



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

BIOLOGÍA SINTÉTICA PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN
ESCHERICHIA COLI BAL1611 A PARTIR DE CARBOHIDRATOS DE *MACROCYSTIS*
PYRIFERA

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

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

JAVIERA DEL PILAR GÓMEZ MURÚA

PROFESOR GUÍA:
ÁLVARO OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
JUAN ASENJO DE LEUZE
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

SANTIAGO DE CHILE

2019

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE: Ingeniera Civil en Biotecnología y grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Química
POR: Javiera del Pilar Gómez Murúa
FECHA: 21 de enero de 2019
PROFESOR GUÍA: Álvaro Olivera Nappa

BIOLOGÍA SINTÉTICA PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN
ESCHERICHIA COLI BAL1611 A PARTIR DE CARBOHIDRATOS DE *MACROCYSTIS*
PYRIFERA

El aumento del consumo energético y la escasez de recursos de origen fósil, han impulsado proyectos de generación de biocombustibles de tercera y cuarta generación como el de producción de etanol a partir del alga chilena *M. pyrifera* mediante la bacteria *E. coli* BAL1611. En este estudio, se obtuvo rendimientos de producto y biomasa menores que los reportados con el alga original *S. japonica*. Hipotéticamente, habría un desbalance *redox* interno en la bacteria por lo que, para mejorar la producción de etanol, se decide estudiar *in silico* cómo afectan las fuentes de carbono en la distribución de flujos y concentración de metabolitos, y así proponer circuitos genéticos o metabólicos que regulen el sistema. Además, se decide proponer nuevos productos de interés comercial que se pueden generar desde *M. pyrifera* mediante *E. coli* BAL1611.

Las simulaciones del modelo cinético construido para *E. coli* BAL1611 muestran que existe escasez de poder reductor intracelular, aunque la causa de la menor producción de etanol se debe a la saturación de la enzima KDG-6-fosfato aldolasa (EDA) de la ruta de Entner-Doudoroff. Los estudios para optimizar la producción de etanol a partir de *M. pyrifera* indican que la sobreexpresión de EDA y alcataldehido deshidrogenasa (ALDH), junto con el *knock-out* de malato-quinona oxidoreductasa (MQO), es la combinación de mutaciones que genera el mayor rendimiento de producto/sustrato, correspondiente a 0,29, aproximadamente el doble que para el caso de la *E. coli* BAL1611 sin mutaciones.

Por otra parte, analizando otros productos de interés como ácido láctico y succínico queda de manifiesto que, utilizando *Macrocystis pyrifera* como sustrato, *E. coli* BAL1611 es una inadecuada alternativa para generar ácido láctico debido a los bajos rendimientos alcanzados. En cuanto a ácido succínico, se propone como combinación de mutaciones la sobreexpresión de la enzima EDA y el transporte de succinato, junto con el *knock-out* de succinato deshidrogenasa (SDH) y ALDH, obteniendo un rendimiento de 2,37, cinco órdenes de magnitud mayor al caso de la *E. coli* BAL1611 original. Además, se observa una relación inversa entre el crecimiento y la producción para etanol y ácido succínico.

Finalmente, se propone implementar las mutaciones respectivas para cada producto en un circuito genético que regule la producción mediante *quorum sensing*, disociando el crecimiento de la producción. Además, se sugiere realizar mejoras en el planteamiento de algunas ecuaciones del modelo, para luego construir una plataforma que permita determinar todos los bioproductos de interés comercial que puedan ser generados de forma eficaz a partir de *Macrocystis pyrifera* mediante la *E. coli* BAL1611.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este proceso de realización de la tesis me embargan muchas emociones y sentimientos diferentes, pero sin duda alguna el que predomina es el de felicidad por haber vivido la mejor etapa universitaria que pudiera haber imaginado. Por lo mismo, no me queda más que agradecer a todas las personas que formaron parte de este proceso, y que hicieron que me lleve solo grandiosos recuerdos.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi familia, especialmente a mis papás y a mi abuelita Helia, que siempre creyeron en mí y me motivaron a llevar a cabo cualquier meta que me propusiera. También a mis gatitas Bianca, y a la nueva integrante de la familia Ámbar, por su cariño incondicional.

Quisiera agradecer en segundo lugar al profesor Álvaro, por aceptar ser mi profesor guía y por confiar en mí años atrás para formar parte del equipo docente de un curso revolucionario para la época, y que actualmente se convirtió en uno de los cursos base de la facultad. Gracias también por estar siempre disponible para mis múltiples consultas, a pesar de lo colapsado que suele estar, y por ese don que tiene para transformar los problemas en oportunidades con solo cambiar el punto de vista.

También les agradezco a mis amigas del colegio, Coté, Nati y Maire, por su amistad incondicional que ha perdurado todos estos años, por todos los consejos, viajes, risas y momentos no tan felices que hemos compartido y en los que nos hemos apoyado mutuamente, y por todos los buenos momentos que sin duda vendrán.

Les agradezco además a mis amigos que conocí a lo largo de la carrera, Iván, Fabi y España, por todas las risas, chelas y bailes compartidos, y por sus palabras de apoyo cuando la tesis se ponía cuesta arriba. A Juan, por todas las conversaciones filosóficas y las sin sentido aparente, por su ilimitada paciencia, y por todas las veces que nos quedamos hasta tarde rayando los vidrios de la pecera con las ecuaciones para ayudarme cuando el modelo se ponía en mi contra. A Rosa, por sacar la Javi deportista que llevo dentro (bien dentro quizás), y por todas las conversaciones sagitarianas y helados de la cafeta compartidos. A Anariky y Lucho, por todas las experiencias internacionales vividas y sus palabras de apoyo y ánimo cuando las necesité.

Finalmente, pero no por eso menos importante, quiero agradecerles a mis amigos del CeBiB, que por nuestro común sentido del humor, gusto por los brebajes, y por los tantos retiros espirituales y workshops vividos, hicieron que todo el proceso de la tesis fuera el mejor que pudiera haber imaginado.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1. Macroalgas pardas..... | 3 |
| 2.1.1. <i>Saccharina japonica</i> | 5 |
| 2.1.2. <i>Macrocystis pyrifera</i> | 5 |
| 2.2. Microorganismo utilizado: <i>Escherichia coli</i> BAL1611 | 5 |
| 2.3. Producción de etanol mediante <i>E. coli</i> BAL1611 | 7 |
| 2.4. Modelos matemáticos en sistemas biológicos | 8 |
| 2.4.1. Modelos matemáticos de <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| 2.5. Biología sintética | 14 |
| 2.6. Productos biológicos de interés comercial | 16 |
| 2.6.1. Ácido láctico..... | 18 |
| 2.6.2. Ácido succínico..... | 20 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 23 |
| 4. OBJETIVOS | 23 |
| 4.1. Objetivo General | 23 |
| 4.2. Objetivos Específicos | 23 |
| 5. METODOLOGÍA | 24 |
| 5.1. Mejora <i>in silico</i> de <i>Escherichia coli</i> BAL1611 | 24 |
| 5.1.1. Análisis <i>in silico</i> de <i>Escherichia coli</i> nativa | 24 |
| 5.1.2. Construcción del modelo cinético de <i>E. coli</i> BAL1611 | 25 |
| 5.1.3. Comparación de las vías metabólicas entre <i>E. coli</i> nativa y BAL1611 | 25 |
| 5.1.4. Estudios para maximizar la producción de etanol..... | 27 |
| 5.2. Búsqueda de nuevos productos generados por <i>E. coli</i> BAL1611 | 28 |
| 5.3. Propuestas para mejorar la producción mediante biología sintética | 29 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 30 |
| 6.1. Mejora <i>in silico</i> de <i>Escherichia coli</i> BAL1611 | 30 |
| 6.1.1. Análisis <i>in silico</i> de <i>Escherichia coli</i> nativa | 30 |
| 6.1.2. Construcción del modelo cinético de <i>E. coli</i> BAL 1611 | 32 |

| | |
|--|-----|
| 6.1.3. Comprensión del modelo cinético de <i>E. coli</i> BAL1611 y búsqueda del problema metabólico para producción de etanol..... | 37 |
| 6.1.4. Análisis de propuestas de mejora para producción de etanol en <i>E. coli</i> BAL1611 | 47 |
| 6.1.5. Análisis de la influencia del poder reductor en la producción de etanol..... | 53 |
| 6.1.6. Estudios para maximizar la producción de etanol..... | 55 |
| 6.2. Búsqueda de nuevos productos de interés comercial..... | 63 |
| 6.2.1. Ácido láctico..... | 63 |
| 6.2.2. Ácido succínico..... | 69 |
| 6.3. Propuestas para mejorar la producción mediante biología sintética | 74 |
| 7. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN | 76 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 78 |
| 9. ANEXOS | 85 |
| 9.1. Anexo A: Modelo de Millard et. al. (2017) | 85 |
| 9.1.1. Ecuaciones diferenciales | 85 |
| 9.1.2. Velocidades enzimáticas y sus parámetros..... | 87 |
| 9.2. Anexo B: Matriz estequiométrica..... | 106 |
| 9.3. Anexo C: Cambios en las cinéticas que involucran pH | 108 |
| 9.4. Anexo D: Cálculo del crecimiento estándar de una <i>E. coli</i> nativa | 108 |
| 9.5. Anexo E: Resultados análisis del flujo de alimentación de glucosa en <i>E. coli</i> nativa | 109 |
| 9.6. Anexo F: Comparación de las reacciones de los modelos cinéticos existentes..... | 121 |
| 9.7. Anexo G: Resultados simulaciones con enzimas nuevas incorporadas | 125 |
| 9.8. Anexo H: Estimación del parámetro K_{cat} de la enzima KDGK de <i>Vibrio splendidus</i> | 130 |
| 9.9. Anexo I: Estimación de la velocidad máxima de la enzima EDA de <i>Vibrio splendidus</i> | 130 |
| 9.10. Anexo J: Modelo cinético de <i>E. coli</i> BAL1611 | 130 |
| 9.10.1. Nuevo sistema de ecuaciones diferenciales..... | 130 |
| 9.10.2. Velocidades enzimáticas incorporadas | 133 |
| 9.11. Anexo K: Esquemas de las simulaciones para estudiar <i>in silico</i> a la <i>E. coli</i> BAL1611 | 137 |
| 9.12. Anexo L: Comparación de los componentes de la velocidad de crecimiento | 154 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 9.13. | Anexo M: Resultados de las simulaciones con poder reductor en la producción de etanol..... | 155 |
| 9.14. | Anexo N: Simulaciones de la optimización de la producción de etanol | 161 |
| 9.14.1. | Una mutación | 161 |
| 9.14.2. | Dos mutaciones..... | 192 |
| 9.14.3. | Tres o más mutaciones | 207 |
| 9.15. | Anexo O: Simulaciones de la optimización de la producción de ácido láctico y ácido succínico | 210 |
| 9.15.1. | Ácido láctico | 210 |
| 9.15.2. | Ácido succínico | 231 |
| 9.16. | Nomenclatura..... | 256 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Composiciones del medio de cultivo de E. coli BAL1611 en %p/V [25]..... | 7 |
| Tabla 2. Cuadro comparativo entre los diferentes modelos cinéticos de E. coli más utilizados. | 13 |
| Tabla 3. Bioproductos mejor proyectados para posicionarse en el mercado en un futuro cercano [50]..... | 17 |
| Tabla 4. Reacciones incorporadas para mejorar el modelo [42]. | 33 |
| Tabla 5. Parámetros utilizados para la construcción del modelo de E. coli BAL1611. ... | 35 |
| Tabla 6. Distribución de carbono en cada célula, según sustrato administrado. | 45 |
| Tabla 7. Distribución de carbono en cada célula, según sustrato administrado, para el caso del doble de la velocidad máxima de la enzima EDA. | 49 |
| Tabla 8. Distribución de carbono en cada célula, según sustrato administrado, para el caso de 10 veces la velocidad máxima de la enzima EDA. | 49 |
| Tabla 9. Resumen de las mutaciones que entregan la mayor producción de etanol para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento. | 55 |
| Tabla 10. Resumen de las dobles mutaciones que entregan la mayor producción de etanol para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento. | 59 |
| Tabla 11. Resumen de las simulaciones con tres o más mutaciones escogidas desde resultados previos, para producción de etanol a partir de M. pyriferá como sustrato..... | 62 |
| Tabla 12. Resumen de las mutaciones que entregan la mayor producción de ácido láctico para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento. | 63 |
| Tabla 13. Resumen de las dobles mutaciones que entregan la mayor producción de ácido láctico para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento. | 66 |
| Tabla 14. Resumen de las mutaciones que entregan la mayor producción de ácido succínico para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento. | 69 |
| Tabla 15. Resumen de las dobles mutaciones que entregan la mayor producción de ácido succínico para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento. | 71 |
| Tabla 16. Resumen de las simulaciones con tres o más mutaciones escogidas desde resultados previos, para producción de etanol a partir de M. pyriferá como sustrato..... | 73 |
| Tabla 17. Rendimientos de producto versus sustrato, para las mutaciones con mayor generación de cada producto dentro del espacio biológicamente factible. | 74 |
| Tabla 18. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]). | 109 |
| Tabla 19. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s])..... | 113 |
| Tabla 20. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]). | 118 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 21. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]). | 119 |
| Tabla 22. Reacciones consideradas en los modelos cinéticos comparados. En azul están las reacciones que faltan en el modelo usado y en naranja las implementadas. | 121 |
| Tabla 23. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada. | 125 |
| Tabla 24. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada. | 127 |
| Tabla 25. Comparación de los componentes de la velocidad de crecimiento. En rojo, los componentes con mayor cambio porcentual con respecto a la E. coli nativa. | 154 |
| Tabla 26. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR. | 155 |
| Tabla 27. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR. | 157 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Alginato estructural. En (a) monómeros de alginato. En (b) polímero de alginato. En (c) secuencias de la cadena del polímero de alginato [14]. | 3 |
| Figura 2. Mecanismo general de degradación de enzimas alginato liasa (endolítica) y oligoalginato [15]. | 4 |
| Figura 3. Estructura molecular del manitol [14]. | 4 |
| Figura 4. Esquema que representa las modificaciones realizadas para la construcción de la E. coli BAL1611. Adaptada de Wargacki et. al. (2012) [10]. | 6 |
| Figura 5. Rendimiento de biomasa para diferentes proporciones de alginato y manitol en el medio de cultivo [25]. | 7 |
| Figura 6. Rendimiento de producto para diferentes proporciones de alginato y manitol en el medio de cultivo [25]. | 8 |
| Figura 7. Algoritmo de las distintas etapas de elaboración de un modelo matemático formal. Adaptada de Motta et. al., 2013 [31]. | 9 |
| Figura 8. Interacción entre las distintas -ómicas. Adaptada de Fischer, 2008 [28]. | 10 |
| Figura 9. (a) Pequeña red metabólica de tres metabolitos (A, B, C), tres transportes y tres reacciones enzimáticas. v_i indica el flujo de la reacción i y b_j representa el flujo del transporte por la proteína j . (b) Ecuaciones de balance de masa para cada metabolito. (c) Matriz estequiométrica construida a partir del balance de masa. (d) Supuestos, restricciones y función objetivo. Adaptada de Terzer et. al. 2009 [33]. | 11 |
| Figura 10. (a) Pequeña red metabólica de tres metabolitos (A, B, C), tres transportes y tres reacciones enzimáticas. v_i indica el flujo de la reacción i y b_j representa el flujo del transporte por la proteína j . (b) Ecuaciones de balance de masa para cada metabolito. (c) Matriz estequiométrica construida a partir del balance de masa. (d) Descripción de las cinéticas, resolución del problema. Adaptada de Terzer et. al. 2009 [33]. | 11 |
| Figura 11. Desarrollo de los primeros modelos matemáticos de E. coli. Adaptado de Reed et. al., 2003 [34]. | 12 |
| Figura 12. Similitudes entre ingeniería en computación y biología. Adaptada de Andrianantoandro et. al., 2006 [44]. | 14 |
| Figura 13. Relación entre la electrónica y la biología sintética. Las flechas con punta indican activación del promotor, mientras que las flechas truncadas indican represión. Adaptada de Khalil et. al., 2010 [47]. | 15 |
| Figura 14. Niveles de regulación en biología. Adaptada de Khalil et. al., 2010 [47]. | 16 |
| Figura 15. Resumen de los precios de mercado y el volumen de consumo global anual para algunos productos químicos. Adaptada de Bidy et. al., 2016 [50]. | 18 |
| Figura 16. Estructura molecular de los isómeros de ácido láctico: A) L-(+)-ácido láctico; B) D-(-)-ácido láctico [50]. | 18 |
| Figura 17. Posibles productos generados a partir del ácido láctico. Adaptada de Datta et. al., 2006 [51]. | 19 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Estructura molecular del ácido succínico [50]. | 20 |
| Figura 19. Esquema de producción sintética y biológica del ácido succínico. Adaptada de Bechthold et. al., 2008 [55]. | 21 |
| Figura 20. Posibles productos generados a partir de ácido succínico. Adaptada de Song et. al., 2006 [57]. | 21 |
| Figura 21. Gráfico del poder reductor para pequeñas variaciones del flujo de glucosa en torno al valor original del modelo. | 30 |
| Figura 22. Gráfico de la disponibilidad energética para pequeñas variaciones del flujo de glucosa en torno al valor original del modelo. | 31 |
| Figura 23. Gráfico del poder reductor para grandes variaciones del flujo de glucosa en torno al valor original del modelo. | 31 |
| Figura 24. Gráfico de la disponibilidad energética para grandes variaciones del flujo de glucosa en torno al valor original del modelo. | 32 |
| Figura 25. Cambio del poder reductor para las distintas enzimas incorporadas para mejorar el modelo. En el eje de las abscisas, cada punto corresponde a lo siguiente: (1) modelo original, (2) modelo con la enzima MAEB, (3) modelo con sistema de succinato, (4) modelo con sistema de lactato, (5) modelo con sistema de etanol, (6) modelo con MAEB y succinato, (7) modelo con MAEB, succinato y lactato, (8) modelo con MAEB, succinato, lactato y etanol. | 34 |
| Figura 26. Cambio de la disponibilidad energética para las distintas enzimas incorporadas para mejorar el modelo. En el eje de las abscisas, cada punto corresponde a lo siguiente: (1) modelo original, (2) modelo con la enzima MAEB, (3) modelo con sistema de succinato, (4) modelo con sistema de lactato, (5) modelo con sistema de etanol, (6) modelo con MAEB y succinato, (7) modelo con MAEB, succinato y lactato, (8) modelo con MAEB, succinato, lactato y etanol. | 34 |
| Figura 27. Gráfico que muestra el flujo destinado a crecimiento para las simulaciones de E. coli con alginato y manitol puros como sustrato. | 37 |
| Figura 28. Acumulación de DEHU y manitol en el extracelular, para las simulaciones de E. coli con alginato y manitol puros como sustrato. | 38 |
| Figura 29. Comparación de la producción de etanol en BAL1611 con glucosa versus diferentes proporciones de alginato y manitol. | 43 |
| Figura 30. Rendimiento de producto versus sustrato para las distintas proporciones de DEHU/manitol. | 44 |
| Figura 31. Rendimiento de biomasa versus sustrato para las distintas proporciones de DEHU/manitol. | 44 |
| Figura 32. Comparación de producción de etanol con la sobreexpresión de la enzima EDA, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol. | 47 |

| | |
|---|----|
| Figura 33. Comparación del crecimiento de la BAL1611 con sobreexpresión de la enzima EDA, con respecto a E. coli nativa y a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol..... | 48 |
| Figura 34. Comparación de producción de etanol con la sobreexpresión de la enzima PFK, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol. | 50 |
| Figura 35. Comparación del crecimiento de la BAL1611 con sobreexpresión de la enzima PFK, con respecto a E. coli nativa y a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol..... | 50 |
| Figura 36. Comparación de producción de etanol con y sin la presencia del sistema de acetato, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol. | 51 |
| Figura 37. Comparación del crecimiento de la BAL1611 con y sin el sistema de acetato, con respecto a E. coli nativa y a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol..... | 51 |
| Figura 38. Comparación de producción de etanol con la sobreexpresión de la enzima EDA, con y sin el sistema de acetato, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de DEHU y manitol..... | 52 |
| Figura 39. Comparación del crecimiento con sobreexpresión de la enzima EDA, con y sin el sistema de acetato, con respecto a E. coli nativa y a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol..... | 52 |
| Figura 40. Comparación del rendimiento de etanol con la utilización de poder reductor (NADH o NADPH) en la degradación de alginato, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol sin la utilización del poder redox. | 53 |
| Figura 41. Comparación del rendimiento de crecimiento con la utilización de poder reductor (NADH o NADPH) en la degradación de alginato, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol sin la utilización del poder redox. | 53 |
| Figura 42. Concentración de NADH en el tiempo, para las distintas proporciones de alginato y manitol, comparadas gráficamente con la concentración de NADH en el tiempo para el caso de E. coli nativa con glucosa. | 54 |
| Figura 43. Concentración de NADPH en el tiempo, para las distintas proporciones de alginato y manitol, comparadas gráficamente con la concentración de NADPH en el tiempo para el caso de E. coli nativa con glucosa..... | 54 |
| Figura 44. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento..... | 56 |
| Figura 45. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para las concentraciones de M. pyrifera, para cada restricción en el crecimiento. | 57 |
| Figura 46. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para DEHU:manitol de 8:5, para cada restricción en el crecimiento..... | 57 |

Figura 47. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para manitol, para cada restricción en el crecimiento.....58

Figura 48. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para *M. pyrifer*, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.61

Figura 49. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para manitol, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.61

Figura 50. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido láctico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.....64

Figura 51. Gráficos de producción de ácido láctico en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento.....64

Figura 52. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido láctico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con *M. pyrifer* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.....65

Figura 53. Gráficos de producción de ácido láctico en la zona de factibilidad biológica para *M. pyrifer*, para cada restricción en el crecimiento.65

Figura 54. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido láctico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación con dos mutaciones, realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.67

Figura 55. Gráficos de producción de ácido láctico en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.....67

Figura 56. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido láctico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación con dos mutaciones, realizada con *M. pyrifer* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.68

Figura 57. Gráficos de producción de ácido láctico en la zona de factibilidad biológica para *M. pyrifer*, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.....68

Figura 58. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido succínico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con *M. pyrifer* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las

| | |
|--|-----|
| simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 70 |
| Figura 59. Gráficos de producción de ácido succínico en la zona de factibilidad biológica para <i>M. pyrifer</i> , para cada restricción en el crecimiento. | 70 |
| Figura 60. Gráficos de producción de ácido succínico en la zona de factibilidad biológica para <i>M. pyrifer</i> , para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones. | 72 |
| Figura 61. Primera parte de la matriz estequiométrica del sistema de la <i>E. coli</i> BAL1611. | 106 |
| Figura 62. Segunda parte de la matriz estequiométrica del sistema de la <i>E. coli</i> BAL1611. | 107 |
| Figura 63. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> con DEHU versus <i>E. coli</i> con glucosa. | 137 |
| Figura 64. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> con manitol versus <i>E. coli</i> con glucosa. | 138 |
| Figura 65. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> nativa versus <i>E. coli</i> BAL1611, con glucosa. | 139 |
| Figura 66. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> sin producción de etanol versus <i>E. coli</i> BAL1611, con DEHU. | 140 |
| Figura 67. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> sin producción de etanol versus <i>E. coli</i> BAL1611, con manitol. | 141 |
| Figura 68. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> nativa con glucosa versus <i>E. coli</i> BAL1611 con DEHU puro. | 142 |
| Figura 69. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> nativa con glucosa versus <i>E. coli</i> BAL1611 con DEHU:manitol 10:3. | 143 |
| Figura 70. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> nativa con glucosa versus <i>E. coli</i> BAL1611 con DEHU:manitol 8:5. | 144 |
| Figura 71. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> nativa con glucosa versus <i>E. coli</i> BAL1611 con DEHU:manitol 5:8. | 145 |
| Figura 72. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> nativa con glucosa versus <i>E. coli</i> BAL1611 con DEHU:manitol 3:10. | 146 |
| Figura 73. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> nativa con glucosa versus <i>E. coli</i> BAL1611 con manitol puro. | 147 |
| Figura 74. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> BAL1611 con glucosa versus <i>E. coli</i> BAL1611 con DEHU puro, considerando en ambos casos la misma producción de etanol. | 148 |
| Figura 75. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de <i>E. coli</i> BAL1611 con glucosa versus <i>E. coli</i> BAL1611 con DEHU:manitol 10:3, considerando en ambos casos la misma producción de etanol. | 149 |

| | |
|---|-----|
| Figura 76. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de E. coli BAL1611 con glucosa versus E. coli BAL1611 con DEHU:manitol 8:5, considerando en ambos casos la misma producción de etanol..... | 150 |
| Figura 77. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de E. coli BAL1611 con glucosa versus E. coli BAL1611 con DEHU:manitol 5:8, considerando en ambos casos la misma producción de etanol..... | 151 |
| Figura 78. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de E. coli BAL1611 con glucosa versus E. coli BAL1611 con DEHU:manitol 3:10, considerando en ambos casos la misma producción de etanol..... | 152 |
| Figura 79. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de E. coli BAL1611 con glucosa versus E. coli BAL1611 con manitol puro, considerando en ambos casos la misma producción de etanol..... | 153 |
| Figura 80. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 161 |
| Figura 81. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con DEHU como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 161 |
| Figura 82. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada para la proporción de M. pyriferá como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 162 |
| Figura 83. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con DEHU:manitol en la proporción 8:5 como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 162 |
| Figura 84. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con la proporción de S. japonica como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 163 |
| Figura 85. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con DEHU:manitol en la proporción 3:10 como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 163 |

| | |
|--|-----|
| Figura 86. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con manitol como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 164 |
| Figura 87. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 192 |
| Figura 88. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones. | 192 |
| Figura 89. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con DEHU como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 193 |
| Figura 90. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con <i>M. pyrifer</i> como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 193 |
| Figura 91. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con DEHU:manitol 8:5 como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 194 |
| Figura 92. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para DEHU:manitol 8:5, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones. | 194 |
| Figura 93. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con <i>S. japonica</i> como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 195 |
| Figura 94. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para <i>S. japonica</i> , para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones. | 195 |
| Figura 95. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con DEHU:manitol 3:10 como sustrato. A la izquierda, el gráfico de | |

| | |
|--|-----|
| todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo..... | 196 |
| Figura 96. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para DEHU:manitol 3:10, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones..... | 196 |
| Figura 97. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con manitol como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 197 |
| Figura 98. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido succínico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo..... | 231 |
| Figura 99. Gráficos de producción de ácido succínico en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento..... | 231 |
| Figura 100. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido succínico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo..... | 242 |
| Figura 101. Gráficos de producción de ácido succínico en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones..... | 242 |
| Figura 102. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido succínico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con <i>M. pyrifer</i> como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo. | 243 |

1. INTRODUCCIÓN

El aumento del consumo energético mundial que se prevé a futuro y la cada vez mayor escasez de recursos de origen fósil, han hecho necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de producción de combustibles, dando paso a la era de los biocombustibles [1]. Dentro de esta área, existen distintas categorías donde se les clasifica según la materia prima que se utiliza para su producción. Por una parte, los de primera generación corresponden a aquellos que provienen de cultivos agrícolas como maíz o caña de azúcar [2]; los de segunda generación corresponden a los provenientes de biomasa agrícola desechada (no para consumo), como residuos agrícolas y forestales, pasto, biomasa acuática, entre otros [2]; los de tercera generación aquellos que provienen de algas naturales [3]; y los de cuarta generación que son aquellos que provienen de algas y algunos microorganismos genéticamente modificados para mejorar su capacidad de consumo de CO₂, generación de biomasa o de algún compuesto de interés como los aceites [4]. Debido a las ventajas que presentan los de tercera y cuarta generación por sobre los de segunda, permitiendo la no competencia por terrenos para la agricultura, la mayor capacidad de consumo de CO₂ (6–8% sobre 1,8–2,2%), el no requerimiento de aplicación de fertilizantes, y la capacidad de crecer incluso en aguas residuales y agua de mar, es que se considera a las macroalgas como una materia prima de gran valor y con un futuro promisorio, en términos de generación de combustibles, en el futuro cercano [1], [5].

Dentro de las macroalgas existen diversos tipos, donde se encuentran: las verdes, rojas y las pardas. Las primeras poseen una gran concentración de almidón y celulosa, por lo que se usan generalmente para consumo o generación de biobutanol. Las rojas poseen principalmente celulosa, agar y carrageninas, siendo por estos últimos compuestos comúnmente tratadas para utilizarlos en productos lácteos y dentífricos como gelificantes. Por otra parte, las algas pardas han mostrado gran desempeño como materia prima para generar biodiésel a partir de sus aceites (ácidos grasos libres o FFAs) o bioetanol a partir de sus azúcares (manitol, celulosa y laminarina degradadas en forma de glucosa, y alginato) [1],[6]. Este último tipo de algas se encuentran en gran cantidad a lo largo de las costas marinas templadas o polares, características que poseen las playas chilenas. En ellas es posible encontrar abundantemente al alga parda *Macrocystis pyrifera*, cuya relación de azúcares alginato:manitol es de 10:3. Su cultivo se encuentra ampliamente estudiado, principalmente como alimento para el molusco abalón, y gracias a su alta tasa de crecimiento, facilidad de reproducción y cultivo, es que se considera idónea para la utilización en la generación de nuevos productos, como por ejemplo, bioetanol a partir de la fermentación de sus azúcares [7],[8],[9].

Hasta el año 2012, el bioetanol de tercera generación se producía utilizando diversos microorganismos que naturalmente son capaces de degradar el manitol y glucosa presentes en las macroalgas, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymobacter palmae* o *Pichia angophorae*, entre otros [6]. Sin embargo, en aquel año, se construyó una *Escherichia coli* transgénica la cual cuenta con una ruta metabólica que le permite degradar el alginato presente en las algas, y utilizarlo también como fuente de carbono para la generación de etanol. Esta nueva cepa fue bautizada como BAL1611, y posee la particularidad de generar etanol de forma aeróbica, gracias a la incorporación de una ruta metabólica heteróloga para la degradación y asimilación de alginato proveniente de

Zymomonas mobilis. Los resultados iniciales de producción de bioetanol, por parte de esta bacteria, fueron obtenidos utilizando como materia prima al alga parda *Saccharina japonica*, la cual posee una concentración de alginato:manitol en una proporción 5:8, generándose 0,281 [peso seco etanol/peso seco biomasa] correspondiente al 80% del teórico, comparable a lo obtenido desde la fermentación de biomasa lignocelulósica mediante *S. cerevisiae* [10].

Estudios posteriores con la *Escherichia coli* BAL1611 demostraron que, a distintas razones de alginato:manitol, la bacteria no es capaz de producir la misma cantidad de bioetanol y, de hecho, esta es siempre menor a la obtenida con las proporciones del alga *S. japonica*. En efecto, si bien la concentración de biomasa útil (carbohidratos) es semejante para las proporciones de alginato:manitol de *S. japonica* y *M. pyrifer*, la generación de etanol solo alcanza su máximo en la razón correspondiente a la primera, teniendo para *M. pyrifer* un rendimiento de etanol del 64% del teórico. Además, en presencia solo de alginato o solo de manitol, si bien hay crecimiento celular (menor que en mezclas de ambos azúcares), no se produce bioetanol [11]. Considerando que la degradación de manitol en condiciones aeróbicas provoca una acumulación de poder reductor NAD(P)H [6], y que el alginato es un compuesto relativamente más oxidado que el manitol y la glucosa, resulta que los mecanismos de balance *redox* internos de la bacteria y la disponibilidad de metabolitos de rutas anabólicas se ven afectados al incorporar a este sistema la degradación de alginato para producir etanol, lo que podría estar provocando los comportamientos descritos [11].

Para diagnosticar las causas de los comportamientos anteriores, una de las mejores herramientas es el análisis de la distribución de flujos metabólicos y concentraciones de metabolitos en las células. Entre los métodos más utilizados para esto en ingeniería metabólica está el análisis de flujos metabólicos (MFA), los modelos a escala genómica, también basados en MFA, y los modelos cinéticos. Estos últimos son más precisos, consideran las inhibiciones y activaciones enzimáticas alostéricas y no tienen las restricciones de linealidad de los métodos basados en MFA, pero son más complejos de parametrizar. Recientemente, se ha publicado un modelo cinético que comprende todas las reacciones del metabolismo central, *redox* y energético de *Escherichia coli*, el cual puede ser utilizado para simular el comportamiento de la red de reacciones bajo una serie de condiciones distintas, permitiendo un análisis predictivo de situaciones que afectan el funcionamiento metabólico de la célula [12]. Dado que las vías centrales de *E. coli* están sujetas a un control metabólico rápido que le permite una adaptación en segundos a condiciones cambiantes internas y externas, más que a un control transcripcional cuya respuesta es más lenta, este modelo matemático de la red de regulación metabólica se presenta como ideal para el análisis de la cepa BAL1611. En efecto, este modelo puede ser modificado introduciendo o eliminando rutas metabólicas, lo que además permite simular fuentes de carbono distintas, introducción de vías metabólicas heterólogas o producción de moléculas que no son sintetizadas naturalmente por *E. coli*.

Es en este contexto donde se desarrolla este trabajo de tesis, el cual busca mejorar la producción de etanol a partir de *M. pyrifer* mediante la *E. coli* BAL1611, utilizando como herramienta un modelo matemático cinético de la bacteria para el diseño de soluciones a nivel genético, logrando compensar los desbalances de la cepa y aumentando su productividad.

2. ANTECEDENTES

2.1. Macroalgas pardas

Como se mencionó anteriormente, existen diversos tipos de macroalgas entre las que se encuentran las pardas, que poseen aceites y azúcares desde los cuales es posible producir biocombustibles como el biodiésel o el bioetanol, respectivamente [1],[6]. Los carbohidratos presentes en las macroalgas pardas son principalmente alginato (50% aproximadamente), manitol y laminarina [13].

El alginato es un copolímero lineal de dos ácidos urónicos, D-manuronato y L-guluronato, ordenados uniformemente en algunas regiones y en otras como mezclas de ellos [10], tal como se muestra en la Figura 1.

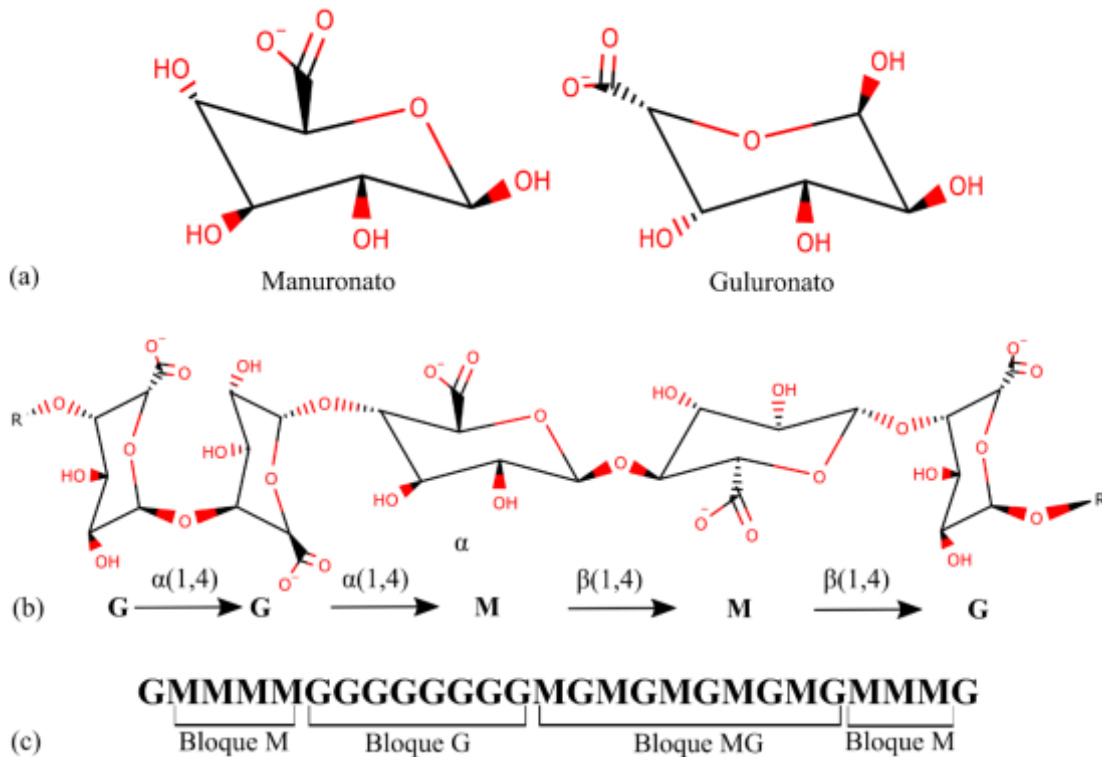
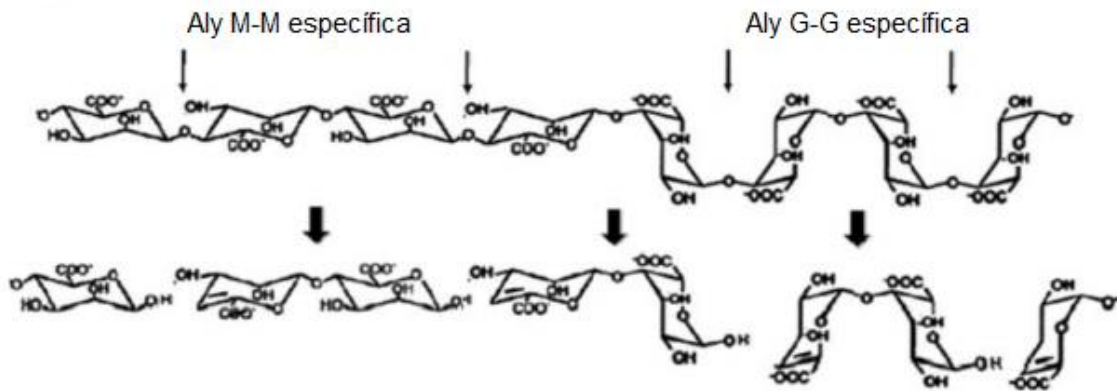


Figura 1. Alginato estructural. En (a) monómeros de alginato. En (b) polímero de alginato. En (c) secuencias de la cadena del polímero de alginato [14].

Existen enzimas presentes en algunos microorganismos que son capaces de degradar el alginato en secuencias más pequeñas de carbohidratos, tal como se muestra en la Figura 2. En primer lugar, las alginato liasas mediante una β -eliminación endolítica, generan oligómeros de ácidos urónicos. Posteriormente, estos son degradados por oligoalginato liasas en monómeros saturados, los que posteriormente se reordenan espontáneamente en la estructura de ácido urónico conocida como DEHU (ácido urónico 4-desoxi-L-eritro-5-hexoseulosa). Éste luego puede ser reducido a KDG (2-ceto-3-desoxi-gluconato), liberando NADH o NADPH dependiendo de la enzima utilizada. Finalmente, KDG ingresa a la ruta de Entner-Doudoroff produciendo KDPG (KDG 6-fosfato), precursor de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato [10].

A Alginato liasa (endolítica)



B Oligoalginato liasa (exolítica)

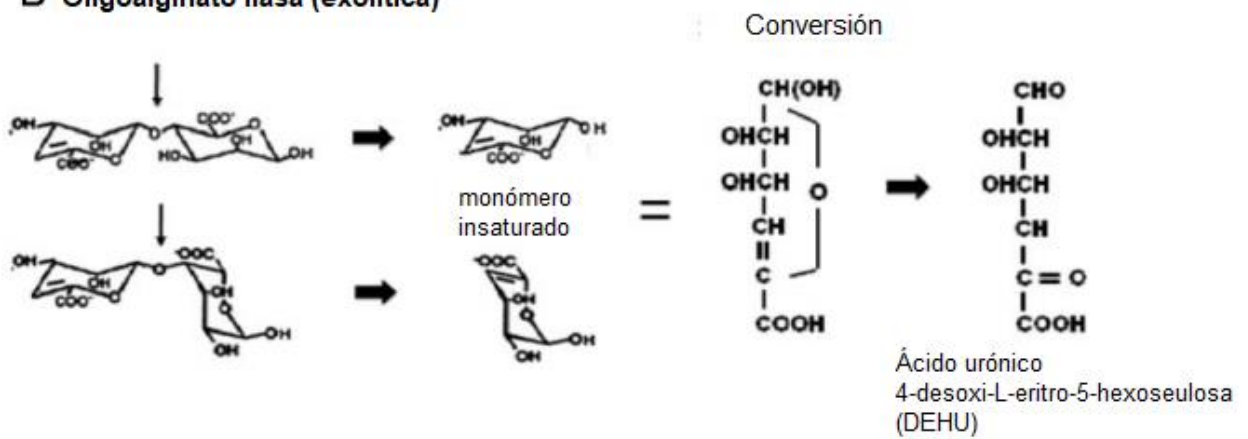


Figura 2. Mecanismo general de degradación de enzimas alginato liasa (endolítica) y oligoalginato [15].

El manitol (ver Figura 3) es un alcohol de azúcar de seis carbonos proveniente de manosa, el cual es oxidado por manitol-2-deshidrogenasa a D-fructosa, liberando NADH [16].

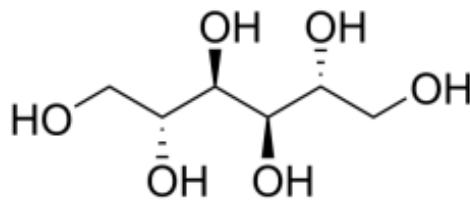


Figura 3. Estructura molecular del manitol [14].

Estos azúcares anteriormente descritos, son posibles de encontrar en algas pardas en diferentes proporciones, como por ejemplo, *Saccharina japonica*, que posee un mayor porcentaje de manitol, o *Macrocystis pyrifera*, macroalga chilena que posee un alto porcentaje de alginato [11].

2.1.1. *Saccharina japonica*

Saccharina japonica o *Laminaria japonica* es una alga parda que habita aguas templadas y frías del hemisferio norte y aguas templadas del hemisferio sur, convirtiéndose en una de las plantas acuáticas más cultivadas gracias a la acuicultura de China, Korea y Japón [17],[18].

La gran demanda de su cultivo se debe principalmente a que posee diversos compuestos atractivos económicamente hablando, como: alginato, fucoïdanos, iodina, manitol, entre otros [19]. Además, como alimento es bastante popular por su bajo contenido calórico, junto con poseer gran cantidad de vitaminas, minerales, fibra dietética, calcio, potasio, magnesio, ácido fosfórico y gran cantidad de iodina [20]. Presenta también propiedades médicas como bloquear la angiogénesis tumoral, y propiedades antibacterianas aprovechadas por la industria cosmética [21].

La composición de *Saccharina japonica* es: entre un 13-25% corresponde a alginato, 9-23% de manitol, y 1-21% de laminarina [16].

2.1.2. *Macrocystis pyrifera*

El género *Macrocystis* es la macroalga más grande del mundo y más ampliamente distribuida, abarcando ambientes con temperaturas desde las boreales hasta las cálidas, y a diferentes profundidades marinas. Particularmente, forma densas áreas forestales marinas en las costas oestes de América del Norte y del Sur, en las costas suroestes de Sudáfrica, Nueva Zelanda y al sur de Australia [22].

Macrocystis pyrifera es un tipo de macroalga parda nativa de Chile, la cual ha estado bajo una fuerte y creciente presión por explotación, principalmente por ser materia prima para la producción de alginato y como fuente de alimento para moluscos [23],[24]. Por ello, actualmente existe una amplia línea de estudio referente a la acuicultura de esta alga, reportando cambios en su composición química dependiendo de la estación del año en que se desarrollen, la intensidad del oleaje, y se ha descrito como una de las algas con un crecimiento más rápido, de entre 30 a 80 [ton peso seco/Ha/año] [25],[26].

La composición de *Macrocystis pyrifera* es: mayoritariamente alginato (entre 15-25%), 9-30% de manitol, y 5% de polímero glicano [15].

2.2. Microorganismo utilizado: *Escherichia coli* BAL1611

La generación de etanol a partir de sustratos como las algas pardas resulta una línea de investigación prometedora en cuanto se logren utilizar la mayor cantidad de azúcares fermentables disponibles en ella. Lamentablemente, los organismos nativos que se utilizan para la fermentación de dichas algas, como *Zymobacter palmae* y *Saccharomyces cerevisiae*, poseen la habilidad de degradar el manitol y los glucanos (laminarina o celulosa) presentes, pero no la mayor cantidad de azúcar disponible: el alginato. Es así como en el año 2012, Wargacki et. al. diseñan y construyen una *Escherichia coli* genéticamente modificada capaz de producir cantidades de etanol comparables a las de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de la degradación de alginato, manitol y glucanos presentes en el alga parda *Saccharina japonica* [10].

Esta *E. coli* BAL1611 posee las modificaciones genéticas necesarias para degradar el alginato sin pretratamientos químicos o sacarificaciones enzimáticas previas a la fermentación, lo que permite eliminar los costos de producción y purificación de enzimas que degraden la materia prima previamente. La cepa posee alginato liasas provenientes de *Pseudoalteromonas* sp. SM0524, las cuales son liberadas al medio extracelular a partir de un sistema de exportación mediado por el antígeno 43, al cual denominan N455+tSM0524 Aly. Además, posee un sistema de transporte y degradación intracelular de los oligoalginatos proveniente de *Vibrio splendidus*, los cuales fueron encontrados por homologación de secuencia codificante de enzimas que participan en la degradación de oligopectinas en *Erwinia chrysanthemi*, debido a la similitud de estas moléculas con los oligoalginatos. Por otra parte, el sistema de producción de etanol proviene de *Zymomonas mobilis*, el cual consiste en la expresión constitutiva de una piruvato decarboxilasa (Pdc) y una alcohol deshidrogenasa (AdhB). Finalmente, para dirigir la mayor cantidad del flujo de carbono a la producción de etanol, se realizaron las delecciones de los genes de las enzimas piruvato formiato-liasa 1 (pf1B), canal formiato (focA), lactato deshidrogenasa (ldhA) y fumarato reductasa (frdABCD) [10]. Una representación gráfica de las modificaciones genéticas realizadas se puede observar en la Figura 4.

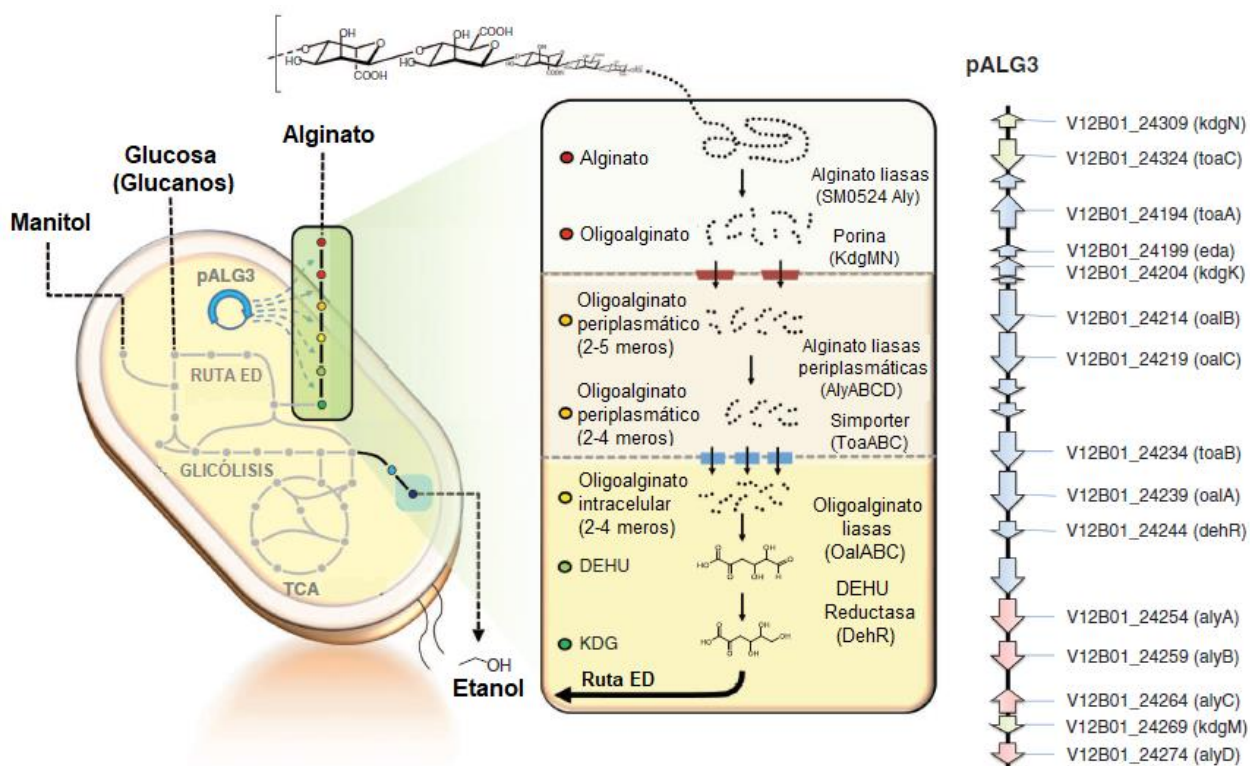


Figura 4. Esquema que representa las modificaciones realizadas para la construcción de la *E. coli* BAL1611. Adaptada de Wargacki et. al. (2012) [10].

2.3. Producción de etanol mediante *E. coli* BAL1611

Las primeras fermentaciones con *E. coli* BAL1611 fueron realizadas con *Saccharina japonica* a 25-30°C, obteniendo una conversión de aproximadamente 0,281 [peso seco etanol/peso seco biomasa] correspondiente al 80% del teórico, comparable a lo obtenido desde la fermentación de biomasa lignocelulósica mediante *S. cerevisiae* [10].

Posteriormente, se realizaron fermentaciones con diferentes proporciones de alginato y manitol, con el fin de simular un mayor espectro de composiciones de diversas algas pardas existentes [25]. Las proporciones probadas se muestran en la Tabla 1, donde 5:8 de alginato:manitol corresponde a *S. japonica* y 10:3 a *M. pyrifera* [11].

Tabla 1. Composiciones del medio de cultivo de *E. coli* BAL1611 en %p/V [25].

| Proporción | 1:0 | 10:3 | 8:5 | 5:8 | 3:10 | 0:1 |
|------------|------|------|------|------|------|------|
| Alginato | 2,6% | 2% | 1,6% | 1% | 0,6% | 0% |
| Manitol | 0% | 0,6% | 1% | 1,6% | 2% | 2,6% |

Con dichas composiciones, se obtuvieron los resultados que se muestran en las Figura 5 y Figura 6. En ellas se puede ver que la generación de etanol solo alcanza su máximo en la razón correspondiente a *S. japonica*, teniendo para *M. pyrifera* un rendimiento de etanol del 64% del teórico, a pesar de que el crecimiento del cultivo en ambos casos posee valores similares. Además, en presencia solo de alginato o solo de manitol, si bien hay crecimiento celular (menor que en mezclas de ambos azúcares), no se produce etanol [11],[25].

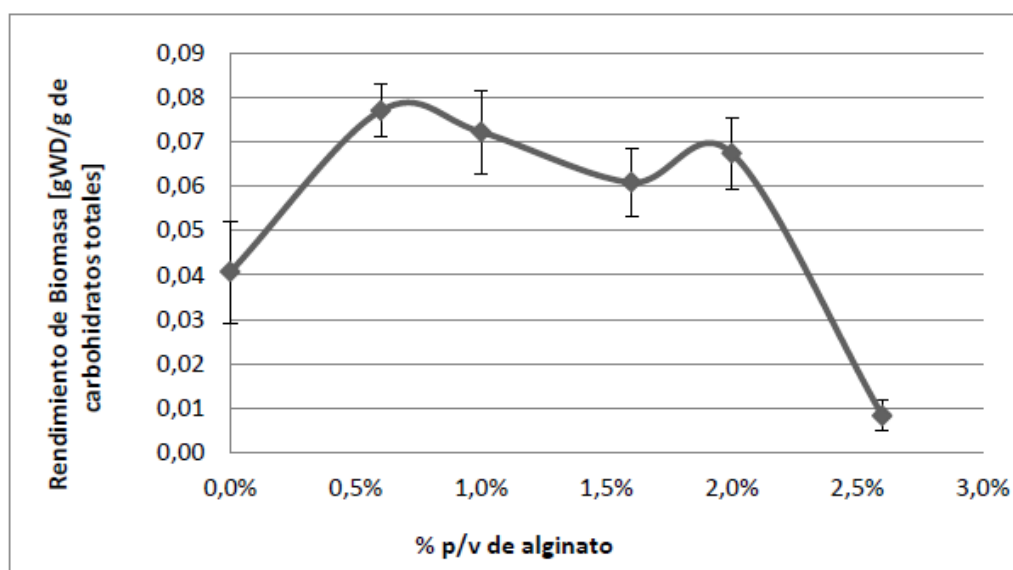


Figura 5. Rendimiento de biomasa para diferentes proporciones de alginato y manitol en el medio de cultivo [25].

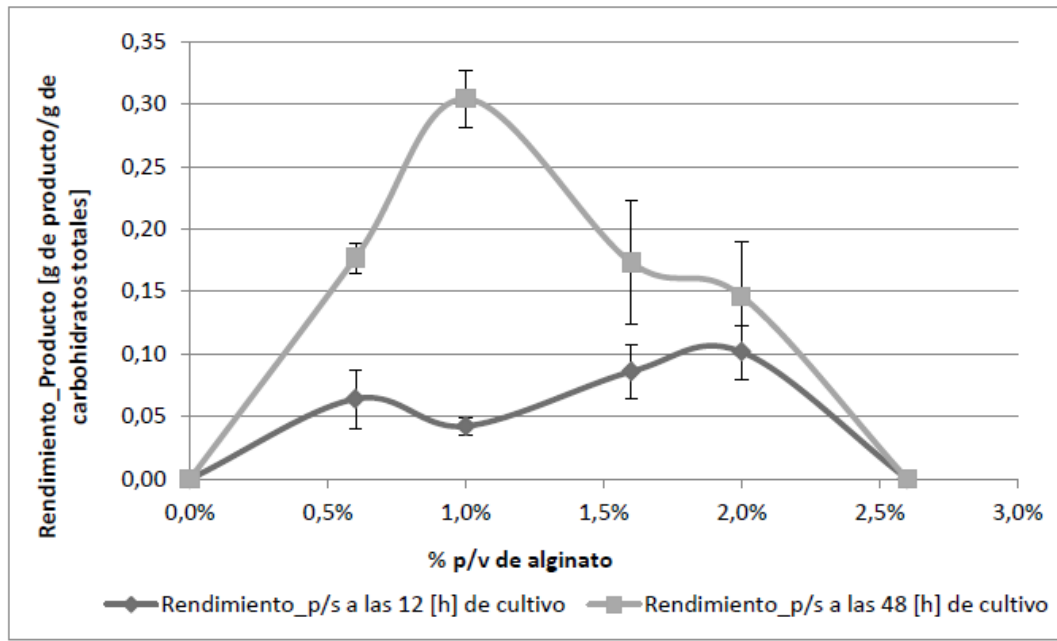


Figura 6. Rendimiento de producto para diferentes proporciones de alginato y manitol en el medio de cultivo [25].

