.3.14	EAE_17155 EAE_07160 (...) EAE_07200	$\text{ADP} + \text{Pi} + 3\text{H}^+ \text{Ex} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
Aldenilato kinasa	2.7.4.3	EAE_13010	$\text{ATP} + \text{AMP} \leftrightarrow 2 \text{ADP}$
ATP drain			$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$
Formato dehidrogenasa	1.1.99.33	EAE_07405 EAE_07410 EAE_07415 EAE_07420 EAE_17440 EAE_19860	$\text{FOR} + \text{OEAC} \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{REAC}$
Polifosfato inorgánico /ATP-NAD kinasa	2.7.1.23	EAE_01135 ppnK	$\text{ATP} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{ADP} + \text{NADP}^+$
Lactato dehidrogenasa	1.1.2.3	EAE_06235	$\text{LAC} + \text{OEAC} \rightarrow \text{PYR} + \text{REAC}$

Tabla C.11: Tabla de metabolitos involucrados en las reacciones de transporte

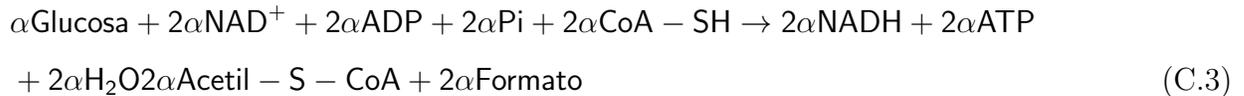
Metabolito	Reacción
Glucosa	GLCE _x +PEP → G6P+PYR
Succinato	SUC ↔ SUCE _x +H ⁺ Ex
Acetato	ACT ↔ ACTE _x +H ⁺ Ex
Etanol	ETOH ↔ ETOHE _x +H ⁺ Ex
Dióxido de carbono	CO ₂ ↔ CO ₂ Ex
Fosfato	Pi ↔ PiEx+H ⁺ Ex
Hidrógeno	H ₂ ↔ H ₂ Ex
Piruvato	PYR ↔ PYRE _x + H ⁺ Ex
Formato	FOR ↔ FORE _x
Lactato	LAC ↔ LACE _x +H ⁺ Ex
Oxígeno	O ₂ Ex ↔ O ₂

C.1 Metabolismo anaeróbico de *E.aerogenes 2F*

Actividad Piruvato formato liasa



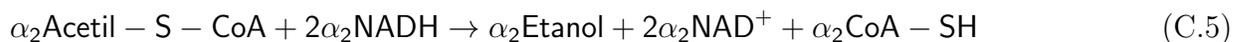
Reacción neta Ecuación (C.1) y (C.2)



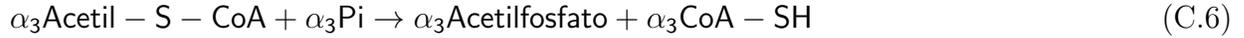
Producción de Hidrógeno



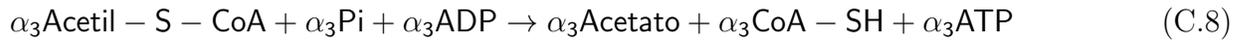
Producción de Etanol



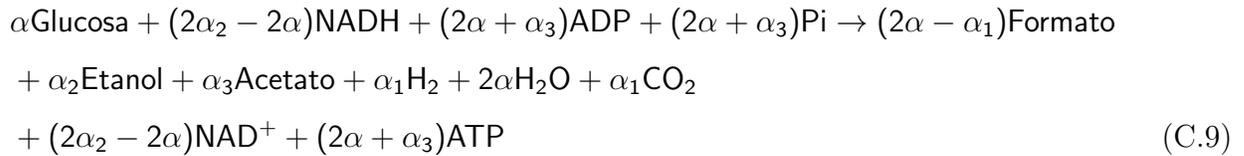
Producción de Acetato



Reacción neta Ecuación (C.6) y (C.7)



Reacción neta Ecuación (C.3), (C.4), (C.5) y (C.8)



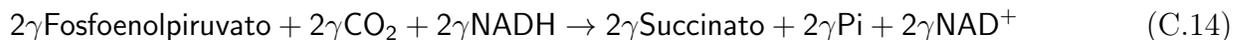
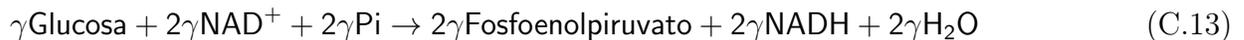
Producción de Lactato



Reacción neta Ecuación (C.10), (C.11)



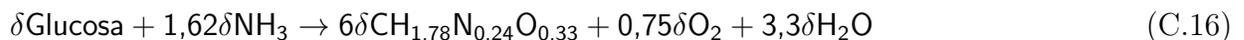
Producción de Succinato



Reacción neta Ecuación (C.13) y (C.14)



Crecimiento celular



Metabolismo Anaeróbico completo: Reacción neta Ecuación (C.9), (C.12), (C.15) y (C.16), donde $\alpha + \beta + \gamma + \delta = 1$

