
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 |