2.4. Modelos matemáticos en sistemas biológicos

La generación de nuevos productos biológicos de interés para la industria y la medicina han impulsado la aplicación de distintas técnicas biotecnológicas (como ADN recombinante) para permitir abaratar los costos y mejorar los rendimientos de producción. Sin embargo, la etapa de laboratorio sigue siendo una limitante a la hora del desarrollo de nuevos productos, debido a los largos tiempos de ensayo y error que se deben llevar a cabo hasta que se logre obtener el organismo transformante adecuado para la productividad buscada. Por ello, resulta de suma importancia poseer alguna herramienta que permita, previa implementación en laboratorio, conocer cuáles serían las modificaciones genéticas apropiadas para obtener el óptimo rendimiento de biomasa o producto, según sea el caso [27]. Es así como el modelamiento matemático toma un rol fundamental para agilizar la investigación y aclarar la metodología a utilizar en laboratorio, disminuyendo tiempos de prueba y gastos en reactivos asociados a la investigación [28].

Hasta la década de los '50 se conocía el funcionamiento general de los organismos multicelulares, pero no qué estaba ocurriendo específicamente dentro de sus células. A partir de ese momento, la biología molecular comenzó a entregar información acerca de las interacciones moleculares involucradas en el comportamiento de las células, principalmente gracias a los avances tecnológicos en equipos y técnicas para trabajar con escalas más pequeñas [29]. Es así como los nuevos descubrimientos metabólicos, sumados a la secuenciación del genoma de diversos organismos, han impulsado el desarrollo de herramientas que permitan automáticamente procesar, comparar y/o interpretar grandes cantidades de datos, lo que se traduce en la elaboración de modelos matemáticos con distintos grados de complejidad [30]. Además, los avances en computación también han sido de gran importancia, dada la complejidad de los sistemas biológicos (debida a la interrelación entre numerosos componentes moleculares, la no-

linealidad de las reacciones cinéticas y la compartimentalización), pues los modelos matemáticos de sistemas biológicos, generalmente no pueden ser resueltos analíticamente, sino que se requiere resolver las ecuaciones de manera numérica con computadores para simular la respuesta del sistema [28].

El proceso de creación de modelos matemáticos permite, en todas las ciencias, relacionar la experimentación con lo teórico, según el esquema que se observa en la Figura 7. Por una parte, la teoría y la matemática formulan las ecuaciones con base en los resultados experimentales que se poseen, las que posteriormente pueden ser simuladas para predecir el comportamiento del sistema ante diferentes condiciones. Los resultados experimentales posteriores pueden ser comparados con las simulaciones y así ajustar el modelo agregando nuevas ecuaciones o corrigiendo parámetros. Además, las simulaciones pueden permitir idear estrategias experimentales para dilucidar información faltante que permita completar al mismo modelo [28],[31].

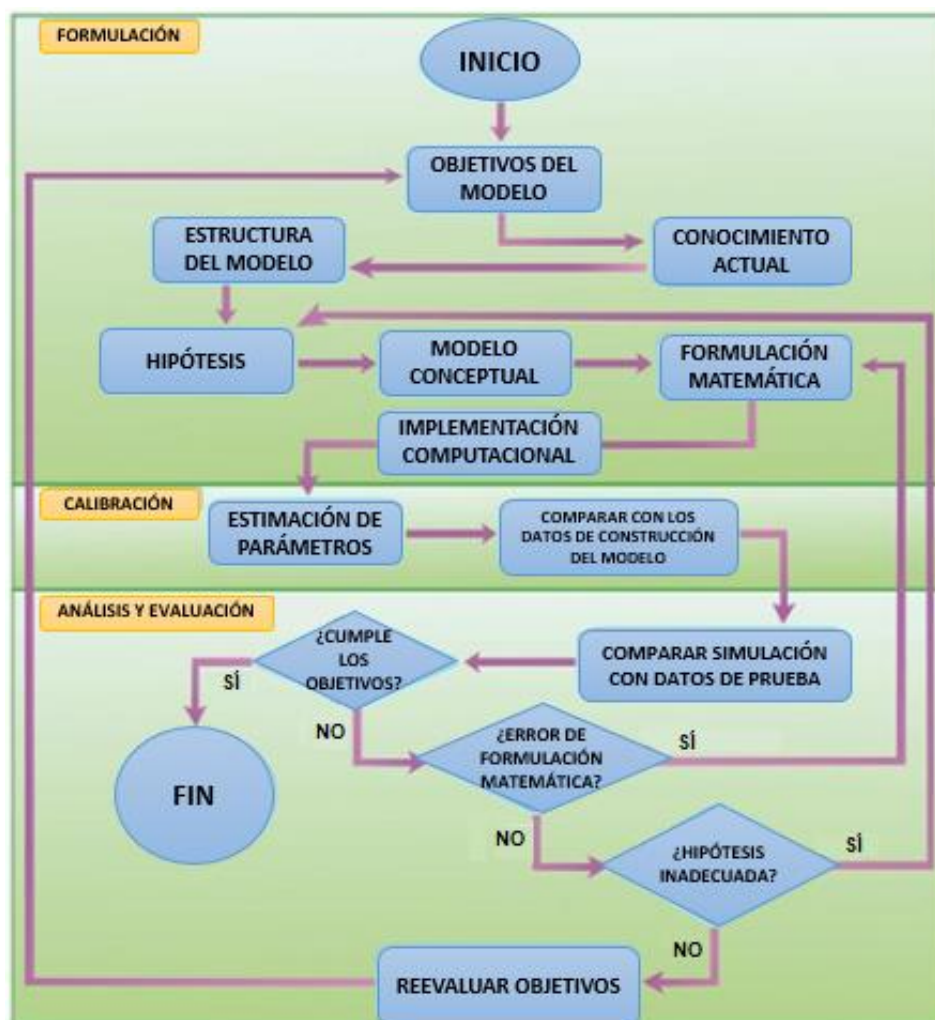


Figura 7. Algoritmo de las distintas etapas de elaboración de un modelo matemático formal. Adaptada de Motta et. al., 2013 [31].

Dependiendo del nivel de la información que se disponga se puede trabajar en modelos matemáticos en diferentes -ómicas (ver Figura 8), como: genómica (genes), transcriptómica (mARN), proteómica (todas las proteínas de una célula o tejido), metabolómica (todos los metabolitos de una célula o tejido), interactómica (interacciones de metabolitos con proteínas) y fenómica (fenotipo del organismo) [28].

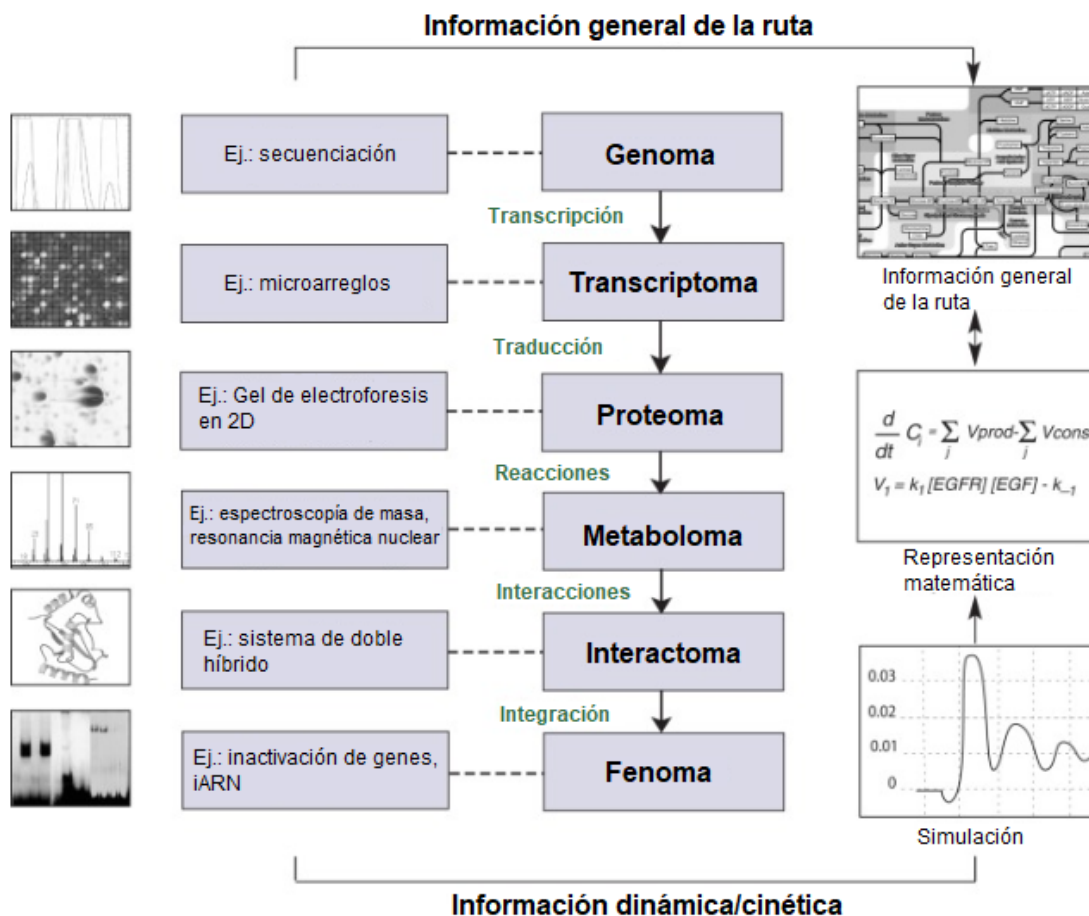


Figura 8. Interacción entre las distintas -ómicas. Adaptada de Fischer, 2008 [28].

Al momento de plantear un modelo matemático se deben considerar algunos supuestos que reflejan las restricciones propias de la naturaleza del problema y, dependiendo de cuáles son implementadas, los modelos metabólicos pueden tener predicciones más o menos certeras [32]. Asimismo, estos supuestos pueden permitir clasificar también a los modelos biológicos destacando, por ejemplo:

- **Modelos estequiométricos:** Permiten la simulación en estado estacionario de los flujos relativos a las distintas reacciones. Son generalmente utilizados en escala genómica, debido a la menor cantidad de información necesaria para su planteamiento, aunque también suelen emplearse para rutas metabólicas específicas de algún organismo. En este tipo de modelos, solo se requiere información acerca de la estequiometría de las reacciones implicadas, aunque se puede complementar incluyendo condiciones de borde o direccionalidad de los flujos [32]. El planteamiento de este tipo de modelos se describe en la Figura 9.

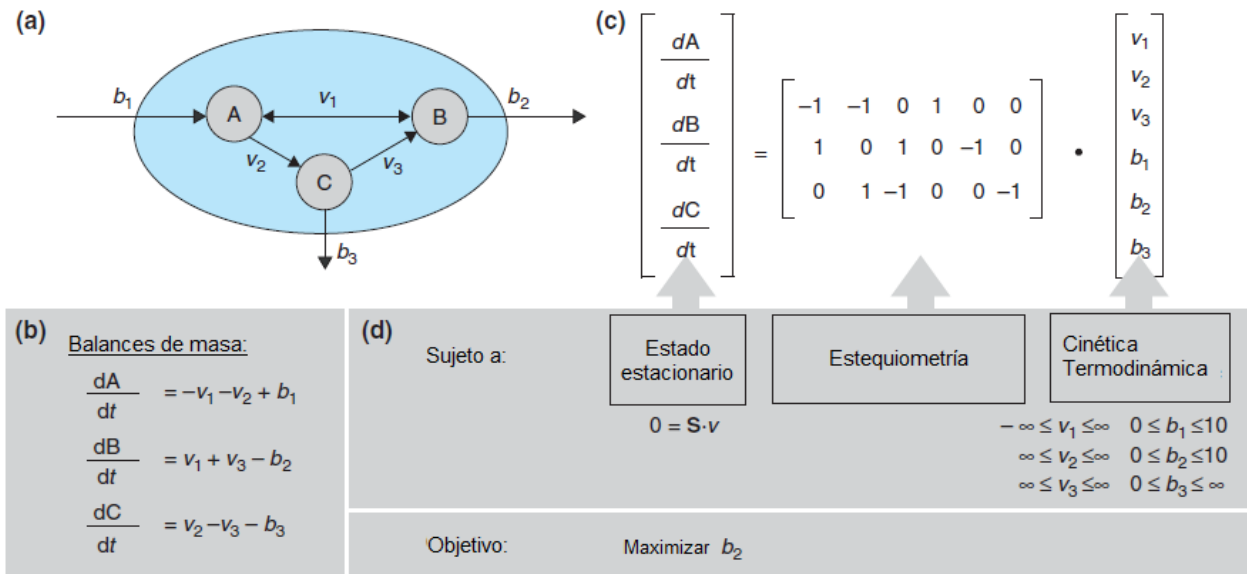


Figura 9. (a) Pequeña red metabólica de tres metabolitos (A, B, C), tres transportes y tres reacciones enzimáticas. v_i indica el flujo de la reacción i y b_j representa el flujo del transporte por la proteína j . (b) Ecuaciones de balance de masa para cada metabolito. (c) Matriz estequiométrica construida a partir del balance de masa. (d) Supuestos, restricciones y función objetivo. Adaptada de Terzer et. al. 2009 [33].

- **Modelos cinéticos:** También conocidos como modelos dinámicos, permiten simular cuantitativamente los cambios en las concentraciones de metabolitos y en los flujos de las reacciones, debido a que son modelados como función del tiempo. Son generalmente utilizados en escala metabólica, por lo que se requiere información acerca de las enzimas involucradas en cada reacción: inhibiciones, cofactores, velocidades enzimáticas y sus parámetros [32]. El planteamiento de este tipo de modelos se describe en la Figura 10.

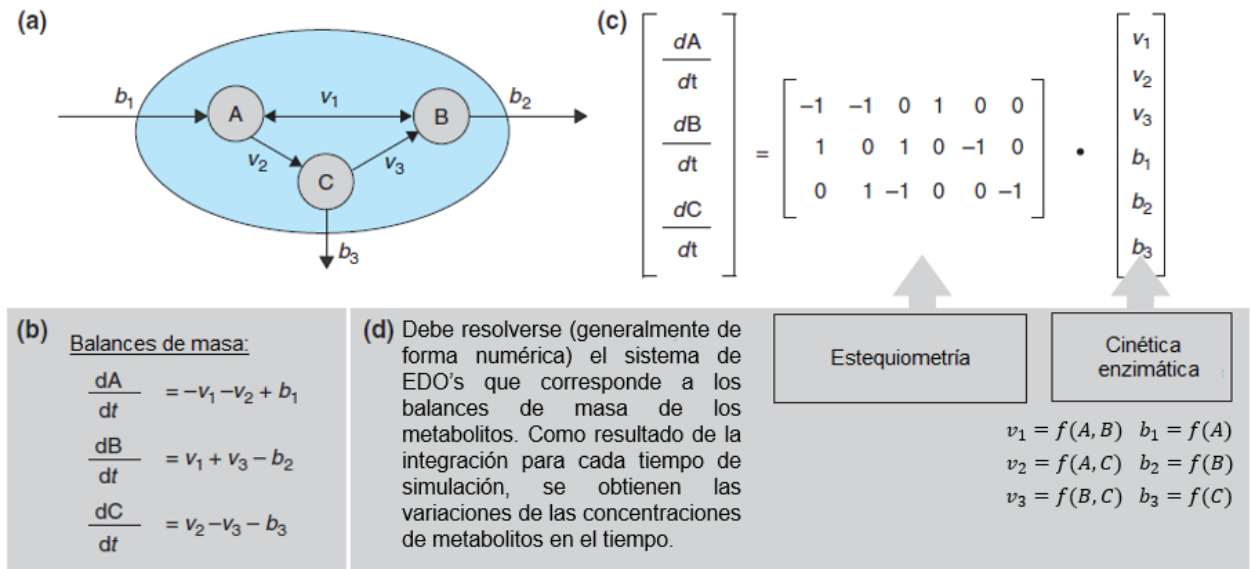


Figura 10. (a) Pequeña red metabólica de tres metabolitos (A, B, C), tres transportes y tres reacciones enzimáticas. v_i indica el flujo de la reacción i y b_j representa el flujo del transporte por la proteína j . (b) Ecuaciones de balance de masa para cada metabolito. (c) Matriz estequiométrica construida a partir del balance de masa. (d) Descripción de las cinéticas, resolución del problema. Adaptada de Terzer et. al.2009 [33].

2.4.1. Modelos matemáticos de *Escherichia coli*

Escherichia coli es uno de los organismos mejor estudiados, conociéndose gran parte de su metabolismo, regulación y fisiología [34]. Es por esto que en los últimos treinta años, diversos modelos matemáticos han sido construidos para evaluar su comportamiento ante diferentes condiciones, y en diferentes -ómicas. En la Figura 11 se observa el comienzo del desarrollo de sucesivos modelos para *E. coli*. En 1997 el genoma de *E. coli* K-12 fue completamente secuenciada [35], pero solo hasta el año 2000 fue publicado el primer modelo estequiométrico completo a escala genómica para este microorganismo [36]. Así, diversos modelos estequiométricos han sido desarrollados a partir de este, incorporando también las reacciones de regulación transcripcional y traduccional [34], obteniendo modelos tan complejos como iML1515 publicado en 2017, el cual contiene cerca de 2.700 reacciones y 1.200 metabolitos [37].

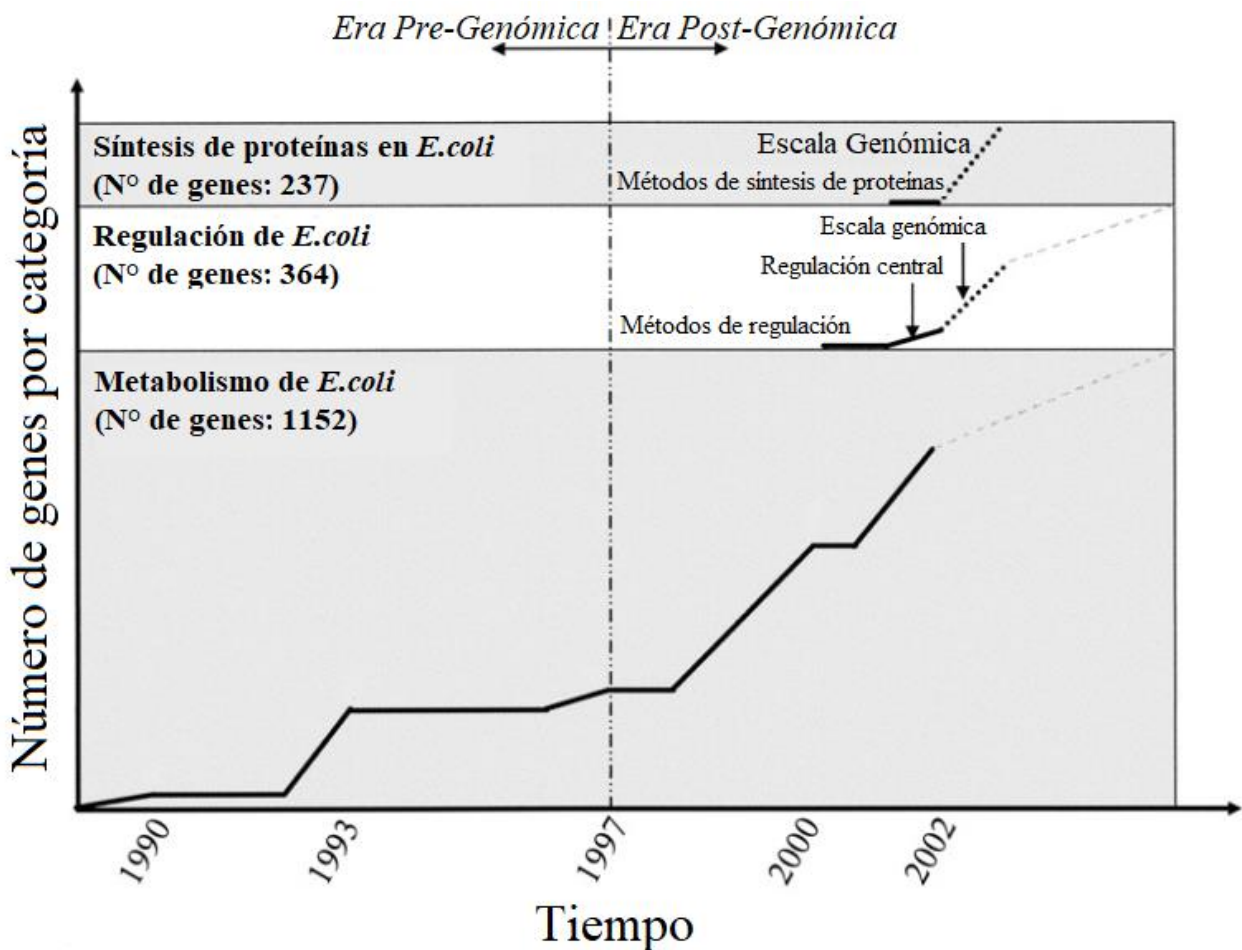


Figura 11. Desarrollo de los primeros modelos matemáticos de *E. coli*. Adaptado de Reed et. al., 2003 [34].

Asimismo, a partir del año 2002 comienza la construcción de diversos modelos dinámicos para *E. coli*, los cuales han ido complementándose a medida que pasan los años gracias a los descubrimientos en materia de regulación metabólica e interacciones enzima-

sustrato. El primer modelo dinámico presentado es el de Chassagnole et al., 2002 [38], el que principalmente representa la glicólisis. Luego en 2010 se incorpora el ciclo de Krebs y la producción de acetato [39],[40], en 2012 la ruta de glioxilato [41] y en 2017 expresiones para crecimiento y las rutas fermentativas [12],[42]. Precisamente en uno de estos últimos modelos (Millard et. al., 2017), se concluye que el modelo dinámico a escala metabólica construido por ellos, es suficiente para describir el comportamiento de *E. coli* K-12, debido a la vasta regulación e interacción a nivel enzimático [12]. Una comparación más detallada se puede apreciar en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Cuadro comparativo entre los diferentes modelos cinéticos de *E. coli* más utilizados.

| Modelos | Escala(s) -ómica(s) | Topología del modelo | | Software |
|---------------------------------------|--|---|-----------------------|---------------------------------|
| | | Rutas modeladas | Estructura | |
| Chassagnole et. al., 2002 [38] | Metabólica | PTS, EMP, PPP, AR, NC&T, | 18 EDO's, 30 flujos | No menciona |
| Kadir et. al., 2010 [39] | Metabólica | PTS, EMP, PPP, TCA, AR, GS, AC, crecimiento | 24 EDO's, 30 flujos | No menciona |
| Kotte et. al., 2010 [40] | Genómica, transcriptómica y metabólica | PTS, EMP, TCA, AR, GS, NC&T, AC | 47 EDO's y 109 flujos | Matlab y SBML |
| Peskov et. al., 2012 [41] | Metabólica | PTS, EMP, PPP, EDP, TCA, AR, GS | 48 EDO's y 75 flujos | Modelcreator2 y DBSolve Optimum |
| Jahan et. al., 2016 [43] | Genómica, transcriptómica y metabólica | PTS, EMP, PPP, EDP, TCA, AR, GS, NC&T, AC | 51 EDO's y 130 flujos | Matlab |
| Millard et. al., 2017 [12] | Metabólica | PTS, EMP, PPP, EDP, TCA, AR; GS, OP, NC&T, AC, XCH, crecimiento | 67 EDO's y 64 flujos | COPASI |
| Matsuoka et. al., 2017 [42] | Genómica, transcriptómica y metabólica | PTS, EMP, PPP, EDP, TCA, AR; GS, OP, NC&T, AC, FP, XCH | 36 EDO's y 61 flujos | Matlab |

2.5. Biología sintética

Al igual que en el caso del modelamiento matemático, los distintos descubrimientos biológicos en el siglo XX, acerca del comportamiento intracelular, los mecanismos de regulación y las técnicas biotecnológicas como el ADN recombinante, así como los avances en matemáticas e ingeniería, han ido forjando el camino hacia esta nueva forma de comprender la biotecnología [44]. El término biología sintética fue utilizado por primera vez en 1980 para referirse a una bacteria que había sido genéticamente modificada, por lo que durante muchos años se consideró como un sinónimo de bioingeniería. No fue hasta pasado el año 2000 que el concepto de biología sintética fue utilizado para referirse a la creación de organismos genéticamente modificados mediante la utilización de “partes” intercambiables que funcionarían de igual manera en distintos organismos [45].

La biología sintética, se define entonces, como la combinación entre la biología (lo natural) y la ingeniería (lo sintético o creado), ya que posee cualidades propias de ingenierías como computación y eléctrica, que se abstraen y se implementan en la biología con el fin de “programar” a los organismos vivos para que generen una respuesta específica ante un estímulo determinado [44].

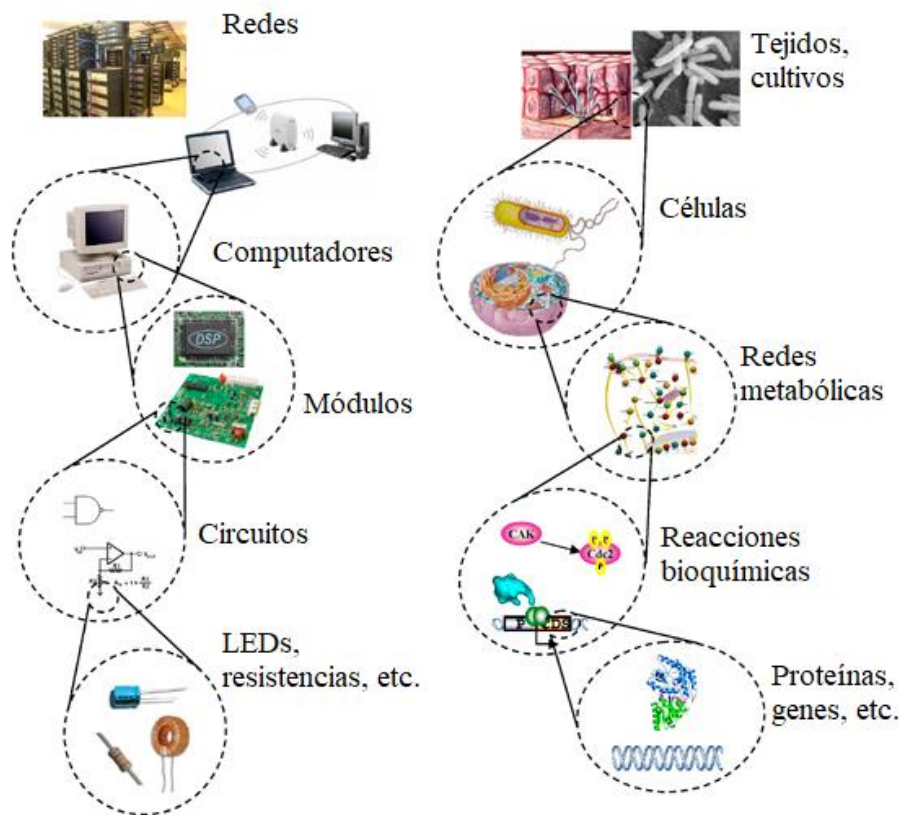


Figura 12. Similitudes entre ingeniería en computación y biología. Adaptada de Andrianantoandro et. al., 2006 [44].

Tal como se puede observar en la Figura 12, los conceptos computacionales de modularidad y estandarización se observan a distintos niveles de *hardware* donde existen diversos módulos específicos que se relacionan entre sí, y que pueden ser reubicados cumpliendo siempre la misma función. En el caso de la biología, estos conceptos se refieren a la estructura particular del ADN, el cual está constituido por 4 nucleótidos que,

según el orden en que se ubiquen, codifican para la información genética del organismo. De esta misma forma, los genes poseen módulos estándares que cumplen labores diferentes en cuanto a la información que entregan (promotor, sitio de unión al ribosoma, región codificante, terminador), y luego cada gen puede ser un módulo en sí que interactúa con otros genes para generar alguna respuesta específica [44],[45]. Actualmente, el mayor repositorio de módulos o partes biológicas estandarizadas, se encuentra asociado a la competencia internacional de biología sintética iGEM, donde los distintos equipos que participan año a año en ella, van documentando nuevas partes utilizadas en sus proyectos, para que así los equipos venideros puedan utilizarlos en caso de que lo requieran [46].

Otros conceptos abstraídos de la ingeniería, en este caso de la eléctrica, son la regulación mediante *switches* y los osciladores. Si bien estos conceptos existen en la biología “natural” tal como se observa en la Figura 13, son unos de los conocimientos más importantes de comprender para la disciplina, y también son de los más interesantes de implementar al momento de crear nuevos sistemas biológicos, pues permiten definir al organismo como una biomáquina programable, capaz de autorregularse según los estímulos percibidos [47].

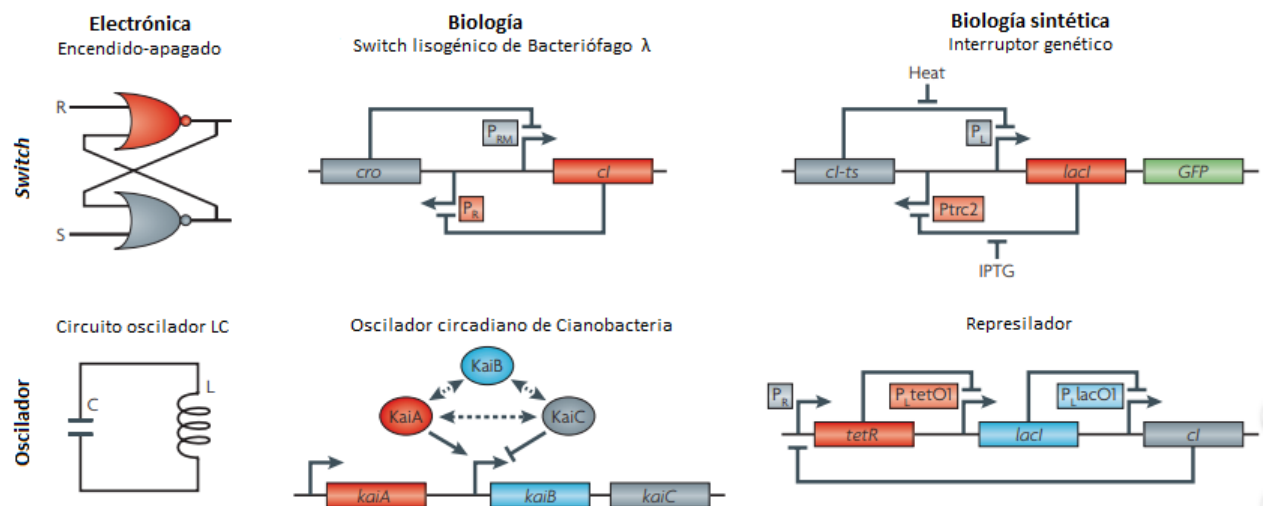


Figura 13. Relación entre la electrónica y la biología sintética. Las flechas con punta indican activación del promotor, mientras que las flechas truncadas indican represión. Adaptada de Khalil et. al., 2010 [47].

Como ya se ha mencionado, comprender los mecanismos de regulación biológicos ha sido de suma importancia para el planteamiento de los sistemas sintéticos. Actualmente se pueden clasificar en transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales, como se muestra en los ejemplos de biosensores de la Figura 14. La regulación transcripcional está asociada con el control de la expresión de genes, la cual puede ser posible gracias al operador que poseen los promotores, de forma natural o bien creado para una función específica que se quiera lograr. La regulación traduccional hace referencia al control de la expresión de proteínas mediante la mutación del RBS (sitio de unión a ribosoma), aunque actualmente existen técnicas más avanzadas que utilizan ribozimas o “*riboswitches*” que censan y responden ante pequeñas moléculas o pequeños fragmentos de ARN (ARNsi) para silenciar o degradar ARNm. Finalmente, la regulación post-

traduccional tiene que ver con la estructura 3D que tendrán las proteínas obtenidas mediante ingeniería (mediante métodos computacionales predictivos), que son creadas con alguna función específica según lo que se quiere lograr en el organismo que la producirá [47],[48].

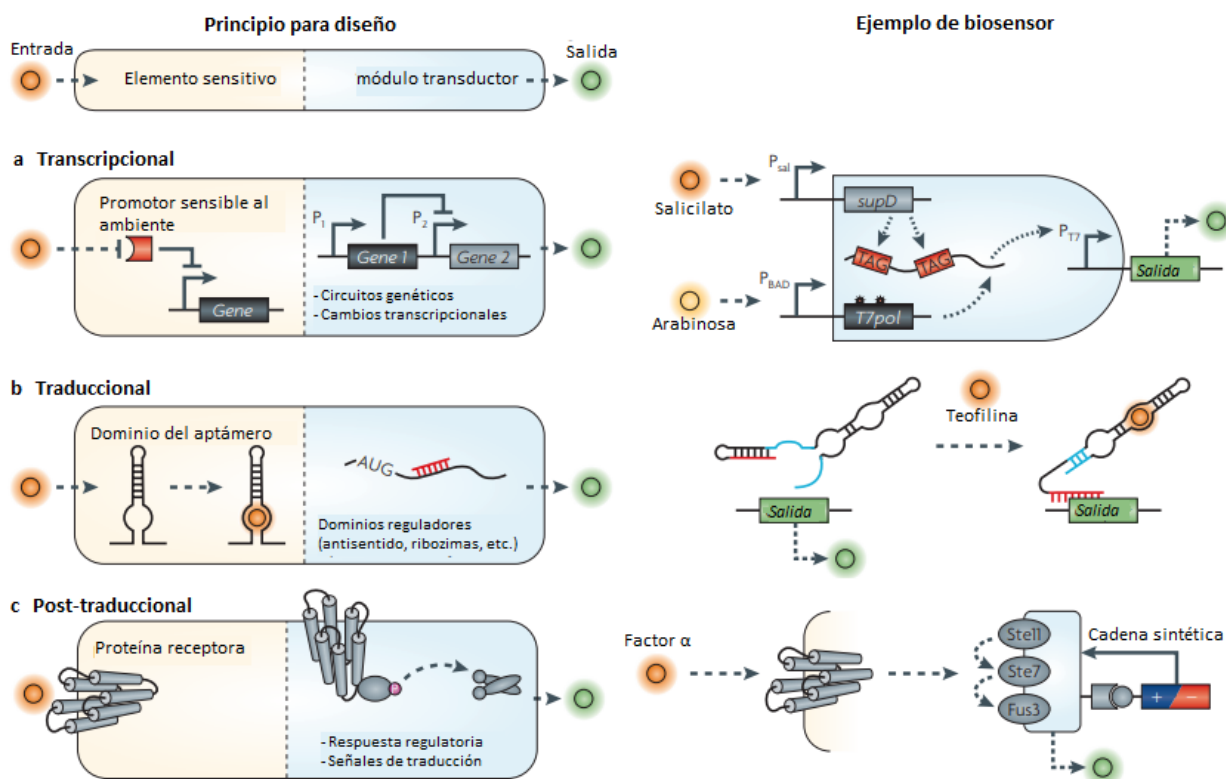


Figura 14. Niveles de regulación en biología. Adaptada de Khalil et. al., 2010 [47].

El principal desafío que posee la biología sintética actualmente tiene que ver con la implementación de los sistemas para crear un nuevo “hardware” celular. Lamentablemente, las técnicas de laboratorio biológicas que existen hasta ahora no son lo suficientemente estándares como para proveer resultados certeros al primer intento como sí lo puede hacer la física con la ingeniería eléctrica. Por ello, la mayor parte de proyectos de biología sintética deben realizar varias iteraciones antes de obtener el comportamiento buscado en el organismo diseñado. En consecuencia, una vez más el uso de herramientas computacionales como el diseño racional basado en modelos matemáticos, suele ser bastante útil para mejorar el resultado obtenido y ahorrar tiempo en cuanto al trabajo iterativo de laboratorio [44],[49].

2.6. Productos biológicos de interés comercial

En la actualidad, la producción de diferentes compuestos químicos utilizando biomasa como materia prima y/o como sistema productor, resulta una oportunidad interesante de prospectar en cuanto a la incorporación del concepto de sustentabilidad en los distintos procesos productivos a nivel mundial. Estos productos químicos de origen biológicos, también llamados bioproductos, deben ser competitivos con respecto a la producción estándar actual derivada del petróleo, considerando que pueden proporcionar

reemplazos directos o reemplazos únicos y funcionales que solo se generan a partir de biomasa. Estos últimos son considerados los más importantes para impulsar el desarrollo de una biorrefinería económicamente viable y sostenible, aunque para lograr un posicionamiento de ellos en el mercado, es necesario realizar una gran cantidad de pruebas con el objetivo de demostrar que poseen iguales propiedades que la molécula que se usa actualmente [50].

En la Tabla 3 se observan los bioproductos con mayor proyección según literatura, considerando: a) si son reemplazos directos o funcionales; b) la plataforma de producción (bioquímica (BC), termoquímica (TC), híbrida entre termoquímica y bioquímica (TC/BC) y algal); c) un puntaje de 1 a 9 en cuanto al avance del desarrollo y su posible masificación en un futuro cercano (TRL: *Energy Technology Readiness Levels*); y d) si están en curso de desarrollo para materias primas lignocelulósicas (I+D) [50].

Tabla 3. Bioproductos mejor proyectados para posicionarse en el mercado en un futuro cercano [50].

| Bioproducto | Clasificación | Plataforma de producción | TRL | I+D |
|--------------------|---------------|--------------------------|-----|-----|
| Butadieno (1,3-) | Directo | BC y TC/BC | 6 | Sí |
| Butanodiol (1,4-) | Directo | BC | 8 | Sí |
| Etil-lactato | Funcional | BC (esterificación) | 9 | Sí |
| Alcoholes grasos | Directo | TC, BC, Algal | 9 | No |
| Furfural | Funcional | TC y BC | 9 | Sí |
| Glicerol | Funcional | Algal | 9 | No |
| Isopreno | Directo | BC | 6 | No |
| Ácido láctico | Funcional | BC | 9 | Sí |
| Propanodiol (1,3-) | Funcional | BC | 9 | No |
| Propilenglicol | Funcional | BC | 9 | No |
| Ácido succínico | Funcional | BC | 9 | Sí |
| Xileno (para) | Directo | BC y TC | 6 | Sí |

Considerando los avances en I+D, los TRL más altos, y que la plataforma de producción sea bioquímica, los bioproductos que cumplen dichas características son ácido láctico y ácido succínico. Por otra parte, en la Figura 15 se grafican los precios de mercado de diversos productos químicos y su consumo a nivel mundial mostrando que, tanto ácido láctico como ácido succínico, poseen precios de mercado mayores que la gasolina o el diésel, aunque su demanda global es entre 3 y 4 órdenes de magnitud menores. No obstante, son mercados que aún se encuentran en expansión, y que se prevé aumenten en los próximos años [50].

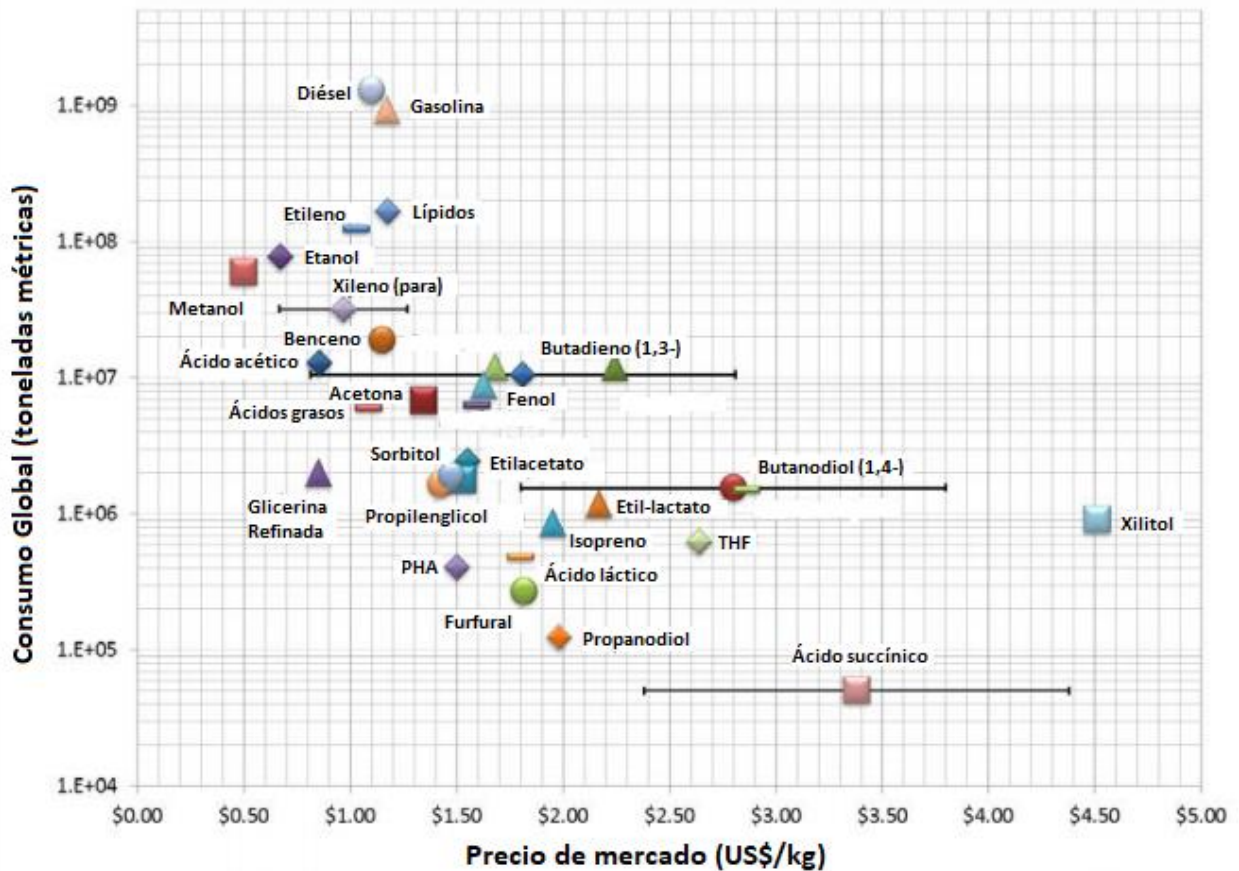


Figura 15. Resumen de los precios de mercado y el volumen de consumo global anual para algunos productos químicos. Adaptada de Bidy et al., 2016 [50].

Por todo lo antes mencionado, se describirán a continuación, y en mayor profundidad, los dos bioproductos con mayores proyecciones económicas.

2.6.1. Ácido láctico

El ácido láctico (ver Figura 16) es un ácido orgánico que puede ser producido, tanto por síntesis química, como mediante fermentación. Se encuentra naturalmente en algunos productos o debido a fermentaciones en el mismo alimento, como es el caso del yogurt. Además, el isómero D-(-)-ácido láctico es un metabolito intermediario en la mayoría de los organismos, desde procariontes anaeróbicos, hasta los humanos [51].

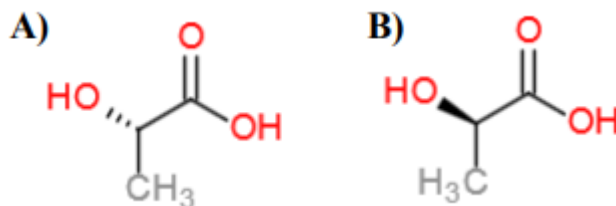


Figura 16. Estructura molecular de los isómeros de ácido láctico: A) L-(+)-ácido láctico; B) D-(-)-ácido láctico [50].

El ácido láctico producido de forma química se genera a partir de acetaldehído y ácido cianhídrico, obteniéndose una mezcla racémica de los isómeros D y L [50]. El ácido láctico producido biológicamente, puede ser generado mediante: bacterias, hongos, levaduras, microalgas o cianobacterias, ya sea de forma natural o gracias a ingeniería genética [52]. Dentro de las bacterias empleadas, una de las que más se utiliza es *E. coli* debido a su cultivo sencillo en cuanto al medio que requiere; sin embargo, el mayor problema de su utilización aparece al momento de purificar el ácido láctico, ya que *E. coli* genera una mezcla de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico y etanol) para balancear los cofactores durante glicólisis. Por ello, el mayor desafío actual en cuanto a la producción en esta bacteria, tiene que ver con aumentar su rendimiento de producción [53].

Por otra parte, existen diversas fuentes de carbono desde las cuales es posible realizar las fermentaciones, entre las que destacan biomasa lignocelulósica y a base de almidón, desechos de industria agrícola y alimenticia (leche), glicerol y microalgas [52].

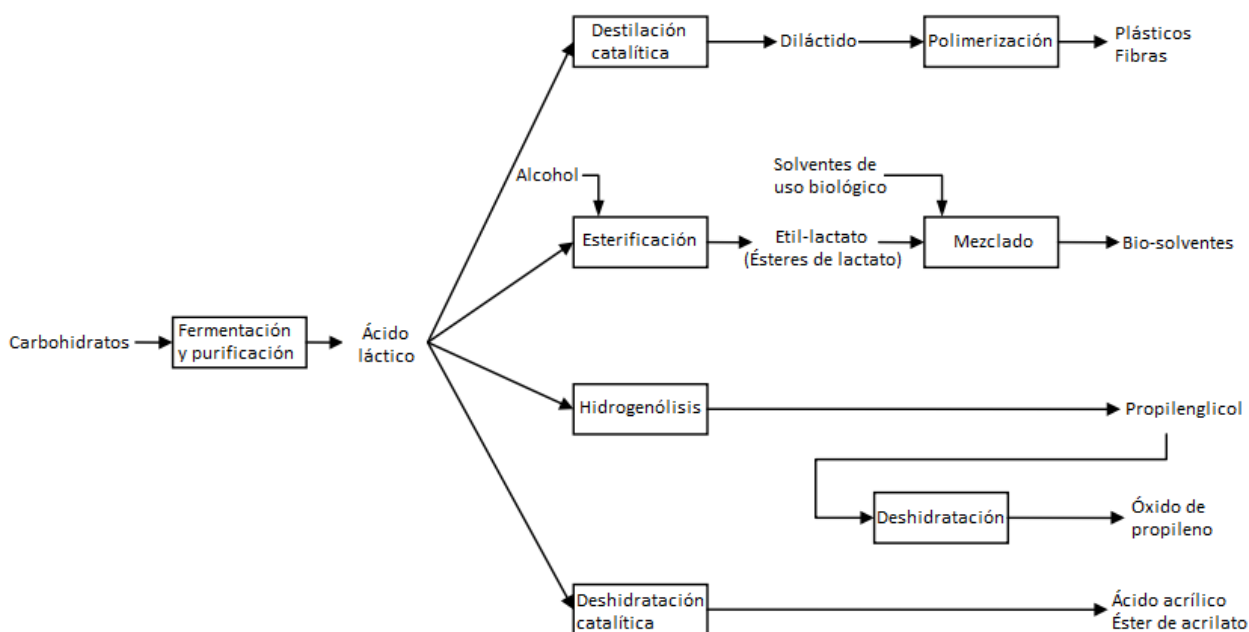


Figura 17. Posibles productos generados a partir del ácido láctico. Adaptada de Datta et. al., 2006 [51].

En la Figura 17 se resumen los distintos usos que posee el ácido láctico. El 85% de la demanda corresponde a la industria alimentaria, donde se utiliza principalmente como acidulante, saborizante, regulador de pH, preservante o para producir otros compuestos que pueden ser empleados en una gran variedad de productos que van desde mayonesa y pan, hasta bebestibles. El otro 15% se utiliza para industria farmacéutica, productos de cuidado personal, productos industriales y polímeros (PLA), siendo éste último el que estaría dirigiendo actualmente la expansión del mercado del ácido láctico [50],[51].

El precio de mercado del ácido láctico depende en parte de la industria que lo requiera, variando entre US\$1,30-US\$2,30/kg, aunque en general tiende a seguir los precios de la materia prima (almidón u otros azúcares) que suele ser un *commodity*. Por lo mismo, el mayor desafío que debe superar el escalamiento de la producción biológica sustentable de ácido láctico, es la utilización de otros azúcares igualmente económicos, para que puedan competir con la materia prima actual [50].

2.6.2. Ácido succínico

El ácido succínico (ver Figura 18), también conocido como ácido butanodioico, es un cristal incoloro soluble en agua, etanol y acetona, y puede ser producido de forma sintética o mediante fermentaciones. Es un intermediario del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA o Ciclo de Krebs) y uno de los productos finales de la fermentación en metabolismos anaeróbicos [54],[55]. El ácido succínico ha sido postulado como un potencial *commodity* de gran aplicabilidad debido a sus facultades para reemplazar un gran número de intermediarios químicos derivados del del petróleo [56].

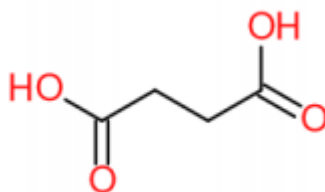


Figura 18. Estructura molecular del ácido succínico [50].

La síntesis química de este compuesto se produce a partir de anhídrido maleico proveniente de n-butano/butadieno, utilizando la fracción C4 de nafta obtenida desde la industria del petróleo, tal como muestra la Figura 19. Existen también diversos microorganismos que producen ácido succínico de forma natural, entre los que destacan algunos hongos, levaduras y bacterias Gram-positivas. Además, se han realizado esfuerzos en biotecnología por generar *E. coli* recombinantes que sean grandes productoras de ácido succínico, tanto de forma aeróbica, como anaeróbica, obteniendo rendimientos de 0,85 mol/mol sustrato [55]. Generalmente se utiliza como fuente de carbono glucosa, sustrato que encarece de gran manera el costo final del producto, por lo que actualmente se han destinado grandes esfuerzos en investigación por encontrar otras fuentes de carbono menos procesadas y más económicas, impulsadas también por la necesidad de utilizar CO₂ durante la fermentación y así aprovechar los vapores desechados de otros procesos que sean ricos en este compuesto [56].

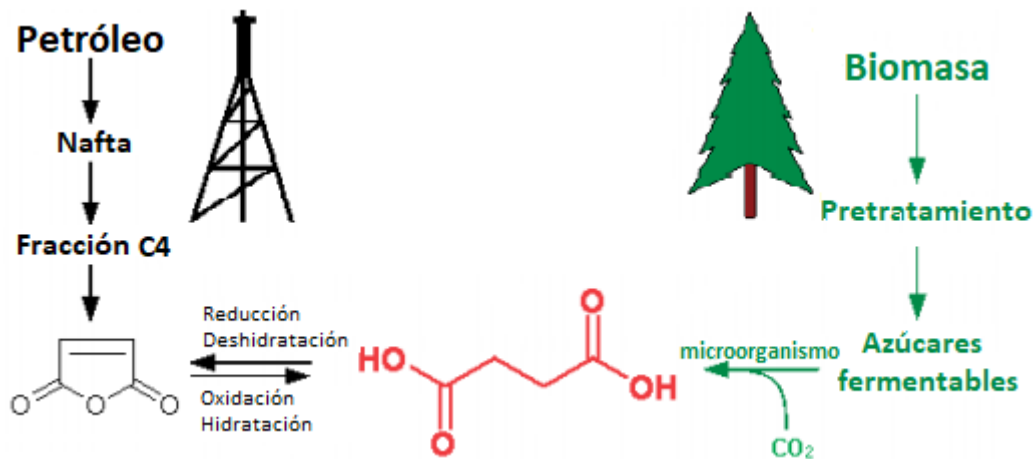


Figura 19. Esquema de producción sintética y biológica del ácido succínico. Adaptada de Bechthold et. al., 2008 [55].

Como se mencionó anteriormente, el ácido succínico posee una gran cantidad de posibles aplicaciones (ver Figura 20), como: ser intermediario en la industria de las pinturas y perfumes, saborizante, bacteriostático o neutralizante en la industria alimentaria, revestimientos, surfactantes, detergentes, solventes orgánicos, plásticos biodegradables y estimulante del crecimiento en animales y plantas [54]. Además, es considerado como un reemplazo para el ácido maleico en varias aplicaciones, debido a que poseen un comportamiento químico similar [56].

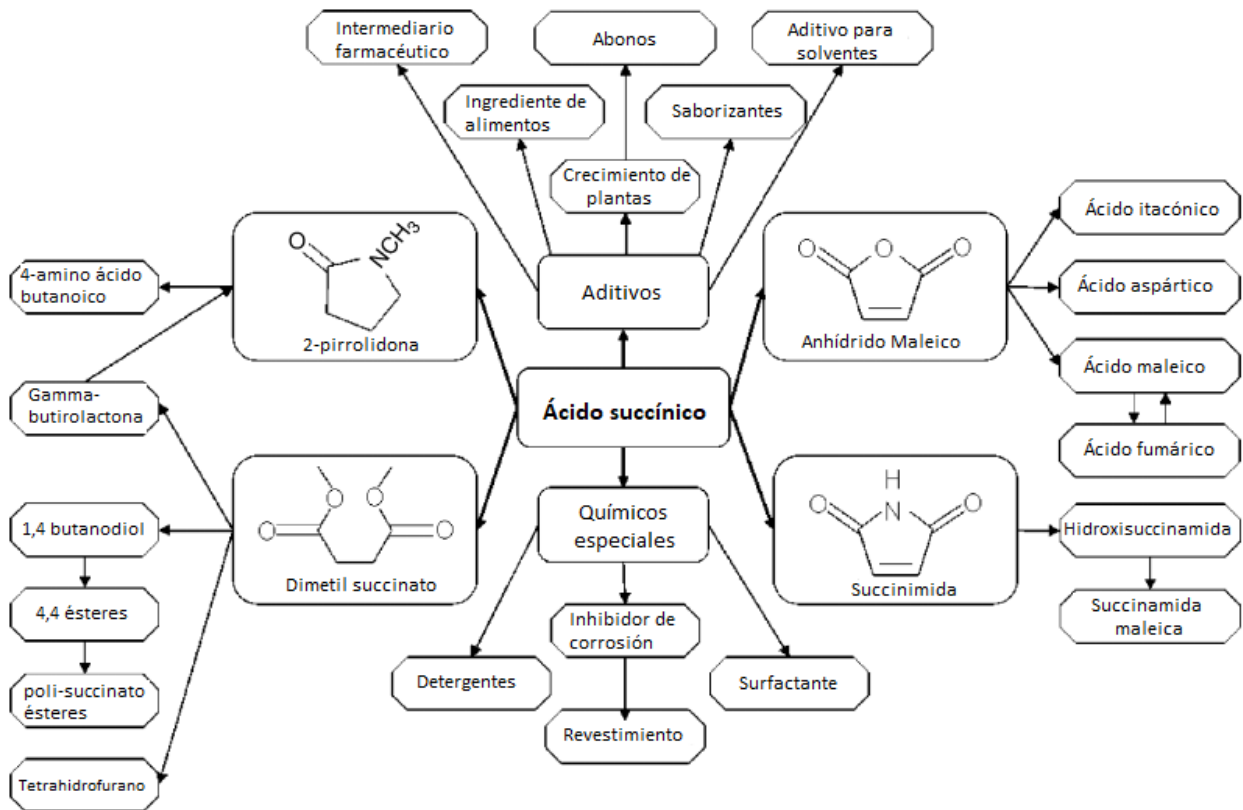


Figura 20. Posibles productos generados a partir de ácido succínico. Adaptada de Song et. al., 2006 [57].

Actualmente, el elevado precio de mercado del ácido succínico, es el tope para que sea ampliamente utilizado como reemplazo del ácido maleico proveniente de la industria petroquímica. Esto se debe, en parte, a los costos de la materia prima utilizada, aunque en gran medida el problema radica en los altos costos de recuperación y purificación posterior desde los cultivos, lo cual se ha intentado reducir realizando las reacciones de conversión a otros compuestos en el mismo caldo de cultivo [56]. Por consiguiente evaluado como uno de los *top 10* de productos con valor agregado, por su versatilidad en la producción de un gran número de *commodities* a partir de él, resulta interesante para el mundo investigativo buscar nuevas maneras de producción biológica de este compuesto, intentando disminuir sus costos y, por ende, obteniendo un precio competitivo con sus sustitutos desde la industria petroquímica [50].

3. HIPÓTESIS

La intervención genética en las vías metabólicas de la bacteria *Escherichia coli* BAL1611 mediante adición o delección de genes o mecanismos regulatorios particulares, permite restablecer el estado *redox* interno de la bacteria, aumentar la disponibilidad de metabolitos de rutas anabólicas y optimizar la producción de bioetanol a partir del consumo de carbohidratos de *Macrocystis pyrifera*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Mejorar el consumo de alginato y manitol en las concentraciones presentes en las algas *Macrocystis pyrifera* chilenas para la producción de bioetanol, usando métodos de biología sintética para la optimización del balance *redox* citoplasmático y la disponibilidad de metabolitos de rutas anabólicas en *Escherichia coli* BAL1611.

4.2. Objetivos Específicos

- Estudiar la distribución de flujos y concentración de metabolitos en las vías metabólicas centrales de *Escherichia coli* con glucosa como fuente de carbono mediante modelos cinéticos con regulación alostérica y compararlos con los de *E. coli* BAL1611 con glucosa, manitol y alginato como fuentes de carbono.
- Proponer y analizar circuitos genéticos o metabólicos de control, usando métodos de biología sintética, que permitan restablecer los niveles de poder reductor dentro de la *Escherichia coli* BAL1611, comparables a los niveles del metabolismo de *E. coli* en base a glucosa.
- Proponer nuevos productos de interés comercial que se pueden generar desde la degradación por *Escherichia coli* BAL1611 del alginato y manitol presentes en *Macrocystis pyrifera*, sin producir desbalances energéticos, *redox* o metabólicos por sí solos, o que puedan ayudar a balancear los requerimientos metabólicos de la producción de etanol.

5. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo los objetivos planteados en la sección anterior, se dividió el trabajo en tres grandes etapas: una primera que tiene relación con el estudio de las vías centrales de *Escherichia coli* BAL1611 para determinar el problema metabólico que se traduce en bajas producciones de etanol; una segunda que hace referencia a la búsqueda de nuevos productos generados por la *E. coli* BAL1611 a partir del alga chilena *M. pyrifera*; y una tercera relativa a la propuesta genética o metabólica que permita mejorar la producción de etanol y los otros productos de interés, a partir de *Macrocystis pyrifera*.

5.1. Mejora *in silico* de *Escherichia coli* BAL1611

5.1.1. Análisis *in silico* de *Escherichia coli* nativa

Lo primero que se realizó fue escoger el modelo a utilizar para las simulaciones. En cuanto a la escala –ómica en la cual trabajar, se decidió que la más apropiada es la escala metabólica debido a que permite observar lo que sucede con las concentraciones de los metabolitos dentro de la BAL1611, específicamente con el poder reductor, considerado como principal hipótesis del problema de la bacteria. Por otra parte, un modelo cinético permite analizar el comportamiento de los metabolitos en el tiempo, por lo que resulta una mejor alternativa que un modelo estequiométrico dada la mayor cantidad de información que se puede obtener. Teniendo en cuenta estos dos aspectos, el modelo que mejor se ajusta es el desarrollado en el trabajo de Millard et. al., 2017 [12], siendo además uno de los más completos en cuanto a las vías metabólicas modeladas y, según los estudios realizados en ese trabajo, este modelo a escala metabólica es capaz de describir completamente el comportamiento de la bacteria.

El modelo cinético de Millard et. al., 2017 [12] posee 67 metabolitos y 64 reacciones, incluyendo una que describe el crecimiento, la fosforilación oxidativa y el balance del poder reductor en la bacteria. Considera como constantes los volúmenes extracelular, periplásmico e intracelular (en una proporción 100:0,25:1), las concentraciones de COA, oxígeno, magnesio y protones al interior de la célula (ver Anexo A). Además, está desarrollado en el *software* COPASI, el cual posee una interfaz útil para el planteamiento de modelos matemáticos cinéticos y sus simulaciones. Sin embargo, es un tanto limitado en cuanto a la visualización de los resultados de las simulaciones que en él se realicen, y para sistemas con alta no linealidad puede presentar problemas al momento de resolver el sistema de ecuaciones diferenciales. En particular, la simulación de los flujos no era posible de observar, aunque sí la de concentración de metabolitos en el tiempo [58].

Por la razón descrita en el párrafo anterior, y buscando tener mayor libertad en cuanto a la forma de mostrar resultados, se decidió traspasar el modelo a Matlab, *software* ampliamente utilizado en ingeniería y ciencias que permite trabajar con un lenguaje matemático de matrices y arreglos para crear algoritmos y modelar diferentes sistemas [59]. Se transcribió el sistema de ecuaciones diferenciales que modela el cambio de concentración de cada metabolito en el tiempo, así como las velocidades de reacción de cada una de las enzimas que forman parte del modelo.

Luego de transcribir el modelo a Matlab, se decidió conocer la sensibilidad de éste frente al sustrato. Así, se realizaron pruebas para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor de flujo de sustrato del modelo original aproximadamente 0,5 y 1,5 veces éste (entre 0,1 y 0,4 [mmol/s], la del modelo original es 0,23 [mmol/s]). También se realizaron pruebas para grandes variaciones de flujo de glucosa con respecto al valor original (entre 8,38 y 67 [mmol/L]), escogiendo como valor máximo, el flujo equivalente al que se agrega en un cultivo *batch* en laboratorio (10-12 [g/L]) [60],[61].

5.1.2. Construcción del modelo cinético de *E. coli* BAL1611

Luego del análisis *in silico* de *E. coli* nativa, es necesario realizar el estudio del metabolismo de BAL1611 para compararlo con la bacteria nativa, y así determinar cuál(es) es(son) el(los) problema(s) a nivel metabólico que genera(n) la baja producción de etanol para el caso de degradación de *M. pyrifera*. Por esto, el primer paso lógico sería construir el modelo cinético incorporando las reacciones y metabolitos relacionados con los sistemas característicos de la BAL1611. No obstante, se decidió realizar previamente una mejora del modelo escogido gracias a la incorporación de algunas reacciones presentes en otros modelos cinéticos existentes de *Escherichia coli*.

Para ello, se realizó una comparación entre las distintas reacciones presentes en diversos modelos encontrados en literatura y las que contiene el modelo escogido de Millard et. al. Luego, se decidió cuáles son aquellas enzimas que se incorporaron al modelo, considerando que debían ser cinéticas independientes de factores transcripcionales y que no fueran además isoenzimas de alguna ya existente en el original.

Posteriormente, se realizaron simulaciones para corroborar que el modelo seguía resolviéndose adecuadamente, utilizando glucosa como fuente de carbono, a la concentración del modelo original como sustrato. Se probó primero con cada sistema incorporado por separado, y luego con la adición paulatina de los sistemas.

Para continuar, se realizó la construcción del modelo cinético de la *E. coli* BAL1611 como tal. Para ello, lo primero que se debió tener en consideración es que posee un *knock-out* de los sistemas de lactato y formiato, por lo que en realidad estas reacciones anteriormente incorporadas al modelo, no fueron realmente utilizadas al momento de realizar las simulaciones, a pesar de que este cuenta con ellas en caso de necesitar ser empleadas. Luego, en cuanto a las rutas incorporadas en la BAL1611, se debió desarrollar una búsqueda bibliográfica para determinar las expresiones matemáticas de las velocidades y los valores de los parámetros de las enzimas involucradas.

5.1.3. Comparación de las vías metabólicas entre *E. coli* nativa y BAL1611

Una vez que el modelo está construido, se da paso a las simulaciones para estudiar el metabolismo de *E. coli* BAL1611 y, de esta forma, determinar cuál es la causa de la menor generación de etanol a partir del alga chilena. Para ello, la metodología general de estas simulaciones fue ir dejando fuera algunos de los flujos incorporados para el sistema de la BAL1611 hasta encontrar la razón de la baja productividad de etanol, y luego ir reincorporándolos paulatinamente junto con la posible solución, para corroborar que efectivamente se resuelve el problema.

Las primeras simulaciones realizadas se ejecutaron con el modelo completo, para los tres distintos sustratos: glucosa, manitol y DEHU. De ellas se analizó la influencia de las concentraciones de los distintos metabolitos en la función de crecimiento, y se estudiaron además, los flujos en las rutas de degradación de alginato y manitol.

Debido a los resultados de las primeras simulaciones, se decidió probar con flujos fijos de entrada directamente a los metabolitos KDPG para DEHU (enzima que convierte KDG en KDPG) y F6P para manitol (enzima que convierte MANI en F6P), con el fin de obtener resultados comparables al caso de glucosa. Para ello, se consideró como valor máximo de flujo de entrada total (suma de DEHU y manitol) el valor determinado por el modelo original para la entrada de glucosa (0,23 [mmol/s] [12]). Se realizaron de esta forma las simulaciones de la *E. coli* BAL1611 para cada una de las proporciones de DEHU:manitol descritas en la Tabla 1, así como para glucosa. También, se decidió estudiar la influencia de la producción heteróloga de etanol en los flujos internos de la bacteria, por lo que se simuló también a la *E. coli* sin producción de etanol, pero utilizando como sustrato DEHU y manitol puros, además de realizar simulaciones utilizando glucosa como sustrato, manteniendo fijo el flujo de producción de etanol obtenido en las simulaciones para cada proporción de DEHU:manitol.

A partir de estas simulaciones, se analizó a la *E. coli* sin producción de etanol con diferentes sustratos; se comparó a la BAL1611 con respecto a la *E. coli* nativa con glucosa, DEHU o manitol como sustrato; se comparó a la BAL1611 con distintas proporciones de DEHU:manitol con respecto a *E. coli* nativa; y se comparó a la BAL1611 con distintas proporciones de DEHU:manitol con respecto a la BAL1611 con glucosa, para una misma producción de etanol. Para comparar, se construyeron esquemas gráficos de las rutas metabólicas de la *E. coli* BAL1611 con los flujos de las distintas vías simuladas, y luego se analizó cómo varían estos a medida que se modifican las proporciones de los distintos sustratos. Se construyó, además, gráficos de rendimiento de producto versus sustrato y crecimiento versus sustrato, aunque este último no es comparable con los resultados experimentales previamente obtenidos y expuestos en el apartado 2.3. Por lo mismo, se decidió calcular la distribución de moles de carbono destinados a producto (etanol), crecimiento, mantenimiento y otros productos (acetato y succinato), para cada una de las proporciones de DEHU:manitol descritas en la Tabla 1.

De estas simulaciones se obtuvo algunos indicios de posibles problemas para la producción de etanol a partir de *M. pyrifera*, por lo que se realizaron nuevas simulaciones cambiando parámetros de las enzimas involucradas, o eliminando sistemas completos, dependiendo del caso. Se construyeron gráficos de rendimiento de producto versus sustrato y crecimiento versus sustrato, junto con calcular la distribución de moles de carbono en *E. coli*.

Luego, como la hipótesis de la tesis es que el problema de la bacteria es el desbalance *redox* interno, se reincorpora el flujo correspondiente a la enzima DehR de la ruta de degradación de alginato (que va de DEHU a KDG), pues en esta reacción se utiliza poder reductor. Sin embargo, al igual que en las simulaciones anteriores, se consideró como un flujo fijo de entrada de DEHU, para poder ser comparado con las simulaciones con glucosa. En el caso de *E. coli* BAL1611, la enzima de *Vibrio* incorporada utiliza NADH, aunque generalmente se emplea NADPH en esta reacción; por esto se decidió hacer dos simulaciones (una utilizando NADH y otra utilizando NADPH) para observar si existe

alguna diferencia en el cofactor empleado. Para comparar, se construyeron gráficos de rendimiento de producto versus sustrato y crecimiento versus sustrato.

5.1.4. Estudios para maximizar la producción de etanol

Una vez realizado el análisis para comprender el comportamiento del metabolismo de *E. coli* BAL1611 cuando es cultivada con distintos sustratos, se procedió a realizar la optimización *in silico* de la producción de etanol, la cual se llevó a cabo mediante un análisis por fuerza bruta de todos los *knock-out* y sobreexpresiones posibles, con un máximo de tres cambios por simulación. Con el propósito de alcanzar el objetivo propuesto, se utilizó el mismo modelo dinámico que se construyó en el apartado 5.1.2 debido a que, un modelo estequiométrico en estado estacionario, habría entregado la respuesta lógica de aumentar la alimentación para obtener más producto, dada la linealidad del problema.

El modelo dinámico cuenta con alrededor de 90 velocidades de reacción, por lo que el total de simulaciones aproximadamente corresponde a 12.000. Dada esa cantidad de pruebas, se realizaron modificaciones en la forma del planteamiento del modelo, buscando perfeccionar el tiempo de procesamiento del mismo. Estos cambios tienen que ver principalmente con el planteamiento del sistema de EDO's como uno matricial (ver matriz estequiométrica en Anexo B), para que de esta forma las operaciones matemáticas se ejecutaran eficientemente.

También es importante mencionar que algunas enzimas no pueden ser variables, por lo que fueron excluidas de las posibles mutaciones a simular. Estas enzimas tienen que ver principalmente con los sistemas de alimentación (glucosa, DEHU y manitol), la salida de etanol y la degradación de acetato en el extracelular, y los sistemas de lactato y formiato que se eliminaron de la *E. coli* BAL1611.

Por otra parte, con algunos de los *knock-out* o sobreexpresiones se obtenían resultados que no eran físicamente factibles. Por este motivo, se revisaron las reacciones asociadas a dicho problema, y se determinó que aquellas que involucraban un cambio de pH estaban planteadas de manera independiente al sentido de ese gradiente, por lo que se realizaron cambios en las ecuaciones para hacerlas dependientes al signo del cambio de pH, obteniendo las que aparecen en el Anexo C. Además, se debió imponer un rango biológicamente aceptable para el pH del periplasma de la bacteria (entre 4 y 10), junto con la condición de borde para todos los metabolitos de que debían ser concentraciones mayores o iguales que cero.

Una vez realizados los cambios en el modelo, se decidió estudiar la importancia de considerar límites biológicamente factibles para el crecimiento y las razones de poder reductor y disponibilidad energética, con el fin de descartar aquellas combinaciones de *knock-out* o sobreexpresiones que lleven a la bacteria a extremos de estrés metabólicos con tal de generar grandes cantidades del producto. Para ello, se realizó simulaciones que involucren un solo cambio al genoma (ya sea *knock-out* o sobreexpresión) para cada sustrato (glucosa, manitol, alginato y combinaciones de estos últimos), y luego se graficó cómo varían los resultados obtenidos al ser más o menos restrictivo con respecto al crecimiento del microorganismo. Los límites de poder reductor y disponibilidad energética fueron escogidos como 0,5 y 2 veces los valores resultantes de las simulaciones

realizadas en el apartado 5.1.3, considerando que bajo o sobre estos niveles la bacteria estaría sufriendo de un estrés suficiente como para no poder sobrevivir. De la misma forma, se escogió los valores restrictivos para crecimiento entre el valor mínimo teórico calculado para una *E. coli* estándar (Anexo D) y el crecimiento base para cada sustrato (obtenido en las simulaciones realizadas en el apartado 5.1.3).

Este mismo análisis descrito se realizó para combinaciones de dos mutaciones simultáneas, comparando los flujos máximos para cada sustrato con los que ya se obtuvieron en el apartado anterior, para determinar si resulta pertinente y sensato realizar el esfuerzo a nivel de ingeniería molecular para llevar a cabo los cambios sugeridos.

A partir de los resultados obtenidos, se decidió probar con algunas combinaciones clave de tres o más mutaciones a la vez, con el fin de analizar si era factible encontrar alguna mezcla de *knock-out* y sobreexpresiones que produjeran flujos mayores de etanol.

5.2. Búsqueda de nuevos productos generados por *E. coli* BAL1611

Según lo descrito anteriormente en el apartado 2.6, existen diversos bioproductos de alto interés comercial que están adquiriendo cada vez más importancia a nivel mundial. Dos de ellos destacaban como los con mayor avance y alentadoras proyecciones en la actualidad: ácido láctico y ácido succínico. Por este motivo, tal como se hizo para la optimización de la producción de etanol, se decidió realizar un estudio para optimizar la producción de cada uno de ellos mediante un análisis por fuerza bruta de todos los *knock-out* y sobreexpresiones posibles, con un máximo de tres cambios por simulación, utilizando el mismo modelo dinámico.

Al igual que en el apartado 5.1.4, se estudió si las soluciones propuestas pertenecían al espacio biológicamente factible para cada concentración de sustrato, determinado por el crecimiento, las razones de poder reductor y disponibilidad energética. Para ello, se realizó simulaciones que involucren un solo cambio al genoma (ya sea *knock-out* o sobreexpresión) para cada sustrato (glucosa, manitol, alginato y combinaciones de estos últimos) y para ambos productos, y luego se graficó cómo varían los resultados obtenidos al ser más o menos restrictivo con respecto al crecimiento del microorganismo. Los límites de poder reductor, disponibilidad energética y crecimiento fueron los mismos que se utilizaron en el apartado 5.1.4.

Este mismo análisis descrito se realizó para combinaciones de dos mutaciones simultáneas, comparando los flujos máximos para cada sustrato con los que ya se obtuvieron en el apartado anterior, para determinar si resulta pertinente y sensato realizar el esfuerzo a nivel de ingeniería molecular para llevar a cabo los cambios sugeridos. Dependiendo de ello, se decidió si proseguir o no con pruebas sobre algunas combinaciones clave de tres o más mutaciones a la vez, con el fin de analizar si era factible encontrar alguna mezcla de *knock-out* y sobreexpresiones que produjeran flujos mayores de ácido láctico o ácido succínico.

5.3. Propuestas para mejorar la producción mediante biología sintética

La biología sintética permite la generación de microorganismos que puedan autocontrolar la producción de sus enzimas y metabolitos en función de los distintos estímulos percibidos, buscando generar alguna respuesta particular. Por ello, resulta interesante buscar una solución al problema de producción de etanol en la BAL1611 utilizando esta técnica.

Las simulaciones realizadas previamente entregaron información acerca de posibles mejoras a nivel metabólico en la *E. coli* BAL1611 que permitirían mejorar la producción de etanol y otros productos, a partir de *M. pyrifer*. Considerando estas mejoras, se planteó investigar la posibilidad de tener un sistema de control a nivel genético que cense algún estímulo y, debido a esto, produzca las enzimas necesarias para obtener mejores rendimientos de producto.

Este sistema quedó planteado para una posterior implementación en laboratorio, con el fin de compararlo con los resultados obtenidos en las simulaciones de las mejoras descritas en el apartado anterior.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como se explicó previamente en la metodología, el trabajo realizado se puede dividir en tres grandes ejes: el estudio *in silico* de *E. coli* BAL1611, la búsqueda y evaluación *in silico* de la generación de nuevos productos a partir del mismo microorganismo, y el planteamiento de propuestas que involucran biología sintética para la generación de los diversos productos a partir de *M. pyrifer*.

6.1. Mejora *in silico* de *Escherichia coli* BAL1611

6.1.1. Análisis *in silico* de *Escherichia coli* nativa

Luego del traspaso del modelo de COPASI a Matlab, se realizaron las simulaciones para estudiar la sensibilidad a glucosa por parte del sistema, realizando por una parte pequeñas y grandes variaciones de este flujo de entrada en torno al valor original del modelo, tal como se mencionó en el apartado 5.1.1. Los valores de las concentraciones de metabolitos y los flujos entre ellos, obtenidos a partir de las simulaciones, se encuentran en el Anexo E.

Para comprender qué sucede en la célula ante los cambios en su alimentación, se decide analizar el comportamiento del poder reductor y la disponibilidad energética. Como se aprecia en la curva amarilla de la Figura 21, a mayores concentraciones de glucosa existe una mayor actividad catabólica en la célula, debido a que hay mayor producción de NADH que de NADPH. En las curvas de la Figura 22 se puede observar un óptimo de producción de ATP aproximadamente a los 0,16-0,17 [mmol/s] de glucosa, valor que es más bajo que el del modelo original, y a medida que aumenta el consumo de glucosa disminuye la eficiencia de producción de etanol. Finalmente, en la Figura 23 y Figura 24 se puede apreciar que se alcanza un estado estacionario tanto para el poder reductor como para la disponibilidad energética a medida que aumenta el consumo de glucosa, lo que puede explicarse debido a la saturación de las enzimas que modelan la incorporación de glucosa a la célula.

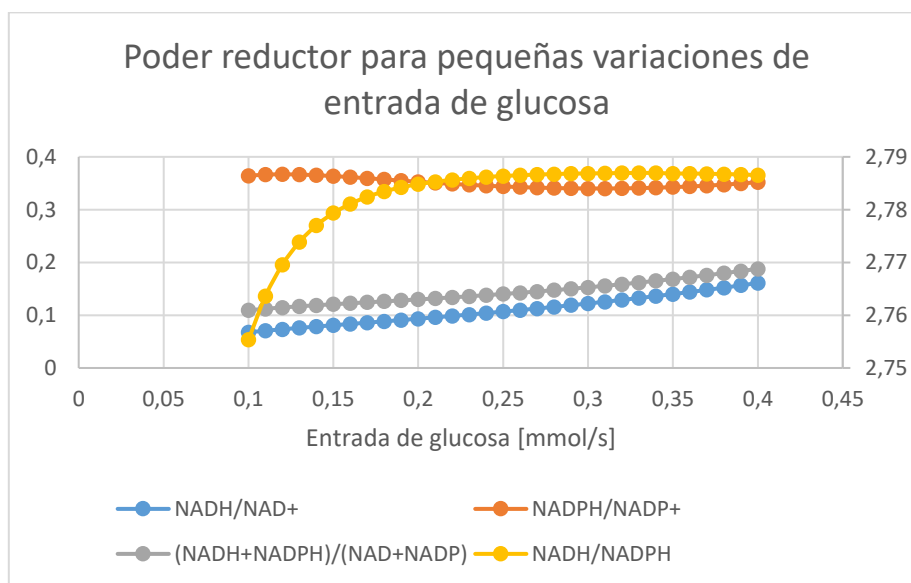


Figura 21. Gráfico del poder reductor para pequeñas variaciones del flujo de glucosa en torno al valor original del modelo.

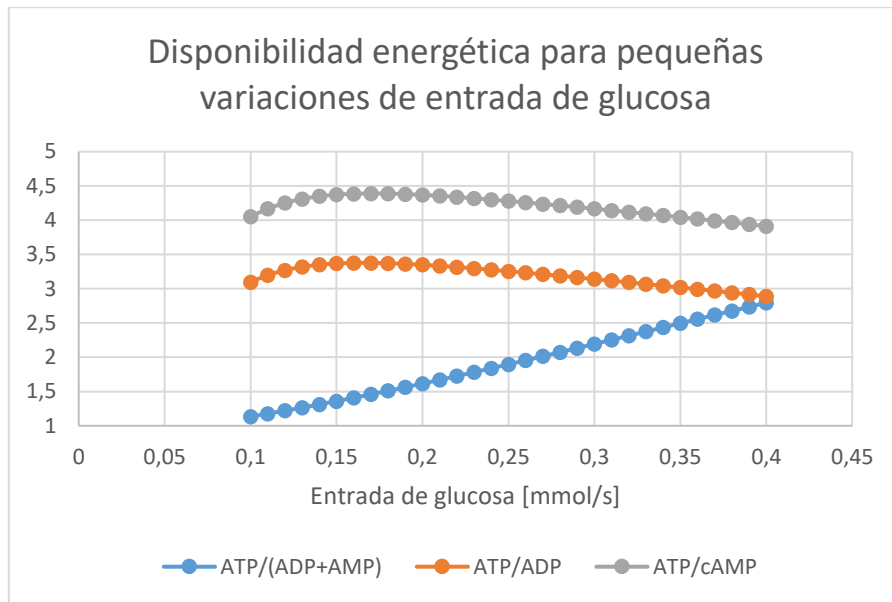


Figura 22. Gráfico de la disponibilidad energética para pequeñas variaciones del flujo de glucosa en torno al valor original del modelo.

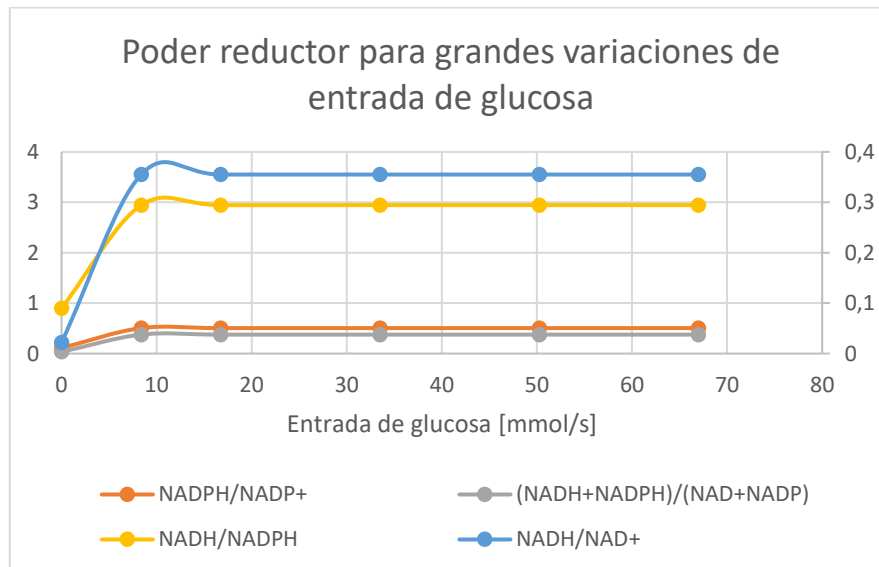


Figura 23. Gráfico del poder reductor para grandes variaciones del flujo de glucosa en torno al valor original del modelo.

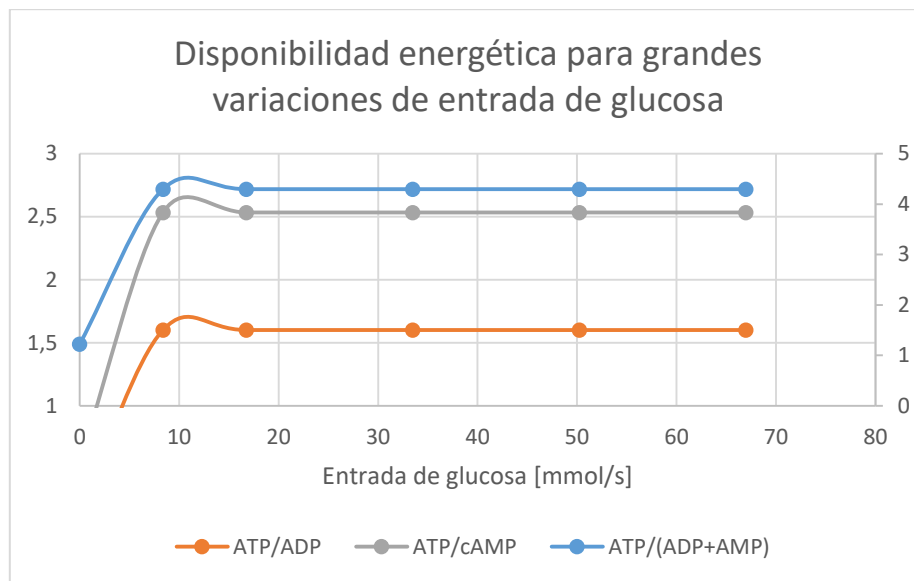


Figura 24. Gráfico de la disponibilidad energética para grandes variaciones del flujo de glucosa en torno al valor original del modelo.

Los resultados expuestos evidencian que existe un rango para el flujo de alimentación dentro del cual es posible observar variaciones en el comportamiento de la célula modelada, lo que hace suponer que es factible utilizar el modelo como base para la construcción del de *E. coli* BAL1611 y para sus posteriores simulaciones con diferentes sustratos. Además, dada la saturación observada en la Figura 23 y Figura 24, se considera necesario mantener los valores del flujo de alimentación cercanos o iguales al del modelo original para asegurar la simulación adecuada del consumo del sustrato proporcionado.

6.1.2. Construcción del modelo cinético de *E. coli* BAL 1611

La comparación entre las distintas reacciones presentes en cada modelo se encuentra en el Anexo F. De esta comparación, algunas de las reacciones que no están en el modelo escogido no fueron implementadas, por diversos motivos. Para el caso de GLK y NON_PTS de la ruta de glicólisis, éstas no fueron incluidas debido a que la ecuación que describía la cinética estaba relacionada con factores transcripcionales, lo que se escapa del marco metabólico en que está desarrollado este modelo. Luego, PYKA y PFKB tampoco fueron incluidas ya que se determinó que como son isoenzimas de PYK y PFK, de alguna forma está incluida su cinética en las respectivas reacciones PYK y PFK del modelo escogido. Por otra parte, se descubrió que la reacción GPLX del modelo de Peskov et. al., 2012 en realidad no está presente en él, pues tiene una velocidad máxima con valor cero dentro de su cinética. Finalmente, la reacción SYN_QH2 tampoco se incorporó, pues el modelo escogido considera la concentración de quinonas como una constante, y su producción depende de factores de transcripcionales.

De esta forma, se incorporó al modelo cinético las reacciones del modelo de Matsuoka et. al., 2017 que aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacciones incorporadas para mejorar el modelo [42].

| Ruta metabólica | Nombre de la reacción | Sustrato(s) | Producto(s) |
|------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|
| Reacción anaplerótica | MAEB | MAL | PYR |
| Lactato | LDH | PYR | LAC |
| | XCH_RMM_LACp | LAC | LACp |
| | XCH_RMM_LACx | LACp | LACx |
| Formiato | PFL | PYR | FOR |
| | XCH_RMM_FORp | FOR | FORp |
| | XCH_RMM_FORx | FORp | FORx |
| Etanol | ALDH | ACCOA | AcAld |
| | ADH | AcAld | ETH |
| | XCH_RMM_ETHp | ETH | ETHp |
| | XCH_RMM_ETHx | ETHp | ETHx |
| Succinato | XCH_RMM_SUCp | SUC | SUCp |
| | XCH_RMM_SUCx | SUCp | SUCx |

Posteriormente, se realizaron simulaciones para corroborar que el modelo sigue resolviéndose adecuadamente, para glucosa a la concentración del modelo original. Se puede observar parte de los resultados de dichas simulaciones en la Figura 25 y la Figura 26, representados nuevamente por el poder reductor y la disponibilidad energética (los datos de las simulaciones se encuentran en el Anexo G). En las figuras se puede apreciar que las razones de poder reductor y disponibilidad energética no varían con respecto al original, a excepción de las combinaciones que poseen el sistema de producción de etanol. Esto se puede explicar debido a que la generación de acetaldehído genera variaciones en la concentración de acetilCoA, lo que provoca cambios en la disponibilidad energética; de la misma forma, la producción de etanol a partir de acetaldehído requiere de NADH, lo que produce variaciones en el poder reductor interno de la célula.

Por otra parte, el sistema de formiato no fue exitosamente incorporado, debido a que la simulación se detenía rápidamente por problemas de error de tolerancia del integrador. Se presume que un cambio en la concentración inicial del metabolito podría eliminar este problema de simulación, aunque se decide no probar el cambio de valor adecuado para resolver la situación, ya que de todas formas para las simulaciones de *E. coli* BAL1611 el sistema siempre estaría apagado debido a que la bacteria posee un *knock-out* para las enzimas de producción de formiato.

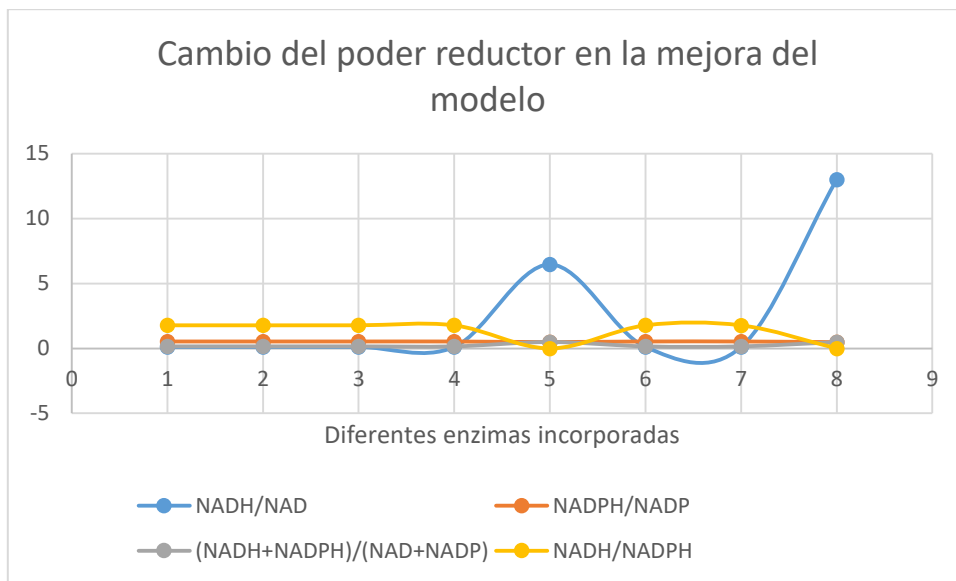


Figura 25. Cambio del poder reductor para las distintas enzimas incorporadas para mejorar el modelo. En el eje de las abscisas, cada punto corresponde a lo siguiente: (1) modelo original, (2) modelo con la enzima MAEB, (3) modelo con sistema de succinato, (4) modelo con sistema de lactato, (5) modelo con sistema de etanol, (6) modelo con MAEB y succinato, (7) modelo con MAEB, succinato y lactato, (8) modelo con MAEB, succinato, lactato y etanol.

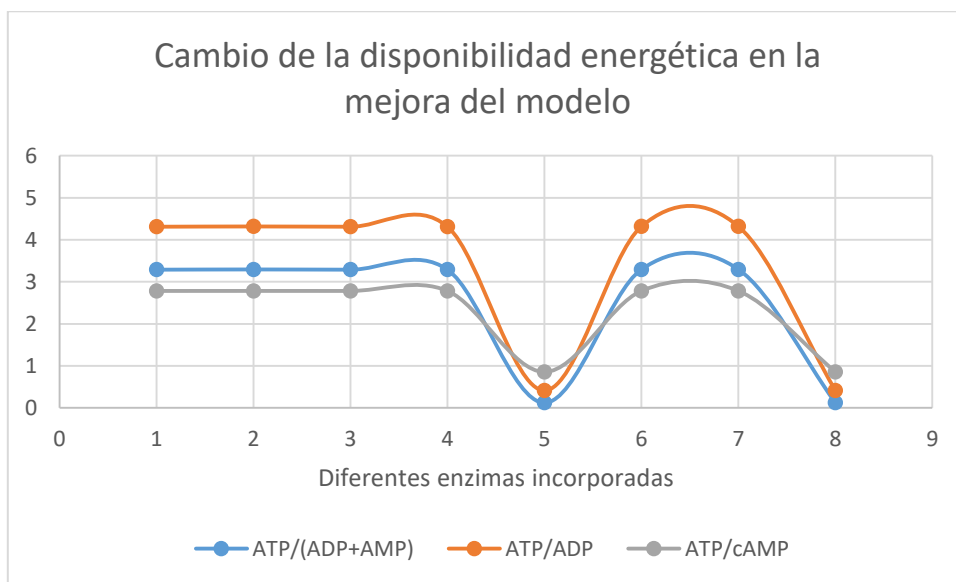


Figura 26. Cambio de la disponibilidad energética para las distintas enzimas incorporadas para mejorar el modelo. En el eje de las abscisas, cada punto corresponde a lo siguiente: (1) modelo original, (2) modelo con la enzima MAEB, (3) modelo con sistema de succinato, (4) modelo con sistema de lactato, (5) modelo con sistema de etanol, (6) modelo con MAEB y succinato, (7) modelo con MAEB, succinato y lactato, (8) modelo con MAEB, succinato, lactato y etanol.

Luego, en cuanto a las rutas incorporadas en la BAL1611, se tiene lo siguiente:

- **Sistema de manitol:** si bien es un sistema nativo de *E. coli*, no se encuentra detallado al nivel de conocer las constantes cinéticas de la reacción involucrada. Por ello, para plantear la cinética de reacción se consideró un promedio de los parámetros de diversos microorganismos que cuentan con esta enzima caracterizada.

- Sistema de alginato: sucede algo similar al caso de manitol, pues las rutas de degradación incorporadas fueron reportadas por primera vez en el mismo trabajo de construcción de la bacteria transgénica. Para el caso de la enzima KDGK, se estimó el parámetro K_{cat} a partir de datos experimentales y el peso molecular de la enzima (ver Anexo H). Para la enzima DehR se debió considerar el valor promedio de los parámetros de otras enzimas reductasas de ácidos hexurónicos similares al DEHU, pues no hay literatura acerca de la reductasa de DEHU; por ello se escogió las reductasas de ácido ascórbico y de ácido galacturónico. En cuanto a la enzima EDA, los parámetros implementados son promedios de constantes cinéticas de microorganismos que poseen estas enzimas, distintos a *E. coli.*, pues el modelo ya posee la enzima EDA de la bacteria nativa. La velocidad máxima fue calculada a partir de la actividad específica, tal como se muestra en el Anexo I.
- Sistema de etanol heterólogo: las cinéticas de las enzimas empleadas sí fueron encontradas ya que este sistema es recurrentemente utilizado para producción de etanol heteróloga en *Escherichia coli* [62],[63],[64].

Los valores encontrados en bibliografía y el valor final utilizado para cada parámetro se encuentran en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5. Parámetros utilizados para la construcción del modelo de *E. coli* BAL1611.

| Sistema | Enzima | Constante | Valor encontrado | Ref. | Valor promedio |
|----------|--------|-----------|------------------|----------------|----------------|
| Manitol | MtlD | K_m | 0,038 [mM] | [65] | 0,4586 [mM] |
| | | | 0,05 [mM] | [66] | |
| | | | 0,055 [mM] | [67] | |
| | | | 0,15 [mM] | [68] | |
| | | | 2 [mM] | [69] | |
| | | K_{cat} | 0,0019 [1/s] | [70] | - |
| | KDGK | K_m | 1 [mM] | [71] | - |
| | | | K_{cat} | 2.335,87 [1/s] | [71],[72] |
| Alginato | DehR | K_m | 0,019-2,5 [mM] | [73] | 2,451 [mM] |
| | | | 0,175-7,11 [mM] | [74] | |
| | | K_{cat} | 5,26-21,51 [1/s] | [75] | 8,385 [1/s] |
| | | | 0,19-6,88 [1/s] | [76] | |

Continuación Tabla 5 Parámetros utilizados para la construcción del modelo de E. coli BAL1611.

| Sistema | Enzima | Constante | Valor encontrado | Ref. | Valor promedio |
|----------|--------|-------------------|--------------------|------|------------------|
| Alginato | EDA | K_m | 0,039 [mM] | [77] | 0,103 [mM] |
| | | | 0,1 [mM] | [78] | |
| | | | 0,17 [mM] | | |
| | | $V_{m\acute{a}x}$ | 0,008 [mmol/s] | [77] | 0,01425 [mmol/s] |
| | | | 0,0205 [mmol/s] | [78] | |
| Etanol | PDC | K_m | 1,1 [mM] | [79] | - |
| | | K_{cat} | 486 [1/s] | | - |
| | ADHII | V_{m_eth} | 820 [unidad/mg] | [80] | - |
| | | K_{ma_eth} | 110 [μ M] | | - |
| | | K_{mb_eth} | 27.000 [μ M] | | - |
| | | K_{ia_eth} | 140 [μ M] | | - |
| | | V_{m_AcAld} | 11.000 [unidad/mg] | | - |
| | | K_{ma_AcAld} | 12 [μ M] | | - |
| | | K_{mb_AcAld} | 1.300 [μ M] | | - |
| | | K_{ia_AcAld} | 18 [μ M] | | - |

Por otra parte, todas las reacciones de transporte de sustancias entre cada uno de los compartimentos fue descrita como un balance de masa (todo lo que sale de un compartimento debe entrar en otro), utilizando los mismos parámetros que contiene el modelo original para el caso de glucosa (para las entradas de manitol y alginato) y acetato (para las salidas de lactato, formiato, succinato y etanol).

Finalmente, las velocidades enzimáticas en sí y las modificaciones en el sistema de ecuaciones diferenciales del modelo original se encuentran en el Anexo J.

6.1.3. Comprensión del modelo cinético de *E. coli* BAL1611 y búsqueda del problema metabólico para producción de etanol

Una vez construido el modelo de la *E. coli* BAL1611, se procedió a realizar las primeras simulaciones. En ellas se determinó el comportamiento metabólico *in silico* de la *Escherichia coli* cuando se enfrenta a sustratos como manitol o alginato puro, comparado con el de *E. coli* con glucosa. Es importante mencionar que, para este caso, la producción heteróloga de etanol no fue considerada en la simulación.

Los esquemas que describen estos resultados corresponden a la Figura 63 y Figura 64 que se encuentran en el Anexo K. Tal como allí se muestra, la bacteria que solo consume alginato o manitol puro no es capaz de sobrevivir, con un crecimiento 20 y 41 órdenes de magnitud menor al de una *E. coli* estándar (ver Anexo D), respectivamente. Esto también se puede comprobar en la Figura 27, donde se muestra que la bacteria solo es capaz de vivir aproximadamente 28 [s] de simulación, tanto con DEHU como con manitol como sustrato.

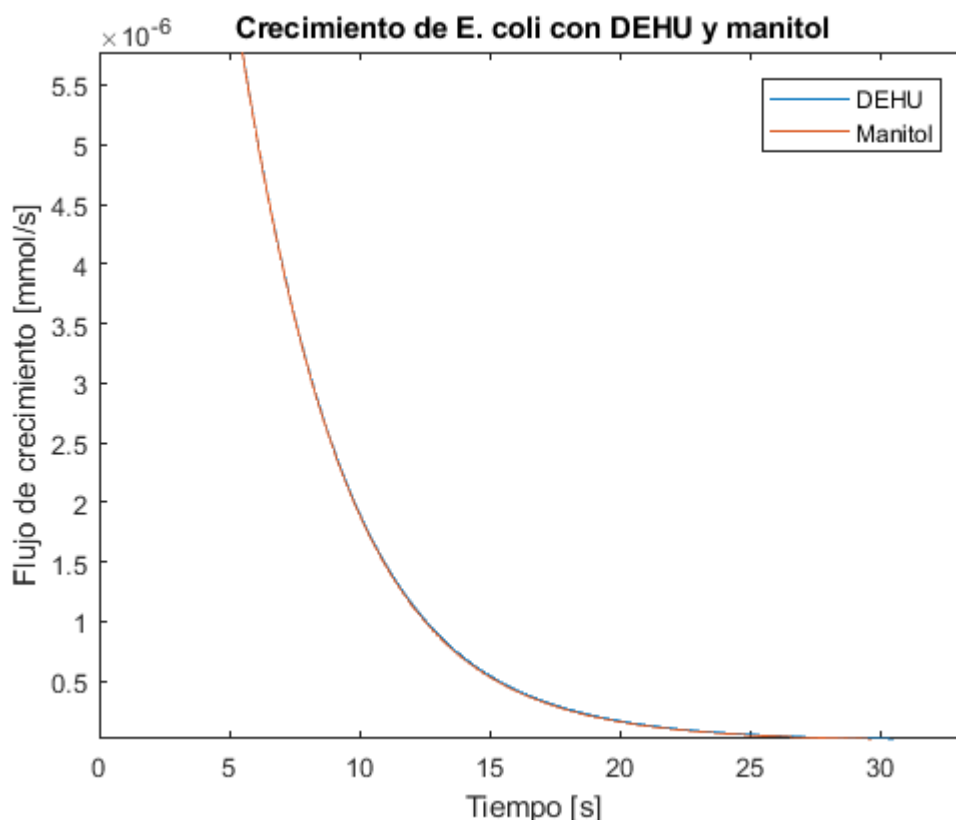


Figura 27. Gráfico que muestra el flujo destinado a crecimiento para las simulaciones de *E. coli* con alginato y manitol puros como sustrato.

Analizando los flujos obtenidos es posible observar que, a pesar de imponer como flujo de entrada para alginato y manitol el mismo que el modelo original considera para glucosa, las enzimas inmediatamente posteriores muestran velocidades muy pequeñas en comparación a las de las demás enzimas del modelo, lo que hace que en realidad los sustratos se acumulen en el medio, tal como muestra la Figura 28. Por esta razón se decide que, para estudiar efectivamente el comportamiento del sistema frente al consumo

de los azúcares de la *M. pyrifera*, se considerarán flujos de entrada constantes hacia metabolitos internos de la bacteria. De esta forma, en las simulaciones siguientes se consideró para DEHU el flujo de entrada directo a KDGP y para manitol a F6P. La concentración inicial mayor que alcanzan cada uno de los sustratos, y la suma de ellos en los casos donde hay presencia de ambos, es la que el modelo consideraba originalmente para glucosa: 0,23 [mmol/L]; se impone este valor debido a que los flujos obtenidos se comparan con el caso original con glucosa, en busca de las diferencias metabólicas que puedan estar causando la menor producción de etanol en la bacteria.

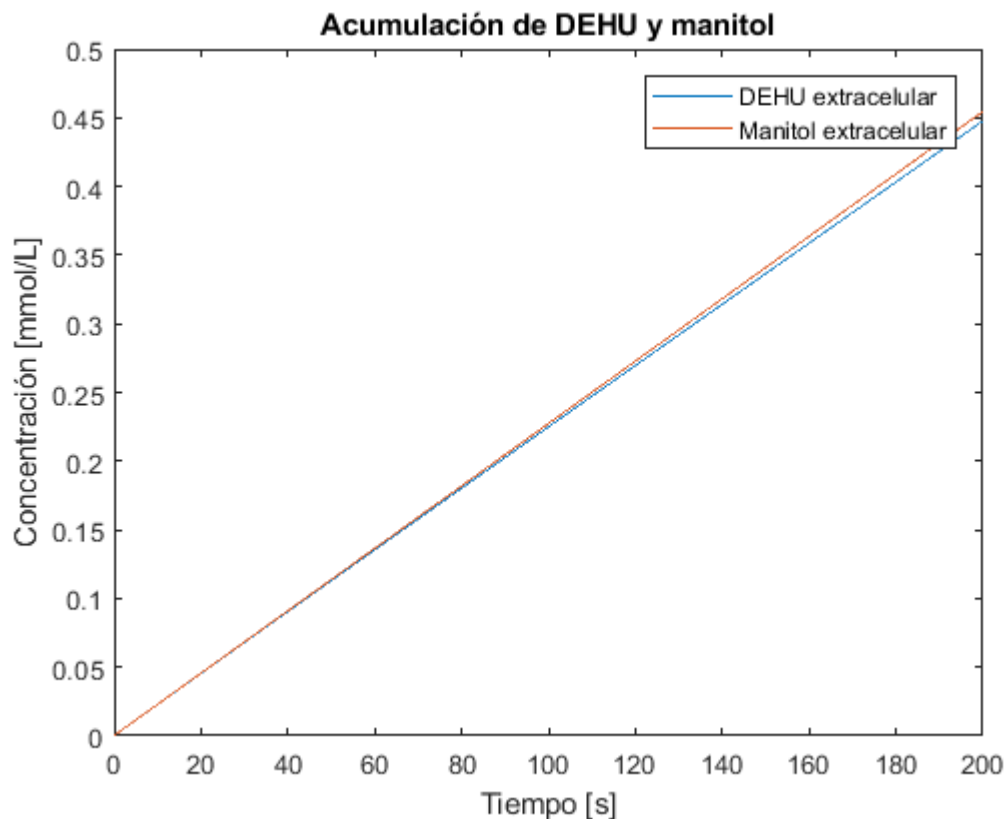


Figura 28. Acumulación de DEHU y manitol en el extracelular, para las simulaciones de *E. coli* con alginato y manitol puros como sustrato.

De esta forma, se procedió a realizar diversas comparaciones entre las simulaciones, en busca del problema que genera la baja producción de etanol. Por ello, se analizó a la *E. coli* sin producción de etanol con diferentes sustratos; se comparó a la BAL1611 con respecto a la *E. coli* nativa con glucosa, DEHU o manitol como sustrato; se comparó a la BAL1611 con distintas proporciones de DEHU:manitol con respecto a *E. coli* nativa; y se comparó a la BAL1611 con distintas proporciones de DEHU:manitol con respecto a la BAL1611 con glucosa, para una misma producción de etanol. Cabe mencionar que todos estos resultados corresponden al sistema sin uso de NADH por parte de la ruta de alginato, mientras que la ruta de manitol sí está provocando variaciones en el poder reductor porque la enzima MtlD afecta la concentración de NADH según las EDOs. Por ello, posteriormente se deberá reincorporar la enzima DehR que es la que utiliza poder reductor para llevar a cabo la reacción de degradación de DEHU.

6.1.3.1. Comparación de la BAL1611 con respecto a la *E. coli* nativa, con glucosa como sustrato

Para esta comparación, la simulación de *Escherichia coli* nativa es considerada como el caso base para evaluar los resultados de la simulación de la *E. coli* BAL1611 con glucosa como sustrato. El esquema que muestra el resultado de las simulaciones corresponde a la Figura 65 del Anexo K.

En cuanto a la glicólisis, se observan flujos mayores que en el caso base, entre 1,05 y 1,2 veces. El TCA presenta menores flujos que en el caso base, y la producción de glioxilato con respecto a AKG es 1:1. Las reacciones anapleróticas están en el sentido correcto, propiciando la generación de PEP (con un flujo menor) y produciendo PYR con un flujo mayor al caso base. En el ciclo de las pentosas los flujos van desde 0,75 a 1,6 veces con respecto al caso base, mientras que para ED se observan los mismos flujos. Hay bastante menos producción de acetato (0,18 del caso base). Tanto el crecimiento, fosforilación oxidativa, ATPasa y disponibilidad energética con flujos menores al caso base. El flujo de balance de poder reductor está en sentido contrario al caso base (flujo del doble, en valor absoluto), lo que indica que la producción de etanol invierte el flujo del balance *redox*.

Todo lo descrito anteriormente podría explicarse debido a la producción de etanol, que requiere procesar mayor cantidad de sustrato por la demanda hacia la generación de producto de 6,3 veces más que el flujo de etanol basal de *E. coli*, lo que corresponde a un flujo de 0,2198 [mmol/s].

6.1.3.2. Comparación de la BAL1611 con respecto a *E. coli* sin etanol, con DEHU como sustrato

Para esta comparación, la simulación de *Escherichia coli* sin producción de etanol (pero con las rutas de degradación de alginato) es considerada como el caso base para evaluar los resultados de la simulación de la *E. coli* BAL1611 con DEHU como sustrato. El esquema que muestra el resultado de las simulaciones corresponde a la Figura 66 del Anexo K.

En cuanto a la glicólisis, se observa el flujo G6P-F6P invertido en ambos casos y 100 veces menor para BAL1611; flujos iguales desde GAP hasta PEP, donde nuevamente disminuyen para ambos casos (10^{-3} y 10^{-5} para BAL1611). Esto puede atribuirse al lugar de la ruta metabólica donde entra el DEHU, ya que debe devolverse para completar el ciclo de las pentosas y las primeras etapas de glicólisis, además de la gran entrada directa en PYR por la degradación de KDPG. De todas formas, para el caso de la BAL1611, el flujo luego a ACCOA no alcanza el valor del caso base de la BAL1611 sin etanol.

El TCA presenta menores flujos que en el caso base, y la producción de glioxilato con respecto a AKG es 1:16. Las reacciones anapleróticas están en el sentido contrario, propiciando producción de OAA en ambos casos; producción de PYR con un flujo menor cuando hay producción de etanol. El comportamiento descrito podría ser una particularidad que ocurre por el aumento de producción de PYR desde ED.

En el ciclo de las pentosas los flujos van desde 0,02 a 0,13 veces con respecto al caso base (el caso base ya tiene valores menores al caso con glucosa), mientras que para ED se observa el flujo 6PG-KDPG invertido en ambos casos. No hay crecimiento cuando se debe producir etanol (baja concentración de metabolitos), mientras que la célula sin etanol tiene un crecimiento 4 órdenes menor al caso con glucosa. Esto indica que el alginato por sí solo estaría siendo un sustrato con menor rendimiento de biomasa que la glucosa.

Fosforilación oxidativa con flujos menores al caso base (sin etanol flujos a la mitad del caso con glucosa) y último citocromo con flujo invertido cuando se produce etanol; ATPasa consumiendo ATP para el caso de producción de etanol. La disponibilidad energética está orientada netamente a la generación de ATP. El balance de poder reductor está en el mismo sentido en ambos casos, aunque con un flujo 0,02 veces menor. Estos resultados estarían dando indicios de problemas con la disponibilidad energética y el balance del poder redox internos.

En este caso, 0,23 [mmol/s] de DEHU produce 0,1534 [mmol/s] de etanol en la BAL1611, lo que equivale a 0,7 del obtenido con glucosa como sustrato. Además, es una producción aparente, ya que en realidad la célula no crece (flujo a crecimiento 13 órdenes de magnitud menor al de una *E. coli* estándar (Anexo D)).

6.1.3.3. Comparación de la BAL1611 con respecto a *E. coli* sin etanol, con manitol como sustrato

Para esta comparación, la simulación de *Escherichia coli* sin producción de etanol (pero con las rutas de degradación de manitol) es considerada como el caso base para evaluar los resultados de la simulación de la *E. coli* BAL1611 con manitol como sustrato. El esquema que muestra el resultado de las simulaciones corresponde a la Figura 67 del Anexo K.

En cuanto a la glicólisis, se observa el flujo G6P-F6P invertido en ambos casos y aunque de igual magnitud; flujos levemente mayores desde F6P hasta PEP para el caso de la *E. coli* BAL1611 (0,06 mayores que el caso de *E. coli* sin producción de etanol). Esto puede atribuirse a que las enzimas de producción de etanol que se encuentran río abajo influyen en que mayor flujo se redireccione en ese sentido. De todas formas, para el caso de la BAL1611, el flujo luego a ACCOA no alcanza el valor del caso base de la *E. coli* sin etanol.

El TCA presenta menores flujos que en el caso base (aprox. 0,7), y la producción de glioxilato con respecto a AKG es 41:50. Las reacciones anapleróticas están en el mismo sentido que el caso base, con un flujo neto cercano a cero entre PEP-OAA.

En el ciclo de las pentosas y ED, los flujos son similares al caso base. El crecimiento se reduce a la mitad cuando se debe producir etanol, mientras que la célula sin etanol tiene un crecimiento mayor al caso con glucosa (0,22 mayor). Esto indica que el manitol por sí solo es un sustrato con mayor rendimiento de biomasa que la glucosa.

Fosforilación oxidativa y ATPasa con flujos menores al caso base (0,81). La disponibilidad energética es similar en ambos casos. El balance de poder reductor está en sentido contrario al caso base (flujo del 0,85 en valor absoluto).

En este caso, 0,23 [mmol/s] de manitol produce 0,1995 [mmol/s] de etanol en la *E. coli* BAL1611, lo que equivale a 0,91 del obtenido con glucosa como sustrato.

6.1.3.4. Comparación de la BAL1611 con distintas proporciones de DEHU:manitol, con respecto a *E. coli* nativa

Para esta comparación, la simulación de *Escherichia coli* nativa es considerada como el caso base para evaluar los resultados de la simulación de la *E. coli* BAL1611 con distintas mezclas de DEHU:manitol como sustrato. Los esquemas que muestran el resultado de las simulaciones van desde la Figura 68 a la Figura 73 del Anexo K.

En cuanto a glicólisis, para todas las proporciones de alginato y manitol que son administradas como sustrato, se observa que el flujo de G6P a F6P se encuentra invertido (produciendo G6P) y con un valor menor al del flujo original con glucosa. El valor más alto de este flujo se presenta para manitol puro, y llega solo a la mitad del flujo en el caso base. Esto puede explicarse debido a que la entrada de manitol se encuentra precisamente en uno de los metabolitos involucrados en esta reacción (F6P), por lo que a mayor concentración de F6P hay mayor flujo para repletar G6P y la ruta de las pentosas.

Por otro lado, los demás flujos de glicólisis van aumentando su flujo a medida que hay más concentración de manitol en el sustrato inicial, llegando al 0,99 del caso base para manitol puro. En particular, la enzima PFK (F6P a FBP) es la que posee un mayor flujo a medida que aumenta el suministro de manitol, y es gracias a esto que se logra equiparar el valor al flujo del caso base para el sistema con manitol puro. Es debido a esta observación que se presume que sobreexpresar la enzima PFK podría ayudar a mejorar la producción de etanol.

En cuanto a los flujos entre PEP y PYR, a medida que hay más concentración de alginato el flujo de la enzima PYK desaparece, haciendo que en vez del camino descrito por el caso base PEP-PYR el flujo recorra el camino PEP-OAA-MAL-PYR. La enzima involucrada en este flujo es inhibida en grandes concentraciones de ATP, Pi y SUCCOA. Sin embargo, las concentraciones en estado estacionario de estas moléculas para el sistema con alginato puro son 0,08, 0,09 y 0,003 del caso base, respectivamente, por lo que se descarta una posible inhibición por concentración. De la misma forma, las concentraciones de PEP, PYR y MgATP también son menores, correspondientes al 0,3, 0,4 y 0,84 de los valores en la bacteria nativa, lo que podría explicar por qué el flujo desaparece.

Finalmente para glicólisis, cabe destacar que a medida que hay mayor suministro de manitol existe un mayor flujo de producción de ACCOA para la BAL1611, gracias al flujo aportado por la enzima heteróloga del sistema de etanol incorporada en esa ruta. De hecho, para la proporción del sustrato que posee la *S. japónica* y para concentraciones de manitol mayores, el flujo es el mismo que para el caso base de la *E. coli* nativa. Esto también se explica por el flujo de la enzima PFK gracias la entrada de manitol a F6P.

En cuanto al TCA, los datos muestran que los flujos presentes en él poseen mayores valores para el caso que simula las proporciones de la *S. japónica* que para las demás mezclas de azúcares, correspondientes a 0,6 veces los flujos del caso base. Esto se debe a que, a pesar de que hay mayor flujo hacia ACCOA, se destina también más flujo hacia la producción de etanol.

A medida que hay mayor concentración de manitol en el sustrato, se observa un mayor flujo hacia producción de glioxilato, hasta la proporción correspondiente a *S. japónica*. A partir de ese punto, al aumentar el manitol se observa que se destina menor flujo hacia glioxilato. De hecho, la proporción de GLX/AKG observada para *S. japónica* es la misma que se observa en el caso base.

Como ya se mencionó antes, para los casos con mayor proporción de alginato se observa que las reacciones anapleróticas están favoreciendo la producción de OAA, para luego generar MAL, y a partir de él producir PYR. Esta situación ocurre para alginato puro y para la proporción correspondiente a *M. pyriferá*, mientras que a partir de ese punto se restablece la producción de PEP mediante las reacciones anapleróticas, aumentando el flujo neto a medida que aumente la proporción de manitol, hasta llegar al caso de manitol puro donde se observa un 0,17 del flujo del caso base. Por otra parte, la producción de piruvato a partir de malato va decreciendo a medida que aumenta la proporción de manitol. Esto se explica ya que el flujo de producción de MAL (y por consiguiente OAA) tiene un *peak* en la proporción correspondiente a *S. japonica*, disminuyendo considerablemente para el caso de manitol puro, alcanzando un valor similar (aunque levemente mayor) al de *M. pyriferá*. Esto mismo podría explicar la necesidad de la ruta de cambiar el flujo original de PEP-PYR por PEP-OAA-MAL-PYR.

En cuanto a la ruta de las pentosas, el valor de los flujos es bastante variable. Para mayores concentraciones de alginato se observa que los flujos son menores al caso base; luego se observa que a mayor manitol algunos flujos alcanzan valores del doble del caso base, intentando llevar mayor flujo hacia glicólisis, sin embargo, el caso de 3:10 de DEHU:manitol se sale de la tendencia, teniendo valores a lo más similares al caso base.

Para la ruta de ED, se observa que el flujo de KDPG a PYR y GAP se mantiene cercano al valor de 0,077 mmol/s para el rango de entrada de DEHU desde 0,23-0,088 mmol/s (correspondientes a las proporciones 1:0 hasta 5:8), lo que hace suponer que esta enzima (EDA) podría estar saturada. De hecho, si se analizan las concentraciones de los metabolitos implicados y se comparan con sus Km respectivos en la cinética enzimática, se puede observar que efectivamente hay una saturación de la enzima EDA por concentración de KDPG para las proporciones 1:0 hasta 5:8.

La producción de acetato en la mayor parte de los casos presenta un ciclo fútil entre ACCOA-ACE-ACP, ya que los flujos entre ellos son iguales para cada simulación. El único caso donde los flujos son diferentes entre ellos es para alginato puro, donde las bajas concentraciones de metabolitos internos en general hacen necesaria la entrada de acetato desde el medio externo. Además, en todos los casos los flujos son menores al caso base. Por ello, la eliminación del sistema de producción de acetato podría ser evaluado con el fin de destinar mayor flujo de ACCOA a la producción de etanol.

En cuanto a la generación de etanol, se produce entre 3 y 5,9 veces lo que se genera como etanol basal en la *E. coli* nativa. La menor producción está dada para la condición de la *M. pyriferá* (menor incluso que para alginato puro), mientras que la más alta se da para la proporción 3:10. En todos los casos la producción de etanol se debe casi totalmente al sistema heterólogo incorporado en la BAL1611.

Para el caso de alginato puro no se observa crecimiento de la BAL1611, lo que puede ser explicado debido a las bajas concentraciones de todos los metabolitos involucrados

en éste. De hecho, si se analizan los valores de los parámetros involucrados en la ecuación de crecimiento (ver Tabla 25 en Anexo L), se observa que 10 de los 14 metabolitos tienen un cambio porcentual mayor al 90% con respecto a la bacteria nativa con glucosa y, en particular, los que más variación generan en la ecuación de crecimiento son OAA, G6P, F6P, AKG, y R5P (en dicho orden), metabolitos de TCA, glicólisis y ruta de las pentosas. También es interesante observar que el valor del parámetro para ACCOA y para NAD es mayor para DEHU, y eso es porque la concentración de estos metabolitos es mayor para este sistema que para el caso base.

Para los demás casos el crecimiento es solo de un orden menor o del mismo orden del caso base. Para la *S. japónica*, el crecimiento es de la mitad del caso base, mientras que para *M. pyrifer* es un orden menor. Cabe destacar que una *E. coli* estándar puede tener un crecimiento de hasta 5 órdenes de magnitud menor al que se obtiene con el modelo para el caso base (ver Anexo D).

En cuanto a la fosforilación oxidativa y ATPasa, se observa que a medida que hay mayor presencia de manitol en el sustrato, hay mayores flujos en la cadena transportadora de electrones y en la ATPasa. De hecho, para manitol puro, algunos valores de la fosforilación oxidativa llegan a 0,9 y la ATPasa a 0,82 del caso base.

Con respecto a la disponibilidad energética, a medida que aumenta el manitol en el sustrato se observa que los flujos hacia AMP y cAMP se hacen mayores al caso base, mientras que hacia sustratos con mayor alginato los flujos son siempre menores al caso base, y propician la generación de ATP. Por otra parte, el balance de poder reductor muestra que el flujo está propiciando la producción de NADH y NADP, en sentido contrario con respecto al caso base, acercándose cada vez más a éste a medida que hay más manitol en el sustrato.

Cabe mencionar además que en ninguna de estas proporciones de DEHU:manitol se obtiene mayor producción de etanol que para el caso con glucosa, tal como se puede ver en la Figura 29.

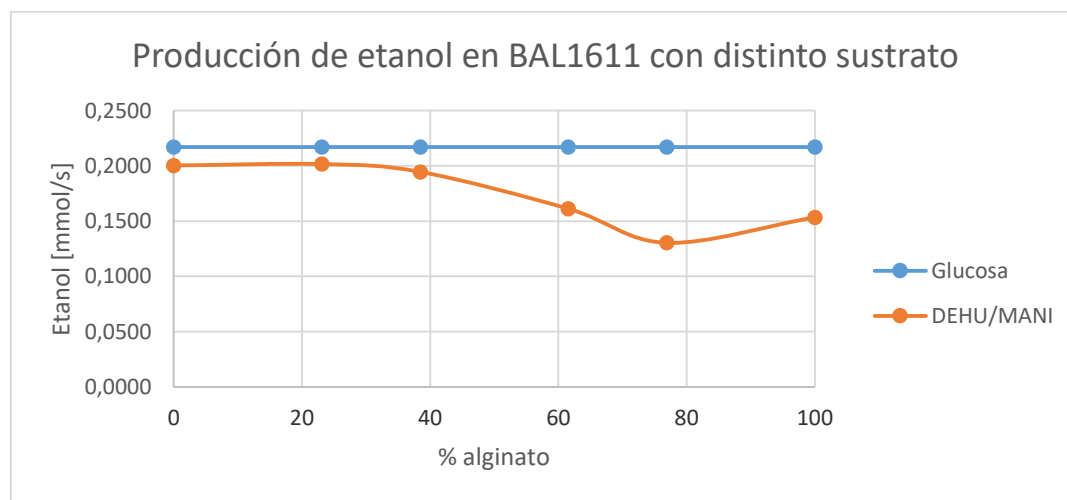


Figura 29. Comparación de la producción de etanol en BAL1611 con glucosa versus diferentes proporciones de alginato y manitol.

También es interesante comparar los rendimientos de biomasa y producto obtenidos en esta simulación con los que se obtuvo experimentalmente (Figura 5 y Figura 6). Para el

caso del rendimiento de producto se obtienen los resultados expuestos en la Figura 30, donde se puede ver que, al menos cualitativamente, la curva se asemeja a la obtenida experimentalmente.

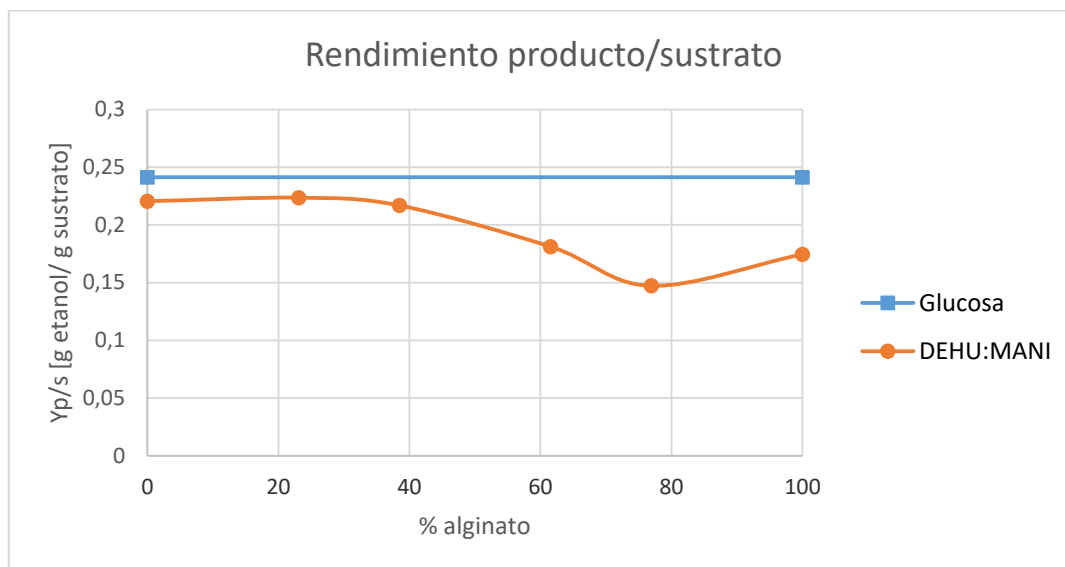


Figura 30. Rendimiento de producto versus sustrato para las distintas proporciones de DEHU/manitol.

Sin embargo, el rendimiento de biomasa de las simulaciones no es comparable al obtenido experimentalmente, debido a que el modelo define el crecimiento como el aumento de moles de una única célula, mientras que experimentalmente el crecimiento que se mide es el del cultivo celular. De todas formas, en la Figura 31 se puede ver que el rendimiento de biomasa es aumenta a medida que hay mayor cantidad de manitol en el sustrato, y que con alginato puro no hay crecimiento. Se realizó entonces un balance de moles para comparar la distribución de moles de carbono destinados a crecimiento, producto, mantenimiento y salidas, tal como se muestra en la Tabla 6. De este análisis se desprende que en cuanto a moles de carbono, los mejores sustratos son aquellos con mayor concentración de manitol, ya que muestran mayores rendimientos de producto y biomasa, y menores flujos de carbono destinados a mantenimiento.

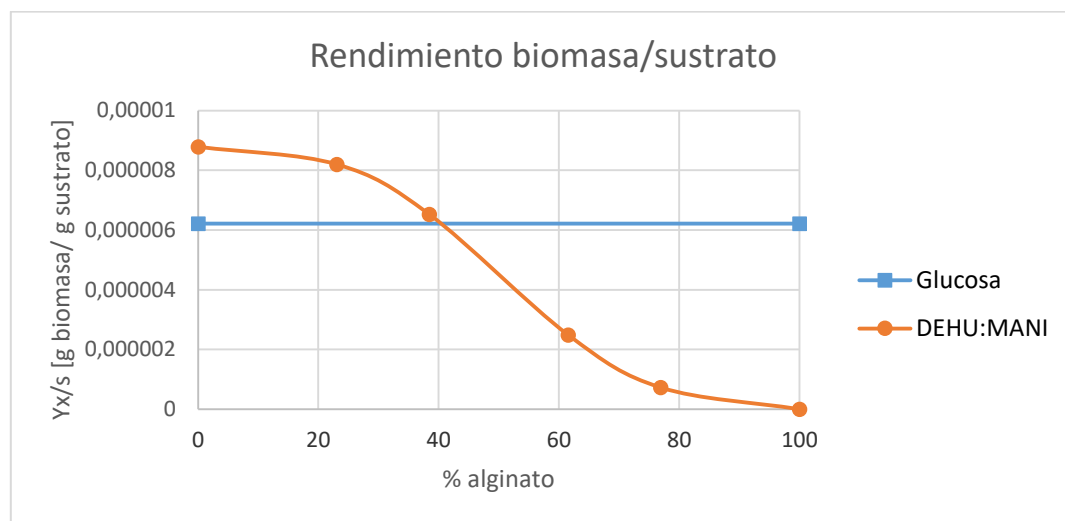


Figura 31. Rendimiento de biomasa versus sustrato para las distintas proporciones de DEHU/manitol.

Tabla 6. Distribución de carbono en cada célula, según sustrato administrado.

| DEHU:MANI:GLC | Y _{P/S} | Y _{X/S} | Manten./sust. | Salida/sust. | Total |
|--------------------------------|------------------|------------------|---------------|--------------|-------|
| 0:0:1 (<i>E. coli</i> nativa) | 5% | 42% | 52% | 2% | 100% |
| 1:0:0 | 22% | 0% | 78% | 0% | 100% |
| 10:3:0 (<i>M. pyrifera</i>) | 19% | 2% | 78% | 1% | 100% |
| 8:5:0 | 23% | 7% | 69% | 1% | 100% |
| 5:8:0 (<i>S. japonica</i>) | 28% | 18% | 53% | 1% | 100% |
| 3:10:0 | 29% | 23% | 47% | 1% | 100% |
| 0:0:1 | 29% | 25% | 45% | 1% | 100% |

6.1.3.5. Comparación de la BAL1611 con distintas proporciones de DEHU:manitol, con respecto a la BAL1611 con glucosa (producción de etanol fija)

Para esta comparación, se consideró la misma producción de etanol en ambos casos, por lo que la concentración de glucosa inicial se calculó a partir de dicha restricción para cada una de las proporciones DEHU:manitol. La simulación de *Escherichia coli* BAL1611 con glucosa como sustrato es utilizada como caso base para evaluar los resultados de la simulación de la *E. coli* BAL1611 con distintas mezclas de DEHU:manitol como sustrato. Los esquemas que muestran el resultado de las simulaciones van desde la Figura 74 a la Figura 79 del Anexo K.

Comenzando por la glicólisis, las simulaciones muestran que el flujo entre G6P y F6P se encuentra invertido con respecto al caso con glucosa, y que a medida que aumenta la concentración de manitol en el sustrato hay mayores flujos a lo largo de esta ruta; incluso, para manitol puro los flujos son mayores al caso de la BAL1611 con glucosa, para la misma producción de etanol. Al igual que en casos anteriores, cuando hay solo alginato se observa que el paso de PEP a PYR se corta, sin embargo, para combinaciones DEHU:manitol se observa un flujo mayor al caso con glucosa respectivo a cada uno, e incluso para manitol puro este flujo es del doble. El flujo hacia ACCOA es similar al caso base en cada caso, excepto por el de alginato puro donde corresponde aproximadamente a la mitad de su caso base respectivo.

Analizando el TCA se observa que el caso de *M. pyrifera* es el que muestra flujos iguales al caso base correspondiente (BAL1611 con glucosa para la misma producción de etanol), mientras que a medida que aumenta la concentración de manitol en el sustrato los flujos se van haciendo menores al caso base correspondiente a cada uno. De todas maneras, a medida que aumenta la concentración de manitol en el sustrato, la proporción en que se reparte el ACCOA para TCA versus etanol se va haciendo más grande, por lo que simplemente la tendencia observada indica que para producir el mismo etanol que con glucosa, queda disponible menor cantidad de ACCOA para TCA.

La distribución de flujo hacia GLX versus AKG es siempre menor para cada caso probado, con respecto a su caso base correspondiente, lo que indica que para producir el mismo etanol, con glucosa se genera más GLX que con DEHU:manitol. Las reacciones anapleróticas con glucosa como sustrato siempre propician la producción de PEP y PYR, lo que no ocurre para los casos donde hay mayor concentración de DEHU en el sustrato. Esto corrobora la idea de que la entrada en PYR desde DEHU es la que modifica los

flujos de estas vías, haciendo que se corte el flujo PEP-PYR. La producción de PYR a partir de MAL se va haciendo menor cuanto más manitol hay en el sustrato, mientras que el flujo de producción de PEP observa un *peak* en el caso 8:5 (DEHU:manitol).

Para las pentosas, se observa que a medida que hay más manitol en el sustrato hay mayores flujos dentro del ciclo, comparado con su respectivo caso con glucosa. Esto puede deberse a que la entrada de manitol es a F6P en vez de la entrada de glucosa a G6P, lo que podría indicar la saturación de las enzimas que degradan F6P, en particular la PFK. Si bien no se observa saturación de la enzima, el flujo asociado a ella es siempre menor al caso con glucosa, lo que podría deberse a que destina mayor flujo hacia repletar la vía de las pentosas que hacia glicólisis. En cuanto a ED se sigue observando la saturación de la enzima EDA, y además para sustratos con más alginato el flujo de 6PG a KDPG está invertido debido a la mayor entrada de sustrato directo a KDPG. Para los casos con más manitol estos flujos vuelven a su sentido correcto aunque con valores menores, excepto para el caso de manitol puro donde se los flujos de ED son 1,5 veces los de glucosa, a pesar de no haber alginato que ingrese en la vía. Esto puede explicarse debido a que PFK alcanza el mismo valor que para el caso de glucosa, por lo que el resto de manitol se distribuye entre el ciclo de las pentosas y ED, lo que podría indicar una eventual saturación.

En cuanto a la producción de acetato, para el caso de alginato puro se observa que hay consumo de acetato desde el medio, mientras que su caso base respectivo produce acetato en bajas concentraciones. Para el caso de *M. pyrifer*a se observa consumo de acetato desde el medio tanto con DEHU:manitol como con glucosa. A medida que aumenta la concentración de manitol en el sustrato se observan flujos mayores a los del caso base respectivo para cada uno, lo que podría indicar que se está utilizando más ACCOA en este sistema que podría ser mejor utilizado en TCA o para producir etanol. Sin embargo, habría que estudiar qué sucede al eliminar esta vía para el caso de *M. pyrifer*a, ya que incluso con glucosa es necesaria la absorción de acetato desde el medio para producir el mismo etanol que con DEHU:manitol.

Observando el crecimiento, se obtiene que para alginato puro nuevamente no hay crecimiento, mientras que su caso base correspondiente es tan solo 0,13 del caso de la *E. coli* nativa con glucosa. Para *M. pyrifer*a el flujo del caso base es aún menor, aunque sí hay crecimiento tanto para DEHU:manitol como glucosa de sustrato. A partir de allí, al aumentar el manitol se observa un *peak* para el caso de 3:10 (DEHU:manitol), llegando el caso base tan solo al 0,34 de la *E. coli* nativa. Sin embargo, las simulaciones con mezclas entre DEHU:manitol poseen mejores crecimientos que sus casos bases respectivos con glucosa. Esto indica que, a pesar de la producción de etanol, con mayor manitol en el sustrato se obtiene un mejor crecimiento.

En cuanto a la fosforilación oxidativa y ATPasa, se observa que a medida que hay más manitol en el sustrato los flujos se hacen mayores al caso base con glucosa correspondiente, siendo el caso de *M. pyrifer*a en el cual se igualan los flujos a su caso base respectivo. Esto estaría indicando que se requiere igual o mayor energía para los procesos con DEHU:manitol que para el mismo proceso con glucosa.

Con respecto a la disponibilidad energética, para el caso de alginato puro se requiere generar mayor ATP por estas vías, por lo que hay un flujo invertido para mejorar su síntesis. Para los casos siguientes los flujos en este sistema son similares a su caso base

respectivo, lo que indica que no habría mayor esfuerzo por generar energía extra para la producción de etanol. En cuanto al balance de poder reductor, todos los flujos se encuentran en el mismo sentido (hacia producción de NADH y NADP), y se observa que para el caso de 8:5 (DEHU:manitol) hay flujo levemente mayor al caso base asociado. Esto podría indicar que, a medida que hay más manitol en el medio, se requiere menor esfuerzo de balance de poder reductor en la célula, asemejándose más al caso de la *E. coli* nativa, donde este flujo se encuentra invertido.

Finalmente, es posible observar que para producir el mismo etanol que se produce con las concentraciones de *M. pyrifer* se requiere menor glucosa que para los demás casos. Luego le sigue la producción de etanol desde alginato puro, y posteriormente en orden según aumenta la concentración de manitol en el sustrato.

6.1.4. Análisis de propuestas de mejora para producción de etanol en *E. coli* BAL1611

6.1.4.1. Sobreexpresión de la enzima que degrada KDPG (EDA)

Como se discutió anteriormente, la vía de degradación de alginato presenta una saturación en una de sus enzimas, en particular, la encargada de degradar KDPG en PYR y GAP en la ruta de Entner Doudoroff. Este paso es uno de los primeros en la vía del alginato, y provoca que para flujos mayores a 0,088 mmol/s de DEHU el sustrato se acumule, manteniendo siempre un flujo de 0,077 mmol/s para esa enzima.

Por esto, una de las soluciones propuestas es mejorar la velocidad enzimática en este paso, en particular, sobreexpresando la enzima. La disminución en la afinidad puede ser una alternativa, sin embargo, su aplicabilidad posterior es más compleja pues requiere de ingeniería de proteínas para cambiar las propiedades de los aminoácidos del sitio activo. Es por esto que el aumento de la velocidad máxima de la enzima resulta la alternativa más llamativa a testear. De esta forma, se probó aumentando dicho parámetro enzimático 2 y 10 veces con respecto al que poseía el modelo original, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 32 y Figura 33.

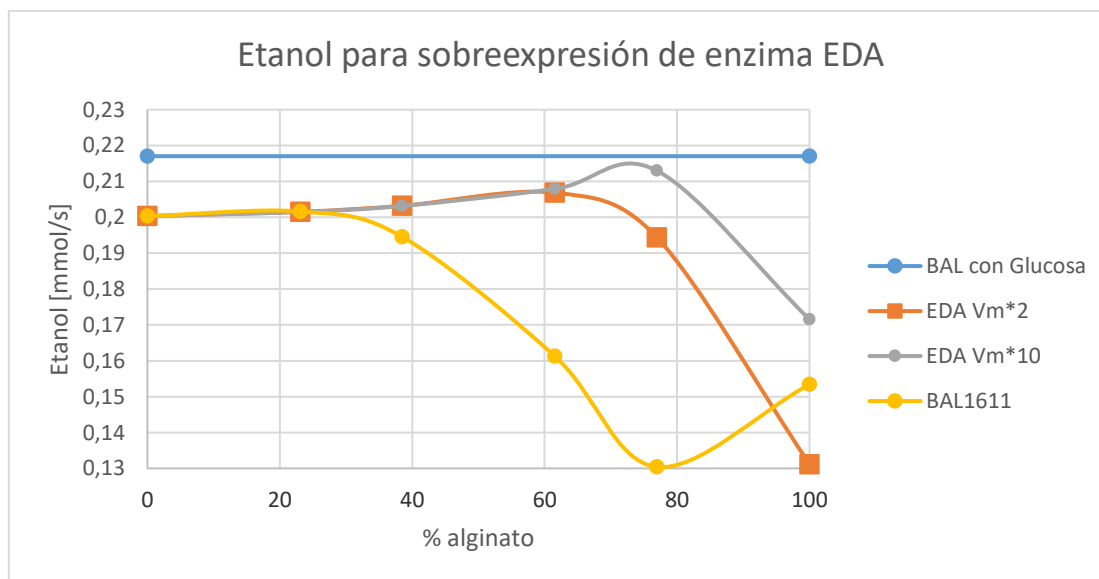


Figura 32. Comparación de producción de etanol con la sobreexpresión de la enzima EDA, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol.

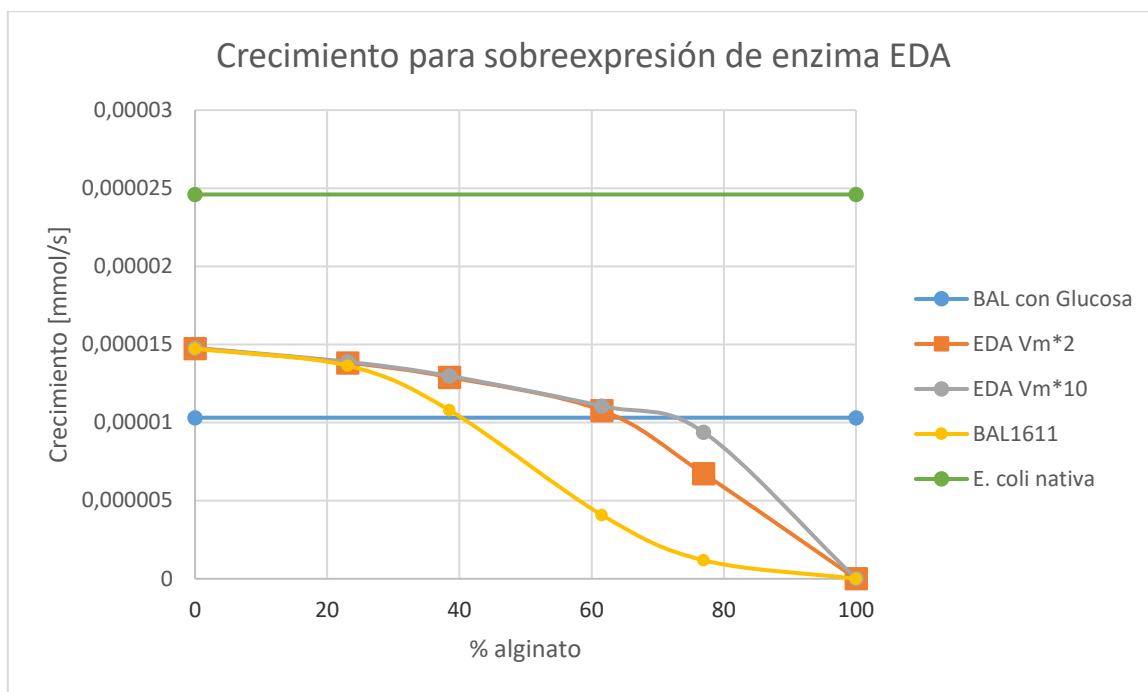


Figura 33. Comparación del crecimiento de la BAL1611 con sobreexpresión de la enzima EDA, con respecto a *E. coli* nativa y a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol.

Comparando la producción de etanol para los distintos escenarios (ver Figura 32), rápidamente se puede observar que tanto para el doble como para 10 veces el valor de la velocidad enzimática de EDA, la producción de etanol para la proporción de *M. pyrifer* se mejora. En el caso del doble de la velocidad enzimática, la producción de etanol mejora en un 50%, siendo comparable a la que se obtiene con *S. japonica* para la BAL1611 original (0,96 de ésta), mientras que para 10 veces la velocidad, la producción de etanol se acerca a la producción de etanol para la BAL1611 con glucosa como sustrato (0,98 del caso con glucosa). También es importante destacar que la sobreexpresión de la enzima no afecta la producción de etanol en presencia de mayor concentración de manitol, sino que las mantiene o incluso las mejora, como para el caso de *S. japonica* donde se obtiene 1,04 veces el valor del caso de la BAL1611 original. Además, resulta interesante mencionar que para el doble de la velocidad la producción de etanol es menor en alginato puro, aunque para 10 veces la velocidad se obtiene mayor flujo de etanol que el caso de la BAL1611 original en dichas condiciones.

Por otra parte, cuando se analiza el crecimiento de la bacteria (ver Figura 33), se observa que existe una diferencia entre las simulaciones con sobreexpresión de la enzima y la de la BAL1611 original, donde se puede apreciar que para los casos con mayor proporción de alginato en el sustrato se obtiene mejores crecimientos, incluso cercanos o mayores al valor de crecimiento para la BAL1611 con glucosa. En particular, para la proporción de *M. pyrifer* se aprecia que el crecimiento mejora en un 566%, con respecto a la *E. coli* BAL1611 original. Se observa de todas formas que con alginato puro el crecimiento es muy bajo, aunque para el caso con la sobreexpresión no llega a ser cero como para la BAL1611 original (10^{-8} versus 10^{-23}). Además, tal como era de esperarse, se aprecia que ninguna configuración logra acercarse al crecimiento de la *E. coli* nativa, llegando como máximo a 0,6 de éste.

Si finalmente se compara la distribución de moles de carbono dentro de la célula, se puede observar en la Tabla 7 que el porcentaje de carbono destinado a producto es casi igual para los casos de *M. pyrifer* y *S. japonica*. Además, el porcentaje destinado a mantenimiento siga mostrando la tendencia de disminuir a medida que hay más manitol en el sustrato, lo que fundamenta el hecho de que el porcentaje destinado a crecimiento para *M. pyrifer* es de la mitad del de *S. japonica*. En otras palabras, la bacteria requiere más carbono para mantenerse y para producción de etanol que la nativa, lo que implica en una disminución de su crecimiento. Por otra parte, en la Tabla 8 se observa que al sobreexpresar *in silico* 10 veces la enzima EDA, se obtiene un porcentaje de carbono levemente mayor destinado a producto, el porcentaje a mantenimiento es igual que para el caso nativo y se mejora el porcentaje destinado a crecimiento.

Tabla 7. Distribución de carbono en cada célula, según sustrato administrado, para el caso del doble de la velocidad máxima de la enzima EDA.

| DEHU:MANI:GLC | Y _{P/S} | Y _{X/S} | Manten./sust. | Salida/sust. | Total |
|--------------------------------|------------------|------------------|---------------|--------------|-------|
| 0:0:1 (<i>E. coli</i> nativa) | 5% | 42% | 52% | 2% | 100% |
| 1:0:0 | 19% | 0% | 80% | 1% | 100% |
| 10:3:0 (<i>M. pyrifer</i>) | 28% | 11% | 59% | 1% | 100% |
| 8:5:0 | 30% | 18% | 51% | 1% | 100% |
| 5:8:0 (<i>S. japonica</i>) | 29% | 22% | 48% | 1% | 100% |
| 3:10:0 | 29% | 23% | 47% | 1% | 100% |
| 0:0:1 | 29% | 25% | 45% | 1% | 100% |

Tabla 8. Distribución de carbono en cada célula, según sustrato administrado, para el caso de 10 veces la velocidad máxima de la enzima EDA.

| DEHU:MANI:GLC | Y _{P/S} | Y _{X/S} | Manten./sust. | Salida/sust. | Total |
|--------------------------------|------------------|------------------|---------------|--------------|-------|
| 0:0:1 (<i>E. coli</i> nativa) | 5% | 42% | 52% | 2% | 100% |
| 1:0:0 | 25% | 0% | 74% | 1% | 100% |
| 10:3:0 (<i>M. pyrifer</i>) | 31% | 16% | 52% | 1% | 100% |
| 8:5:0 | 30% | 19% | 50% | 1% | 100% |
| 5:8:0 (<i>S. japonica</i>) | 29% | 22% | 48% | 1% | 100% |
| 3:10:0 | 29% | 24% | 46% | 1% | 100% |
| 0:0:1 | 29% | 25% | 45% | 1% | 100% |

De este análisis se puede desprender que, mediante la predicción del modelo, la sobreexpresión de la enzima EDA ayudaría a mejorar notablemente la producción de etanol y el crecimiento de la BAL1611, por lo que resulta una de las alternativas más llamativas para probar en laboratorio.

Además, para los sistemas mejorados con esta sobreexpresión enzimática, se observa que existe secreción de acetato al medio, lo que sugiere interesante también analizar si hacer *knock-out* de estos sistemas puede ayudar aún más a la producción de etanol y/o crecimiento de la bacteria.

6.1.4.2. Sobreexpresión de la enzima que produce FBP (PFK)

Según lo descrito previamente, para el caso con manitol puro se observa que el ciclo de las pentosas y ED poseen flujos mayores al caso con glucosa, mientras que glicólisis (desde F6P en adelante) alcanza los mismos valores que para el caso con glucosa. Este resultado hace suponer que podría haber una saturación de la enzima que convierte F6P en FBP, por lo que se probó aumentando su velocidad enzimática 2 y 10 veces con respecto al que poseía el modelo original, obteniéndose los resultados que se muestran en Figura 34 y Figura 35. Lamentablemente contrario a lo esperado, la sobreexpresión de esta enzima no muestra una mejora en la producción de etanol o del crecimiento de la BAL1611, para ninguna de las configuraciones de alginato/manitol probadas.

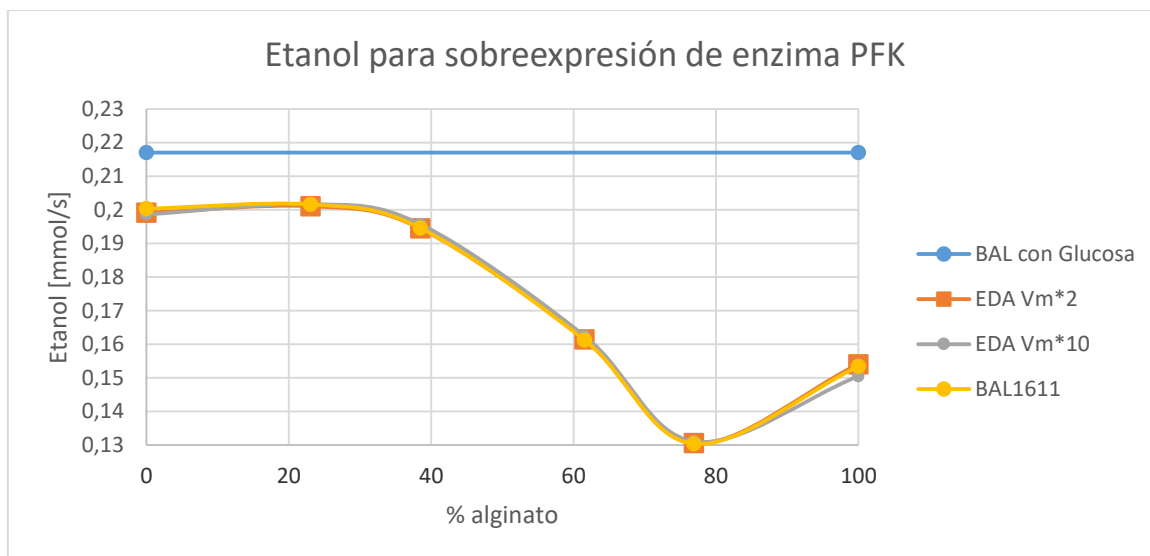


Figura 34. Comparación de producción de etanol con la sobreexpresión de la enzima PFK, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol.

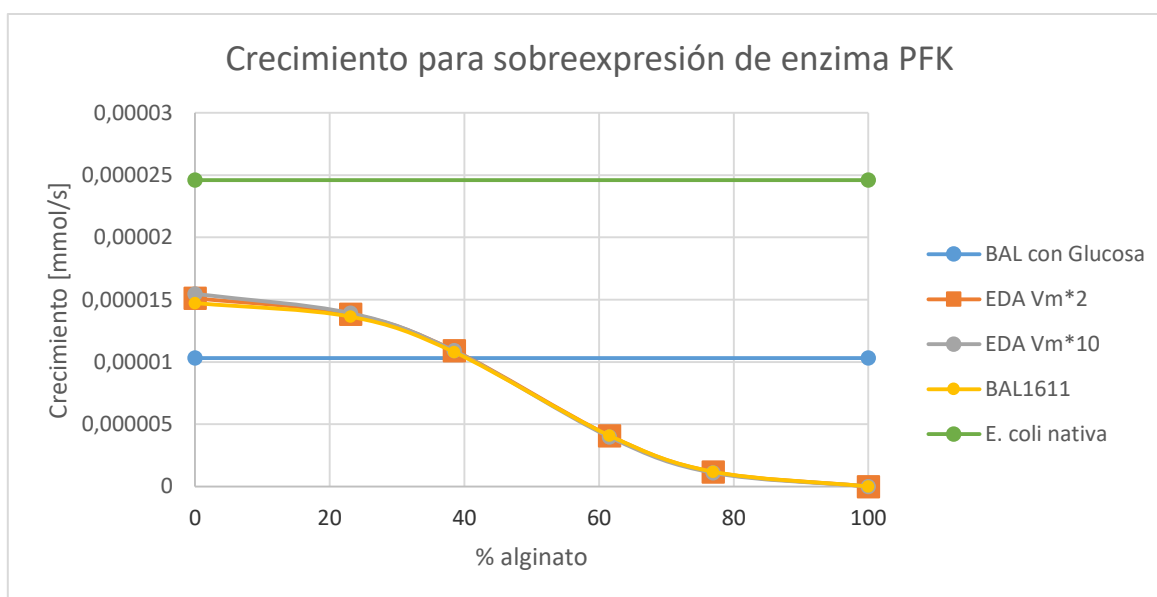


Figura 35. Comparación del crecimiento de la BAL1611 con sobreexpresión de la enzima PFK, con respecto a E. coli nativa y a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol.

6.1.4.3. *Knock-out* del sistema de acetato

6.1.4.3.1. *Por sí solo*

El nodo presente en ACCOA es un punto interesante a analizar, ya que a partir de él se produce el etanol (principal producto buscado) y el TCA (relacionado directamente con crecimiento y ATP). Por ello, se presume que la eliminación del sistema de producción de acetato podría mejorar la producción de etanol. Los resultados obtenidos son los que se muestran en la Figura 36 y Figura 37 donde se puede ver que, contrario a lo esperado, no hay una mejora en la producción de etanol o del crecimiento de la BAL1611, para ninguna de las configuraciones de alginato/manitol simuladas.

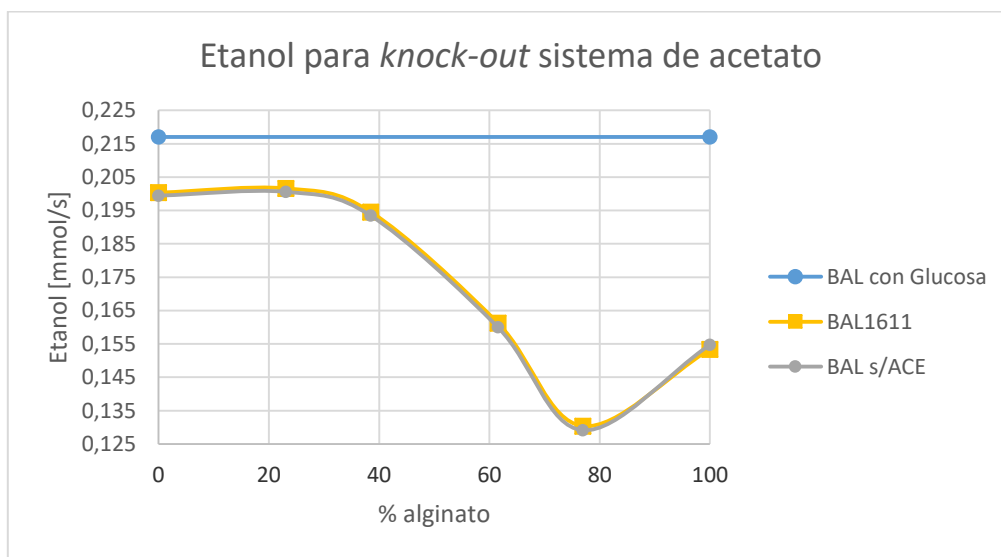


Figura 36. Comparación de producción de etanol con y sin la presencia del sistema de acetato, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol.

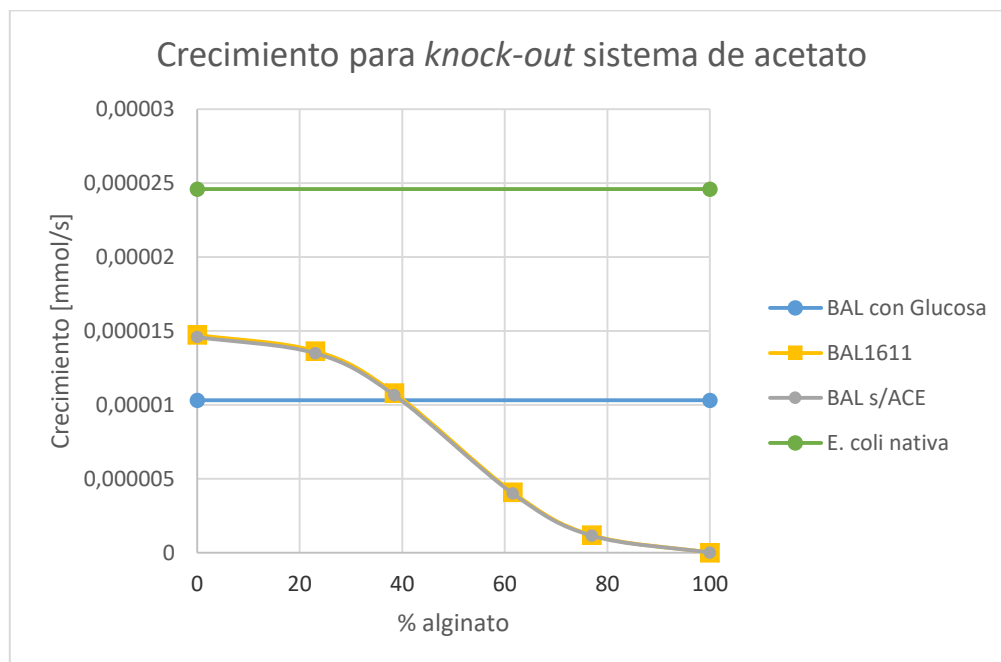


Figura 37. Comparación del crecimiento de la BAL1611 con y sin el sistema de acetato, con respecto a E. coli nativa y a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol.

6.1.4.3.2. *Knock-out del sistema de acetato con la mejora en la enzima EDA*

Además de la prueba de *knock-out* del sistema de acetato por sí solo, se decidió testarlo en conjunto con la mejora que hasta ahora ha descrito resultados auspiciosos para la producción de etanol: la sobreexpresión de la enzima EDA. De esta simulación se obtuvo los resultados que se muestran en las Figura 38 y Figura 39, donde se puede apreciar que el crecimiento del cultivo es el mismo que para el caso de la BAL1611 original en todas las proporciones de alginato y manitol, mientras que para la producción de etanol incluso se obtienen cifras menores. Esto puede ser explicado debido a que la nueva distribución de flujos en la célula destina mayores flujos a TCA que a producción de etanol. Contrario a lo supuesto, el *knock-out* del sistema de acetato no sería una alternativa factible para mejorar la producción de etanol en la BAL1611.

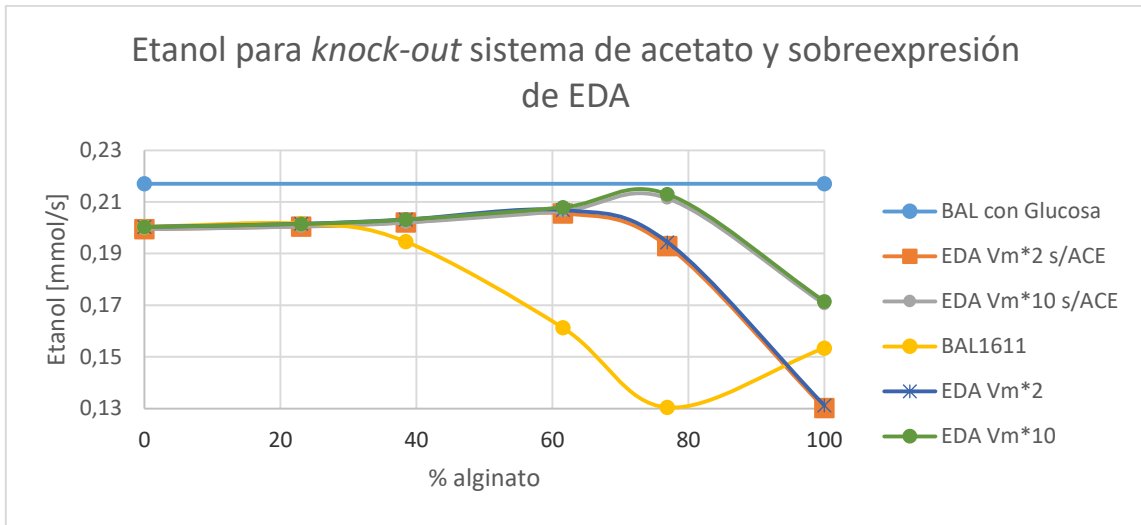


Figura 38. Comparación de producción de etanol con la sobreexpresión de la enzima EDA, con y sin el sistema de acetato, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de DEHU y manitol.

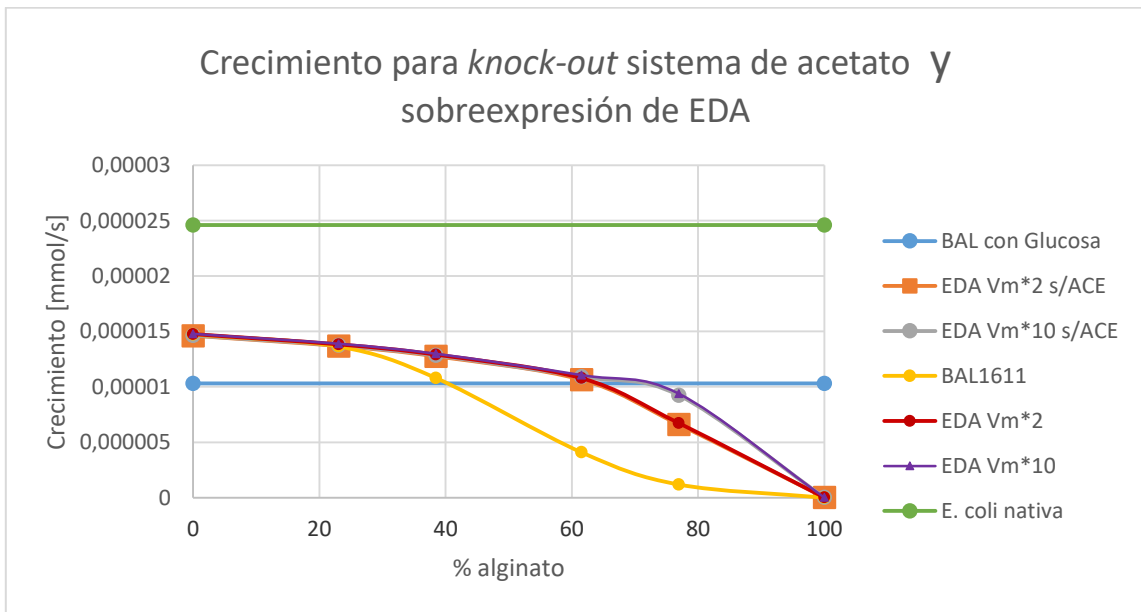


Figura 39. Comparación del crecimiento con sobreexpresión de la enzima EDA, con y sin el sistema de acetato, con respecto a E. coli nativa y a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol.

6.1.5. Análisis de la influencia del poder reductor en la producción de etanol

Luego del análisis del metabolismo de *E. coli* BAL1611 de los apartados anteriores, se realizaron las simulaciones que involucraban al consumo de NADH o NADPH en la degradación de alginato, tal como se describió en el apartado 5.1.3. De estas simulaciones se obtuvieron los gráficos de la Figura 40 y Figura 41 (datos en Anexo M), donde se puede observar en ambos casos que tanto la utilización de NADH o NADPH en la vía de consumo de alginato no implica en una menor o mayor producción significativa de etanol ni crecimiento de la bacteria modelada.

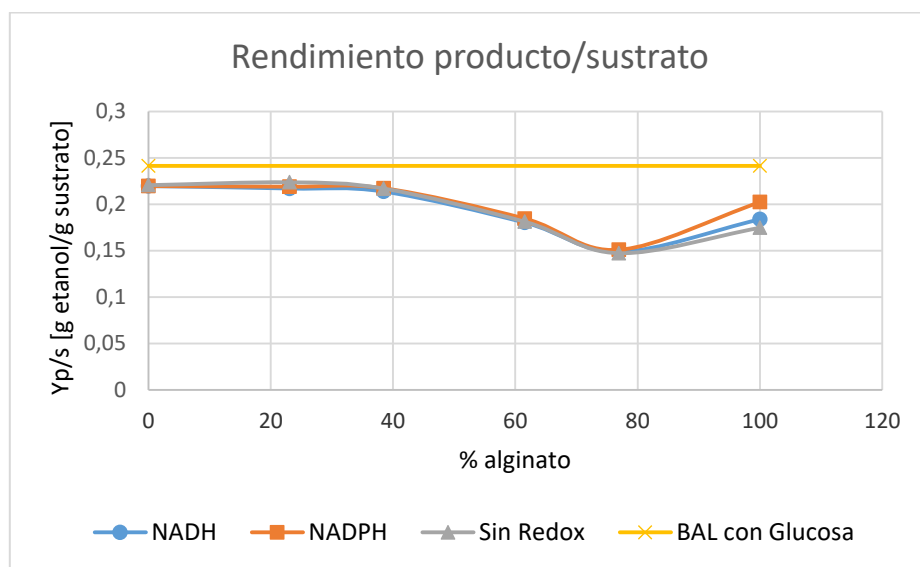


Figura 40. Comparación del rendimiento de etanol con la utilización de poder reductor (NADH o NADPH) en la degradación de alginato, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol sin la utilización del poder redox.

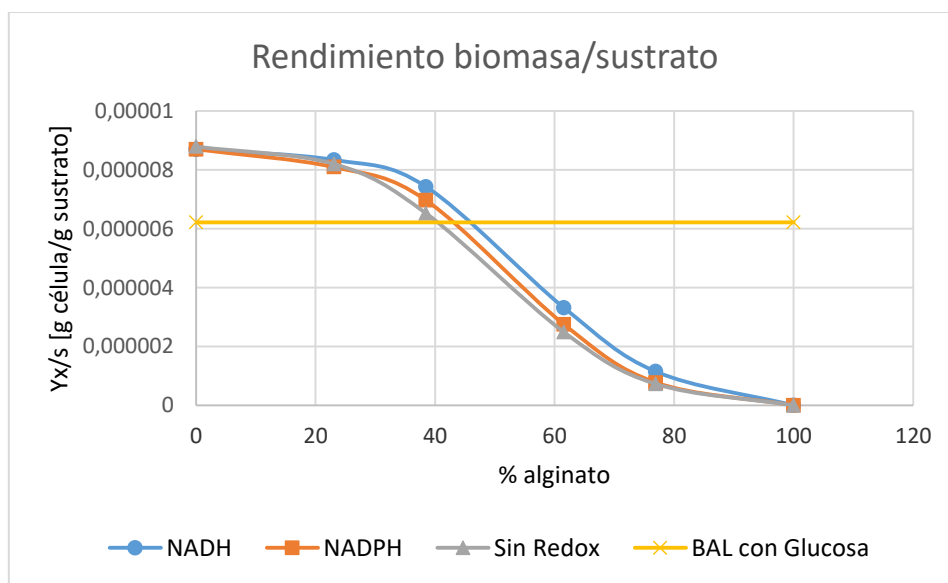


Figura 41. Comparación del rendimiento de crecimiento con la utilización de poder reductor (NADH o NADPH) en la degradación de alginato, con respecto a la BAL1611 original con glucosa y con las distintas proporciones de alginato y manitol sin la utilización del poder redox.

De todas maneras, a pesar de que no se observa una correlación entre la utilización del poder reductor y la producción de etanol, se puede observar en la Figura 42 y en la Figura 43, que para las distintas proporciones de alginato y manitol del sustrato existe una menor disponibilidad de poder reductor dentro de la célula, con respecto a la *Escherichia coli* nativa con glucosa.

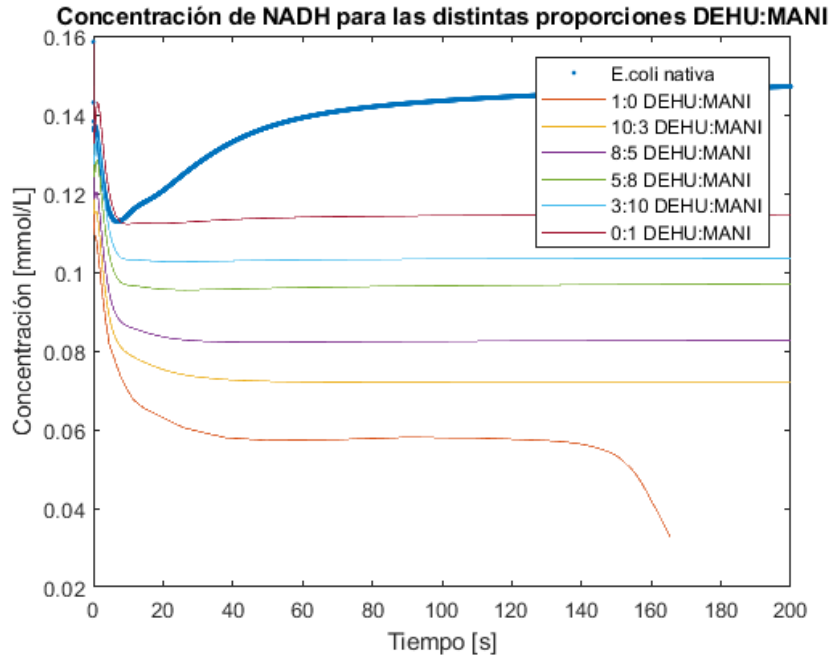


Figura 42. Concentración de NADH en el tiempo, para las distintas proporciones de alginato y manitol, comparadas gráficamente con la concentración de NADH en el tiempo para el caso de *E. coli* nativa con glucosa.

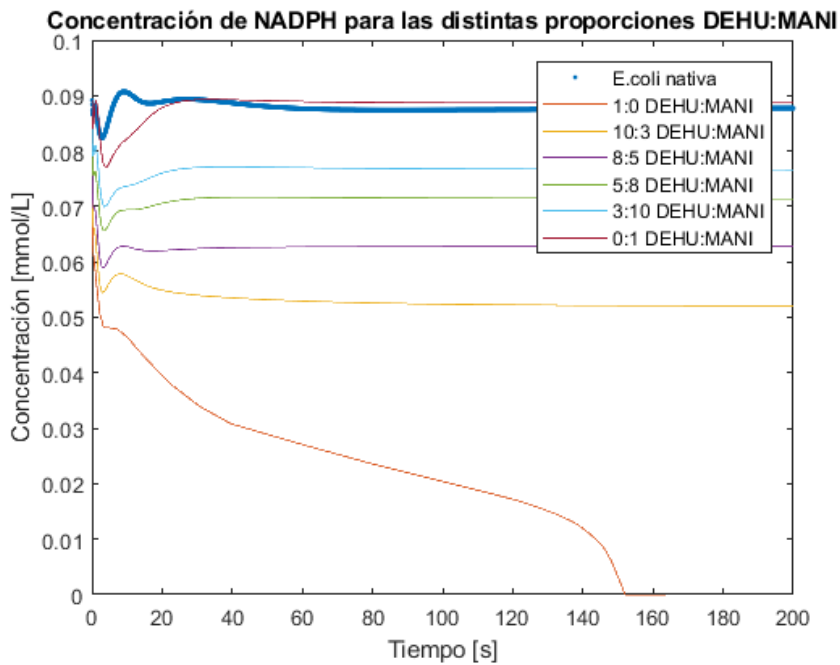


Figura 43. Concentración de NADPH en el tiempo, para las distintas proporciones de alginato y manitol, comparadas gráficamente con la concentración de NADPH en el tiempo para el caso de *E. coli* nativa con glucosa.

6.1.6. Estudios para maximizar la producción de etanol

Ahora que ya se conoce el comportamiento *in silico* de la *E. coli* BAL1611, se realizaron las simulaciones para identificar la combinación de modificaciones genéticas que podrían optimizar la producción de etanol con cada sustrato. Por este motivo, se ejecutaron simulaciones con uno, dos y tres o más mutaciones genéticas, las cuales entregaron los resultados que se muestran a continuación. Cabe destacar que, para estas simulaciones, el consumo de NADH en la degradación de alginato se encuentra considerado.

Algunos gráficos que no fueron expuestos en esta sección, así como el código de Matlab para realizar las simulaciones, se pueden encontrar en el Anexo N. También es importante notar que, si bien los ajustes del modelo mencionados en 5.1.4 permitieron simular adecuadamente, es necesario reescribir algunas cinéticas enzimáticas para que las ecuaciones describan por sí solas lo que ocurre al interior de la célula.

6.1.6.1. Una sola mutación

En estos casos, se estudió la relación del poder reductor, la disponibilidad energética y el crecimiento, con respecto a la producción de etanol, para descartar aquellas simulaciones que entreguen altas tasas de producción de etanol a costa de generar un gran estrés en la célula.

En la Tabla 9 se puede observar que, para la mayoría de los sustratos, la mutación que produce mayor concentración de etanol corresponde al *knock-out* de enzimas relacionadas con la respiración celular y ciclo de Krebs. Inclusive, para los casos de glucosa y manitol puro, estas mutaciones cumplen con la restricción de crecimiento establecida. Los flujos asociados a estas mejoras corresponden entre un 0% de mejora para el caso de DEHU puro, y aproximadamente un 100% para los demás casos. Este resultado estaría indicando que la mejor forma de producir etanol en la *E. coli* BAL1611 sería cultivándola de forma anaeróbica, aunque en las concentraciones de sustrato con alguna proporción de alginato podría haber severos problemas de crecimiento en dichas condiciones.

Tabla 9. Resumen de las mutaciones que entregan la mayor producción de etanol para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento.

| Restricción | Glucosa | 1:0 | 10:3 | 8:5 | 5:8 | 3:10 | 0:1 |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Sin restricción | <i>knock-out</i> CYTBO | <i>knock-out</i> PCK | <i>knock-out</i> CYTBO | <i>knock-out</i> CYTBO | <i>knock-out</i> CYTBO | <i>knock-out</i> CYTBO | <i>knock-out</i> GLT |
| | 0,44 [mmol/s] de etanol | 0,15 [mmol/s] de etanol | 0,26 [mmol/s] de etanol | 0,31 [mmol/s] de etanol | 0,41 [mmol/s] de etanol | 0,43 [mmol/s] de etanol | 0,39 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,49$ | $Y_{P/S} = 0,17$ | $Y_{P/S} = 0,29$ | $Y_{P/S} = 0,35$ | $Y_{P/S} = 0,46$ | $Y_{P/S} = 0,48$ | $Y_{P/S} = 0,43$ |
| Crecimiento (a) | <i>knock-out</i> PIT | - | Sobreexpresar EDA | Sobreexpresar ALDH | - | - | <i>knock-out</i> NDH1 |
| | 0,22 [mmol/s] de etanol | - | 0,16 [mmol/s] de etanol | 0,19 [mmol/s] de etanol | - | - | 0,2 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,24$ | - | $Y_{P/S} = 0,18$ | $Y_{P/S} = 0,21$ | - | - | $Y_{P/S} = 0,22$ |
| Crecimiento (b) | <i>knock-out</i> PIT | - | Sobreexpresar EDA | Sobreexpresar ALDH | - | - | <i>knock-out</i> NDH1 |
| | 0,22 [mmol/s] de etanol | - | 0,16 [mmol/s] de etanol | 0,19 [mmol/s] de etanol | - | - | 0,2 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,24$ | - | $Y_{P/S} = 0,18$ | $Y_{P/S} = 0,21$ | - | - | $Y_{P/S} = 0,22$ |
| Crecimiento (c) | <i>knock-out</i> PIT | - | Sobreexpresar EDA | Sobreexpresar ALDH | - | - | <i>knock-out</i> NDH1 |
| | 0,22 [mmol/s] de etanol | - | 0,16 [mmol/s] de etanol | 0,19 [mmol/s] de etanol | - | - | 0,2 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,24$ | - | $Y_{P/S} = 0,18$ | $Y_{P/S} = 0,21$ | - | - | $Y_{P/S} = 0,22$ |

Continuación Tabla 9. Resumen de las mutaciones que entregan la mayor producción de etanol para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento.

| Restricción | Glucosa | 1:0 | 10:3 | 8:5 | 5:8 | 3:10 | 0:1 |
|--------------------------|----------------------------|-----|-------------------------|-------------------------|-----|------|-------------------------|
| Crecimiento (d) | <i>knock-out</i> PIT | - | Sobreexpresar EDA | Sobreexpresar ALDH | - | - | <i>knock-out</i> NDH1 |
| | 0,22 [mmol/s] de etanol | - | 0,16 [mmol/s] de etanol | 0,19 [mmol/s] de etanol | - | - | 0,2 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,24$ | - | $Y_{P/S} = 0,18$ | $Y_{P/S} = 0,21$ | - | - | $Y_{P/S} = 0,22$ |
| Crecimiento (e) | <i>knock-out</i> PIT | - | Sobreexpresar EDA | Sobreexpresar ALDH | - | - | <i>knock-out</i> NDH1 |
| | 0,22 [mmol/s] de etanol | - | 0,16 [mmol/s] de etanol | 0,19 [mmol/s] de etanol | - | - | 0,2 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,24$ | - | $Y_{P/S} = 0,18$ | $Y_{P/S} = 0,21$ | - | - | $Y_{P/S} = 0,22$ |
| Crecimiento ideal | <i>knock-out</i> XCH_RMM_P | - | Sobreexpresar EDA | Sobreexpresar ALDH | - | - | <i>knock-out</i> PIT |
| | 0,22 [mmol/s] de etanol | - | 0,16 [mmol/s] de etanol | 0,19 [mmol/s] de etanol | - | - | 0,18 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,24$ | - | $Y_{P/S} = 0,18$ | $Y_{P/S} = 0,21$ | - | - | $Y_{P/S} = 0,2$ |

Por otra parte, los resultados gráficos mostrados en la Figura 44, Figura 45, Figura 46 y Figura 47, dan a conocer que existe una relación inversamente proporcional entre el crecimiento y la producción de etanol, debido a que a medida que el crecimiento se hace más restrictivo (la restricción aumenta del gráfico (a) al (f)), se van observando menos puntos que cumplen la condición en cada gráfico. Este hecho se puede observar también en los datos de la Tabla 9, ya que al pasar de los datos sin restricción hacia los restrictivos, se produce una disminución del flujo de producción de etanol de aproximadamente la mitad, en los casos donde existen mutaciones que cumplen las restricciones definidas.

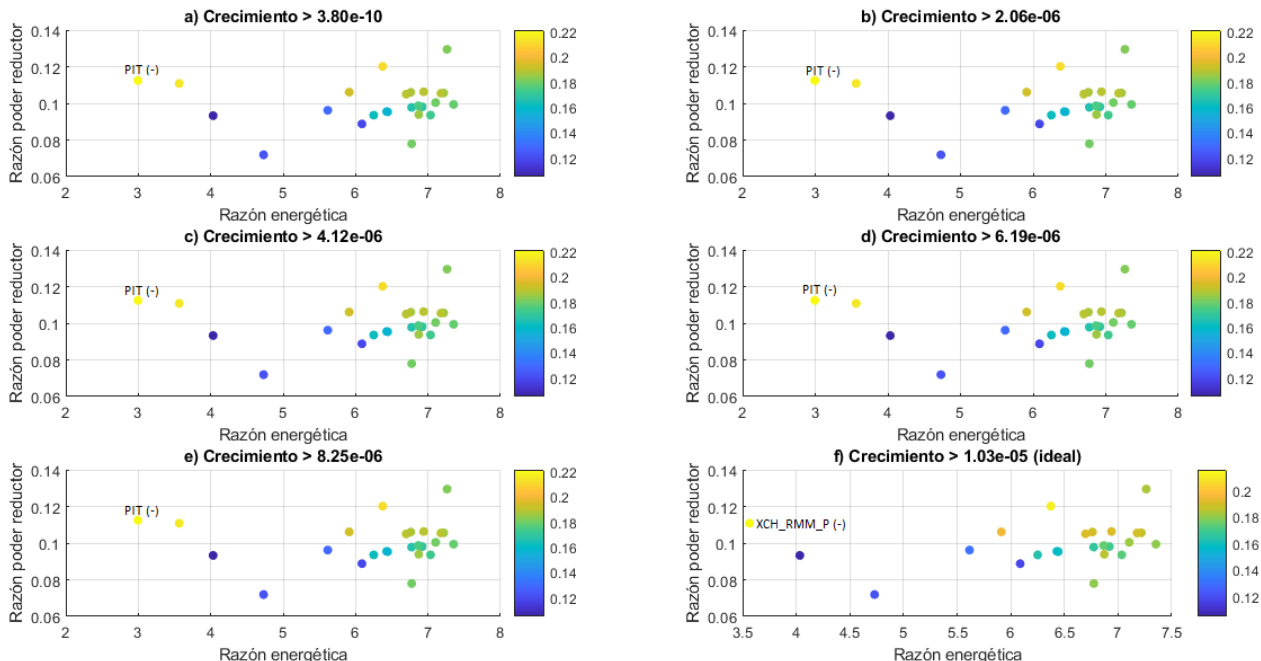


Figura 44. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento.

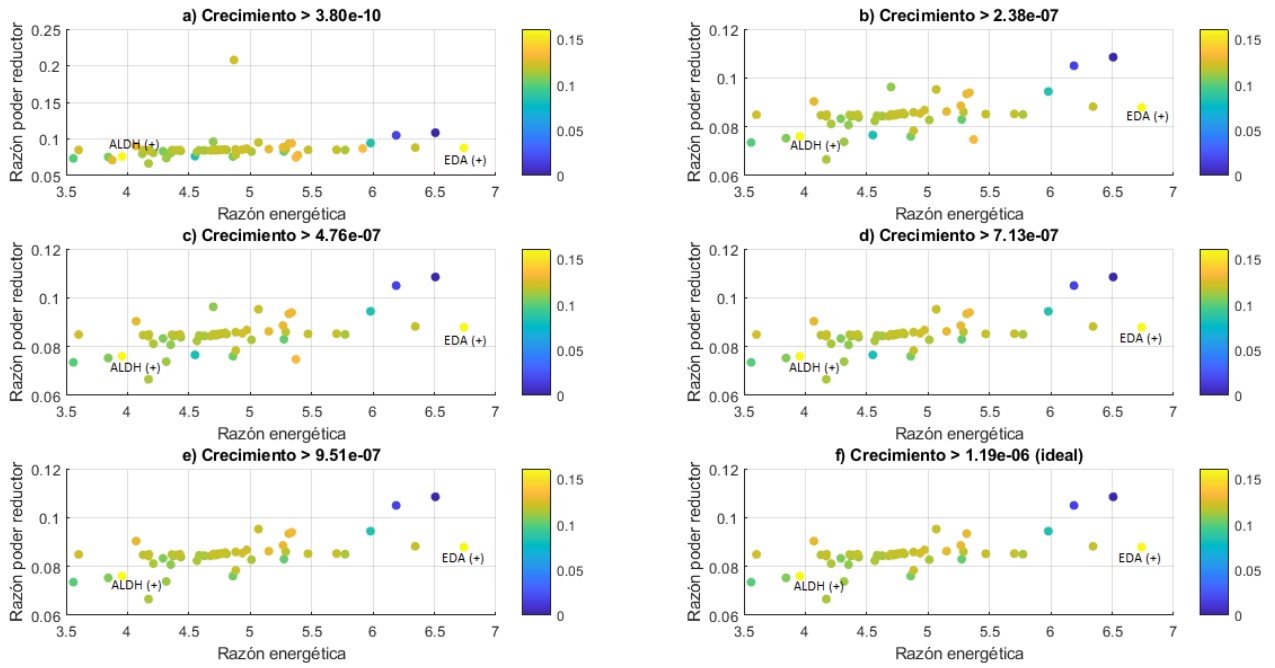


Figura 45. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para las concentraciones de *M. pyrifera*, para cada restricción en el crecimiento.

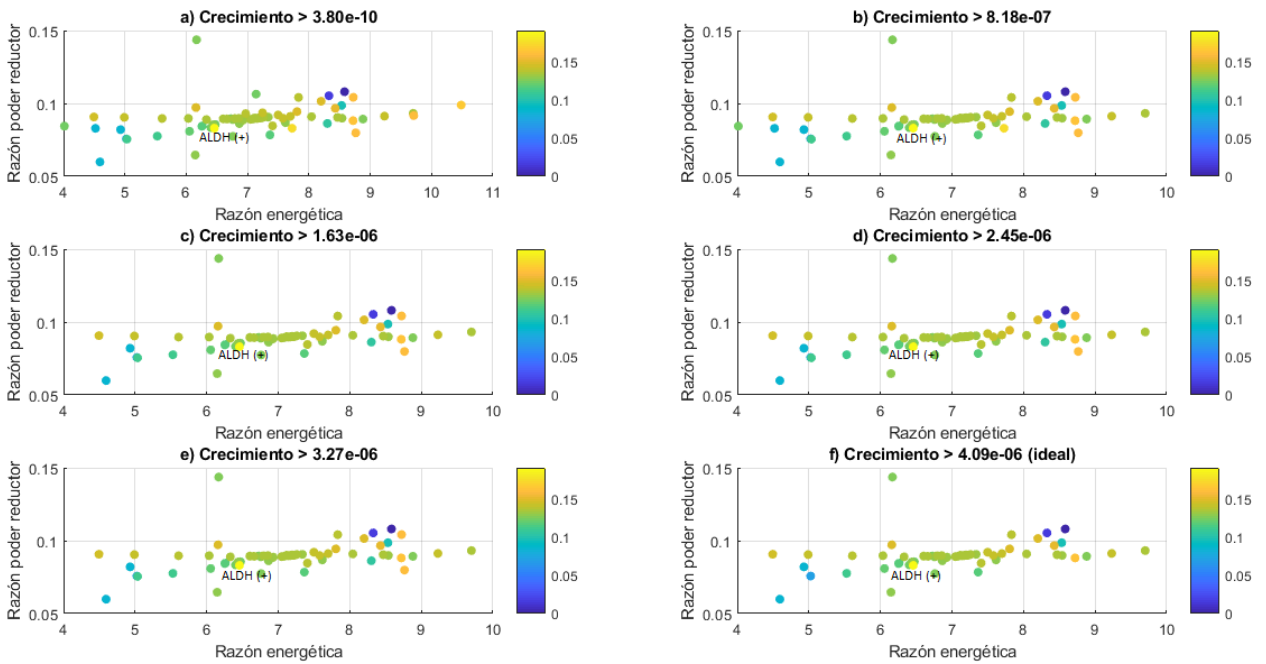


Figura 46. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para DEHU:manitol de 8:5, para cada restricción en el crecimiento.

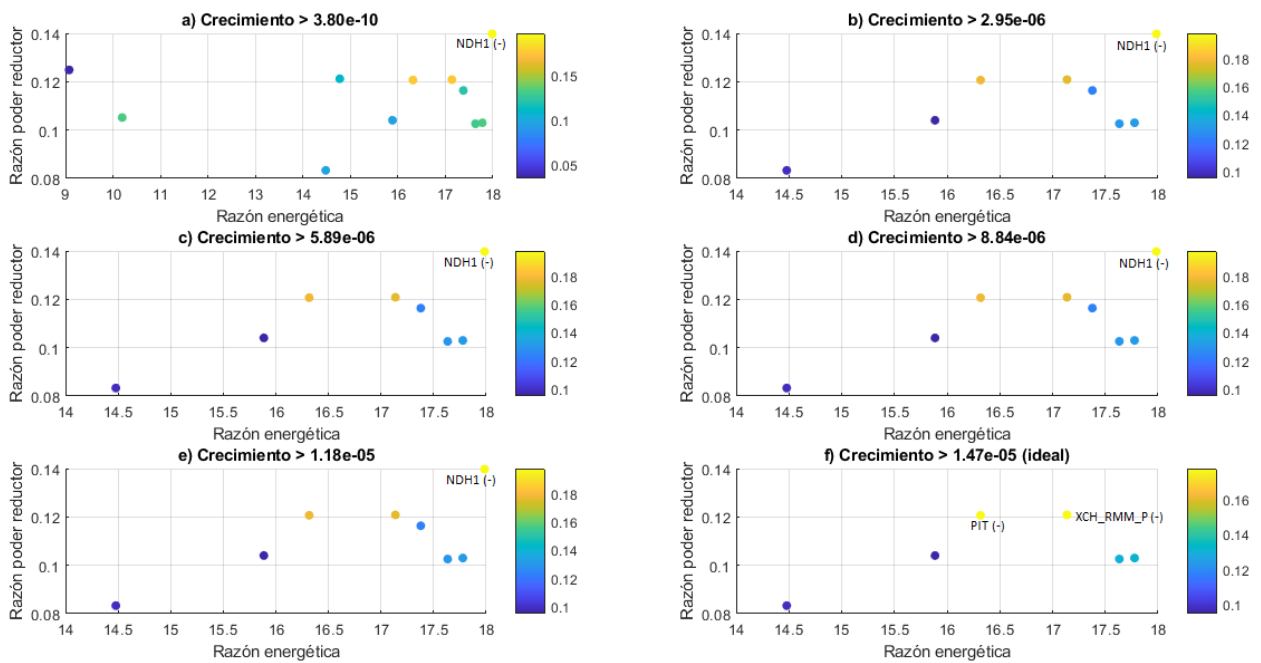


Figura 47. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para manitol, para cada restricción en el crecimiento.

A partir de la misma Tabla 9 y la Figura 44, Figura 45, Figura 46 y Figura 47, se puede observar que para las concentraciones de DEHU puro, *S. japonica* y 3:10 DEHU:manitol no existen mutaciones que cumplan con las condiciones de factibilidad biológica, particularmente aquella relativa al crecimiento del cultivo.

Por otra parte, para el caso de *M. pirifera* se observa que, al restringir el crecimiento, la mutación que genera mayor producción de etanol corresponde a la sobreexpresión de la enzima EDA, el mismo resultado que se había obtenido en el análisis exploratorio de los apartados 6.1.3 y 6.1.4.1. De todas formas, en cuanto al rendimiento de producción de etanol, se obtiene un 75% con respecto a la BAL1611 con glucosa, mientras que con respecto al caso base para *M. pirifera*, se obtiene una mejora del 20%.

En cuanto al caso de DEHU:manitol de 8:5, la mutación que genera la mayor producción de etanol corresponde a la sobreexpresión de la enzima ALDH, incluso para los casos más restrictivos de crecimiento. Esta enzima es la encargada de generar acetaldehído, reactivo necesario para la generación de etanol, por lo que una sobreexpresión de dicha enzima provocaría mayor disponibilidad de esta molécula precursora y, por ende, se aumentará el flujo hacia etanol. Con respecto al caso base para este sustrato, la producción de etanol corresponde a una mejora del 18,8%, mientras que comparado con el rendimiento de la *E. coli* BAL1611 con glucosa para el mismo crecimiento, alcanza solo un 87,5% de éste.

6.1.6.2. Dos mutaciones

Nuevamente se analizó aquellas mutaciones que se encontraban dentro del espacio factible definido a partir de valores biológicamente posibles de poder reductor, disponibilidad energética y crecimiento, para descartar simulaciones que entreguen altas tasas de producción de etanol a costa de generar un gran estrés en la célula.

En la Tabla 10 se puede observar que, para la mayoría de los sustratos, las mutaciones que producen mayor concentración de etanol corresponden a *knock-out* de enzimas relacionadas con la respiración celular y ciclo de Krebs, junto con la sobreexpresión de la enzima EDA para los casos con mayor proporción de alginato. Los flujos asociados a estas mejoras corresponden entre un 40% de mejora para el caso de DEHU puro, y aproximadamente un 175% para el caso de glucosa. Este resultado nuevamente indica que la mejor forma de producir etanol en la *E. coli* BAL1611 sería cultivándola anaeróbicamente, aunque en las concentraciones de sustrato con alguna proporción de alginato es necesario además mejorar el sistema de degradación del sustrato, sobreexpresando la enzima EDA.

Por otra parte, los datos de la Tabla 10 nuevamente muestran que existe una relación inversamente proporcional entre el crecimiento y la producción de etanol, ya que al pasar de los datos sin restricción hacia los restrictivos en cuanto a crecimiento, se produce una disminución del flujo de producción de etanol de aproximadamente la mitad. Además, se puede observar que solo para las concentraciones de DEHU puro no existen mutaciones que cumplan con las condiciones de factibilidad biológica, particularmente aquella relativa al crecimiento del cultivo.

Tabla 10. Resumen de las dobles mutaciones que entregan la mayor producción de etanol para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento.

| Restricción | Glucosa | 1:0 (D:M) | 10:3 (D:M) | 8:5 (D:M) | 5:8 (D:M) | 3:10 (D:M) | 0:1 (D:M) |
|------------------------|---|--|--|--|--|-------------------------------------|------------------------------|
| Sin restricción | <i>knock-out</i> CYTBO y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp | <i>knock-out</i> ADK y sobreexpresar EDA | <i>knock-out</i> CYTBO y sobreexpresar EDA | <i>knock-out</i> GLT y MQO | <i>knock-out</i> NDH1 y NDH2 | <i>knock-out</i> NDH1 y NDH2 | <i>knock-out</i> GLT y PGI |
| | 0,55 [mmol/s] de etanol | 0,28 [mmol/s] de etanol | 0,37 [mmol/s] de etanol | 0,41 [mmol/s] de etanol | 0,44 [mmol/s] de etanol | 0,45 [mmol/s] de etanol | 0,43 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,61$ | $Y_{P/S} = 0,32$ | $Y_{P/S} = 0,42$ | $Y_{P/S} = 0,46$ | $Y_{P/S} = 0,49$ | $Y_{P/S} = 0,5$ | $Y_{P/S} = 0,47$ |
| Crecimiento (a) | <i>knock-out</i> MQO y PCK | - | Sobreexpresar EDA y ALDH | <i>knock-out</i> CYTBO y SK | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y duplicar crecimiento | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y ATP_SYN | <i>knock-out</i> ACN_1 y EDD |
| | 0,36 [mmol/s] de etanol | - | 0,23 [mmol/s] de etanol | 0,26 [mmol/s] de etanol | 0,37 [mmol/s] de etanol | 0,22 [mmol/s] de etanol | 0,25 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,4$ | - | $Y_{P/S} = 0,26$ | $Y_{P/S} = 0,29$ | $Y_{P/S} = 0,41$ | $Y_{P/S} = 0,24$ | $Y_{P/S} = 0,28$ |
| Crecimiento (b) | <i>knock-out</i> PIT y sobreexpresar ALDH | - | Sobreexpresar EDA y ALDH | Sobreexpresar EDA y <i>knock-out</i> MQO | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y duplicar crecimiento | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y ATP_SYN | <i>knock-out</i> ACN_1 y EDD |
| | 0,29 [mmol/s] de etanol | - | 0,23 [mmol/s] de etanol | 0,25 [mmol/s] de etanol | 0,37 [mmol/s] de etanol | 0,22 [mmol/s] de etanol | 0,25 [mmol/s] de etanol |
| | $Y_{P/S} = 0,32$ | - | $Y_{P/S} = 0,26$ | $Y_{P/S} = 0,28$ | $Y_{P/S} = 0,41$ | $Y_{P/S} = 0,24$ | $Y_{P/S} = 0,28$ |

Continuación Tabla 10. Resumen de las dobles mutaciones que entregan la mayor producción de etanol para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento.

| Restricción | Glucosa | 1:0 (D:M) | 10:3 (D:M) | 8:5 (D:M) | 5:8 (D:M) | 3:10 (D:M) | 0:1 (D:M) |
|--------------------------|--|-----------|--|--|--|--|--|
| Crecimiento (c) | <i>knock-out</i> PIT y sobreexpresar ALDH | - | Sobreexpresar EDA y ALDH | Sobreexpresar EDA y <i>knock-out</i> MQO | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y duplicar crecimiento | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y ATP_SYN | <i>knock-out</i> ACN_1 y EDD |
| | 0,29 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,32 | - | 0,23 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,26 | 0,25 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,28 | 0,37 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,41 | 0,22 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,24 | 0,25 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,28 |
| Crecimiento (d) | <i>knock-out</i> NDH1 y sobreexpresar ALDH | - | Sobreexpresar EDA y ALDH | Sobreexpresar EDA y <i>knock-out</i> MQO | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y duplicar crecimiento | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y ATP_SYN | <i>knock-out</i> NDH1 y sobreexpresar ZWF |
| | 0,29 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,32 | - | 0,23 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,26 | 0,25 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,28 | 0,37 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,41 | 0,22 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,24 | 0,2 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,22 |
| Crecimiento (e) | <i>knock-out</i> PNT y sobreexpresar ALDH | - | Sobreexpresar EDA y ALDH | Sobreexpresar EDA y ALDH | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y duplicar crecimiento | <i>knock-out</i> ACEB y EDD | <i>knock-out</i> NDH1 y sobreexpresar ZWF |
| | 0,27 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,3 | - | 0,23 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,26 | 0,23 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,26 | 0,37 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,41 | 0,12 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,13 | 0,2 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,22 |
| Crecimiento ideal | <i>knock-out</i> ICD y PPC | - | Sobreexpresar EDA y ALDH | Sobreexpresar EDA y ALDH | <i>knock-out</i> ATP_MAIN y duplicar crecimiento | <i>knock-out</i> ACEB y EDD | Sobreexpresar ACEK1 y <i>knock-out</i> CYA |
| | 0,26 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,29 | - | 0,23 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,26 | 0,23 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,26 | 0,37 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,41 | 0,12 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,13 | 0,18 [mmol/s] de etanol Y _{P/S} = 0,2 |

Adicionalmente, para el caso de *M. pyrifera*, se observa en la Tabla 10 y en la Figura 48 que, al restringir el crecimiento incluso hasta el ideal, la mutación que genera mayor producción de etanol corresponde a la sobreexpresión de las enzimas EDA y ALDH, lo que concuerda con los resultados previos obtenidos para la simulación con un solo cambio. De hecho, ambas mutaciones resultan lógicas, pues tienen relación con mejorar la degradación del sustrato y, por otro lado, la generación del producto de interés. Afortunadamente en este caso, el rendimiento de producción de etanol con respecto al caso base para este sustrato corresponde a una mejora del 44%, mientras que con respecto a la BAL1611 original con glucosa es el 108%. Esto señala que, con estas dos mutaciones, se produciría mayores concentraciones de etanol que con la *E. coli* BAL1611 original cultivada en glucosa o en *S. japonica*.

También se observa en la Figura 48, que la segunda combinación de mutaciones que genera mayor producción es la sobreexpresión de la enzima EDA y el *knock-out* de la enzima MQO, encargada de transformar malato en oxaloacetato. Esto tiene sentido pues, para los sustratos con mayor concentración de alginato, se había determinado previamente que las reacciones anapleróticas cumplen un rol fundamental, por lo que el flujo en realidad va hacia OAA y de allí a malato a través de la enzima MDH, en vez de en sentido contrario.

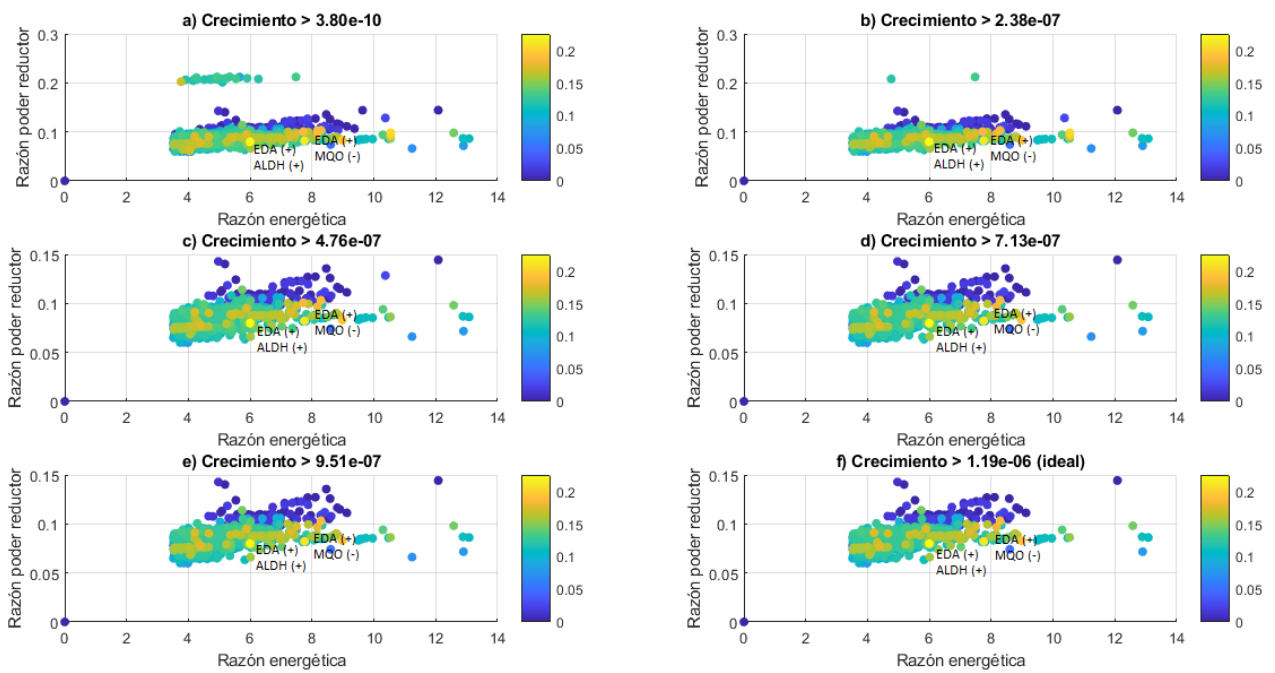


Figura 48. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para *M. pyriferá*, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

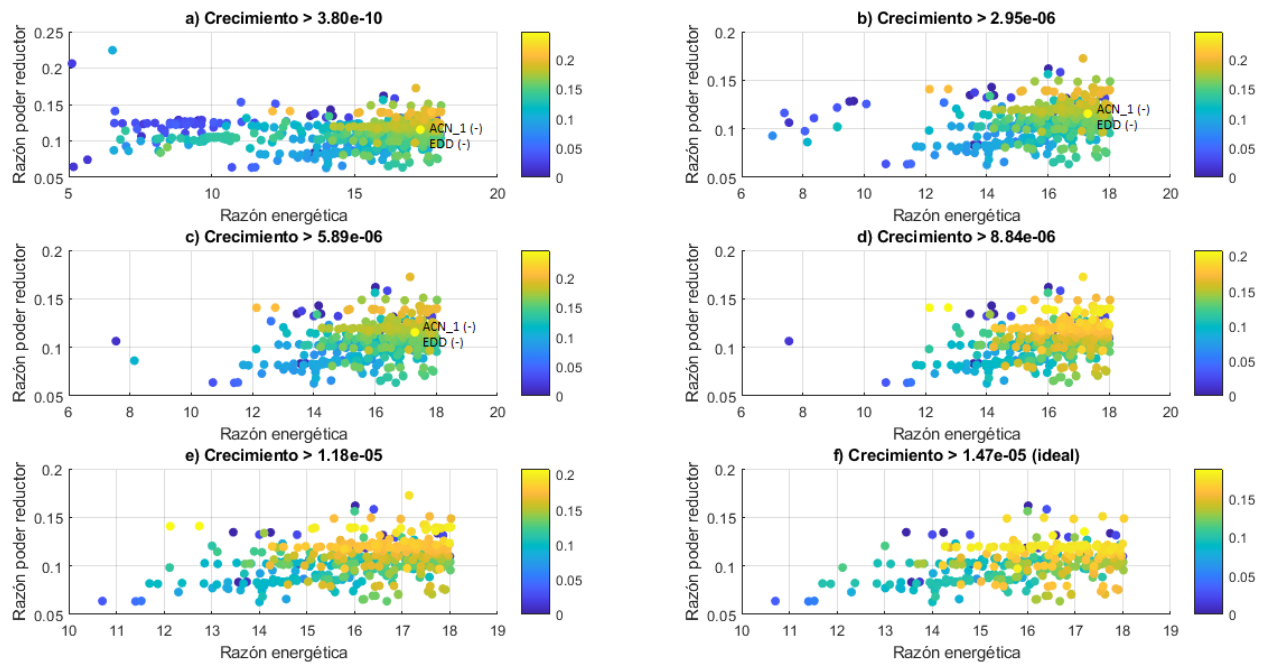


Figura 49. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para manitol, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

También es importante destacar que, debido a que para el caso de doble mutación se obtienen muchas más combinaciones que para el de un solo cambio, existen asimismo muchas soluciones que puedan producir semejantes flujos de etanol en cada simulación. Esto se puede ver reflejado en la Figura 49, donde se aprecia que a medida que se

restringe el crecimiento, se observan más puntos amarillos correspondientes a los máximos respectivos a cada gráfico. Esto también puede explicarse debido a que, a mayor restricción de crecimiento, la producción de etanol es menor y, por lo tanto, existen más alternativas de mutaciones que cumplan con dicha producción.

6.1.6.3. Tres o más mutaciones

A partir de los resultados de las simulaciones con una y con dos mutaciones, se decide probar simultáneamente aquellas mutaciones que entregaban las mayores producciones de etanol para el caso de *M. pyrifer*. Por ello, se realizó las pruebas con sobreexpresión de EDA y ALDH, y *knock-out* de CYTBO y MQO, obteniéndose los resultados de la Tabla 11. En ella se puede observar que, las combinaciones que generan las mayores producciones de etanol, no son factibles en cuanto a la razón energética dentro de la célula, probablemente debido a que la fermentación anaeróbica, representada por el *knock-out* de la enzima CYTBO, genera una menor concentración de ATP dentro de la célula.

De todos modos, la combinación de sobreexpresión de EDA y ALDH junto con el *knock-out* de MQO genera un rendimiento de producto versus sustrato de aproximadamente el doble que para el caso original de la *E. coli* BAL1611, además de cumplir con los requerimientos de factibilidad biológica, por lo que se sugiere para futuros trabajos en laboratorio probar con esta combinación de mutaciones. Sin embargo, comparando el rendimiento con respecto al de la sobreexpresión de EDA y ALDH, éste mejora tan solo en un 12%, lo que indica que en realidad las mutaciones que generan un cambio significativo en la producción de etanol corresponden solo a estas dos sobreexpresiones.

Tabla 11. Resumen de las simulaciones con tres o más mutaciones escogidas desde resultados previos, para producción de etanol a partir de *M. pyrifer* como sustrato.

| | EDA+ALDH-CYTBO | EDA+ALDH-MQO | EDA+ALDH-CYTBO-MQO |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Etanol [mmol/s] | 0,373 | 0,253 | 0,315 |
| Y_{P/S} | 0,42 | 0,29 | 0,36 |
| Crecimiento [mmol/s] | 2,2*10 ⁻⁷ | 1,3*10 ⁻⁶ | 2,2*10 ⁻⁷ |
| | Factible | Factible | Factible |
| Razón de poder reductor | 0,226 | 0,073 | 0,115 |
| | Factible | Factible | Factible |
| Razón energética | 1,994 | 6,109 | 3,035 |
| | No factible | Factible | No factible |

6.2. Búsqueda de nuevos productos de interés comercial

Además de la producción de etanol, se decide estudiar la generación de otros productos de interés comercial, donde destacan el ácido láctico y succínico. Por ello, se realizan las simulaciones para determinar las mejores combinaciones de cambios genéticos que permitan optimizar sus producciones, para el sustrato de *M. pirifera*. Al igual que para el caso de etanol, se ejecutaron simulaciones con uno, dos y tres o más mutaciones genéticas, las cuales entregaron los resultados que se muestran a continuación.

Algunos gráficos que no fueron expuestos en esta sección, así como el código de Matlab para realizar las simulaciones, se pueden encontrar en el Anexo O.

6.2.1. Ácido láctico

6.2.1.1. Una mutación

De la misma forma que para la optimización de la producción de etanol, se estudió la relación del poder reductor, la disponibilidad energética y el crecimiento, en este caso con respecto a la producción de ácido láctico, para descartar aquellas simulaciones que entreguen altas tasas de producción a costa de generar un gran estrés en la célula.

En la Tabla 12 se puede observar que, tanto para glucosa como para *M. pirifera*, la mutación que produce mayor concentración de ácido láctico corresponde al *knock-out* de la enzima PDH, encargada de transformar piruvato en acetilCoA. Esta mutación hace sentido pues el ácido láctico se produce a partir de piruvato, por lo que cortar la ruta de la glicólisis para redirigir los flujos hacia el producto de interés es razonable en términos de la optimización. Sin embargo, esta mutación genera un rendimiento de a lo más el 90% con respecto al caso base de producción de lactato con glucosa.

Tabla 12. Resumen de las mutaciones que entregan la mayor producción de ácido láctico para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento.

| Restricción | Glucosa | <i>M. pirifera</i> |
|-------------------|--|--|
| Sin restricción | <i>knock-out</i> PDH | <i>knock-out</i> PDH |
| | 0,022 [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 0,05$ | 0,0044 [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 0,009$ |
| Crecimiento (a) | <i>knock-out</i> PIT | <i>knock-out</i> S7P_E4P_TAL |
| | $3,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 8 \cdot 10^{-5}$ | $6,6 \cdot 10^{-6}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 1,5 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento (b) | <i>knock-out</i> PIT | <i>knock-out</i> S7P_E4P_TAL |
| | $3,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 8 \cdot 10^{-5}$ | $6,6 \cdot 10^{-6}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 1,5 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento (c) | <i>knock-out</i> PIT | <i>knock-out</i> S7P_E4P_TAL |
| | $3,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 8 \cdot 10^{-5}$ | $6,6 \cdot 10^{-6}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 1,5 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento (d) | <i>knock-out</i> PIT | Sobreexpresar EDA |
| | $3,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 8 \cdot 10^{-5}$ | $5,6 \cdot 10^{-6}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 1,2 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento (e) | <i>knock-out</i> PIT | Sobreexpresar EDA |
| | $3,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 8 \cdot 10^{-5}$ | $5,6 \cdot 10^{-6}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 1,2 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento ideal | <i>knock-out</i> PIT | Sobreexpresar EDA |
| | $3,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 8 \cdot 10^{-5}$ | $5,6 \cdot 10^{-6}$ [mmol/s] de lactato $Y_{P/S} = 1,2 \cdot 10^{-5}$ |

Por otra parte, a pesar de que el *knock-out* de la enzima PDH se encuentra dentro de la región factible en la Figura 50, al imponer la restricción de crecimiento mínimo éste punto queda fuera del espacio biológicamente factible de la Figura 51. Tal como se muestra en la Tabla 12, las mayores producciones de lactato en este caso se encuentran dadas por el *knock-out* del sistema de transporte de fosfatos, lo que indica un desbalance de estos al interior de la célula. De todas formas, la producción máxima en cualquiera de estos casos es tres órdenes de magnitud menor.

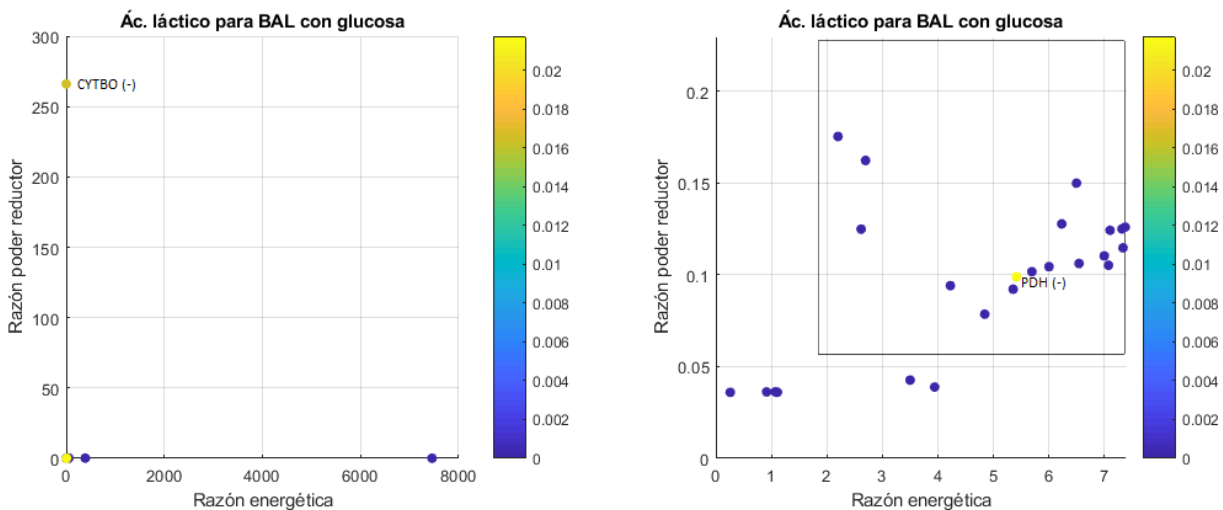


Figura 50. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido láctico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

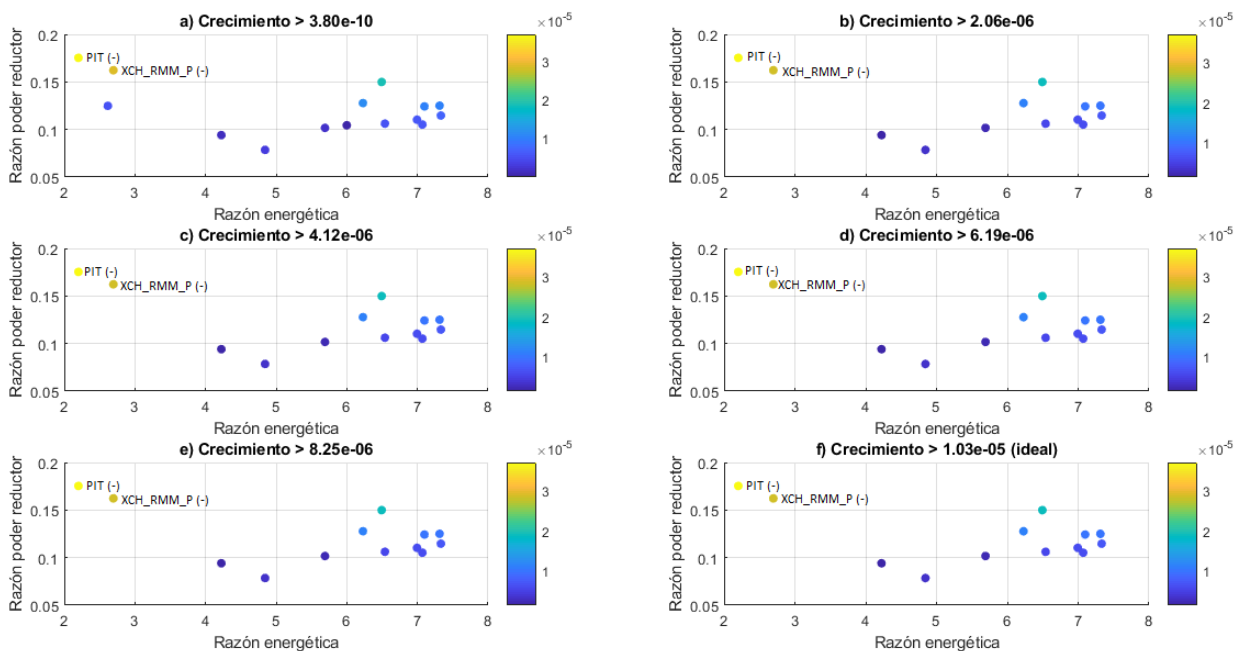


Figura 51. Gráficos de producción de ácido láctico en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento.

En cuanto al sustrato *M. pyrifer*, el *knock-out* de la enzima PDH en este caso no se encuentra dentro de región factible en la Figura 52. Tal como se observa en la Figura 53 y en la Tabla 12, las mayores producciones de ácido láctico en las condiciones más restrictivas de crecimiento se encuentran dadas por la sobreexpresión de la enzima EDA, probablemente debido a la necesidad de mejorar el consumo de DEHU por parte de la bacteria. También es importante destacar que la sobreexpresión de la enzima que produce ácido láctico se puede observar en la Figura 53, donde se ve que es la tercera mutación con mayor producción de lactato en los casos más restrictivos de crecimiento. De todas formas, al igual que con glucosa, la producción máxima en cualquiera de estos casos es al menos cuatro órdenes de magnitud menor.

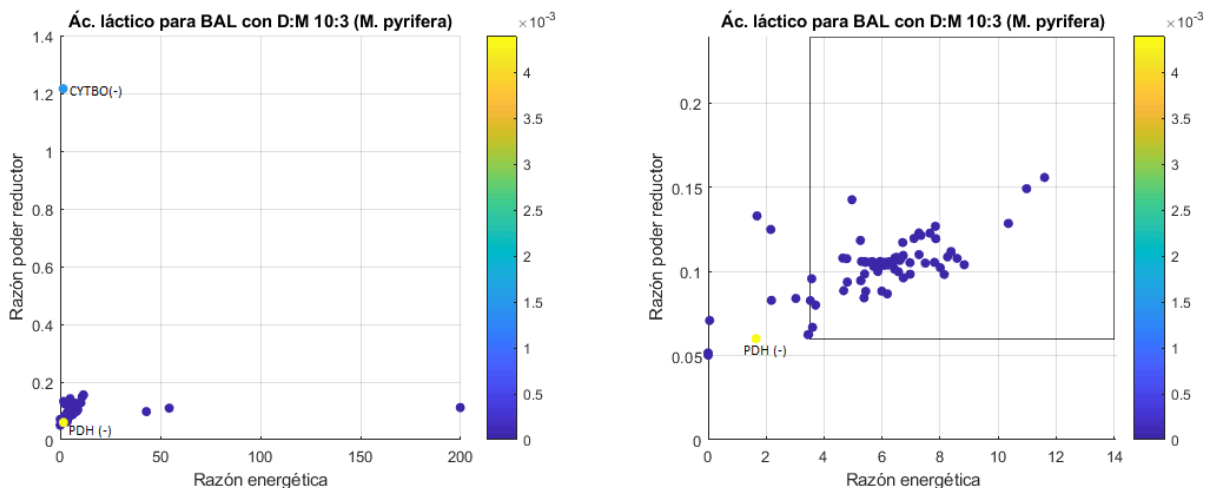


Figura 52. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido láctico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con *M. pyrifer* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

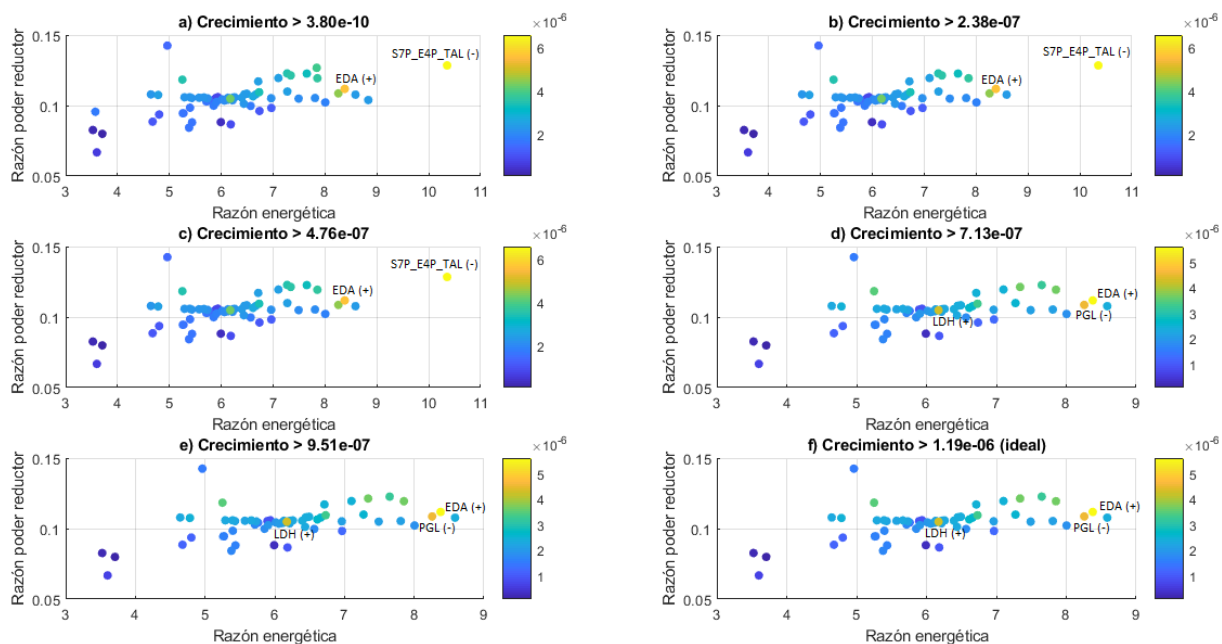


Figura 53. Gráficos de producción de ácido láctico en la zona de factibilidad biológica para *M. pyrifer*, para cada restricción en el crecimiento.

6.2.1.2. Dos mutaciones

Una vez más, analizando las simulaciones en cuanto a su pertenencia al espacio biológicamente factible, en la Tabla 13 se puede observar que, para glucosa, las mutaciones que generan una mayor producción de ácido láctico corresponden al *knock-out* del citocromo CYTBO (cultivo anaeróbico) y de la enzima PDH, encargada de transformar piruvato en acetilCoA (cortar glicólisis para redirigir los flujos hacia ácido láctico). Esta combinación de mutaciones genera un flujo al menos 20 veces mayor con respecto al caso base de producción de lactato con glucosa. Sin embargo, en la Figura 54 y Figura 55 se observa que en la región biológicamente factible, las producciones de ácido láctico son aproximadamente un orden de magnitud menor a este máximo, similares a la producción estándar de *E. coli*.

Tabla 13. Resumen de las dobles mutaciones que entregan la mayor producción de ácido láctico para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento.

| Restricción | Glucosa | <i>M. pyrifera</i> |
|--------------------------|--|--|
| Sin restricción | <i>knock-out</i> CYTBO y sobreexpresar PDH | <i>knock-out</i> CYTBO y ALDH |
| | 0,59 [mmol/s] de lactato | 0,09 [mmol/s] de lactato |
| | $Y_{P/S} = 1,3$ | $Y_{P/S} = 0,19$ |
| Crecimiento (a) | <i>knock-out</i> ACN_2 y PDH | <i>knock-out</i> S7P_R5P_TKT y sobreexpresar EDA |
| | 0,02 [mmol/s] de lactato | $1,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato |
| | $Y_{P/S} = 0,04$ | $Y_{P/S} = 3,8 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento (b) | <i>knock-out</i> NDH1 y NDH2 | <i>knock-out</i> S7P_R5P_TKT y sobreexpresar EDA |
| | $9,4 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato | $1,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato |
| | $Y_{P/S} = 2 \cdot 10^{-4}$ | $Y_{P/S} = 3,8 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento (c) | <i>knock-out</i> NDH1 y NDH2 | <i>knock-out</i> S7P_R5P_TKT y sobreexpresar EDA |
| | $9,4 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato | $1,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato |
| | $Y_{P/S} = 2 \cdot 10^{-4}$ | $Y_{P/S} = 3,8 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento (d) | <i>knock-out</i> NDH1 y NDH2 | <i>knock-out</i> S7P_R5P_TKT y sobreexpresar EDA |
| | $9,4 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato | $1,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato |
| | $Y_{P/S} = 2 \cdot 10^{-4}$ | $Y_{P/S} = 3,8 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento (e) | <i>knock-out</i> NDH1 y NDH2 | <i>knock-out</i> S7P_R5P_TKT y sobreexpresar EDA |
| | $9,4 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato | $1,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato |
| | $Y_{P/S} = 2 \cdot 10^{-4}$ | $Y_{P/S} = 3,8 \cdot 10^{-5}$ |
| Crecimiento ideal | <i>knock-out</i> NDH1 y NDH2 | <i>knock-out</i> S7P_R5P_TKT y sobreexpresar EDA |
| | $9,4 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato | $1,7 \cdot 10^{-5}$ [mmol/s] de lactato |
| | $Y_{P/S} = 2 \cdot 10^{-4}$ | $Y_{P/S} = 3,8 \cdot 10^{-5}$ |

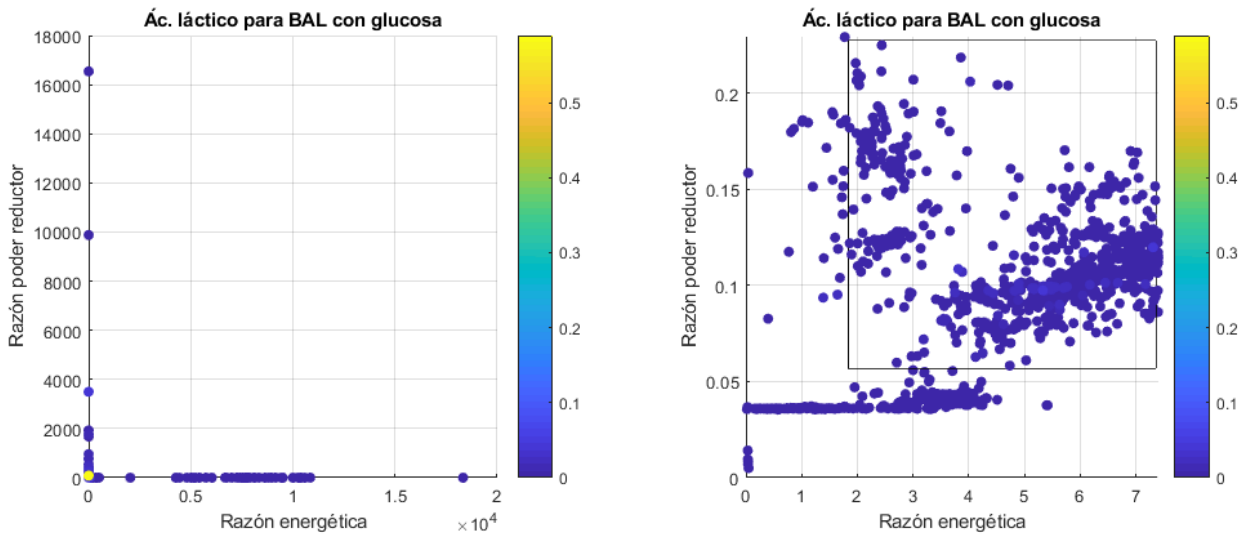


Figura 54. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido láctico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación con dos mutaciones, realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

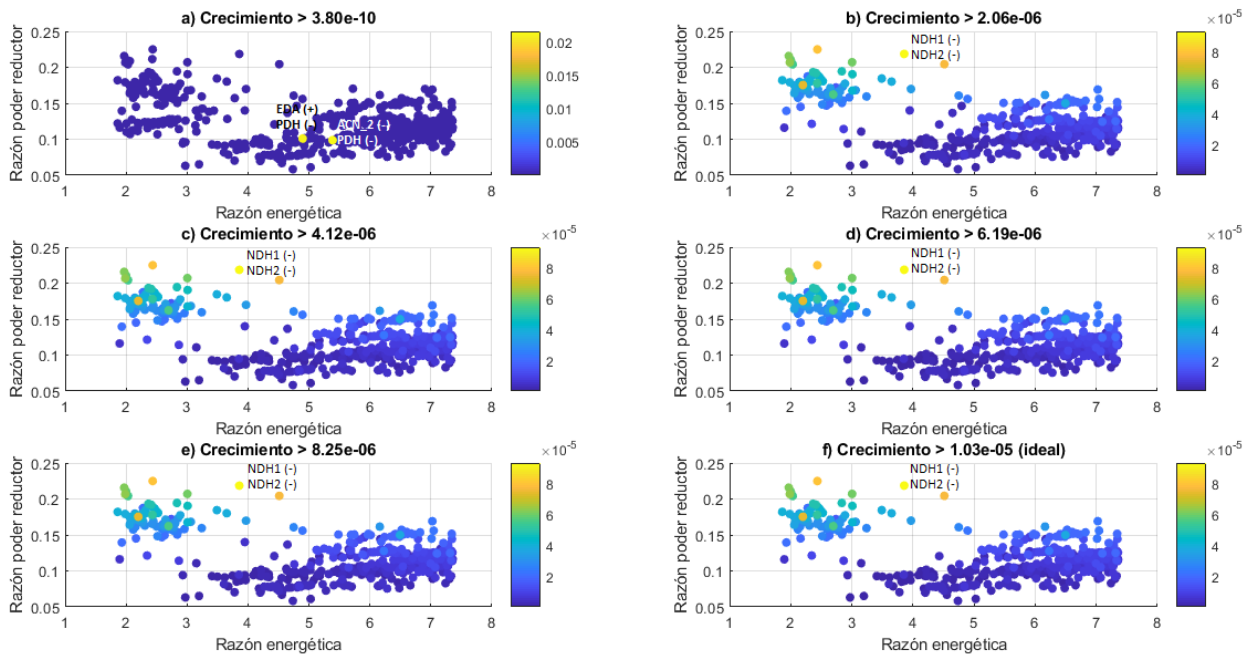


Figura 55. Gráficos de producción de ácido láctico en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

Para el caso de *M. pyrifer*, se observa en la Tabla 13 que se repite nuevamente el *knock-out* del citocromo CYTBO (cultivo anaeróbico), aunque esta vez combinado con el *knock-out* de la enzima ALDH, encargada de producir acetaldehído. Este resultado deja entrever que la producción de ácido láctico está inversamente relacionada con la generación de etanol, lo cual tiene sentido pues ambos compuestos fermentativos provienen de metabolitos cercanos en la glicólisis. Si bien esta combinación de mutaciones produce un flujo de etanol de casi 5 veces el del caso base con glucosa, hay que notar que, tal como se aprecia en la Figura 56 y Figura 57, en la región factible las producciones de ácido

láctico son tres órdenes de magnitud menores a este máximo, inclusive mejorando la capacidad de consumo del sustrato mediante la sobreexpresión de la enzima EDA y con el *knock-out* de la enzima S7P_R5P_TKT. Esto se puede explicar debido a que la *E. coli* cuando produce ácido láctico utiliza la vía homofermentativa [81], la cual generalmente depende de las concentraciones de metabolitos en glicólisis más que de la ruta de las pentosas, la ruta fosfoacetolasa (donde participa la transcetolasa S7P_R5P_TKT) o Entner-Doudoroff, utilizadas en las vías heterofermentativas de ácido láctico [82],[83].

Los trabajos en biología molecular hasta ahora para bacterias modificadas genéticamente para producir lactato desde sustratos distintos a glucosa, apuestan por mejorar las enzimas relativas a la asimilación del sustrato y hacer *knock-out* de las demás rutas de la vía fermentativa empleada por el microorganismo *chassis* [84],[85],[86] por lo que, en ese sentido, la sugerencia del modelo resulta coherente. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos de generación de ácido láctico a partir de *Macrocystis pyrifer* como sustrato, resulta técnicamente inviable su producción. Por lo mismo, no se seguirá probando más combinaciones de mutaciones para este caso.

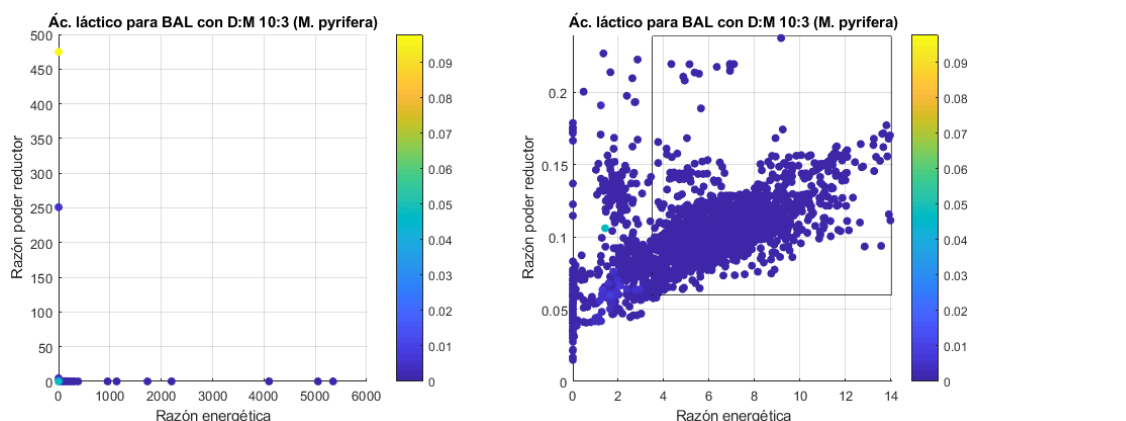


Figura 56. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido láctico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación con dos mutaciones, realizada con *M. pyrifer* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

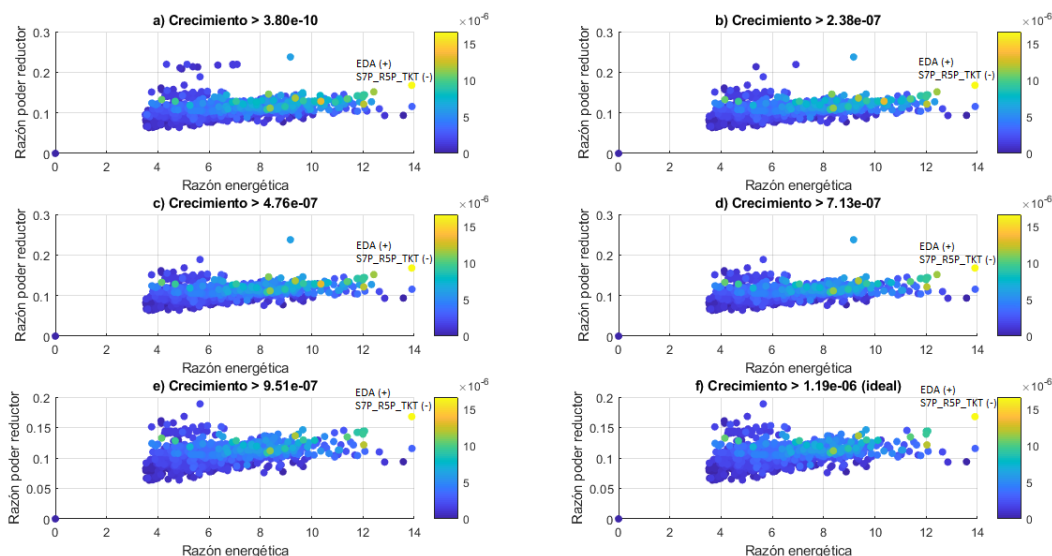


Figura 57. Gráficos de producción de ácido láctico en la zona de factibilidad biológica para *M. pyrifer*, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

6.2.2. Ácido succínico

6.2.2.1. Una mutación

Al igual que los casos con etanol y ácido láctico, se estudió la relación del poder reductor, la disponibilidad energética y el crecimiento, en este caso con respecto a la producción de ácido succínico, para descartar aquellas simulaciones que entreguen altas tasas de producción a costa de generar un gran estrés en la célula.

En la Tabla 14 se puede observar que, tanto para glucosa como para *M. pyrifera*, la mutación que produce mayor flujo de ácido succínico corresponde al *knock-out* de la enzima SDH, encargada de transformar succinato en fumarato. Esta mutación resulta lógica, pues redirigir completamente el flujo de succinato hacia la exportación de éste mejora la producción en cuatro órdenes de magnitud respecto al caso base de generación de succinato con glucosa, logrando un rendimiento de producto versus sustrato cercano a 1.

Tabla 14. Resumen de las mutaciones que entregan la mayor producción de ácido succínico para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento.

| Restricción | Glucosa | <i>M. pyrifera</i> |
|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Sin restricción | <i>knock-out</i> SDH | <i>knock-out</i> SDH |
| | 0,35 [mmol/s] de succinato | 0,34 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 0,99$ | $Y_{P/S} = 0,98$ |
| Crecimiento (a) | <i>knock-out</i> SDH | <i>knock-out</i> FUMA |
| | 0,35 [mmol/s] de succinato | 0,0065 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 0,99$ | $Y_{P/S} = 0,019$ |
| Crecimiento (b) | <i>knock-out</i> SDH | <i>knock-out</i> FUMA |
| | 0,35 [mmol/s] de succinato | 0,0065 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 0,99$ | $Y_{P/S} = 0,019$ |
| Crecimiento (c) | <i>knock-out</i> SDH | <i>knock-out</i> FUMA |
| | 0,35 [mmol/s] de succinato | 0,0065 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 0,99$ | $Y_{P/S} = 0,019$ |
| Crecimiento (d) | <i>knock-out</i> SDH | <i>knock-out</i> FUMA |
| | 0,35 [mmol/s] de succinato | 0,0065 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 0,99$ | $Y_{P/S} = 0,019$ |
| Crecimiento (e) | <i>knock-out</i> SDH | Sobreexpresar XCH_RMM_SUCp |
| | 0,35 [mmol/s] de succinato | 0,0056 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 0,99$ | $Y_{P/S} = 0,016$ |
| Crecimiento ideal | <i>knock-out</i> SDH | Sobreexpresar XCH_RMM_SUCp |
| | 0,35 [mmol/s] de succinato | 0,0056 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 0,99$ | $Y_{P/S} = 0,016$ |

Resulta interesante destacar también que, en la Tabla 14 y en la Figura 58 y Figura 59, se observa que al restringir el crecimiento para *M. pyrifera*, la producción de succinato disminuye en dos órdenes de magnitud; sin embargo, las mutaciones asociadas generan de todas formas mayores producciones al caso base con respecto a glucosa. La disminución en el rendimiento de producto al hacer el sistema más restrictivo permite

deducir una relación inversa entre crecimiento y producción de succinato. Para los casos más restrictivos de crecimiento, la mutación con mayor producción corresponde a la sobreexpresión del transportador de succinato al periplasma, lo cual tiene sentido si lo que se busca maximizar es el flujo de transporte al extracelular.

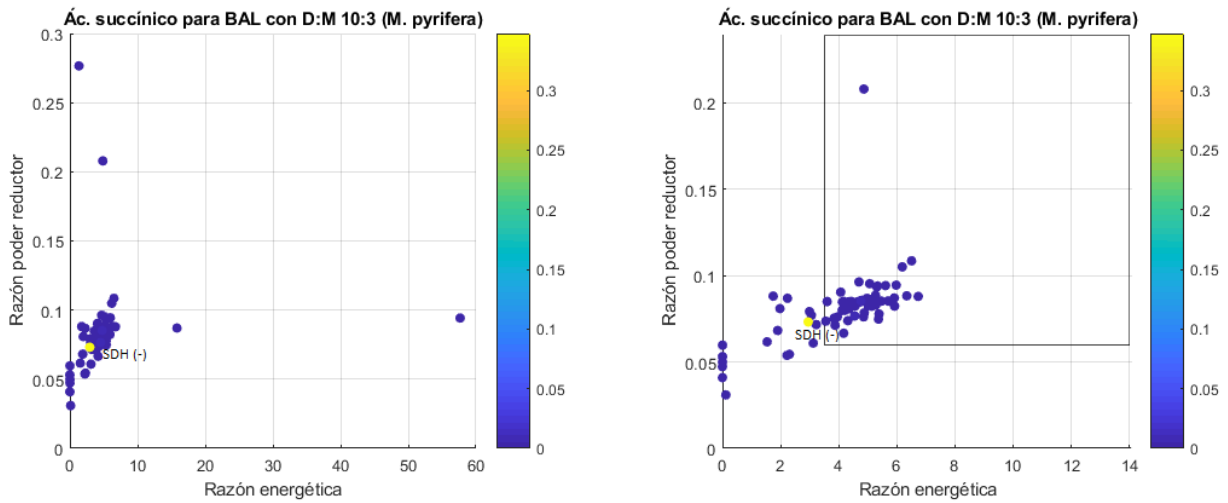


Figura 58. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido succínico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con *M. pyrifera* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

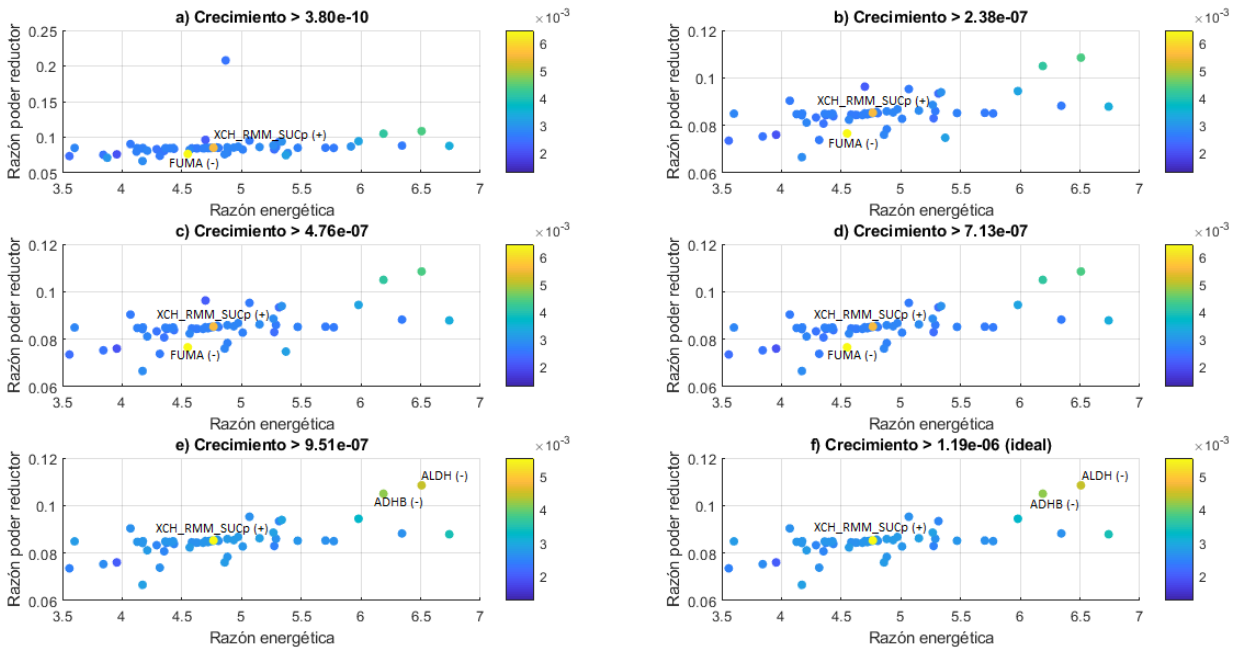


Figura 59. Gráficos de producción de ácido succínico en la zona de factibilidad biológica para *M. pyrifera*, para cada restricción en el crecimiento.

A partir de los gráficos (e) y (f) de la Figura 59 se puede deducir también que existe una relación inversamente proporcional entre la producción de succinato y etanol, ya que las mutaciones que generan la segunda y tercera mejor producción de ácido succínico corresponden precisamente a los *knock-out* del sistema de generación de etanol.

6.2.2.2. Dos mutaciones

Analizando los resultados de estas simulaciones, en la Tabla 15 se puede observar que, tanto para glucosa como para *M. pyrifera*, las mutaciones que producen mayor flujo de ácido succínico corresponden al *knock-out* de la enzima SDH (encargada de transformar succinato en fumarato) y la sobreexpresión del transportador de succinato al periplasma. Estas mutaciones resultan lógicas, pues redirigir completamente el flujo de succinato hacia la exportación de éste mejora la producción en cuatro órdenes de magnitud respecto al caso base de generación de succinato con glucosa. De hecho, para este sustrato, la combinación de mutaciones cumple con el requerimiento de crecimiento ideal.

Para el caso de *M. pyrifera*, al restringir el crecimiento se observa una disminución del flujo de succinato, lo que corrobora que existe una relación inversamente proporcional entre producir ácido succínico y el crecimiento. De todas formas, el flujo de producción en este caso sigue siendo 4 órdenes mayor al caso base de *E. coli* con glucosa. En este caso también, además del *knock-out* de la enzima SDH, se sugiere hacer *knock-out* de la ALDH, asociada al sistema de producción de etanol. Esta propuesta confirma los resultados obtenidos para una sola mutación, donde se observaba una relación inversamente proporcional entre la producción de succinato y etanol.

Tabla 15. Resumen de las dobles mutaciones que entregan la mayor producción de ácido succínico para cada sustrato, sujetas a distintas restricciones de crecimiento.

| Restricción | Glucosa | <i>M. pyrifera</i> |
|-------------------|---|---|
| Sin restricción | <i>knock-out</i> SDH y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp | <i>knock-out</i> SDH y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp |
| | 0,47 [mmol/s] de succinato | 0,47 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 1,34$ | $Y_{P/S} = 1,36$ |
| Crecimiento (a) | <i>knock-out</i> SDH y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp | <i>knock-out</i> SDH y ALDH |
| | 0,47 [mmol/s] de succinato | 0,36 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 1,34$ | $Y_{P/S} = 1,04$ |
| Crecimiento (b) | <i>knock-out</i> SDH y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp | <i>knock-out</i> SDH y ALDH |
| | 0,47 [mmol/s] de succinato | 0,36 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 1,34$ | $Y_{P/S} = 1,04$ |
| Crecimiento (c) | <i>knock-out</i> SDH y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp | <i>knock-out</i> SDH y ALDH |
| | 0,47 [mmol/s] de succinato | 0,36 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 1,34$ | $Y_{P/S} = 1,04$ |
| Crecimiento (d) | <i>knock-out</i> SDH y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp | <i>knock-out</i> SDH y ALDH |
| | 0,47 [mmol/s] de succinato | 0,36 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 1,34$ | $Y_{P/S} = 1,04$ |
| Crecimiento (e) | <i>knock-out</i> SDH y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp | <i>knock-out</i> SDH y ALDH |
| | 0,47 [mmol/s] de succinato | 0,36 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 1,34$ | $Y_{P/S} = 1,04$ |
| Crecimiento ideal | <i>knock-out</i> SDH y sobreexpresar XCH_RMM_SUCp | <i>knock-out</i> SDH y ALDH |
| | 0,47 [mmol/s] de succinato | 0,36 [mmol/s] de succinato |
| | $Y_{P/S} = 1,34$ | $Y_{P/S} = 1,04$ |

Por otra parte, en la Figura 60 se puede apreciar que existen varios puntos amarillos con producciones similares de ácido succínico a la obtenida con la combinación de mutaciones descrita en la Tabla 15 para *M. pyrifer*. Estas mutaciones son: (1) sobreexpresión de EDA y *knock-out* de SDH, (2) *knock-out* de SDH y ADHB, (3) *knock-out* de SDH y sobreexpresión de GLT, (4) *knock-out* de SDH y DOS (AMP a cAMP), (5) *knock-out* de SDH y sobreexpresión de CYA (ATP a cAMP), (6) *knock-out* de SDH y sobreexpresión de PIT (transporte de fosfatos), (7) *knock-out* de SDH y NDH2, (8) *knock-out* de SDH y ATP_MAIN. De estas combinaciones se desprende que puede existir un desbalance en la disponibilidad energética en la célula, al intentar mejorar la producción de succinato; sin embargo, y debido a que existen mutaciones con efectos inversos de generación/degradación de ATP, no resulta concluyente hacia dónde se encuentra desbalanceado el sistema.

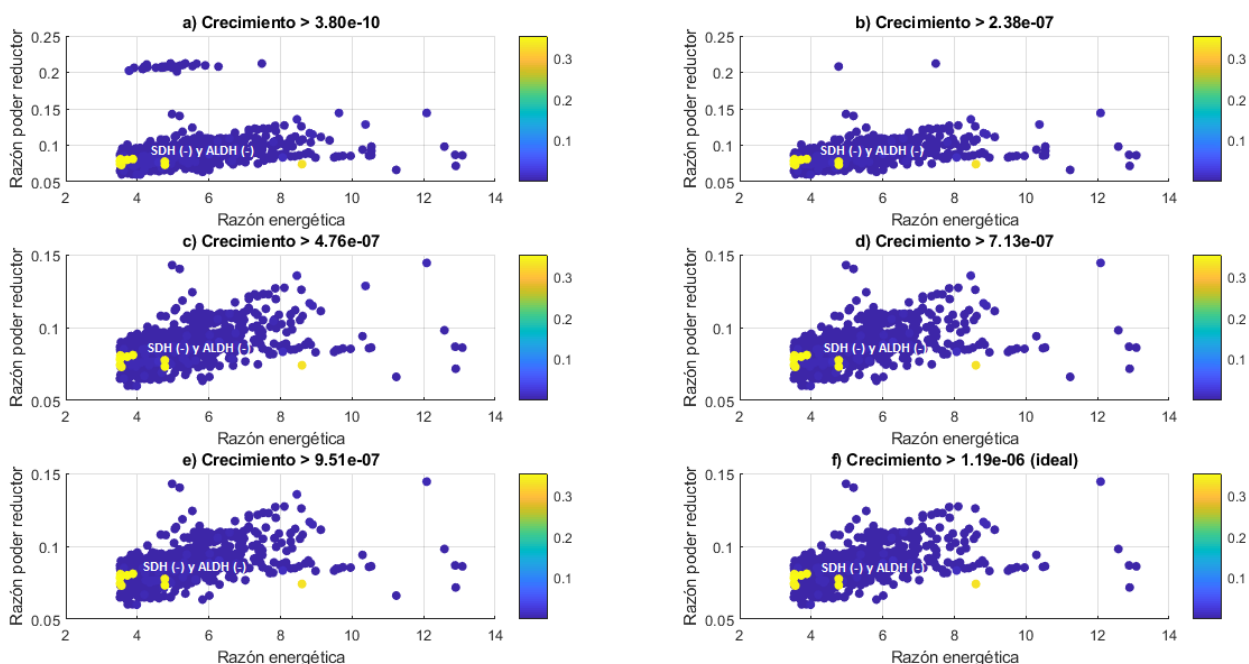


Figura 60. Gráficos de producción de ácido succínico en la zona de factibilidad biológica para *M. pyrifer*, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

6.2.2.3. Tres o más mutaciones

A partir de los resultados de las simulaciones con una y con dos mutaciones, se decide probar simultáneamente aquellas mutaciones que entregaban las mayores producciones para el caso de *M. pyrifer*. Por ello, se realizó las pruebas con *knock-out* de SDH y ALDH, y sobreexpresión de XCH_RMM_SUCp y EDA. Además, debido a que los flujos del transportador a periplasma son de aproximadamente el doble que los del transportador al extracelular en estas simulaciones, se decidió agregar dicho transportador de membrana como una quinta mutación.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16. En ella se puede ver que, si bien todas las combinaciones de mutaciones muestran factibilidad biológica, la combinación de cinco mutaciones tiene una producción de casi el doble de las otras, y corresponde a 62.000 veces la producción basal de succinato de la *E. coli* BAL1611 original. Según

literatura, una de las enzimas más relevantes en el control de la producción de succinato corresponde precisamente a la SDH, y en los estudios donde se ha realizado un *knock-out* de ella, se ha mejorado la producción de ácido succínico [87],[88]. Además, la sobreexpresión de los transportadores ayudarían a extraer el producto desde el extracelular con mayor facilidad, debido a la necesidad de una menor cantidad de etapas de separación. Por otra parte, si bien la sobreexpresión de EDA no genera aumentos en el rendimiento de producto, sí permite asimilar de mejor manera el sustrato y, por tanto, mejorar el crecimiento, disponibilidad energética y el balance del poder reductor. Por estos motivos, se sugiere que si se desea producir ácido succínico, se le realicen estas modificaciones a la bacteria para optimizar su producción a partir de *Macrocystis pyrifer*.

Tabla 16. Resumen de las simulaciones con tres o más mutaciones escogidas desde resultados previos, para producción de etanol a partir de *M. pyrifer* como sustrato.

| | -SDH +XCH_RMM_SUCp -ALDH | -SDH +XCH_RMM_SUCp +EDA | -SDH +XCH_RMM_SUCp -ALDH +EDA | -SDH +XCH_RMM_SUCp -ALDH +EDA+XCH_RMM_SUCx |
|--|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--|
| Succinato [mmol/s] | 0,469 | 0,469 | 0,47 | 0,818 |
| Y_{P/S} | 1,36 | 1,36 | 1,36 | 2,37 |
| Crecimiento [mmol/s] | 6,5*10 ⁻⁶ | 1,3*10 ⁻⁵ | 1,7*10 ⁻⁵ | 1,7*10 ⁻⁵ |
| | Factible | Factible | Factible | Factible |
| Razón de poder reductor | 0,079 | 0,072 | 0,081 | 0,081 |
| | Factible | Factible | Factible | Factible |
| Razón energética | 3,549 | 4,242 | 5,63 | 5,63 |
| | Factible | Factible | Factible | Factible |

6.3. Propuestas para mejorar la producción mediante biología sintética

A partir de los resultados de los apartados 6.1.6 y 6.2, se construye la Tabla 17 a modo de resumen de los rendimientos de producción para cada producto de interés. Tal como se puede apreciar, existen mutaciones genéticas que permitirían mejorar la producción de etanol y ácido succínico con respecto a la obtenida con la *E. coli* BAL1611 a partir de *Macrocystis pyrifer*, sin embargo, para el caso de ácido láctico esto no fue posible lograr. Cabe destacar también que para el caso de etanol, el mayor rendimiento de producto/sustrato se genera con glucosa.

Asimismo, analizando los datos de la Tabla 17 para *M. pyrifer* se puede deducir que, con este sustrato, *E. coli* BAL1611 es una gran productora de ácido succínico, productora regular de etanol, y una inadecuada alternativa para generar ácido láctico.

Tabla 17. Rendimientos de producto versus sustrato, para las mutaciones con mayor generación de cada producto dentro del espacio biológicamente factible.

| Sustrato | Etanol | Ácido láctico | Ácido succínico |
|--|--------|----------------------|----------------------|
| Glucosa (<i>E. coli</i> BAL1611 original) | 0,24 | 0,05 | 3,7*10 ⁻⁵ |
| Glucosa | 0,4 | 0,04 | 1,34 |
| DEHU | - | - | - |
| <i>M. pyrifer</i> (10:3 D:M) | 0,29 | 3,8*10 ⁻⁵ | 2,37 |
| 8:5 D:M | 0,29 | - | - |
| <i>S. japonica</i> (5:8 D:M) | 0,41 | - | - |
| 3:10 D:M | 0,24 | - | - |
| Manitol | 0,28 | - | - |

Por otra parte, tanto para etanol como para ácido succínico, se determina que existe una relación inversamente proporcional entre crecimiento y generación del producto en cuestión, por lo que se propone como solución para obtener mejores rendimientos disociar el crecimiento de la producción. Hace algunas décadas se descubrió un sistema de comunicación entre bacterias que, entre otras muchas señales de supervivencia, les permite censar la densidad poblacional de células y así inducir o reprimir la expresión de ciertos genes [89]. Este sistema, conocido como *quorum sensing*, se ha utilizado desde ese entonces en biología sintética para controlar la producción de algún metabolito de interés a partir de la concentración de moléculas como la homoseril-lactona (HSL), relacionada directamente con el crecimiento celular [90].

Por lo antes descrito, la generación de una etapa de crecimiento inicial y luego una de producción de etanol o succinato se puede llevar a cabo mediante el diseño de un circuito genético que cence la concentración de HSL producida por el cultivo para que de esta forma, cuando se alcance un estado estacionario y una alta concentración de la molécula, entonces se expresen los genes relacionados con la producción de etanol o succinato (propuestos en 6.1.6.3 y 6.2.2.3, respectivamente), dependiendo del caso.

Por su parte, la sobreexpresión de la enzima EDA se sugiere sea implementada mediante una expresión constitutiva, debido a que este cambio está asociado en mayor medida a la correcta degradación del sustrato, situación que favorece no solo la producción de algún metabolito específico, sino que también el crecimiento de la célula.

7. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN

Este trabajo de tesis tenía como principal objetivo mejorar el consumo de alginato y manitol presentes en las algas *Macrocystis pyrifera* chilenas, para la producción de bioetanol mediante el cultivo de *Escherichia coli* BAL1611. La hipótesis planteada para explicar el menor rendimiento de producto a partir de este sustrato correspondía a un desbalance en el poder reductor interno de la bacteria, por lo que se presumía que la intervención genética en las vías metabólicas de la bacteria *Escherichia coli* BAL1611 permitiría restablecer el estado *redox* interno, aumentar la disponibilidad de metabolitos de rutas anabólicas y optimizar la producción de bioetanol a partir del consumo de carbohidratos de *Macrocystis pyrifera*.

En primer lugar, es importante destacar que se logró construir un modelo cinético para *Escherichia coli* BAL1611, que permite estudiar los flujos y concentraciones de metabolitos de las rutas centrales del microorganismo, utilizando glucosa, manitol y/o DEHU como sustratos. A partir de los resultados obtenidos de las simulaciones del modelo se reveló que, a pesar de existir menores concentraciones de poder reductor en la bacteria en las fermentaciones de *M. pyrifera*, éstas no son las causantes de la menor producción de etanol. No obstante, mediante el estudio de las vías metabólicas centrales de *Escherichia coli* nativa y *E. coli* BAL1611 se determinó que, en la ruta de degradación de alginato, la enzima EDA se saturaba para concentraciones de este sustrato mayores a una proporción 5:8 con respecto a manitol (proporción de azúcares en el alga *Saccharina japonica*). La sobreexpresión de dicha enzima mejora la producción de etanol en un 50% para *M. pyrifera*, haciéndola comparable con la producción a partir de *S. japonica*, además de mejorar el crecimiento de la bacteria en un poco más de 5 veces.

Por otra parte, de este mismo análisis se puede concluir que, inclusive con glucosa, la generación de etanol es la causante de obtener menores crecimientos y disponibilidad energética. De igual manera, cuando se produce etanol a partir de mezclas de DEHU y manitol, se requiere igual o mayor energía para los procesos metabólicos, comparado con el caso de producción de etanol con glucosa. Además, el sentido del balance de poder reductor se invierte hacia la producción de NADH, para todos los casos donde hay generación de etanol, aunque a medida que hay más manitol en el medio se requiere menor esfuerzo de balance de poder reductor en la célula, asemejándose más al caso de la *E. coli* nativa.

Junto a ello, las reacciones anapleróticas y el ciclo de acetato toman relevancia para sustratos con mayor proporción de alginato, para suplir la carencia de concentraciones en los metabolitos del ciclo de Krebs, acetilCoA y piruvato. Por otro lado, se observa un aumento de los flujos en la ruta de las pentosas cuando hay mayor ingreso de manitol, a costa de un menor flujo en glicólisis.

Se puede concluir también que el alginato puro es un sustrato que genera menores rendimientos de biomasa que glucosa, debido a que las bajas concentraciones de metabolitos impiden que la célula crezca. Mientras tanto, el manitol resulta ser un mejor sustrato en cuanto a rendimiento de biomasa con respecto a glucosa. De hecho, los mejores sustratos son aquellos con mayor concentración de manitol, ya que muestran mayores rendimientos de producto y biomasa, y menores flujos de carbono destinados a mantenimiento celular.

También es importante concluir que la sobreexpresión de la enzima PFK y el *knock-out* del sistema de acetato, este último incluso en conjunto con la sobreexpresión de la enzima EDA, no muestran mejoras significativas con respecto a la producción de etanol de la *E. coli* BAL1611.

En la búsqueda de optimizar la producción de etanol, se concluye que el crecimiento y la producción de etanol poseen una relación inversamente proporcional. Además, los resultados indican que el cultivo anaeróbico generaría mayores producciones de etanol para cultivos con glucosa como sustrato, aunque en desmedro del crecimiento celular y la disponibilidad energética. Adicionalmente, para *M. pyrifer*a se obtiene que la sobreexpresión de EDA y ALDH junto con el *knock-out* de MQO es la combinación de mutaciones que genera el mayor rendimiento de producto versus sustrato, siendo aproximadamente el doble que para el caso de la *E. coli* BAL1611 sin mutaciones.

En cuanto al estudio de nuevos productos de interés comercial que se pueden generar desde la degradación por *Escherichia coli* BAL1611 del alginato y manitol presentes en *Macrocystis pyrifer*a, se concluye que para ácido láctico resulta técnicamente inviable su producción debido a los bajos rendimientos obtenidos. Con respecto al ácido succínico, se propone como combinación de mutaciones la sobreexpresión de la enzima EDA y el transporte de succinato, junto con el *knock-out* de SDH y ALDH, obteniendo un rendimiento 5 órdenes de magnitud mayor que el caso de la *E. coli* BAL1611 original.

Asimismo, comparando las producciones de etanol, ácido láctico y succínico queda de manifiesto que, para *Macrocystis pyrifer*a como sustrato, *E. coli* BAL1611 es una gran productora de ácido succínico, productora regular de etanol, y una inadecuada alternativa para generar ácido láctico.

Finalmente, como trabajo futuro, se propone implementar en laboratorio la sobreexpresión de la enzima EDA de forma constitutiva para mejorar el consumo de sustrato, mientras que las demás mutaciones respectivas para cada producto en un circuito genético que permita regular la producción mediante *quorum sensing*, a modo de disociar el crecimiento de la producción. Además, se sugiere reanalizar las ecuaciones de las velocidades enzimáticas planteadas en el modelo, para evaluar posibles mejoras que permitan describir de mejor manera el comportamiento de las enzimas, en diferentes escenarios para las concentraciones de los metabolitos que controlan sus cinéticas. Por último, y utilizando el modelo cinético mejorado, se sugiere implementar una plataforma que permita estudiar posibles desvíos de flujos en la célula sin perjudicar el balance de poder reductor, disponibilidad energética o crecimiento, con el fin de encontrar otros productos de interés comercial que puedan ser generados de forma óptima a partir de *Macrocystis pyrifer*a mediante la *E. coli* BAL1611.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ASHOKKUMAR, V., RAZMAN, M., SALAM, Z., SIVAKUMAR, P., TUNG, CH., ELUMALAI, S., SURESH, V. Y NASIR, F. 2017. Production of liquid biofuels (biodiesel and bioethanol) from Brown marine macroalgae *Padina tetrastromatica*. *Energy Conversion and Management* 135:351–361.
- [2] NAIK, S.N., GOUD, V., ROUT, P. Y DALAI, A. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:578–597.
- [3] LÜ, J., SHEAHANB, C. Y FU, P. 2011. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy and Environmental Science* 4:2451-2466.
- [4] DUTTA, K., DAVEREY, A. Y LIN, J. 2014. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy* 69:114-122.
- [5] ARESTA, M., DIBENEDETTO, A. Y BARBERIO, G. 2005. Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study. *Fuel Processing Technology* 86:1679– 1693.
- [6] WEI, N., QUARTERMAN, J. Y JIN, Y. 2013. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology* 31(2):70-77.
- [7] BUSCHMANN A.H., PRESCOTT S., POTIN P., FAUGERON S., VÁSQUEZ J.A., CAMUS C. 2014. The status of kelp exploitation and marine agronomy, with emphasis on *Macrocystis pyrifera*, in Chile. En: *Advances in Botanical Research*. Edición Jacquot JP y Gadal P (Serial Eds.) & Bourgougnon N (Serial Vol. Ed.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Ltd.
- [8] CORREA T., GUTIÉRREZ A., FLORES R., BUSCHMANN A.H., CORNEJO P. Y BUCAREY C. 2016. Production and economic assessment of giant kelp *Macrocystis pyrifera* cultivation for abalone feed in the south of Chile. *Aquacult Res* 47:698–707.
- [9] CAMUS, C. Y BUCSHMANN A.H. 2017. *Macrocystis pyrifera* aquafarming: Production optimization of rope-seeded juvenile sporophytes. *Aquaculture* 468(1):107–114.
- [10] WARGACKI A., LEONARD E., WIN M.N., REGITSKY D.D., SANTOS C.N.S., KIM P.B. 2012. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science* 335:308-313.
- [11] CAMUS, C., BALLERINO, P., DELGADO, R., OLIVERA-NAPPA, A., LEYTON, C. Y BUSCHMANN A.H. 2016. Scaling up bioethanol production from the farmed brown macroalgae *Macrocystis pyrifera* in Chile. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*
- [12] MILLARD, P., SMALLBONE, K., MENDES, P. 2017. Metabolic regulation is sufficient for global and robust coordination of glucose uptake, catabolism, energy production and growth in *Escherichia coli*. *PLOS Computational Biology* 13(2):1-24.
- [13] JANG, J., CHO, Y., JEONG, G., KIM, S. 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35:11-18.
- [14] MEZA, J. 2017. Bioconversión de carbohidratos de macroalgas pardas en ácido hialurónico utilizando una cepa de *Escherichia coli* recombinante. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Química y Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 129p.

- [15] DUGUET, J. 2017. Ingeniería metabólica en *Saccharomyces cerevisiae* para la degradación de alginato de sodio. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería, mención Ing. Química y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 216p.
- [16] MATSUOKA, F., HIRAYAMA, M., KASHIHARA, T., TANAKA, H., HASHIMOTO, W., MURATA, K. y KAWAI, S. 2017. Crucial role of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate reductase for alginate utilization revealed by adaptive evolution in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Scientific Reports* 7:4206.
- [17] KIM, S., BHATNAGAR, I. 2011. Chapter 7 - Physical, Chemical, and Biological Properties of Wonder Kelp—*Laminaria*. *Advances in Food and Nutrition Research* 64:85-96.
- [18] SEAWEED. The Seaweed Site: information on marine algae. Phaeophyceae: Brown Algae. [en línea] <<http://www.seaweed.ie/algae/phaeophyta.php>> [consulta: 01 septiembre 2018].
- [19] CHI, S., LIU, T. WANG, X., WANG, R., WANG, S., WANG, G., SHAN, G. LIU, C. 2018. Functional genomics analysis reveals the biosynthesis pathways of important cellular components (alginate and fucoidan) of *Saccharina*. *Current Genetics* 64(1):259-273.
- [20] HWANG, J., KIM, N., WOO, H. RHA, S., KIM, S., SHIN, T. 2014. Variation in the Chemical Composition of *Saccharina Japonica* with Harvest Area and Culture Period. *Journal of Aquaculture Research & Development* 5:286.
- [21] ROBINSON, N., WINBERG, P. y KIRKENDALE, L. 2013. Genetic improvement of macroalgae: status to date and needs for the future. *J Appl Phycol* 25:703–716.
- [22] GIBSON, R., ATKINSON, J., GORDON, J. 2007. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. Florida, EE. UU. CRC Press. Vol 45. 560p.
- [23] CAMUS, C. FAUGERON, S., BUSCHMANN A. 2018. Assessment of genetic and phenotypic diversity of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, to support breeding programs. *Algal Research* 30:101-112.
- [24] MCKEE, J., KAVALIERIS, L., BRASCH, D., BROWN, M., MELTON, L. 1992. Alginate content and composition of *Macrocystis pyrifera* from New Zealand. *Journal of Applied Phycology* 4:357-369.
- [25] LEYTON, C. 2015. Condiciones óptimas de fermentación de carbohidratos de algas pardas, mediante el uso de organismos genéticamente modificados. Memoria para optar al título de Ingeniera Civil en Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 118p.
- [26] ZIMMERMAN, R. y KREMER, J. 1986. In situ growth and chemical composition of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*: response to temporal changes in ambient nutrient availability. *Marine Ecology Progress Series* 27:277-285.
- [27] EDWARDS, J. y PALSSON, B. 1998. How will bioinformatics influence metabolic engineering? *John Wiley & Sons, Inc. Biotechnology and Bioengineering* 58:162-169.
- [28] FISCHER, H. P. 2008. *Mathematical Modeling of Complex Biological Systems. From Parts Lists to Understanding Systems Behavior*. *Alcohol Research Health* 31(1):49-59.
- [29] INGALLS, B. 2012. *Mathematical Modelling in Systems Biology: An Introduction*. Applied Mathematics, University of Waterloo.
- [30] TOMLIN, C. y AXELROD, J. 2007. Biology by numbers: mathematical modelling in developmental biology. *Nature Reviews Genetics* 8:331-340.

- [31] MOTTA, S. y PAPPALARDO, F. 2013. Mathematical modeling of biological systems. *Briefings in Bioinformatics* 14:411-422.
- [32] STALIDZANS, E., SEIMAN, A., PEEBO, K., KOMASILOVS, V., PENTJUSS, A. 2018. Model-based metabolism design: constraints for kinetic and stoichiometric models. *Biochemical Society Transactions* 1-7.
- [33] TERZER, M., MAYNARD, N., COVERT, M., STELLING, J. 2009. Genome-scale metabolic networks. John Wiley & Sons, Inc. *WIREs System Biology and Medicine* 1(3): 285-297.
- [34] REED, J. y PALSSON, B. 2003. Thirteen years of building constraint-based *in silico* models of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 185:2692–2699.
- [35] BLATTNER, F. R., PLUNKETT 3RD, G., BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F., GREGOR, J., DAVIS, N. W., KIRKPATRICK, H. A., GOEDEN, M. A., ROSE, D. J., MAU, B. Y SHAO, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474.
- [36] EDWARDS, J. y PALSSON, B. 2000. The *Escherichia coli* MG1655 *in silico* metabolic genotype: Its definition, characteristics, and capabilities. *PNAS* 97(10):5528-5533.
- [37] MONK, J. M., LLOYD, C. J., BRUNK, E., MIH, N., SASTRY, A., KING, Z., PALSSON, B. O. 2017. *ML1515*, a knowledgebase that computes *Escherichia coli* traits. *Nature Biotechnology* 35(10):904–908.
- [38] CHASSAGNOLE, C., NOISOMMIT-RIZZI, N., SCHMID, K., REUSS, M. 2002. Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. Wiley Periodicals, Inc. *Biotechnology and Bioengineering* 79:53-73.
- [39] KADIR, T. A. A., MANNAN, A. A., KIERZEK, A. M., MCFADDEN, J., SHIMIZU, K. 2010. Modeling and simulation of the main metabolism in *Escherichia coli* and its several single-gene knockout mutants with experimental verification. *Microbial Cell Factories* 9:88-109.
- [40] KOTTE, O., ZAUGG, J. B. y HEINEMANN, M. 2010. Bacterial adaptation through distributed sensing of metabolic fluxes. *Molecular Systems Biology* 6:355.
- [41] PESKOV, K., MOGILEVSKAYA, E. y DENIM, O. 2012. Kinetic modelling of central carbon metabolism in *Escherichia coli*. *The FEBS Journal* 279:3374-3385.
- [42] MATSUOKA, Y. y KURATA, H. 2017. Modeling and simulation of the redox regulation of the metabolism in *Escherichia coli* at different oxygen concentrations. *Biotechnology for Biofuels* 10:183.
- [43] JAHAN, N., MAEDA, K., MATSUOKA, Y., SUGIMOTO, Y, KURATA, H. 2016. Development of an accurate kinetic model for the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 15:112.
- [44] ANDRIANANTOANDRO, E., BASU, S., KARIG, D., WEISS, R. 2006. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *EMBO and Nature Publishing Group* 2:1-14.
- [45] BENNER, S. y SISMOUR, A. M. 2005. Synthetic biology. *Nature Reviews Genetics* 6(7):533–543.
- [46] IGEN. Registry of standard biological parts. [en línea] <<http://parts.igem.org/Catalog>> [consulta: 8 de octubre de 2018].
- [47] KHALIL, A. S. y COLLINS, J. J. 2010. Synthetic biology: applications come of age. *Nature Reviews Genetics* 11(5):367–379.

- [48] PURNICK, P. E. M. y WEISS, R. 2009. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(6):410–422.
- [49] KWOK, R. 2010. Five hard truths for synthetic biology. *Nature* 463:288-290.
- [50] BIDDY, M., SCARLATA, C. y KINCHIN, C. 2016. Chemicals from biomass: A market assessment of bioproducts with near-term potential. National Renewable Energy Laboratory, Denver, USA.
- [51] DATTA, R., y HENRY, M. 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(7):1119–1129.
- [52] ABDEL-RAHMAN, M. A., TASHIRO, y, & SONOMOTO, K. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6):877–902.
- [53] OKANO, K., TANAKA, T., OGINO, CH., FUKUDA, H. y KONDO, A. 2010. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(3):413-423.
- [54] CHENG, K.-K., ZHAO, X.-B., ZENG, J., y ZHANG, J.-A. 2012. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3):302–318.
- [55] BECHTHOLD, I., BRETZ, K., KABASCI, S., KOPITZKY, R., y SPRINGER, A. 2008. Succinic Acid: A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources. *Chemical Engineering & Technology*, 31(5):647–654.
- [56] CUKALOVIC, A., y STEVENS, C. V. 2008. Feasibility of production methods for succinic acid derivatives: a marriage of renewable resources and chemical technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(6):505–529.
- [57] SONG, H., y LEE, S. Y. 2006. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3):352–361.
- [58] COPASI. COPASI: Biochemical System Simulator. [en línea] <<http://copasi.org/Support/Features/>> [consulta: 4 de octubre de 2018].
- [59] MATHWORKS. Matlab. [en línea] <<https://la.mathworks.com/products/matlab.html>> [consulta: 4 de octubre de 2018].
- [60] MEYENBURG, H. 1969. Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose limited aerobic growth. *Archiv für Mikrobiologie* 66(4):289-303.
- [61] MATAR, S. EL-KAZZAZ, S., WAGIH, E., EL-DIWANY, A., MOUSTAFA, H., EL-SAADANI, M., ABO-ZAID, G., HAFEZ, E. Bioprocessing and Scaling-up Cultivation of *Bacillus subtilis* as a Potential Antagonist to Certain Plant Pathogenic Fungi, III. *Biotechnology*, 8: 138-143.
- [62] INGRAM, L., CONWAY, T., CLARK, D., SEWELL, G., PRESTON, J. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and environmental Microbiology* 5(10):2420-2425.
- [63] INGRAM, L. y CONWAY, T. 1987. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(2):397-404.
- [64] OHTA, K., BEALL, D., MEJIA, J., SHANMUGAM, K., INGRAM, L. 1990. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of

- Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. Applied and Environmental Microbiology 57(4):893-900.
- [65] KISER, R. y NIEHAUS, W. 1981. Purification and kinetic characterization of mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus niger*. Arch. Biochem. Biophys. 211(2):613-621.
- [66] SINGH, S. y ROGERS, P. 1993. Isolation and characterization of mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Brochothrix thermosphacta*. J. Gen. Appl. Microbiol. 39:327-337.
- [67] SUVARNA, K., BARTISS, A., WONG, B. 2000. Mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans* is a zinc-containing long-chain alcohol/polyol dehydrogenase. Microbiology 146:2705-2713.
- [68] BROWN, A. y BOWLES, R. 1977. Polyol metabolism by a caries-conductive *Streptococcus*: Purification and properties of a Nicotinamide Adenine Dinucleotide-dependent Mannitol 1-Phosphate Dehydrogenase. Infection and Immunity 16(1):163-173.
- [69] LISS, M., HORWITZ, S., KAPLAN, N. 1962. D-Mannitol 1-Phosphate dehydrogenase and D-Sorbitol 6-Phosphate Dehydrogenase in *Aerobacter aerogenes*. The Journal of Biological Chemistry 237(4):1342-1350.
- [70] KRAHULEC, S., ARMAO, G., BUBNER, P., KLIMACEK, M, NIDETZKY, B. 2009. Polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductases of mannitol metabolism in *Aspergillus fumigatus*: Biochemical characterization and pH studies of mannitol 2-dehydrogenase and mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase. Chemico-biological interactions 178:274-282.
- [71] CYNKIN, M. y ASHWELL, G. 1959. Uronic acid metabolism in bacteria. IV. Purification and properties of 2-keto-3-deoxy-d-gluconokinase in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 235(6):1576-1579.
- [72] BRENDA. Information on EC 2.7.1.45 - 2-dehydro-3-deoxygluconokinase and Organism(s) *Escherichia coli*. [en línea] <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.7.1.45&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Escherichia+coli&show_tm=0#UNIPROT> [consulta: 4 de octubre de 2018].
- [73] BRENDA. Information on EC 1.8.5.1 - glutathione dehydrogenase (ascorbate) [en línea] <[http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.8.5.1#KM%20VALUE%20\[mM\]](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.8.5.1#KM%20VALUE%20[mM])> [consulta: 6 de octubre de 2018].
- [74] BRENDA. Information on EC 1.1.1.365 - D-galacturonate reductase [en línea] <[http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.365#KM%20VALUE%20\[mM\]](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.365#KM%20VALUE%20[mM])> [consulta: 6 de octubre de 2018].
- [75] BRENDA. Information on EC 1.8.5.1 - glutathione dehydrogenase (ascorbate) [en línea] <[http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.8.5.1#TURNOVER%20NUMBER%20\[1/s\]](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.8.5.1#TURNOVER%20NUMBER%20[1/s])> [consulta: 6 de octubre de 2018].
- [76] BRENDA. Information on EC 1.1.1.365 - D-galacturonate reductase [en línea] <[http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.365#TURNOVER%20NUMBER%20\[1/s\]](http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.1.1.365#TURNOVER%20NUMBER%20[1/s])> [consulta: 6 de octubre de 2018].

- [77]TAHA, T. y DEITS, T. 1994. Purification and characterization of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Azotobacter vinelandii*: evidence that the enzyme is bifunctional towards 2-keto-4-hydroxyglutarate cleavage; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:459-466.
- [78]UNIPROT. UniProtKB - O54288 (KDGA_SULSF) [en línea] <<https://www.uniprot.org/uniprot/O54288>> [consulta: 6 de octubre de 2018].
- [79]SIEGERT, P., MCLEISH, M., BAUMANN, M., IDING, H., KNEEN, M., KENYON, G., POHL, M. 2005. Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Protein Engineering, Design & Selection* 18(7):345–357.
- [80]KINOSHITA, S., KAKIZONO, T., KADOTA, K., DAS, K., TAGUCHI, H. 1985. Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 22:249–254.
- [81]CHANG, D., JUNG, H., RHEE, J. y PAN, J. 1999. Homofermentative Production of D- or L-Lactate in Metabolically Engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4):1384-1389.
- [82]PATEL, M., OU, M., INGRAM, L. y SHANMUGAM, K.T. 2004. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to L(+)-lactic acid by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* 26:865–868.
- [83]SALVETTI, E., FONDI, M., FANI, R., TORRIANI, S. y FELIS, G. 2013. Evolution of lactic acid bacteria in the order *Lactobacillales* as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Systematic and Applied Microbiology* 36:291–305.
- [84]SHINKAWA, S., OKANO, K., YOSHIDA, S. et al. Improved homo l-lactic acid fermentation from xylose by abolishment of the phosphoketolase pathway and enhancement of the pentose phosphate pathway in genetically modified xylose-assimilating *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:1537.
- [85]KENJI, O., SHOGO, Y., TSUTOMU, T., CHIAKI, O., HIDEKI, F. y AKIHIKO, K. 2009. Homo-D-Lactic Acid Fermentation from Arabinose by Redirection of the Phosphoketolase Pathway to the Pentose Phosphate Pathway in L-Lactate Dehydrogenase Gene-Deficient *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol* 75(15):5175-5178.
- [86]DIEN, B., NICHOLS, N. y BOTHAST, R. 2001. Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27:259–264.
- [87]LEE, S., LEE, D., KIM, T., KIM, B., LEE, J. y LEE, S. 2005. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Enhanced Production of Succinic Acid, Based on Genome Comparison and In Silico Gene Knockout Simulation. *Applied And Environmental Microbiology* 71(12):7880–7887.
- [88]LIN, H., BENNETT, G. y SAN, K. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metabolic Engineering* 7(2):116-127.
- [89]MILLER, M. Y BASSLER, B. 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:165-199.
- [90]BASSLER, B. L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 2(6):582–587.

- [91] BIONUMBERS. Weight of an *Escherichia coli*. [en línea] <<http://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?&id=103905&ver=6>> [consulta: 4 de enero de 2018].
- [92] CELL BIOLOGY BY THE NUMBERS. What is the elemental composition of a cell? [en línea] <<http://book.bionumbers.org/what-is-the-elemental-composition-of-a-cell/>> [consulta: 23 de noviembre de 2018].

9. ANEXOS

9.1. Anexo A: Modelo de Millard et. al. (2017)

9.1.1. Ecuaciones diferenciales

$$\begin{aligned}d \frac{[ACCOA]}{dt} &= PDH - GLT - ACEB + ACS - PTA - 2118 * GROWTH \\d \frac{[ACO]}{dt} &= ACN_1 - ACN_2 \\d \frac{[ACP]}{dt} &= -ACK + PTA \\d \frac{[AKG]}{dt} &= ICD - LPD - 610 * GROWTH \\d \frac{[BPG]}{dt} &= GDH - PGK \\d \frac{[CIT]}{dt} &= GLT - ACN_1 \\d \frac{[DAP]}{dt} &= FBA - TPI \\d \frac{[E4P]}{dt} &= -F6P_E4P_TKT + S7P_E4P_TAL - 204 * GROWTH \\d \frac{[F6P]}{dt} &= PGI - PFK + F6P_E4P_TKT + F6P_GAP_TAL + FBP - 40 * GROWTH \\d \frac{[FDP]}{dt} &= PFK - FBP - FBA \\d \frac{[FUM]}{dt} &= SDH - FUMA \\d \frac{[G6P]}{dt} &= -PGI + \frac{PTS_4}{V_{cell}} - 116 * GROWTH - ZWF \\d \frac{[GAP]}{dt} &= X5P_GAP_TKT - F6P_GAP_TAL + FBA + TPI - GDH + EDA - 73 * GROWTH \\d \frac{[GL6P]}{dt} &= -PGL - GL6P_HYDROLYSIS + ZWF \\d \frac{[GLX]}{dt} &= ACEA - ACEB \\d \frac{[ICIT]}{dt} &= ACN_2 - ICD - ACEA \\d \frac{[KDPG]}{dt} &= EDD - EDA \\d \frac{[MAL]}{dt} &= -MAD + FUMA - MQO + MDH + ACEB \\d \frac{[NAD]}{dt} &= -MAD - PDH - LPD - GDH + \frac{NDH1}{V_{cell}} - PNT + NDH2 - 2004 * GROWTH \\d \frac{[NADH]}{dt} &= MAD + PDH + LPD + GDH - \frac{NDH1}{V_{cell}} + PNT - NDH2 + 2004 * GROWTH \\d \frac{[NADP]}{dt} &= -GND - ICD + PNT + 10169 * GROWTH - ZWF \\d \frac{[NADPH]}{dt} &= GND + ICD - PNT - 10169 * GROWTH + ZWF \\d \frac{[OAA]}{dt} &= PPC - PCK - GLT + MQO - MDH - 1010 * GROWTH \\d \frac{[PEP]}{dt} &= -PPC + PCK + PPS - PTS_0 - 293 * GROWTH + ENO - PYK \\d \frac{[PGA2]}{dt} &= GPM - ENO \\d \frac{[PGA3]}{dt} &= PGK - 845 * GROWTH - GPM \\d \frac{[PGN]}{dt} &= PGL - GND - EDD + GL6P_HYDROLYSIS \\d \frac{[PYR]}{dt} &= -PPS + MAD - PDH + EDA + PTS_0 - 1601 * GROWTH + PYK \\d \frac{[Q]}{dt} &= -MQO + MDH - \frac{NDH1}{V_{cell}} + 2 * \frac{CYTBO}{V_{cell}} - SQR - NDH2 \\d \frac{[QH2]}{dt} &= MQO - MDH + \frac{NDH1}{V_{cell}} - 2 * \frac{CYTBO}{V_{cell}} + SQR + NDH2 \\d \frac{[R5P]}{dt} &= RPI - S7P_R5P_TKT - 507 * GROWTH \\d \frac{[RUSP]}{dt} &= GND - RPE - RPI \\d \frac{[S7P]}{dt} &= S7P_R5P_TKT - S7P_E4P_TAL\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
d \frac{[SUC]}{dt} &= SK - SDH + ACEA \\
d \frac{[SUCCOA]}{dt} &= LPD - SK \\
d \frac{[X5P]}{dt} &= RPE - X5P_GAP_TKT \\
d \frac{[ei]}{dt} &= -PTS_0 + k1_PTS_1 * hpr * eiP - k2_PTS_1 * hprP * ei \\
d \frac{[eiP]}{dt} &= PTS_0 - k1_PTS_1 * hpr * eiP + k2_PTS_1 * hprP * ei \\
d \frac{[eiiA]}{dt} &= -k1_PTS_2 * eiiA * hprP + k2_PTS_2 * eiiAP * hpr + k1_PTS_3 * eiicb * eiiAP - k2_PTS_3 * eiicbP * eiiA \\
d \frac{[eiiAP]}{dt} &= k1_PTS_2 * eiiA * hprP - k2_PTS_2 * eiiAP * hpr - k1_PTS_3 * eiicb * eiiAP + k2_PTS_3 * eiicbP * eiiA \\
d \frac{[eiicb]}{dt} &= -k1_{PTS_3} * eiicb * eiiAP + k2_{PTS_3} * eiicbP * eiiA + \frac{PTS_4}{V_{cell}} \\
d \frac{[eiicbP]}{dt} &= k1_{PTS_3} * eiicb * eiiAP - k2_{PTS_3} * eiicbP * eiiA - \frac{PTS_4}{V_{cell}} \\
d \frac{[hpr]}{dt} &= -k1_PTS_1 * hpr * eiP + k2_PTS_1 * hprP * ei + k1_PTS_2 * eiiA * hprP - k2_PTS_2 * eiiAP * hpr \\
d \frac{[hprP]}{dt} &= k1_PTS_1 * hpr * eiP - k2_PTS_1 * hprP * ei - k1_PTS_2 * eiiA * hprP + k2_PTS_2 * eiiAP * hpr \\
d \frac{[icd]}{dt} &= -ACEK_1 + ACEK_2 \\
d \frac{[icdP]}{dt} &= ACEK_1 - ACEK_2 \\
d \frac{[tal]}{dt} &= F6P_GAP_TAL - S7P_E4P_TAL \\
d \frac{[talC3]}{dt} &= -F6P_GAP_TAL + S7P_E4P_TAL \\
d \frac{[tkt]}{dt} &= -X5P_GAP_TKT + F6P_E4P_TKT + S7P_R5P_TKT \\
d \frac{[tktC2]}{dt} &= X5P_GAP_TKT - F6P_E4P_TKT - S7P_R5P_TKT \\
d \frac{[ADP]}{dt} &= PFK + PCK - SK + ACEK_1 + 2 * ADK - \frac{ATP_SYN}{V_{cell}} - ACK - PGK + 30508 * GROWTH + \\
&ATP_MAIN - PYK \\
d \frac{[AMP]}{dt} &= PPS - ADK + DOS + ACS \\
d \frac{[ATP]}{dt} &= -PFK - PCK - PPS + SK - ACEK_1 - ADK + \frac{ATP_SYN}{V_{cell}} - CYA + ACK - ACS + PGK - 30508 * \\
&GROWTH - ATP_MAIN + PYK \\
d \frac{[CAMP]}{dt} &= CYA - DOS \\
d \frac{[P]}{dt} &= FBP + PPC + PPS - SK + ACEK_2 - GDH - \frac{ATP_SYN}{V_{cell}} + 2 * CYA + 2 * ACS - PTA + 30508 * \\
&GROWTH + ATP_MAIN + \frac{PIT}{V_{cell}} \\
d \frac{[MgADP]}{dt} &= 0 \\
d \frac{[MgATP]}{dt} &= 0 \\
d \frac{[MgFDP]}{dt} &= 0 \\
d \frac{[FAD]}{dt} &= -SDH + SQR \\
d \frac{[FADH2]}{dt} &= SDH - SQR \\
d \frac{[ACE]}{dt} &= ACK - ACS - \frac{XCH_RMM_ACE}{V_{cell}} \\
d \frac{[GLCx]}{dt} &= GLC_FEED - \frac{XCH_RMM_GLC}{V_{xcell}} \\
d \frac{[ACEx]}{dt} &= -k1_ACE_OUT * ACEx + \frac{XCH_RMM_ACEx}{V_{xcell}} \\
d \frac{[Hout]}{dt} &= \frac{4*NDH1 - 4*ATP_SYN + 8*CYTBO - PIT}{V_{peri}} \\
d \frac{[GLCp]}{dt} &= \frac{-PTS_4 + XCH_RMM_GLC}{V_{peri}} \\
d \frac{[Pp]}{dt} &= \frac{-PIT + XCH_RMM_P}{V_{peri}} \\
d \frac{[ACEp]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_ACE - XCH_RMM_ACEx}{V_{peri}}
\end{aligned}$$

9.1.2. Velocidades enzimáticas y sus parámetros

i. ACEA

$$KdICIT_{suc} = 0,00489074$$

$$KdPEP = 1,05105$$

$$KdPEP_{glx} = 0,0358555$$

$$KdPEP_{icit} = 0,164263$$

$$KdPGA3 = 0,8$$

$$KdSUC = 0,53053$$

$$K_{eq} = 8,8088$$

$$KmGLX = 0,13013$$

$$KmICIT = 0,063063$$

$$KmSUC = 0,58941$$

$$V_{max} = 1,52595$$

ACEA

$$ACEA = \frac{V_{max} * \frac{ICIT - GLX * \frac{SUC}{K_{eq}}}{KmICIT}}{1 + \frac{ICIT}{KmICIT} * \left(1 + \frac{PEP}{KdPEP_{icit}}\right) + \frac{SUC}{KdSUC} * \left(1 + \frac{ICIT}{KdICIT_{suc}}\right) + \frac{KmSUC}{KdSUC} * \left(\frac{GLX}{KmGLX}\right) * \left(1 + \frac{PEP}{KdPEP_{glx}}\right) + \frac{GLX}{KmGLX} * \left(\frac{SUC}{KdSUC}\right) + \frac{PEP}{KdPEP} + \frac{PGA3}{KdPGA3}}$$

ii. ACEB

$$K_{eq} = 230000$$

$$KmACCOA = 0,009$$

$$KmCOA = 10,5652$$

$$KmGLX = 0,021$$

$$KmMAL = 15,0572$$

$$V_{max} = 0,352769$$

$$ACEB = V_{max} * \frac{ACCOA * GLX - COA * \frac{MAL}{K_{eq}}}{KmACCOA * KmGLX} \left(1 + \frac{ACCOA}{KmACCOA}\right) * \left(1 + \frac{GLX}{KmGLX}\right) + \left(1 + \frac{COA}{KmCOA}\right) * \left(1 + \frac{MAL}{KmMAL}\right) - 1$$

iii. ACK

$$K_{eq} = 174$$

$$KmACE = 7$$

$$KmACP = 0,16$$

$$KmADP = 0,5$$

$$KmATP = 0,07$$

$$V_{max} = 7,23$$

$$ACK = V_{cell} * V_{max} * \frac{ACP * ADP - ACE * \frac{ATP}{K_{eq}}}{KmACP * KmADP} \left(1 + \frac{ACP}{KmACP} + \frac{ACE}{KmACE}\right) * \left(1 + \frac{ADP}{KmADP} + \frac{ATP}{KmATP}\right)$$

iv. ACEK_1

$$K_{eq} = 888$$

$$k = 1,25457$$

$$ACEK_1 = k * \left(ATP * icd - ADP * \frac{icdP}{K_{eq}}\right)$$

v. ACEK_2

Keq= 400

k= 0,0332

$$ACEK_2 = k * \left(icdP - P * \frac{icd}{Keq} \right)$$

vi. ACN_1

Keq= 0,384503

KmACO= 0,02001

KmCIT= 0,0628882

KmICIT= 9,31352

Vmax= 9,72413

$$ACN_1 = \frac{Vmax * \frac{CIT - \frac{ACO}{Keq}}{KmCIT}}{1 + \frac{CIT}{KmCIT} + \frac{ACO}{KmACO} + \frac{ICIT}{KmICIT}}$$

vii. ACN_2

Keq= 3,49183

KmACO= 0,02001

KmCIT= 0,0628882

KmICIT= 9,31352

Vmax= 9,86571

$$ACN_2 = \frac{Vmax * \frac{ACO - \frac{ICIT}{Keq}}{KmACO}}{1 + \frac{CIT}{KmCIT} + \frac{ACO}{KmACO} + \frac{ICIT}{KmICIT}}$$

viii. ACS

KmACE= 0,07

KmATP= 0,1

KmCOA= 0,01

Vmax= 7,3

$$ACS = \frac{Vcell * Vmax * ACE * ATP * \frac{COA}{KmACE * KmATP * KmCOA}}{\left(1 + \frac{ACE}{KmACE}\right) * \left(1 + \frac{ATP}{KmATP}\right) * \left(1 + \frac{COA}{KmCOA}\right)}$$

ix. ADK

Keq= 0,962758

k= 0,242256

$$ADK = k * \left(AMP * ATP - \frac{ADP^2}{Keq} \right)$$

x. ATP_MAIN

Vmax= 1,30166

Keq= 3,63369

$$ATP_MAIN = Vmax * \left(ATP - ADP * \frac{P}{Keq} \right)$$

xi. ATP_SYN

Vmax= 108,733

Keq= 49,8315

$$ATP_SYN = \left(Vmax * \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} \right)^4 \right) * \frac{ADP * P - \frac{ATP}{Keq}}{1 + \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} \right)^4}$$

xii. CYA

Keq= 2591,19

k= 0,00414418

KaeiiaP= 0,180981

$$CYA = \frac{k * \left(ATP - CAMP * \frac{P^2}{Keq} \right) * eiaP}{eiaP + KaeiiaP}$$

xiii. CYTBO

Vmax= 8,54045

Keq= 12,067

$$CYTBO = Vmax * \frac{QH2^2 * O_2 - \frac{Q^2}{Keq}}{1 + \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} \right)^2}$$

xiv. DOS

k= 0,00828

Keq= 674,242

$$DOS = k * \left(CAMP - \frac{AMP}{Keq} \right)$$

xv. EDA

Keq= 0,5

KmGAP= 86,678

KmKDPG= 0,06

KmPYR= 10

Vmax= 0,0775241

$$EDA = Vmax * \frac{\frac{KDPG - GAP * \frac{PYR}{Keq}}{KmKDPG}}{1 + \frac{KDPG}{KmKDPG} + \left(1 + \frac{GAP}{KmGAP}\right) * \left(1 + \frac{PYR}{KmPYR}\right) - 1}$$

xvi. EDD

Keq= 1000

KmKDPG= 0,318316

KmPGN= 0,6

Vmax= 0,111359

$$EDD = \frac{Vmax * \frac{PGN - \frac{KDPG}{Keq}}{KmPGN}}{1 + \frac{PGN}{KmPGN} + \frac{KDPG}{KmKDPG}}$$

xvii. ENO

Keq= 3

KmPEP= 0,1

KmPGA2= 0,1

Vmax= 11,7189

$$ENO = \frac{Vmax * \frac{PGA2 - \frac{PEP}{Keq}}{KmPGA2}}{1 + \frac{PGA2}{KmPGA2} + \frac{PEP}{KmPEP}}$$

xviii. F6P_E4P_TKT

Keq= 0,5005

kcat= 40,0002

$$F6P_E4P_TKT = kcat * \left(E4P * tktC2 - F6P * \frac{tkt}{Keq} \right)$$

xix. F6P_GAP_TAL

Keq= 0.11011

kcat= 119.992

$$F6P_GAP_TAL = kcat * \left(GAP * talC3 - F6P * \frac{tal}{Keq} \right)$$

xx. FBA

Keq= 0,18981

KmDAP= 0,13001

KmFDP= 0,12012

KmGAP= 0,13001

KmPEP= 0,5

Vmax= 21,6978

$$FBA = \frac{Vmax * \frac{FDP - DAP * \frac{GAP}{Keq}}{KmFDP}}{1 + \frac{FDP}{KmFDP} + \frac{DAP}{KmDAP} + DAP * \frac{GAP}{KmDAP * KmGAP} + \frac{PEP}{KmPEP}}$$

xxi. FBP

KirAMP= 0,00122122;

KirAMPFDP= 0,256256

KirF6P= 1,12112

KirF6PMg= 0,384615

KirFDP= 1,35327

KirFDPMg= 0,75924

KirFDPMgMg= 0,356356

KirP= 3,16316

KirPF6P= 6,60538

KirPF6PMg= 48,4484

KirPMg= 0,856

KitAMP= 0,000255

KitAMPFDP= 690

KitF6P= 0,304

KitF6PMg= 315

KitFDP= 0,043101

KitFDPMg= 0,00642

KitFDPMgMg= 100

KitP= 0,642

KitPF6P= 0,00689

KitPF6PMg= 16,5

KitPMg= 539

KmrFDP= 0,0636141

KmrMg= 0,039039

KmtFDP= 1,00E-05

KmtMg= 55,055

L0= 0,000815

Vmax= 0,215583

n= 4

KdFDPMg= 5,81

$$FBP = ((Vmax * n * MgFDP/KirFDPMg)/(1 + KmrFDP/KirFDP * (MG/KmrMg) + P/KirP + P/KirP * (MG/KirPMg) + F6P/KirF6P + F6P/KirF6P * (MG/KirF6PMg) + P/KirP * (F6P/KirPF6P) + P/KirP * (F6P/KirPF6P) * (MG/KirPF6PMg) + (FDP - MgFDP)/KirFDP + KdFDPMg/KmrMg * (MgFDP/KirFDP) + AMP/KirAMP + MgFDP/KirFDPMg + MgFDP/KirFDPMg * (MG/KirFDPMgMg) + AMP/KirAMP * ((FDP - MgFDP)/KirAMPFDP)))/(1 + L0 * ((1 + KmtFDP/KitFDP * (MG/KmtMg) + P/KitP + P/KitP * (MG/KitPMg) + F6P/KitF6P + F6P/KitF6P * (MG/KitF6PMg) + P/KitP * (F6P/KitPF6P) + P/KitP * (F6P/KitPF6P) * (MG/KitPF6PMg) + (FDP - MgFDP)/KitFDP + KdFDPMg/KmtMg * (MgFDP/KitFDP) + AMP/KitAMP + MgFDP/KitFDPMg + MgFDP/KitFDPMg * (MG/KitFDPMgMg) + AMP/KitAMP * ((FDP - MgFDP)/KitAMPFDP)))/(1 + KmrFDP/KirFDP * (MG/KmrMg) + P/KirP + P/KirP * (MG/KirPMg) + F6P/KirF6P + F6P/KirF6P * (MG/KirF6PMg) + P/KirP * (F6P/KirPF6P) + P/KirP * (F6P/KirPF6P) * (MG/KirPF6PMg) + (FDP - MgFDP)/KirFDP + KdFDPMg/KmrMg * (MgFDP/KirFDP) + AMP/KirAMP + MgFDP/KirFDPMg + MgFDP/KirFDPMg * (MG/KirFDPMgMg) + AMP/KirAMP * ((FDP - MgFDP)/KirAMPFDP)))^n)$$

xxii. FUMA

Keq= 4,99966

KmMAL= 0,7

KmFUM= 0,6

Vmax= 53,3414

$$FUMA = \frac{Vmax * \frac{FUM - \frac{MAL}{Keq}}{KmFUM}}{1 + \frac{FUM}{KmFUM} + \frac{MAL}{KmMAL}}$$

xxiii. GDH

Keq= 20

KmGAP= 2,47265

KmNADH= 3,69797

Vmax= 8,66573

KmBPG= 0,2

KmNAD= 0,0110454

KmP= 0,017

$$GDH = \frac{Vmax * \frac{P * GAP * NAD - BPG * \frac{NADH}{Keq}}{KmP * KmGAP * KmNAD}}{\left(1 + \frac{P}{KmP}\right) * \left(1 + \frac{GAP}{KmGAP}\right) * \left(1 + \frac{NAD}{KmNAD}\right) + \left(1 + \frac{BPG}{KmBPG}\right) * \left(1 + \frac{NADH}{KmNADH}\right) - 1}$$

xxiv. GL6P_HYDROLYSIS

KGl6Phydrol= 0,000167

KeqGl6Phydrol= 42,8

$$GL6P_{HYDROLYSIS} = KGl6Phydrol * \left(GL6P - \frac{PGN}{KeqGl6Phydrol} \right)$$

xxv. GLT

KdACCOA0= 0,699309

KdcsCOA= 0,00174282

Keq= 83067,1

Ki1NADH= 0,000330313

Ki2NADH= 0,0504

KmACCOA0= 0,119974

KmcsCIT= 1,15715

Vmax= 57,0584

KdcsCIT= 7,38128

KdcsOAA= 0,154601

Ki1AKG= 0,0150083

Ki2AKG= 0,256252

KiATP= 0,579939

KmOAA0= 0,00123458

KmcsCOA= 9,63E-05

$$\begin{aligned}
GLT = & (V_{max} * (ACCOA * OAA - CIT * COA/Keq)/(KdACCOA0 \\
& * KmOAA0))/(ACCOA/KdACCOA0 * (1 + AKG/Ki1AKG \\
& + NADH/Ki1NADH) + ACCOA/KdACCOA0 * (OAA/KmOAA0) * (1 \\
& + AKG/Ki2AKG + NADH/Ki2NADH) + (1 + ATP/KiATP) * (1 \\
& + KmACCOA0/KdACCOA0 * (OAA/KmOAA0)) + KmcsCOA/KdcsCOA \\
& * (CIT/KmcsCIT) + KmcsCOA/KdcsCOA * (ACCOA/KdACCOA0) \\
& * (CIT/KmcsCIT) + COA/KdcsCOA + CIT/KmcsCIT * (OAA/KmOAA0) \\
& + ACCOA/KdACCOA0 * (CIT/KdcsCIT) * (OAA/KmOAA0) \\
& + KmACCOA0/KdACCOA0 * (COA/KdcsCOA) * (OAA/KmOAA0) \\
& + CIT/KmcsCIT * (COA/KdcsCOA) * (OAA/KdcsOAA))
\end{aligned}$$

xxvi. GND

| | |
|------------------------|----------------------|
| KdHCO3= 58,8951 | KdHCO3NADPH= 9,7257 |
| KdNADP= 0,116989 | KdNADPH= 0,00340034 |
| KdRU5P= 0,0440044 | KefATP= 0,0650065 |
| KefFbP= 0,0129987 | KefNADPATP= 0,139986 |
| KefNADPFbP= 0,00519948 | Keq= 49,962 |
| KmHCO3= 6,41899 | KmNADP= 0,049 |
| KmNADPH= 68,3828 | KmPGN= 0,093 |
| KmRU5P= 45,1977 | Vmax= 4,08105 |

$$\begin{aligned}
GND = & (V_{max} * (NADP * PGN - NADPH * RU5P * HCO3/Keq)/(KdNADP \\
& * KmPGN))/(1 + NADP/KdNADP + FDP/KefFbP + NADP/KdNADP \\
& * (FDP/KefNADPFbP) + KmNADP/KdNADP * (PGN/KmPGN) \\
& + NADP/KdNADP * (PGN/KmPGN) + ATP/KefATP + ATP/KefNADPATP \\
& * (KmNADP/KdNADP) * (PGN/KmPGN) + HCO3/KdHCO3 \\
& + NADPH/KdNADPH + RU5P/KdRU5P + HCO3/KdHCO3 \\
& * (NADPH/KdHCO3NADPH) + HCO3/KdHCO3 \\
& * (KmNADPH/KdHCO3NADPH) * (RU5P/KmRU5P) + HCO3/KdHCO3 \\
& * (NADPH/KdHCO3NADPH) * (RU5P/KmRU5P) + KmHCO3/KdHCO3 \\
& * (NADPH/KdHCO3NADPH * (RU5P/KmRU5P)))
\end{aligned}$$

xxvii. GPM

| | |
|---------------|----------------|
| Keq= 0,565818 | KmPGA2= 1,9153 |
| KmPGA3= 0,115 | Vmax= 10,9934 |

$$GPM = \frac{V_{max} * \frac{PGA3 - \frac{PGA2}{Keq}}{KmPGA3}}{1 + \frac{PGA3}{KmPGA3} + \frac{PGA2}{KmPGA2}}$$

xxviii. GROWTH

$$V_{max} = 9,74137$$

$$K_{mE4P} = 1,63298$$

$$K_{mOAA} = 0,0248351$$

$$K_{mPYR} = 0,00463904$$

$$K_{mPEP} = 0,457734$$

$$K_{mF6P} = 0,366423$$

$$K_{mACCOA} = 0,0494404$$

$$K_{mATP} = 0,0468266$$

$$K_{mG6P} = 1,20911$$

$$K_{mPGA3} = 0,0764619$$

$$K_{mAKG} = 5,11989$$

$$K_{mR5P} = 0,021234$$

$$K_{mGAP} = 0,024854$$

$$K_{mNADPH} = 3,59774$$

$$K_{mNAD} = 2,82239$$

$$GROWTH = \frac{V_{max} * G6P * E4P * PGA3 * OAA * AKG * PYR * R5P * PEP * GAP * F6P * NADPH * ACCOA * NAD * ATP}{(K_{mG6P} * K_{mE4P} * K_{mPGA3} * K_{mOAA} * K_{mAKG} * K_{mPYR} * K_{mR5P} * K_{mPEP} * K_{mGAP} * K_{mF6P} * K_{mNADPH} * K_{mACCOA} * K_{mNAD} * K_{mATP}) * ((1 + G6P/K_{mG6P}) * (1 + E4P/K_{mE4P}) * (1 + PGA3/K_{mPGA3}) * (1 + OAA/K_{mOAA}) * (1 + AKG/K_{mAKG}) * (1 + PYR/K_{mPYR}) * (1 + R5P/K_{mR5P}) * (1 + PEP/K_{mPEP}) * (1 + GAP/K_{mGAP}) * (1 + F6P/K_{mF6P}) * (1 + NADPH/K_{mNADPH}) * (1 + ACCOA/K_{mACCOA}) * (1 + NAD/K_{mNAD}) * (1 + ATP/K_{mATP}))}$$

xxix. ICD

$$K_{eq} = 28,1631$$

$$K_{mICIT} = 0,010989$$

$$K_{mNADPH} = 0,000683333$$

$$K_{mAKG} = 0,038038$$

$$K_{mNADP} = 0,005994$$

$$k_{cat} = 2461,97$$

$$ICD = \frac{icd * k_{cat} * \frac{ICIT * NADP - AKG * \frac{NADPH}{K_{eq}}}{K_{mICIT} * K_{mNADP}}}{\left(1 + \frac{ICIT}{K_{mICIT}}\right) * \left(1 + \frac{NADP}{K_{mNADP}}\right) + \left(1 + \frac{AKG}{K_{mAKG}}\right) * \left(1 + \frac{NADPH}{K_{mNADPH}}\right) - 1}$$

xxx. LPD

$$K_dAKG = 14,9386$$

$$K_{mCOA} = 0,0760076$$

$$V_{max} = 0,0684413$$

$$K_{mAKG} = 0,020002$$

$$K_{mNAD} = 0,0980098$$

$$\alpha = 16,4304$$

$$\begin{aligned}
LPD = Vmax * COA * AKG * NAD * (1 - AKG/KdAKG) / & (KmCOA * KmAKG \\
& * KmNAD) / (COA/KmCOA * (AKG/KmAKG) + COA/KmCOA \\
& * (NAD/KmNAD) + AKG/KmAKG * (NAD/KmNAD) + COA/KmCOA \\
& * (AKG/KmAKG) * (NAD/KmNAD) - AKG/KdAKG * (COA/KmCOA \\
& * (AKG/KmAKG) + AKG/KmAKG * (NAD/KmNAD) + alpha \\
& * (COA/KmCOA) * (AKG/KmAKG) * (NAD/KmNAD)))
\end{aligned}$$

xxx. MAD

$$KefrACCOA = 1,83336$$

$$KefrASP = 0,362142$$

$$KefrATP = 88,9752$$

$$KefrCOA = 0,268$$

$$KeftACCOA = 0,197$$

$$KeftASP = 0,583$$

$$KeftATP = 0,26$$

$$KeftCOA = 0,268$$

$$KirNAD = 0,636457$$

$$KitNAD = 0,990398$$

$$KmrMAL = 0,212913$$

$$KmrMg = 0,191871$$

$$KmrMn = 0,272568$$

$$KmrNAD = 1,36636$$

$$KmtMAL = 0,093$$

$$KmtMg = 2,37681$$

$$KmtMn = 0,410198$$

$$KmtNAD = 0,108$$

$$L0 = 19,9$$

$$Vmax = 6,64269$$

$$n = 4$$

$$\begin{aligned}
MAD = Vmax * n * MAL * NAD / (KmrMAL * KirNAD) / & (1 + KmrNAD / KirNAD \\
& * (MAL / KmrMAL) + NAD / KirNAD + MAL / KmrMAL * (NAD / KirNAD)) \\
& * ((MG / KmrMg + MN / KmrMn) / (1 + MG / KmrMg + MN / KmrMn)) / (1 \\
& + L0 * ((1 + ASP / KeftASP) * (1 + MG / KmtMg + MN / KmtMn) * (1 \\
& + ATP / KeftATP) * (1 + ACCOA / KeftACCOA + COA / KeftCOA) * (1 \\
& + KmtNAD / KitNAD * (MAL / KmtMAL) + NAD / KitNAD + MAL / KmtMAL \\
& * (NAD / KitNAD)) / ((1 + ASP / KefrASP) * (1 + MG / KmrMg \\
& + MN / KmrMn) * (1 + ATP / KefrATP) * (1 + ACCOA / KefrACCOA \\
& + COA / KefrCOA) * (1 + KmrNAD / KirNAD * (MAL / KmrMAL) \\
& + NAD / KirNAD + MAL / KmrMAL * (NAD / KirNAD))))^n
\end{aligned}$$

xxxii. MDH

$$Keq = 100000$$

$$KiNAD = 0,0233122$$

$$KiNADH = 0,000196981$$

$$KiOAA = 2,46446$$

$$KmMAL = 0,86$$

$$KmNAD = 0,64$$

$$KmNADH = 0,003$$

$$KmOAA = 0,001$$

$$Vmax = 6,11492$$

$$\begin{aligned}
MDH = Vmax * (NADH * OAA - MAL * NAD/Keq) / & (KiNADH * KmOAA) / (1 \\
& + KmNAD/KiNAD * (MAL/KmMAL) + NAD/KiNAD + MAL/KmMAL \\
& * (NAD/KiNAD) + NADH/KiNADH + KmNAD/KiNAD * (MAL/KmMAL) \\
& * (NADH/KiNADH) + KmNADH/KiNADH * (OAA/KmOAA) \\
& + KmNADH/KiNADH * (NAD/KiNAD) * (OAA/KmOAA) + MAL * NAD \\
& * OAA / (KiNAD * KiOAA * KmMAL) + NADH/KiNADH * (OAA/KmOAA) \\
& + Keq * (KiNADH * KmOAA / (KiNAD * KmMAL)) * (KmNAD/KiNAD) \\
& * (MAL/KmMAL) * (NADH/KmNADH) * (OAA/KiOAA))
\end{aligned}$$

xxxiii. MQO

$$Keq = 9$$

$$KmMAL = 0,435$$

$$KmOAA = 75,8036$$

$$KmQ = 0,0414$$

$$KmQH2 = 8,77942$$

$$Vmax = 4,62283$$

$$MQO = \frac{Vmax * \frac{MAL * Q - OAA * \frac{QH2}{Keq}}{KmMAL * KmQ}}{\left(1 + \frac{MAL}{KmMAL}\right) * \left(1 + \frac{Q}{KmQ}\right) + \left(1 + \frac{OAA}{KmOAA}\right) * \left(1 + \frac{QH2}{KmQH2}\right) - 1}$$

xxxiv. NDH1

$$Vmax = 23,0735$$

$$Keq = 27,6193$$

$$NDH1 = Vmax * \frac{NADH * Q - NAD * \frac{QH2}{Keq}}{1 + \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)}\right)^2}$$

xxxv. NDH2

$$Vmax = 30,8306$$

$$Keq = 27,6193$$

$$NDH2 = Vmax * \left(NADH * Q - NAD * \frac{QH2}{Keq}\right)$$

xxxvi. PCK

$$Keq = 1,88166$$

$$KmADP = 0,04997$$

$$KmATP = 0,0600418$$

$$KmHCO3 = 2,6319$$

$$KmOAA = 0,66966$$

$$KmPEP = 0,0699833$$

$$Vmax = 8,08777$$

$$PCK = Vmax * (MgATP * OAA - HCO3 * MgADP * PEP/Keq)/(KmATP * KmOAA)/(1 + HCO3/KmHCO3 + HCO3/KmHCO3 * (ADP/KmADP) + MgADP/KmADP + MgATP/KmATP + OAA/KmOAA + MgATP/KmATP * (OAA/KmOAA) + HCO3/KmHCO3 * (PEP/KmPEP) + PEP/KmPEP + HCO3/KmHCO3 * (MgADP/KmADP) * (PEP/KmPEP) + MgADP/KmADP * (PEP/KmPEP))$$

xxxvii. PDH

Keq= 3138,16

KmACCOA= 10,174

KmCOA= 0,00500461

KmHCO3= 0,00545112

KmNAD= 0,00999

KmNADH= 6,63512

KmPYR= 2

Vmax= 961,706

$$PDH = Vmax * (COA * NAD * PYR - ACCOA * NADH * HCO3/Keq)/(KmCOA * KmNAD * KmPYR)/(ACCOA/KmACCOA + NADH/KmNADH + ACCOA/KmACCOA * (NADH/KmNADH) + COA/KmCOA * (NADH/KmNADH) + ACCOA/KmACCOA * (COA/KmCOA) * (NADH/KmNADH) + NAD/KmNAD * (NADH/KmNADH) + COA/KmCOA * (NAD/KmNAD) * (NADH/KmNADH) + ACCOA/KmACCOA * (PYR/KmPYR) + ACCOA/KmACCOA * (COA/KmCOA) * (PYR/KmPYR) + COA/KmCOA * (1 + NAD/KmNAD) * (PYR/KmPYR) + NAD/KmNAD * (1 + COA/KmCOA + PYR/KmPYR))/(1 + HCO3/KmHCO3)$$

xxxviii. PFK

KefrADP= 0,0735264

KefrPEP= 19,98

KeftADP= 9,009

KeftPEP= 0,26026

Keq= 1998

KirADP= 54,945

KirATP= 2,50E-05

KirF6P= 1,84615

KirFDP= 0,045954

KitADP= 80,08

KitATP= 0,014014

KitF6P= 0,00856856

KitFDP= 50,5505

KmrADP= 0,690009

KmrATPMg= 8,12E-05

KmrF6P= 2,05E-05

KmrFDP= 10,01

KmtADP= 2,002

KmtATPMg= 3,34334

KmtF6P= 32,967

KmtFDP= 9,99

L0= 14,0851

Vmax= 0,185253

Wr= 0,0237041

Wt= 0,146735

n= 4

$$\begin{aligned}
PFK = Vmax * n * (MgATP * F6P - MgADP * FDP/Keq)/(KirF6P * KmrATPMg)/(1 \\
+ KmrFDP/KirFDP * (MgADP/KmrADP) + KmrF6P/KirF6P \\
* (MgATP/KmrATPMg) + KmrFDP/KirFDP * (MgADP/KmrADP) \\
* (F6P/KirF6P) + MgATP/KmrATPMg * (F6P/KirF6P) \\
+ MgADP/KirADP * (MgATP/KmrATPMg) * (F6P/KirF6P) + (1 + (ATP \\
- MgATP)/KirATP) * (F6P/KirF6P) + FDP/KirFDP + MgADP/KmrADP \\
* (FDP/KirFDP) + KmrF6P/KirF6P * (MgATP/KmrATPMg) \\
* (FDP/KirFDP) + Wr * (KmrF6P/KirF6P) * (MgADP/KirADP) \\
* (MgATP/KmrATPMg) * (FDP/KmrFDP))/(1 + L0 * ((1 \\
+ KmtFDP/KitFDP * (MgADP/KmtADP) + KmtF6P/KitF6P \\
* (MgATP/KmtATPMg) + KmtFDP/KitFDP * (MgADP/KmtADP) \\
* (F6P/KitF6P) + MgATP/KmtATPMg * (F6P/KitF6P) + MgADP/KitADP \\
* (MgATP/KmtATPMg) * (F6P/KitF6P) + (1 + (ATP - MgATP)/KitATP) \\
* (F6P/KitF6P) + FDP/KitFDP + MgADP/KmtADP * (FDP/KitFDP) \\
+ KmtF6P/KitF6P * (MgATP/KmtATPMg) * (FDP/KitFDP) + Wt \\
* (KmtF6P/KitF6P) * (MgADP/KitADP) * (MgATP/KmtATPMg) \\
* (FDP/KmtFDP)) * (1 + MgADP/KeftADP + PEP/KeftPEP \\
+ MgADP/KeftADP * (PEP/KeftPEP))/((1 + KmrFDP/KirFDP \\
* (MgADP/KmrADP) + KmrF6P * MgATP/(KirF6P * KmrATPMg) \\
+ KmrFDP/KirFDP * (MgADP/KmrADP) * (F6P/KirF6P) \\
+ MgATP/KmrATPMg * (F6P/KirF6P) + MgADP/KirADP \\
* (MgATP/KmrATPMg) * (F6P/KirF6P) + (1 + (ATP - MgATP)/KirATP) \\
* (F6P/KirF6P) + FDP/KirFDP + MgADP/KmrADP * (FDP/KirFDP) \\
+ KmrF6P/KirF6P * (MgATP/KmrATPMg) * (FDP/KirFDP) + Wr \\
* (KmrF6P/KirF6P) * (MgADP/KirADP) * (MgATP/KmrATPMg) \\
* (FDP/KmrFDP)) * (1 + MgADP/KefrADP + PEP/KefrPEP \\
+ MgADP/KefrADP * (PEP/KefrPEP))))^n)
\end{aligned}$$

xxxix. PGI

$$Keq = 0,36$$

$$KmG6P = 0,28$$

$$Vmax = 2,32456$$

$$KmF6P = 0,147$$

$$KmPEP = 1,999$$

$$KmPGN = 0,515958$$

$$PGI = \frac{Vmax * \frac{G6P - \frac{F6P}{Keq}}{KmG6P}}{1 + \frac{F6P}{KmF6P} + \frac{G6P}{KmG6P} + \frac{PEP}{KmPEP} + \frac{PGN}{KmPGN}}$$

xl. PGK

$$K_{eq} = 99,9925$$

$$K_{mATPMg} = 3,47737$$

$$K_{mPGA3} = 2,45722$$

$$K_{mADPMg} = 0,085416$$

$$K_{mBPG} = 0,0113296$$

$$V_{max} = 16,1089$$

$$PGK = \frac{(V_{max} * (MgADP * BPG - MgATP * PGA3 / K_{eq})) / (K_{mADPMg} * K_{mBPG})}{(1 + MgADP / K_{mADPMg} + BPG / K_{mBPG} + (MgADP * BPG / K_{mADPMg}) / K_{mBPG} + MgATP / K_{mATPMg} + PGA3 / K_{mPGA3} + (MgATP * PGA3 / K_{mATPMg}) / K_{mPGA3})}$$

xli. PGL

$$K_{eq} = 42,7572$$

$$K_{mGL6P} = 0,022977$$

$$V_{max} = 11,5967$$

$$K_{iG6P} = 2,0001$$

$$K_{mPGN} = 9,99$$

$$PGL = \frac{V_{max} * \frac{GL6P - \frac{PGN}{K_{eq}}}{K_{mGL6P}}}{1 + \frac{GL6P}{K_{mGL6P}} + \frac{PGN}{K_{mPGN}} + \frac{G6P}{K_{iG6P}}}$$

xlii. PIT

$$V_{max} = 7,146$$

$$K_{mPp} = 0,025$$

$$K_{mP} = 12,18$$

$$K_r = 0,1$$

$$PIT = V_{max} * \left(\frac{\left(\frac{\log\left(\frac{H_{out}}{H_{in}}\right)}{\log(10)} \right)^2}{\left(1 + \left(\frac{\log\left(\frac{H_{out}}{H_{in}}\right)}{\log(10)} \right)^2 \right) * (K_{mPp} + Pp)} - K_r * \frac{P}{\left(1 + \left(\frac{\log\left(\frac{H_{out}}{H_{in}}\right)}{\log(10)} \right)^2 \right) * (K_{mP} + P)} \right)$$

xliii. PNT

$$K_{eq} = 0,181891$$

$$k = 2,49441$$

$$PNT = k * \left(NAD * NADPH - NADH * \frac{NADP}{K_{eq}} \right)$$

xliv. PPC

| | |
|-----------------------|-------------------------|
| KdrOAA= 4,35404 | KdrPEP= 655,591 |
| KdtOAA= 17,9127 | KdtPEP= 0,0121991 |
| KefrACCOA= 0,140029 | KefrASP= 0,389183 |
| KefrCIT= 34,4277 | KefrCYS= 0,000448843 |
| KefrFDP= 9,99126 | KefrFDPACCOA= 0,0156251 |
| KefrFUM= 2,7475 | KefrMAL= 0,23002 |
| KefrSUC= 22,9834 | KeftACCOA= 1,27598 |
| KeftASP= 27,4729 | KeftCIT= 0,521945 |
| KeftCYS= 0,977374 | KeftFDP= 13,2064 |
| KeftFDPACCOA= 47,7563 | KeftFUM= 9,76119 |
| KeftMAL= 0,737283 | KeftSUC= 107,18 |
| Keq= 149,705 | KmrHCO3= 0,00219811 |
| KmrOAA= 13,0469 | KmrP= 0,663356 |
| KmrPEP= 3,20089 | KmtHCO3= 0,00220031 |
| KmtOAA= 6,80995 | KmtP= 0,285131 |
| KmtPEP= 5,12497 | L0= 6,37E-06 |
| Vmax= 21,439 | n= 4,00319 |

$$\begin{aligned}
 PPC = Vmax * n * (PEP * HCO3 - OAA * P / Keq) / & (KdrPEP * KmrHCO3) / (1 \\
 + KmrPEP / KdrPEP * (HCO3 / KmrHCO3) + KmrOAA / KdrOAA & \\
 * (P / KmrP) + OAA / KdrOAA + P / KmrP * (OAA / KdrOAA) & \\
 + HCO3 / KmrHCO3 * (PEP / KdrPEP) + PEP / KdrPEP) / & (1 + L0 * ((1 \\
 + ACCOA / KeftACCOA + FDP / KeftFDP + FDP / KeftFDP & \\
 * (ACCOA / KeftFDPACCOA)) * (1 + KmtPEP / KdtPEP * (HCO3 / KmtHCO3) & \\
 + KmtOAA / KdtOAA * (P / KmtP) + OAA / KdtOAA + P / KmtP & \\
 * (OAA / KdtOAA) + HCO3 / KmtHCO3 * (PEP / KdtPEP) + PEP / KdtPEP) & \\
 * (1 + ASP / KeftASP + CYS / KeftCYS + CIT / KeftCIT + FUM / KeftFUM & \\
 + MAL / KeftMAL + SUC / KeftSUC) / ((1 + ACCOA / KefrACCOA & \\
 + FDP / KefrFDP + FDP / KefrFDP * (ACCOA / KefrFDPACCOA)) * (1 & \\
 + KmrPEP / KdrPEP * (HCO3 / KmrHCO3) + KmrOAA / KdrOAA & \\
 * (P / KmrP) + OAA / KdrOAA + P / KmrP * (OAA / KdrOAA) & \\
 + HCO3 / KmrHCO3 * (PEP / KdrPEP) + PEP / KdrPEP) * (1 & \\
 + ASP / KefrASP + CYS / KefrCYS + CIT / KefrCIT + FUM / KefrFUM & \\
 + MAL / KefrMAL + SUC / KefrSUC))) ^ n
 \end{aligned}$$

xlv. PPS

KdAMP= 1480

KdMg= 36,9

KdPEP= 95,7

KefADP= 0,0283

KefATP= 0,000628

Keq= 200000

KmATPMg= 0,0549

KmPEP= 20,7

Vmax= 0,0163772

alpha= 38900

KdATPMg= 0,0847634

KdATPMgPPS= 0,0549

KdP= 346

KdPYR= 2740

KefAKG= 0,274

KefOAA= 0,796

KmAMP= 0,000384

KmP= 84,4

KmPYR= 0,229

W= 10

KdADPMg= 1,27771

$$\begin{aligned} PPS = & Vmax * (MgATP * PYR - AMP * PEP * P * MG/Keq)/(KmATPMg \\ & * KmPYR)/(MgATP/KmATPMg + alpha * (P/KdP) * (MgATP/KmATPMg) \\ & + alpha * (AMP/KdAMP) * (MgATP/KmATPMg) + alpha * (P/KdP) \\ & * (AMP/KdAMP) * (MgATP/KmATPMg) + alpha * (MG/KdMg) \\ & * (P/KmP) * (AMP/KdAMP) * (MgATP/KdATPMgPPS)/(W * (1 \\ & + MG/KdMg)) + MgATP/KmATPMg * (AKG/KefAKG) + (1 + MG/KdMg) \\ & * (AKG/KefAKG) * (PEP/KmPEP)/W + MgATP/KmATPMg \\ & * (OAA/KefOAA) + (1 + MG/KdMg) * (OAA/KefOAA) * (PEP/KmPEP)/W \\ & + MG/KdMg * (P/KmP) * (AMP/KdAMP)/W + alpha * (P/KdP) \\ & * (AMP/KdAMP) * (PEP/KmPEP)/W + alpha * (MG/KdMg) * (P/KmP) \\ & * (AMP/KdAMP) * (PEP/KmPEP)/W + alpha * (1 + MG/KdMg) \\ & * (KmAMP/KdAMP * (P/KmP) * (PEP/KmPEP) + AMP/KdAMP \\ & * (PEP/KmPEP))/W + (1 + MG/KdMg) * (PYR/KmPYR) \\ & + MgATP/KmATPMg * (PYR/KmPYR) + KdADPMg/KdMg * (P/KmP) \\ & * (MgADP/KefADP) * (AMP/KdAMP)/(W * (1 + MG/KdMg)) + (ADP \\ & - MgADP)/KefADP * (PYR/KmPYR) + KdATPMg/KdMg * (P/KmP) \\ & * (AMP/KdAMP) * (MgATP/KefATP)/(W * (1 + MG/KdMg)) + (ATP \\ & - MgATP)/KefATP * (PYR/KmPYR) + (1 + MG/KdMg) \\ & * (PEP/KmPEP)/W + alpha * (1 + MG/KdMg) * (PEP/KdPEP) \\ & * (PYR/KmPYR) + (1 + MG/KdMg) * (PYR/KdPYR) * (PEP/KmPEP)/W \end{aligned}$$

xlvi. PTA

Keq= 0,0053952

KiACCOA= 0,2

KiACP= 0,2

KiCOA= 0,029

KiP= 13,54

KmACP= 0,7

KmP= 6,1

Vmax= 2,7

$$PTA = Vmax * (ACCOA * P - ACP * COA/Keq)/(KiACCOA * KmP)/(1 + ACCOA/KiACCOA + P/KiP + ACP/KiACP + COA/KiCOA + ACCOA * P/(KiACCOA * KmP) + ACP * COA/(KmACP * KiCOA))$$

xlvi. PTS_0

KmPEP= 0,6

KmPYR= 1

kF= 12000

kR= 8000

$$PTS_0 = (kF * ei * PEP^2)/(KmPEP^2 + PEP^2) - \frac{kR * eiP * PYR^2}{KmPYR^2 + PYR^2}$$

xlvi. PTS_4

KmG6P= 2125,91

KmGLC= 0,02

kF= 4000

kR= 1,00E-05

$$PTS_4 = Vcell * \left(kF * eiicbP * \frac{GLCp}{KmGLC + GLCp} - kR * eiicb * \frac{G6P}{KmG6P + G6P} \right)$$

xlix. PYK

KefrFDP= 0,449149

KefrG6P= 0,158746

KefrGL6P= 0,150482

KefrR5P= 9,33254

KefrRU5P= 1,53591

KefrS7P= 0,0785955

KefrX5P= 0,677374

KeftATP= 3,69117

KeftSUCCOA= 8,26406

KirADP= 0,517585

KirATP= 96,0333

KirPEP= 0,181056

KirPYR= 15,1403

KirPyrATP= 230,781

KitADP= 0,224911

KitATP= 0,039564

KitPEP= 0,465672

KitPYR= 0,2499

KitPyrATP= 11,3691

KmrADPMg= 0,326144

KmrPEP= 5,56E-07

KmtADPMg= 0,054678

KmtPEP= 0,11475

L0= 50,4818

Vmax= 0,74716

n= 4

$$\begin{aligned}
PYK = & Vmax * n * PEP * MgADP / (KirPEP * KmrADPMg) / (1 + KmrPEP / KirPEP \\
& * (MgADP / KmrADPMg) + MgATP / KirATP + MgADP / KmrADPMg \\
& * (PEP / KirPEP) + KmrADPMg / KmrADPMg * (1 + (ADP \\
& - MgADP) / KirADP) * (PEP / KirPEP) + PYR / KirPYR \\
& + MgATP / KirPyrATP * (PYR / KirPYR)) / (1 + L0 * ((1 + KmtPEP / KitPEP \\
& * (MgADP / KmtADPMg) + MgATP / KitATP + MgADP * PEP / (KitPEP \\
& * KmtADPMg) + (1 + (ADP - MgADP) / KitADP) * (PEP / KitPEP) \\
& + PYR / KitPYR + MgATP / KitPyrATP * (PYR / KitPYR)) * (1 \\
& + SUCCOA / KeftSUCCOA + MgATP * SUCCOA / (KeftATP \\
& * KeftSUCCOA)) / ((1 + KmrPEP / KirPEP * (MgADP / KmrADPMg) \\
& + MgATP / KirATP + MgADP / KmrADPMg * (PEP / KirPEP) + (1 + (ADP \\
& - MgADP) / KirADP) * (PEP / KirPEP) + PYR / KirPYR \\
& + MgATP / KirPyrATP * (PYR / KirPYR)) * (1 + FDP / KefrFDP \\
& + G6P / KefrG6P + GL6P / KefrGL6P + R5P / KefrR5P + RU5P / KefrRU5P \\
& + S7P / KefrS7P + X5P / KefrX5P)))^n
\end{aligned}$$

I. RPE

$$Keq = 1,5015$$

$$KmRU5P = 0,872522$$

$$KmX5P = 0,893607$$

$$Vmax = 6,00103$$

$$RPE = \frac{Vmax * \frac{RU5P - \frac{X5P}{Keq}}{KmRU5P}}{1 + \frac{RU5P}{KmRU5P} + \frac{X5P}{KmX5P}}$$

ii. RPI

$$Keq = 0,330093$$

$$KmE4P = 0,67067$$

$$KmR5P = 3,09715$$

$$KmRU5P = 4,40263$$

$$Vmax = 8$$

$$RPI = \frac{Vmax * \frac{RU5P - \frac{R5P}{Keq}}{KmRU5P}}{1 + \frac{RU5P}{KmRU5P} + \frac{R5P}{KmR5P} + \frac{E4P}{KmE4P}}$$

iii. S7P_E4P_TAL

$$Keq = 26,6266;$$

$$kcat = 99,9991$$

$$S7P_E4P_TAL = kcat * \left(S7P * tal - E4P * \frac{talC3}{Keq} \right)$$

liii. S7P_R5P_TKT

$$K_{eq} = 0,33033$$

$$k_{cat} = 199,979$$

$$S7P_R5P_TKT = k_{cat} * \left(R5P * tktC2 - S7P * \frac{tkt}{K_{eq}} \right)$$

liv. SDH

$$K_{efFUM} = 0,067048$$

$$K_{efSUC} = 0,0322425$$

$$K_{eq} = 2250$$

$$K_{mFUM} = 1,36019$$

$$K_{mQ} = 0,00160718$$

$$K_{mQH2} = 0,00611663$$

$$K_{mSUC} = 0,805727$$

$$V_{max} = 1,56184$$

$$SDH = V_{max} * \frac{\frac{SUC * Q - FUM * \frac{QH2}{K_{eq}}}{K_{efSUC} * K_{mQ}}}{1 + \frac{FUM}{K_{efFUM}} + \frac{K_{mSUC}}{K_{efSUC}} * \left(\frac{Q}{K_{mQ}} \right) + \frac{K_{mFUM}}{K_{efFUM}} * \left(\frac{QH2}{K_{mQH2}} \right) + \frac{FUM}{K_{efFUM}} * \left(\frac{QH2}{K_{mQH2}} \right) + \frac{SUC}{K_{efSUC}} + \frac{SUC}{K_{efSUC}} * \left(\frac{Q}{K_{mQ}} \right)}$$

lv. SK

$$K_{eq} = 1,15994$$

$$K_{mADP} = 0,00868475$$

$$K_{mATP} = 0,102321$$

$$K_{mCOA} = 0,255019$$

$$K_{mP} = 0,914709$$

$$K_{mSUC} = 0,800744$$

$$K_{mSUCCOA} = 0,0085$$

$$V_{max} = 76,8163$$

$$SK = V_{max} * \frac{\frac{ADP * SUCCOA * P - ATP * COA * \frac{SUC}{K_{eq}}}{K_{mADP} * K_{mSUCCOA} * K_{mP}}}{\left(1 + \frac{ADP}{K_{mADP}} \right) * \left(1 + \frac{SUCCOA}{K_{mSUCCOA}} \right) * \left(1 + \frac{P}{K_{mP}} \right) + \left(1 + \frac{ATP}{K_{mATP}} \right) * \left(1 + \frac{COA}{K_{mCOA}} \right) * \left(1 + \frac{SUC}{K_{mSUC}} \right) - 1}$$

lvi. SQR

$$K_{eq} = 0,94033$$

$$V_{max} = 3,41617$$

$$SQR = V_{max} * \left(FADH2 * Q - FAD * \frac{QH2}{K_{eq}} \right)$$

lvii. TPI

$$K_{eq} = 0,270203$$

$$K_{mDAP} = 0,01$$

$$K_{mGAP} = 1,89301$$

$$V_{max} = 24,1843$$

$$TPI = \frac{V_{max} * \frac{DAP - \frac{GAP}{K_{eq}}}{K_{mDAP}}}{1 + \frac{DAP}{K_{mDAP}} + \frac{GAP}{K_{mGAP}}}$$

Iviii. X5P_GAP_TKT

Keq= 1,001

kcat= 40

$$X5P_GAP_TKT = kcat * \left(tkt * X5P - GAP * \frac{tktC2}{Keq} \right)$$

lix. XCH_RMM_ACE

Vmax= 100

Km= 10

$$XCH_RMM_ACE = Vmax * \frac{\frac{ACE}{Km} - \frac{ACEp}{Km}}{1 + \frac{ACE}{Km} + \frac{ACEp}{Km}}$$

Ix. XCH_RMM_ACEx

Vmax= 100

Km= 10

$$XCH_RMM_ACEx = Vmax * \frac{\frac{ACEp}{Km} - \frac{ACEx}{Km}}{1 + \frac{ACEp}{Km} + \frac{ACEx}{Km}}$$

Ixi. XCH_RMM_GLC

Vmax= 100

Km= 10

$$XCH_RMM_GLC = Vmax * \frac{\frac{GLCx}{Km} - \frac{GLCp}{Km}}{1 + \frac{GLCx}{Km} + \frac{GLCp}{Km}}$$

Ixii. XCH_RMM_P

Vmax= 100

Km= 10

$$XCH_RMM_P = Vmax * \frac{\frac{Px}{Km} - \frac{Pp}{Km}}{1 + \frac{Px}{Km} + \frac{Pp}{Km}}$$

Ixiii. ZWF

KdG6P= 0,192

KdGL6P= 0,02

Keq= 6,00E+10

KmG6P= 0,118525

KmGL6P= 0,328629

KmNADP= 0,0274

KmNADPH= 0,0168

Vmax= 0,2658

$$ZWF = \frac{Vmax * \frac{G6P * NADP - GL6P * \frac{NADPH}{Keq}}{KdG6P * KmNADP}}{1 + \frac{G6P}{KdG6P} + \frac{KmG6P}{KdG6P} * \left(\frac{NADP}{KmNADP} \right) + \frac{G6P}{KdG6P} * \left(\frac{NADP}{KmNADP} \right) + \frac{KmGL6P}{KdGL6P} * \left(\frac{NADPH}{KmNADPH} \right) + \frac{GL6P}{KdGL6P} * \left(\frac{NADPH}{KmNADPH} \right)}$$

9.3. Anexo C: Cambios en las cinéticas que involucran pH

Las nuevas cinéticas implementadas, correspondientes a las enzimas ATP_SYN, CYTBO, NDH1 y PIT, son:

$$ATP_SYN = \frac{Vmax * \left(ADP * P - \frac{ATP}{Keq}\right) * abs\left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)}\right) * \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)}\right)^3}{1 + \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)}\right)^4}$$

$$CYTBO = Vmax * (QH2^2 * O2 - Q^2/Keq) * \frac{\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} + 0.5}{1.5 * 0.5^{2.5} + \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} + 0.5\right)^{2.5}}$$

$$NDH1 = Vmax * (NADH * Q - NAD * QH2/Keq) * \frac{\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} + 0.5}{1.5 * 0.5^{2.5} + \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} + 0.5\right)^{2.5}}$$

$$PIT = Vmax * \frac{abs\left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)}\right) * \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)}\right) * Pp}{\left(1 + \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)}\right)^2\right) * (KmPp + Pp)} - Kr * P * \frac{\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} + 0.5}{(KmP + P) * 1.5 * 0.5^{2.5} + \left(\frac{\log\left(\frac{Hout}{Hin}\right)}{\log(10)} + 0.5\right)^{2.5}}$$

9.4. Anexo D: Cálculo del crecimiento estándar de una *E. coli* nativa

El peso de una célula de *E. coli* estándar es de 9,5E-12 g [91]. Por otra parte, la fórmula empírica de una célula de *Escherichia coli* es C₁H_{1,77}O_{0,49}N_{0,24} [92], lo que corresponde a un peso molecular de 24,97 g/mol.

Por lo tanto, el cálculo del tamaño de una célula de *E. coli* en milimoles es el siguiente:

$$1 \text{ E. coli} = \frac{9,5 * 10^{-12} [g]}{24,97 \left[\frac{g}{mol}\right]} = 3,8 * 10^{-13} [mol] = 3,8 * 10^{-10} [mmol]$$

9.5. Anexo E: Resultados análisis del flujo de alimentación de glucosa en *E. coli* nativa

Tabla 18. Concentración de cada metabolito (mmol/L) en estado estacionario, para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original (mmol/s).

| Flujo de glucosa | ACCOA | ACO | ACP | AKG | BPG | CIT | DAP | E4P | F6P | FDP | FUM | G6P | GAP | GL6P | GLX | ICIT | KDPG | MAL | NAD |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0,1 | 0,101 | 0,011 | 0,009 | 0,315 | 0,065 | 0,032 | 0,190 | 0,070 | 0,207 | 0,054 | 0,120 | 0,611 | 0,051 | 0,001 | 0,007 | 0,038 | 0,025 | 0,584 | 1,464 |
| 0,11 | 0,106 | 0,013 | 0,010 | 0,344 | 0,066 | 0,037 | 0,209 | 0,075 | 0,216 | 0,065 | 0,128 | 0,643 | 0,056 | 0,002 | 0,007 | 0,043 | 0,028 | 0,622 | 1,459 |
| 0,12 | 0,111 | 0,015 | 0,010 | 0,372 | 0,067 | 0,041 | 0,227 | 0,081 | 0,224 | 0,077 | 0,136 | 0,672 | 0,061 | 0,002 | 0,007 | 0,049 | 0,032 | 0,659 | 1,455 |
| 0,13 | 0,115 | 0,016 | 0,011 | 0,397 | 0,068 | 0,045 | 0,246 | 0,086 | 0,231 | 0,089 | 0,143 | 0,698 | 0,066 | 0,002 | 0,008 | 0,054 | 0,036 | 0,694 | 1,451 |
| 0,14 | 0,119 | 0,018 | 0,011 | 0,420 | 0,068 | 0,050 | 0,265 | 0,091 | 0,236 | 0,104 | 0,150 | 0,720 | 0,071 | 0,002 | 0,008 | 0,059 | 0,040 | 0,728 | 1,447 |
| 0,15 | 0,123 | 0,019 | 0,012 | 0,442 | 0,069 | 0,054 | 0,283 | 0,096 | 0,241 | 0,119 | 0,157 | 0,741 | 0,076 | 0,002 | 0,008 | 0,064 | 0,044 | 0,762 | 1,443 |
| 0,16 | 0,127 | 0,021 | 0,012 | 0,463 | 0,068 | 0,058 | 0,302 | 0,101 | 0,245 | 0,135 | 0,164 | 0,760 | 0,081 | 0,002 | 0,008 | 0,069 | 0,049 | 0,796 | 1,439 |
| 0,17 | 0,131 | 0,022 | 0,012 | 0,482 | 0,068 | 0,062 | 0,321 | 0,105 | 0,249 | 0,152 | 0,171 | 0,778 | 0,086 | 0,002 | 0,009 | 0,073 | 0,053 | 0,830 | 1,435 |
| 0,18 | 0,135 | 0,024 | 0,013 | 0,501 | 0,068 | 0,066 | 0,340 | 0,110 | 0,252 | 0,171 | 0,178 | 0,795 | 0,091 | 0,002 | 0,009 | 0,078 | 0,058 | 0,864 | 1,431 |
| 0,19 | 0,139 | 0,025 | 0,013 | 0,519 | 0,068 | 0,070 | 0,359 | 0,114 | 0,255 | 0,190 | 0,185 | 0,810 | 0,096 | 0,003 | 0,009 | 0,083 | 0,064 | 0,898 | 1,427 |
| 0,2 | 0,143 | 0,027 | 0,013 | 0,537 | 0,067 | 0,074 | 0,378 | 0,119 | 0,257 | 0,211 | 0,193 | 0,825 | 0,102 | 0,003 | 0,009 | 0,087 | 0,069 | 0,933 | 1,424 |
| 0,21 | 0,147 | 0,028 | 0,014 | 0,554 | 0,067 | 0,078 | 0,398 | 0,123 | 0,259 | 0,233 | 0,200 | 0,839 | 0,107 | 0,003 | 0,009 | 0,092 | 0,075 | 0,969 | 1,419 |
| 0,22 | 0,151 | 0,029 | 0,014 | 0,570 | 0,066 | 0,082 | 0,417 | 0,127 | 0,261 | 0,257 | 0,207 | 0,852 | 0,112 | 0,003 | 0,009 | 0,097 | 0,081 | 1,005 | 1,415 |
| 0,23 | 0,155 | 0,031 | 0,014 | 0,586 | 0,066 | 0,087 | 0,437 | 0,131 | 0,263 | 0,281 | 0,215 | 0,865 | 0,117 | 0,003 | 0,009 | 0,102 | 0,087 | 1,042 | 1,411 |
| 0,24 | 0,159 | 0,033 | 0,015 | 0,602 | 0,065 | 0,091 | 0,456 | 0,136 | 0,264 | 0,307 | 0,223 | 0,877 | 0,122 | 0,003 | 0,009 | 0,107 | 0,094 | 1,079 | 1,407 |
| 0,25 | 0,163 | 0,034 | 0,015 | 0,617 | 0,065 | 0,096 | 0,476 | 0,140 | 0,266 | 0,335 | 0,231 | 0,889 | 0,128 | 0,004 | 0,009 | 0,113 | 0,101 | 1,117 | 1,402 |
| 0,26 | 0,167 | 0,036 | 0,015 | 0,631 | 0,064 | 0,101 | 0,496 | 0,144 | 0,267 | 0,363 | 0,239 | 0,901 | 0,133 | 0,004 | 0,009 | 0,118 | 0,108 | 1,156 | 1,398 |
| 0,27 | 0,171 | 0,038 | 0,016 | 0,645 | 0,063 | 0,106 | 0,516 | 0,148 | 0,268 | 0,393 | 0,247 | 0,912 | 0,138 | 0,004 | 0,009 | 0,124 | 0,116 | 1,194 | 1,393 |
| 0,28 | 0,176 | 0,040 | 0,016 | 0,659 | 0,063 | 0,111 | 0,536 | 0,152 | 0,269 | 0,424 | 0,255 | 0,924 | 0,144 | 0,004 | 0,009 | 0,130 | 0,124 | 1,234 | 1,388 |
| 0,29 | 0,180 | 0,042 | 0,016 | 0,672 | 0,062 | 0,117 | 0,557 | 0,156 | 0,269 | 0,457 | 0,263 | 0,935 | 0,149 | 0,004 | 0,009 | 0,136 | 0,132 | 1,273 | 1,383 |
| 0,3 | 0,185 | 0,044 | 0,017 | 0,685 | 0,061 | 0,122 | 0,577 | 0,160 | 0,270 | 0,491 | 0,272 | 0,946 | 0,154 | 0,005 | 0,009 | 0,143 | 0,141 | 1,314 | 1,378 |
| 0,31 | 0,189 | 0,046 | 0,017 | 0,697 | 0,061 | 0,129 | 0,597 | 0,164 | 0,270 | 0,527 | 0,280 | 0,956 | 0,160 | 0,005 | 0,010 | 0,150 | 0,150 | 1,354 | 1,373 |
| 0,32 | 0,194 | 0,048 | 0,017 | 0,709 | 0,060 | 0,135 | 0,618 | 0,167 | 0,271 | 0,564 | 0,288 | 0,967 | 0,165 | 0,005 | 0,009 | 0,157 | 0,159 | 1,394 | 1,368 |
| 0,33 | 0,198 | 0,051 | 0,018 | 0,721 | 0,059 | 0,142 | 0,639 | 0,171 | 0,271 | 0,603 | 0,297 | 0,977 | 0,171 | 0,005 | 0,009 | 0,165 | 0,169 | 1,434 | 1,362 |
| 0,34 | 0,203 | 0,053 | 0,018 | 0,732 | 0,058 | 0,149 | 0,660 | 0,175 | 0,271 | 0,643 | 0,305 | 0,988 | 0,176 | 0,006 | 0,009 | 0,173 | 0,179 | 1,474 | 1,356 |
| 0,35 | 0,208 | 0,056 | 0,018 | 0,743 | 0,057 | 0,157 | 0,681 | 0,179 | 0,271 | 0,685 | 0,314 | 0,998 | 0,182 | 0,006 | 0,009 | 0,182 | 0,189 | 1,514 | 1,350 |
| 0,36 | 0,213 | 0,059 | 0,019 | 0,754 | 0,057 | 0,165 | 0,702 | 0,183 | 0,271 | 0,729 | 0,322 | 1,008 | 0,187 | 0,006 | 0,009 | 0,191 | 0,199 | 1,554 | 1,344 |
| 0,37 | 0,218 | 0,062 | 0,019 | 0,764 | 0,056 | 0,173 | 0,724 | 0,186 | 0,271 | 0,774 | 0,330 | 1,019 | 0,193 | 0,006 | 0,009 | 0,200 | 0,210 | 1,593 | 1,338 |
| 0,38 | 0,224 | 0,065 | 0,019 | 0,774 | 0,055 | 0,182 | 0,745 | 0,190 | 0,271 | 0,821 | 0,338 | 1,029 | 0,199 | 0,007 | 0,009 | 0,210 | 0,221 | 1,633 | 1,331 |
| 0,39 | 0,229 | 0,068 | 0,020 | 0,783 | 0,054 | 0,192 | 0,767 | 0,194 | 0,271 | 0,870 | 0,347 | 1,039 | 0,204 | 0,007 | 0,009 | 0,221 | 0,233 | 1,672 | 1,325 |
| 0,4 | 0,235 | 0,072 | 0,020 | 0,793 | 0,053 | 0,202 | 0,788 | 0,198 | 0,271 | 0,920 | 0,355 | 1,050 | 0,210 | 0,007 | 0,009 | 0,233 | 0,244 | 1,710 | 1,318 |

Continuación Tabla 18. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | NADH | NADP | NADPH | OAA | PEP | PGA2 | PGA3 | PGN | PYR | Q | QH2 | R5P | RU5P | S7P | SUC | SUCCOA | X5P | ei | eiP |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| 0,1 | 0,106 | 0,163 | 0,094 | 0,162 | 1,142 | 0,404 | 0,728 | 0,058 | 0,143 | 0,407 | 0,593 | 0,082 | 0,256 | 0,169 | 0,115 | 0,022 | 0,377 | 0,000 | 0,007 |
| 0,11 | 0,111 | 0,163 | 0,094 | 0,159 | 1,136 | 0,405 | 0,730 | 0,063 | 0,152 | 0,399 | 0,601 | 0,085 | 0,267 | 0,169 | 0,122 | 0,023 | 0,392 | 0,000 | 0,007 |
| 0,12 | 0,115 | 0,163 | 0,094 | 0,156 | 1,128 | 0,404 | 0,730 | 0,067 | 0,160 | 0,391 | 0,609 | 0,088 | 0,276 | 0,168 | 0,128 | 0,024 | 0,407 | 0,000 | 0,007 |
| 0,13 | 0,119 | 0,163 | 0,094 | 0,153 | 1,119 | 0,403 | 0,729 | 0,072 | 0,168 | 0,384 | 0,616 | 0,091 | 0,285 | 0,166 | 0,134 | 0,026 | 0,420 | 0,000 | 0,007 |
| 0,14 | 0,123 | 0,163 | 0,094 | 0,151 | 1,108 | 0,401 | 0,727 | 0,077 | 0,176 | 0,377 | 0,623 | 0,093 | 0,293 | 0,165 | 0,140 | 0,027 | 0,432 | 0,000 | 0,007 |
| 0,15 | 0,127 | 0,164 | 0,093 | 0,148 | 1,097 | 0,399 | 0,725 | 0,082 | 0,183 | 0,370 | 0,630 | 0,095 | 0,300 | 0,163 | 0,145 | 0,028 | 0,443 | 0,000 | 0,007 |
| 0,16 | 0,131 | 0,164 | 0,093 | 0,145 | 1,086 | 0,397 | 0,722 | 0,087 | 0,190 | 0,364 | 0,636 | 0,097 | 0,307 | 0,161 | 0,151 | 0,029 | 0,453 | 0,000 | 0,006 |
| 0,17 | 0,135 | 0,165 | 0,092 | 0,143 | 1,074 | 0,395 | 0,719 | 0,093 | 0,198 | 0,358 | 0,642 | 0,099 | 0,313 | 0,158 | 0,156 | 0,030 | 0,462 | 0,000 | 0,006 |
| 0,18 | 0,139 | 0,165 | 0,092 | 0,140 | 1,062 | 0,393 | 0,716 | 0,099 | 0,205 | 0,353 | 0,647 | 0,101 | 0,319 | 0,156 | 0,162 | 0,031 | 0,471 | 0,000 | 0,006 |
| 0,19 | 0,143 | 0,166 | 0,091 | 0,138 | 1,050 | 0,390 | 0,713 | 0,105 | 0,212 | 0,347 | 0,653 | 0,102 | 0,324 | 0,153 | 0,167 | 0,032 | 0,479 | 0,000 | 0,006 |
| 0,2 | 0,146 | 0,166 | 0,091 | 0,136 | 1,038 | 0,388 | 0,710 | 0,111 | 0,218 | 0,342 | 0,658 | 0,104 | 0,330 | 0,151 | 0,173 | 0,033 | 0,487 | 0,000 | 0,006 |
| 0,21 | 0,151 | 0,167 | 0,090 | 0,133 | 1,025 | 0,385 | 0,706 | 0,118 | 0,225 | 0,336 | 0,664 | 0,105 | 0,334 | 0,148 | 0,178 | 0,034 | 0,494 | 0,000 | 0,006 |
| 0,22 | 0,155 | 0,167 | 0,090 | 0,131 | 1,013 | 0,382 | 0,702 | 0,125 | 0,232 | 0,331 | 0,669 | 0,106 | 0,339 | 0,146 | 0,184 | 0,035 | 0,501 | 0,000 | 0,006 |
| 0,23 | 0,159 | 0,168 | 0,089 | 0,129 | 1,000 | 0,379 | 0,698 | 0,132 | 0,239 | 0,325 | 0,675 | 0,107 | 0,343 | 0,143 | 0,190 | 0,036 | 0,508 | 0,000 | 0,006 |
| 0,24 | 0,163 | 0,168 | 0,089 | 0,127 | 0,988 | 0,377 | 0,694 | 0,139 | 0,246 | 0,320 | 0,680 | 0,108 | 0,347 | 0,140 | 0,196 | 0,037 | 0,514 | 0,000 | 0,006 |
| 0,25 | 0,168 | 0,169 | 0,088 | 0,125 | 0,975 | 0,374 | 0,690 | 0,147 | 0,253 | 0,315 | 0,685 | 0,109 | 0,350 | 0,138 | 0,202 | 0,038 | 0,519 | 0,000 | 0,006 |
| 0,26 | 0,172 | 0,169 | 0,088 | 0,123 | 0,962 | 0,371 | 0,686 | 0,155 | 0,260 | 0,310 | 0,690 | 0,110 | 0,354 | 0,135 | 0,209 | 0,040 | 0,525 | 0,000 | 0,006 |
| 0,27 | 0,177 | 0,169 | 0,088 | 0,121 | 0,949 | 0,368 | 0,681 | 0,164 | 0,267 | 0,304 | 0,696 | 0,111 | 0,357 | 0,133 | 0,215 | 0,041 | 0,530 | 0,000 | 0,006 |
| 0,28 | 0,182 | 0,169 | 0,088 | 0,119 | 0,936 | 0,365 | 0,677 | 0,172 | 0,273 | 0,299 | 0,701 | 0,112 | 0,360 | 0,131 | 0,222 | 0,042 | 0,535 | 0,000 | 0,006 |
| 0,29 | 0,187 | 0,169 | 0,088 | 0,117 | 0,923 | 0,361 | 0,672 | 0,181 | 0,280 | 0,294 | 0,706 | 0,112 | 0,363 | 0,128 | 0,229 | 0,043 | 0,539 | 0,000 | 0,006 |
| 0,3 | 0,192 | 0,169 | 0,088 | 0,115 | 0,909 | 0,358 | 0,667 | 0,190 | 0,287 | 0,289 | 0,711 | 0,113 | 0,366 | 0,126 | 0,237 | 0,045 | 0,543 | 0,000 | 0,006 |
| 0,31 | 0,197 | 0,169 | 0,088 | 0,113 | 0,896 | 0,355 | 0,662 | 0,200 | 0,294 | 0,284 | 0,716 | 0,114 | 0,368 | 0,123 | 0,244 | 0,046 | 0,547 | 0,001 | 0,006 |
| 0,32 | 0,202 | 0,169 | 0,088 | 0,111 | 0,883 | 0,351 | 0,657 | 0,209 | 0,301 | 0,279 | 0,721 | 0,114 | 0,370 | 0,121 | 0,252 | 0,047 | 0,551 | 0,001 | 0,006 |
| 0,33 | 0,208 | 0,169 | 0,088 | 0,109 | 0,869 | 0,347 | 0,651 | 0,219 | 0,308 | 0,273 | 0,727 | 0,115 | 0,373 | 0,119 | 0,260 | 0,049 | 0,555 | 0,001 | 0,006 |
| 0,34 | 0,214 | 0,169 | 0,088 | 0,108 | 0,855 | 0,344 | 0,645 | 0,229 | 0,315 | 0,268 | 0,732 | 0,115 | 0,375 | 0,117 | 0,269 | 0,050 | 0,558 | 0,001 | 0,006 |
| 0,35 | 0,220 | 0,169 | 0,088 | 0,106 | 0,841 | 0,340 | 0,640 | 0,239 | 0,322 | 0,263 | 0,737 | 0,116 | 0,376 | 0,114 | 0,277 | 0,052 | 0,561 | 0,001 | 0,006 |
| 0,36 | 0,226 | 0,168 | 0,089 | 0,104 | 0,827 | 0,336 | 0,633 | 0,249 | 0,329 | 0,258 | 0,742 | 0,116 | 0,378 | 0,112 | 0,286 | 0,054 | 0,564 | 0,001 | 0,006 |
| 0,37 | 0,232 | 0,168 | 0,089 | 0,102 | 0,813 | 0,332 | 0,627 | 0,260 | 0,336 | 0,253 | 0,747 | 0,116 | 0,380 | 0,110 | 0,296 | 0,055 | 0,567 | 0,001 | 0,006 |
| 0,38 | 0,239 | 0,167 | 0,090 | 0,101 | 0,799 | 0,328 | 0,621 | 0,270 | 0,343 | 0,248 | 0,752 | 0,117 | 0,381 | 0,108 | 0,306 | 0,057 | 0,570 | 0,001 | 0,006 |
| 0,39 | 0,245 | 0,167 | 0,090 | 0,099 | 0,785 | 0,324 | 0,614 | 0,281 | 0,350 | 0,243 | 0,757 | 0,117 | 0,383 | 0,106 | 0,316 | 0,059 | 0,572 | 0,001 | 0,006 |
| 0,4 | 0,252 | 0,166 | 0,091 | 0,098 | 0,770 | 0,320 | 0,607 | 0,291 | 0,357 | 0,238 | 0,762 | 0,117 | 0,384 | 0,104 | 0,326 | 0,061 | 0,574 | 0,001 | 0,006 |

Continuación Tabla 18. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | eiia | eiiaP | eiicb | eiicbP | hpr | hprP | icd | icdP | tal | talC3 | tkc | tkc2 | ADP | AMP | ATP | CAMP | P | MgADP | MgATP |
|------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0,1 | 0,006 | 0,489 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,010 | 0,060 | 0,616 | 0,187 | 2,551 | 0,927 | 9,538 | 0,270 | 2,352 |
| 0,11 | 0,007 | 0,488 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,010 | 0,060 | 0,606 | 0,182 | 2,565 | 0,928 | 9,654 | 0,266 | 2,364 |
| 0,12 | 0,007 | 0,488 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,010 | 0,060 | 0,599 | 0,179 | 2,574 | 0,928 | 9,739 | 0,263 | 2,373 |
| 0,13 | 0,008 | 0,487 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,011 | 0,059 | 0,594 | 0,177 | 2,580 | 0,929 | 9,800 | 0,261 | 2,378 |
| 0,14 | 0,008 | 0,486 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,011 | 0,059 | 0,591 | 0,176 | 2,584 | 0,929 | 9,841 | 0,260 | 2,382 |
| 0,15 | 0,009 | 0,486 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,011 | 0,059 | 0,590 | 0,175 | 2,586 | 0,929 | 9,865 | 0,259 | 2,384 |
| 0,16 | 0,010 | 0,485 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,012 | 0,058 | 0,589 | 0,176 | 2,586 | 0,929 | 9,876 | 0,259 | 2,384 |
| 0,17 | 0,010 | 0,484 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,012 | 0,058 | 0,589 | 0,176 | 2,586 | 0,928 | 9,878 | 0,258 | 2,384 |
| 0,18 | 0,011 | 0,484 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,012 | 0,058 | 0,589 | 0,177 | 2,585 | 0,928 | 9,871 | 0,259 | 2,383 |
| 0,19 | 0,012 | 0,483 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,013 | 0,057 | 0,590 | 0,179 | 2,583 | 0,927 | 9,857 | 0,259 | 2,382 |
| 0,2 | 0,012 | 0,483 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,013 | 0,057 | 0,592 | 0,180 | 2,581 | 0,927 | 9,839 | 0,260 | 2,380 |
| 0,21 | 0,013 | 0,482 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,013 | 0,057 | 0,593 | 0,182 | 2,579 | 0,926 | 9,816 | 0,260 | 2,377 |
| 0,22 | 0,014 | 0,481 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,013 | 0,057 | 0,595 | 0,184 | 2,576 | 0,925 | 9,789 | 0,261 | 2,375 |
| 0,23 | 0,014 | 0,481 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,597 | 0,186 | 2,573 | 0,925 | 9,760 | 0,262 | 2,372 |
| 0,24 | 0,015 | 0,480 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,599 | 0,188 | 2,569 | 0,924 | 9,728 | 0,263 | 2,369 |
| 0,25 | 0,016 | 0,479 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,601 | 0,190 | 2,566 | 0,923 | 9,694 | 0,264 | 2,365 |
| 0,26 | 0,016 | 0,478 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,015 | 0,055 | 0,604 | 0,192 | 2,562 | 0,922 | 9,658 | 0,265 | 2,362 |
| 0,27 | 0,017 | 0,478 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,015 | 0,055 | 0,606 | 0,194 | 2,558 | 0,921 | 9,621 | 0,266 | 2,359 |
| 0,28 | 0,018 | 0,477 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,015 | 0,055 | 0,608 | 0,196 | 2,555 | 0,921 | 9,582 | 0,267 | 2,355 |
| 0,29 | 0,018 | 0,476 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,016 | 0,054 | 0,611 | 0,199 | 2,551 | 0,920 | 9,542 | 0,268 | 2,351 |
| 0,3 | 0,019 | 0,476 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,016 | 0,054 | 0,614 | 0,201 | 2,546 | 0,919 | 9,501 | 0,269 | 2,347 |
| 0,31 | 0,020 | 0,475 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,016 | 0,054 | 0,616 | 0,203 | 2,542 | 0,918 | 9,459 | 0,271 | 2,344 |
| 0,32 | 0,021 | 0,474 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,619 | 0,206 | 2,538 | 0,917 | 9,416 | 0,272 | 2,340 |
| 0,33 | 0,021 | 0,473 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,622 | 0,209 | 2,534 | 0,916 | 9,372 | 0,273 | 2,336 |
| 0,34 | 0,022 | 0,473 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,625 | 0,211 | 2,529 | 0,915 | 9,327 | 0,274 | 2,331 |
| 0,35 | 0,023 | 0,472 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,627 | 0,214 | 2,524 | 0,914 | 9,281 | 0,275 | 2,327 |
| 0,36 | 0,024 | 0,471 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,018 | 0,052 | 0,630 | 0,217 | 2,520 | 0,913 | 9,235 | 0,277 | 2,323 |
| 0,37 | 0,025 | 0,470 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,018 | 0,052 | 0,633 | 0,220 | 2,515 | 0,912 | 9,187 | 0,278 | 2,318 |
| 0,38 | 0,025 | 0,469 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,018 | 0,052 | 0,636 | 0,223 | 2,510 | 0,911 | 9,139 | 0,279 | 2,314 |
| 0,39 | 0,026 | 0,469 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,005 | 0,055 | 0,019 | 0,051 | 0,639 | 0,226 | 2,505 | 0,910 | 9,089 | 0,281 | 2,309 |
| 0,4 | 0,027 | 0,468 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,005 | 0,055 | 0,019 | 0,051 | 0,643 | 0,229 | 2,500 | 0,909 | 9,039 | 0,282 | 2,304 |

Continuación Tabla 18. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | MgFDP | FAD | FADH2 | ACE | GLCx | ACEx | Hout | GLCp | Pp | ACEp |
|------------------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|
| 0,1 | 0,008 | 0,350 | 0,650 | 0,0001 | 0,011 | 0,0001 | 0,0001 | 0,001 | 9,999 | 0,0001 |
| 0,11 | 0,009 | 0,340 | 0,660 | 0,0001 | 0,013 | 0,0001 | 0,0001 | 0,002 | 9,998 | 0,0001 |
| 0,12 | 0,011 | 0,330 | 0,670 | 0,0001 | 0,014 | 0,0001 | 0,0001 | 0,002 | 9,996 | 0,0001 |
| 0,13 | 0,013 | 0,322 | 0,678 | 0,0001 | 0,015 | 0,0001 | 0,0001 | 0,002 | 9,995 | 0,0001 |
| 0,14 | 0,015 | 0,314 | 0,686 | 0,0001 | 0,016 | 0,0001 | 0,0001 | 0,002 | 9,994 | 0,0001 |
| 0,15 | 0,017 | 0,306 | 0,694 | 0,0002 | 0,017 | 0,0002 | 0,0001 | 0,002 | 9,992 | 0,0002 |
| 0,16 | 0,020 | 0,299 | 0,701 | 0,0002 | 0,019 | 0,0002 | 0,0001 | 0,003 | 9,991 | 0,0002 |
| 0,17 | 0,022 | 0,292 | 0,708 | 0,0002 | 0,020 | 0,0002 | 0,0001 | 0,003 | 9,990 | 0,0002 |
| 0,18 | 0,025 | 0,285 | 0,715 | 0,0002 | 0,021 | 0,0002 | 0,0001 | 0,003 | 9,989 | 0,0002 |
| 0,19 | 0,028 | 0,279 | 0,721 | 0,0002 | 0,022 | 0,0002 | 0,0001 | 0,003 | 9,987 | 0,0002 |
| 0,2 | 0,031 | 0,272 | 0,728 | 0,0002 | 0,023 | 0,0002 | 0,0001 | 0,003 | 9,986 | 0,0002 |
| 0,21 | 0,034 | 0,266 | 0,734 | 0,0002 | 0,025 | 0,0002 | 0,0001 | 0,004 | 9,985 | 0,0002 |
| 0,22 | 0,038 | 0,259 | 0,741 | 0,0002 | 0,026 | 0,0002 | 0,0001 | 0,004 | 9,984 | 0,0002 |
| 0,23 | 0,041 | 0,253 | 0,747 | 0,0002 | 0,027 | 0,0002 | 0,0001 | 0,004 | 9,983 | 0,0002 |
| 0,24 | 0,045 | 0,247 | 0,753 | 0,0002 | 0,028 | 0,0002 | 0,0001 | 0,004 | 9,981 | 0,0002 |
| 0,25 | 0,049 | 0,241 | 0,759 | 0,0002 | 0,030 | 0,0002 | 0,0001 | 0,005 | 9,980 | 0,0002 |
| 0,26 | 0,053 | 0,234 | 0,766 | 0,0002 | 0,031 | 0,0002 | 0,0001 | 0,005 | 9,979 | 0,0002 |
| 0,27 | 0,058 | 0,228 | 0,772 | 0,0002 | 0,032 | 0,0002 | 0,0001 | 0,005 | 9,978 | 0,0002 |
| 0,28 | 0,062 | 0,222 | 0,778 | 0,0002 | 0,033 | 0,0002 | 0,0001 | 0,005 | 9,977 | 0,0002 |
| 0,29 | 0,067 | 0,216 | 0,784 | 0,0002 | 0,035 | 0,0002 | 0,0001 | 0,006 | 9,975 | 0,0002 |
| 0,3 | 0,072 | 0,210 | 0,790 | 0,0002 | 0,036 | 0,0002 | 0,0001 | 0,006 | 9,974 | 0,0002 |
| 0,31 | 0,077 | 0,204 | 0,796 | 0,0002 | 0,037 | 0,0002 | 0,0001 | 0,006 | 9,973 | 0,0002 |
| 0,32 | 0,083 | 0,198 | 0,802 | 0,0002 | 0,039 | 0,0002 | 0,0001 | 0,007 | 9,972 | 0,0002 |
| 0,33 | 0,089 | 0,191 | 0,809 | 0,0002 | 0,040 | 0,0002 | 0,0001 | 0,007 | 9,970 | 0,0002 |
| 0,34 | 0,094 | 0,185 | 0,815 | 0,0002 | 0,041 | 0,0002 | 0,0001 | 0,007 | 9,969 | 0,0002 |
| 0,35 | 0,101 | 0,179 | 0,821 | 0,0002 | 0,043 | 0,0002 | 0,0001 | 0,008 | 9,968 | 0,0002 |
| 0,36 | 0,107 | 0,173 | 0,827 | 0,0003 | 0,044 | 0,0002 | 0,0001 | 0,008 | 9,967 | 0,0003 |
| 0,37 | 0,114 | 0,167 | 0,833 | 0,0003 | 0,046 | 0,0003 | 0,0001 | 0,008 | 9,966 | 0,0003 |
| 0,38 | 0,121 | 0,161 | 0,839 | 0,0003 | 0,047 | 0,0003 | 0,0001 | 0,009 | 9,964 | 0,0003 |
| 0,39 | 0,128 | 0,155 | 0,845 | 0,0003 | 0,048 | 0,0003 | 0,0001 | 0,009 | 9,963 | 0,0003 |
| 0,4 | 0,135 | 0,149 | 0,851 | 0,0003 | 0,050 | 0,0003 | 0,0001 | 0,010 | 9,962 | 0,0003 |

Tabla 19. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | ACEA | ACEB | ACK | ACEK_1 | ACEK_2 | ACN_1 | ACN_2 | ACS | ADK | ATP_MAIN | ATP_SYN | CYA | CYTBO | DOS | EDA | EDD | ENO |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0,1 | 0,0787 | 0,0787 | 0,0124 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1534 | 0,1534 | 0,0124 | 0,0199 | 1,2178 | 1,2423 | 0,0076 | 0,4904 | 0,0077 | 0,0092 | 0,0092 | 0,1702 |
| 0,11 | 0,0823 | 0,0823 | 0,0129 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1609 | 0,1609 | 0,0129 | 0,0205 | 1,2428 | 1,2966 | 0,0077 | 0,5126 | 0,0077 | 0,0098 | 0,0098 | 0,1854 |
| 0,12 | 0,0852 | 0,0852 | 0,0134 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1677 | 0,1677 | 0,0134 | 0,0210 | 1,2600 | 1,3460 | 0,0077 | 0,5327 | 0,0077 | 0,0103 | 0,0103 | 0,2006 |
| 0,13 | 0,0877 | 0,0877 | 0,0139 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1739 | 0,1739 | 0,0139 | 0,0215 | 1,2713 | 1,3916 | 0,0077 | 0,5513 | 0,0077 | 0,0109 | 0,0109 | 0,2157 |
| 0,14 | 0,0898 | 0,0898 | 0,0143 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1799 | 0,1799 | 0,0143 | 0,0220 | 1,2783 | 1,4346 | 0,0077 | 0,5687 | 0,0077 | 0,0114 | 0,0114 | 0,2307 |
| 0,15 | 0,0917 | 0,0917 | 0,0148 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1855 | 0,1855 | 0,0148 | 0,0224 | 1,2822 | 1,4755 | 0,0077 | 0,5852 | 0,0077 | 0,0119 | 0,0119 | 0,2456 |
| 0,16 | 0,0933 | 0,0933 | 0,0152 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1910 | 0,1910 | 0,0152 | 0,0229 | 1,2836 | 1,5148 | 0,0077 | 0,6011 | 0,0077 | 0,0125 | 0,0125 | 0,2606 |
| 0,17 | 0,0948 | 0,0948 | 0,0156 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1963 | 0,1963 | 0,0156 | 0,0233 | 1,2832 | 1,5531 | 0,0077 | 0,6165 | 0,0077 | 0,0130 | 0,0130 | 0,2755 |
| 0,18 | 0,0961 | 0,0961 | 0,0161 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2015 | 0,2015 | 0,0161 | 0,0238 | 1,2814 | 1,5904 | 0,0077 | 0,6315 | 0,0077 | 0,0136 | 0,0136 | 0,2904 |
| 0,19 | 0,0973 | 0,0973 | 0,0165 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2067 | 0,2067 | 0,0165 | 0,0242 | 1,2787 | 1,6272 | 0,0077 | 0,6463 | 0,0077 | 0,0141 | 0,0141 | 0,3053 |
| 0,2 | 0,0983 | 0,0983 | 0,0170 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2118 | 0,2118 | 0,0170 | 0,0246 | 1,2752 | 1,6634 | 0,0077 | 0,6608 | 0,0077 | 0,0147 | 0,0147 | 0,3202 |
| 0,21 | 0,0993 | 0,0993 | 0,0174 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2168 | 0,2168 | 0,0174 | 0,0251 | 1,2711 | 1,6994 | 0,0077 | 0,6753 | 0,0077 | 0,0152 | 0,0153 | 0,3350 |
| 0,22 | 0,1002 | 0,1002 | 0,0179 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2219 | 0,2219 | 0,0178 | 0,0255 | 1,2667 | 1,7350 | 0,0077 | 0,6895 | 0,0077 | 0,0158 | 0,0158 | 0,3499 |
| 0,23 | 0,1009 | 0,1009 | 0,0183 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2269 | 0,2269 | 0,0183 | 0,0260 | 1,2620 | 1,7705 | 0,0076 | 0,7038 | 0,0077 | 0,0164 | 0,0164 | 0,3649 |
| 0,24 | 0,1016 | 0,1016 | 0,0188 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2319 | 0,2319 | 0,0188 | 0,0264 | 1,2570 | 1,8059 | 0,0076 | 0,7179 | 0,0076 | 0,0169 | 0,0169 | 0,3798 |
| 0,25 | 0,1022 | 0,1022 | 0,0192 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2370 | 0,2370 | 0,0192 | 0,0269 | 1,2520 | 1,8412 | 0,0076 | 0,7321 | 0,0076 | 0,0174 | 0,0175 | 0,3947 |
| 0,26 | 0,1028 | 0,1028 | 0,0197 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2420 | 0,2420 | 0,0197 | 0,0273 | 1,2469 | 1,8764 | 0,0076 | 0,7462 | 0,0076 | 0,0180 | 0,0180 | 0,4097 |
| 0,27 | 0,1032 | 0,1032 | 0,0202 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2471 | 0,2471 | 0,0202 | 0,0278 | 1,2417 | 1,9117 | 0,0076 | 0,7603 | 0,0076 | 0,0185 | 0,0185 | 0,4247 |
| 0,28 | 0,1036 | 0,1036 | 0,0206 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2522 | 0,2522 | 0,0206 | 0,0283 | 1,2365 | 1,9469 | 0,0076 | 0,7744 | 0,0076 | 0,0190 | 0,0191 | 0,4397 |
| 0,29 | 0,1039 | 0,1039 | 0,0211 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2573 | 0,2573 | 0,0211 | 0,0288 | 1,2313 | 1,9821 | 0,0076 | 0,7884 | 0,0076 | 0,0195 | 0,0196 | 0,4547 |
| 0,3 | 0,1041 | 0,1041 | 0,0216 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2624 | 0,2624 | 0,0216 | 0,0293 | 1,2260 | 2,0175 | 0,0075 | 0,8026 | 0,0076 | 0,0200 | 0,0201 | 0,4698 |
| 0,31 | 0,1043 | 0,1043 | 0,0221 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2675 | 0,2675 | 0,0221 | 0,0298 | 1,2208 | 2,0528 | 0,0075 | 0,8166 | 0,0076 | 0,0205 | 0,0205 | 0,4849 |
| 0,32 | 0,1043 | 0,1043 | 0,0226 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2727 | 0,2727 | 0,0226 | 0,0303 | 1,2156 | 2,0881 | 0,0075 | 0,8307 | 0,0076 | 0,0209 | 0,0210 | 0,5000 |
| 0,33 | 0,1043 | 0,1043 | 0,0232 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2778 | 0,2778 | 0,0231 | 0,0308 | 1,2104 | 2,1234 | 0,0075 | 0,8448 | 0,0076 | 0,0214 | 0,0214 | 0,5152 |
| 0,34 | 0,1042 | 0,1042 | 0,0237 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2830 | 0,2830 | 0,0237 | 0,0313 | 1,2052 | 2,1587 | 0,0075 | 0,8589 | 0,0076 | 0,0218 | 0,0219 | 0,5303 |
| 0,35 | 0,1041 | 0,1041 | 0,0242 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2882 | 0,2881 | 0,0242 | 0,0318 | 1,2000 | 2,1940 | 0,0075 | 0,8730 | 0,0076 | 0,0222 | 0,0223 | 0,5456 |
| 0,36 | 0,1038 | 0,1038 | 0,0248 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2933 | 0,2933 | 0,0247 | 0,0324 | 1,1948 | 2,2292 | 0,0075 | 0,8869 | 0,0076 | 0,0226 | 0,0226 | 0,5608 |
| 0,37 | 0,1035 | 0,1035 | 0,0253 | 0,0017 | 0,0017 | 0,2985 | 0,2985 | 0,0253 | 0,0329 | 1,1895 | 2,2644 | 0,0074 | 0,9010 | 0,0075 | 0,0229 | 0,0230 | 0,5760 |
| 0,38 | 0,1031 | 0,1031 | 0,0259 | 0,0017 | 0,0017 | 0,3037 | 0,3037 | 0,0259 | 0,0335 | 1,1842 | 2,2998 | 0,0074 | 0,9150 | 0,0075 | 0,0233 | 0,0234 | 0,5913 |
| 0,39 | 0,1026 | 0,1026 | 0,0265 | 0,0017 | 0,0017 | 0,3089 | 0,3089 | 0,0265 | 0,0340 | 1,1788 | 2,3351 | 0,0074 | 0,9291 | 0,0075 | 0,0236 | 0,0237 | 0,6066 |
| 0,4 | 0,1020 | 0,1020 | 0,0271 | 0,0017 | 0,0017 | 0,3142 | 0,3141 | 0,0270 | 0,0346 | 1,1733 | 2,3703 | 0,0074 | 0,9431 | 0,0075 | 0,0239 | 0,0240 | 0,6220 |

Continuación Tabla 19. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | F6P_E4P_TKT | F6P_GAP_TAL | FBA | FBP | FUMA | GDH | GL6P_HYDROLYSIS | GLC_FEED | GLT | GND | GPM | GROWTH | ICD | LPD | MAD |
|------------------|-------------|-------------|--------|--------|--------|--------|-----------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0,1 | 0,0099 | 0,0108 | 0,0777 | 2,E-05 | 0,1506 | 0,1741 | 2,E-08 | 0,0010 | 0,1534 | 0,0333 | 0,1702 | 5,E-06 | 0,0747 | 0,0719 | 0,0270 |
| 0,11 | 0,0097 | 0,0109 | 0,0858 | 2,E-05 | 0,1571 | 0,1906 | 2,E-08 | 0,0011 | 0,1609 | 0,0342 | 0,1854 | 6,E-06 | 0,0786 | 0,0748 | 0,0261 |
| 0,12 | 0,0095 | 0,0110 | 0,0939 | 3,E-05 | 0,1629 | 0,2071 | 2,E-08 | 0,0012 | 0,1677 | 0,0352 | 0,2006 | 8,E-06 | 0,0824 | 0,0777 | 0,0254 |
| 0,13 | 0,0092 | 0,0111 | 0,1021 | 3,E-05 | 0,1682 | 0,2235 | 2,E-08 | 0,0013 | 0,1740 | 0,0360 | 0,2157 | 9,E-06 | 0,0862 | 0,0805 | 0,0249 |
| 0,14 | 0,0090 | 0,0112 | 0,1102 | 4,E-05 | 0,1730 | 0,2400 | 2,E-08 | 0,0014 | 0,1799 | 0,0369 | 0,2307 | 1,E-05 | 0,0900 | 0,0832 | 0,0244 |
| 0,15 | 0,0087 | 0,0113 | 0,1184 | 4,E-05 | 0,1776 | 0,2564 | 2,E-08 | 0,0015 | 0,1855 | 0,0377 | 0,2456 | 1,E-05 | 0,0938 | 0,0860 | 0,0240 |
| 0,16 | 0,0084 | 0,0113 | 0,1265 | 5,E-05 | 0,1820 | 0,2729 | 3,E-08 | 0,0016 | 0,1910 | 0,0384 | 0,2606 | 1,E-05 | 0,0976 | 0,0887 | 0,0237 |
| 0,17 | 0,0081 | 0,0114 | 0,1347 | 6,E-05 | 0,1862 | 0,2893 | 3,E-08 | 0,0017 | 0,1963 | 0,0391 | 0,2755 | 2,E-05 | 0,1015 | 0,0915 | 0,0234 |
| 0,18 | 0,0077 | 0,0114 | 0,1429 | 7,E-05 | 0,1903 | 0,3057 | 3,E-08 | 0,0018 | 0,2015 | 0,0398 | 0,2904 | 2,E-05 | 0,1054 | 0,0943 | 0,0232 |
| 0,19 | 0,0073 | 0,0114 | 0,1511 | 8,E-05 | 0,1944 | 0,3222 | 3,E-08 | 0,0019 | 0,2067 | 0,0404 | 0,3053 | 2,E-05 | 0,1094 | 0,0971 | 0,0229 |
| 0,2 | 0,0070 | 0,0114 | 0,1593 | 9,E-05 | 0,1983 | 0,3386 | 3,E-08 | 0,0020 | 0,2118 | 0,0409 | 0,3202 | 2,E-05 | 0,1134 | 0,1000 | 0,0227 |
| 0,21 | 0,0066 | 0,0114 | 0,1675 | 1,E-04 | 0,2023 | 0,3550 | 3,E-08 | 0,0021 | 0,2168 | 0,0414 | 0,3350 | 2,E-05 | 0,1175 | 0,1030 | 0,0225 |
| 0,22 | 0,0061 | 0,0113 | 0,1757 | 1,E-04 | 0,2062 | 0,3715 | 3,E-08 | 0,0022 | 0,2219 | 0,0418 | 0,3499 | 3,E-05 | 0,1217 | 0,1061 | 0,0223 |
| 0,23 | 0,0057 | 0,0113 | 0,1840 | 1,E-04 | 0,2101 | 0,3880 | 3,E-08 | 0,0023 | 0,2269 | 0,0422 | 0,3649 | 3,E-05 | 0,1260 | 0,1092 | 0,0222 |
| 0,24 | 0,0053 | 0,0112 | 0,1922 | 1,E-04 | 0,2140 | 0,4045 | 3,E-08 | 0,0024 | 0,2320 | 0,0426 | 0,3798 | 3,E-05 | 0,1303 | 0,1124 | 0,0220 |
| 0,25 | 0,0048 | 0,0111 | 0,2005 | 1,E-04 | 0,2179 | 0,4210 | 3,E-08 | 0,0025 | 0,2370 | 0,0429 | 0,3947 | 3,E-05 | 0,1347 | 0,1157 | 0,0218 |
| 0,26 | 0,0043 | 0,0110 | 0,2088 | 1,E-04 | 0,2218 | 0,4375 | 3,E-08 | 0,0026 | 0,2421 | 0,0431 | 0,4097 | 3,E-05 | 0,1392 | 0,1191 | 0,0216 |
| 0,27 | 0,0038 | 0,0109 | 0,2172 | 1,E-04 | 0,2258 | 0,4541 | 3,E-08 | 0,0027 | 0,2471 | 0,0433 | 0,4247 | 3,E-05 | 0,1438 | 0,1226 | 0,0214 |
| 0,28 | 0,0033 | 0,0107 | 0,2256 | 2,E-04 | 0,2297 | 0,4707 | 4,E-08 | 0,0028 | 0,2522 | 0,0434 | 0,4397 | 4,E-05 | 0,1485 | 0,1262 | 0,0213 |
| 0,29 | 0,0027 | 0,0106 | 0,2340 | 2,E-04 | 0,2337 | 0,4873 | 4,E-08 | 0,0029 | 0,2573 | 0,0435 | 0,4547 | 4,E-05 | 0,1533 | 0,1298 | 0,0211 |
| 0,3 | 0,0022 | 0,0104 | 0,2424 | 2,E-04 | 0,2376 | 0,5039 | 4,E-08 | 0,0030 | 0,2624 | 0,0436 | 0,4698 | 4,E-05 | 0,1582 | 0,1336 | 0,0209 |
| 0,31 | 0,0016 | 0,0102 | 0,2509 | 2,E-04 | 0,2416 | 0,5206 | 4,E-08 | 0,0031 | 0,2675 | 0,0436 | 0,4849 | 4,E-05 | 0,1632 | 0,1374 | 0,0207 |
| 0,32 | 0,0010 | 0,0100 | 0,2594 | 2,E-04 | 0,2456 | 0,5373 | 4,E-08 | 0,0032 | 0,2727 | 0,0435 | 0,5000 | 4,E-05 | 0,1683 | 0,1414 | 0,0205 |
| 0,33 | 0,0004 | 0,0098 | 0,2681 | 2,E-04 | 0,2496 | 0,5540 | 4,E-08 | 0,0033 | 0,2778 | 0,0434 | 0,5152 | 5,E-05 | 0,1734 | 0,1454 | 0,0204 |
| 0,34 | -0,0002 | 0,0096 | 0,2765 | 2,E-04 | 0,2537 | 0,5707 | 4,E-08 | 0,0034 | 0,2830 | 0,0433 | 0,5304 | 5,E-05 | 0,1787 | 0,1496 | 0,0202 |
| 0,35 | -0,0008 | 0,0093 | 0,2852 | 2,E-04 | 0,2577 | 0,5875 | 4,E-08 | 0,0035 | 0,2882 | 0,0431 | 0,5456 | 5,E-05 | 0,1840 | 0,1538 | 0,0200 |
| 0,36 | -0,0014 | 0,0090 | 0,2937 | 2,E-04 | 0,2617 | 0,6042 | 4,E-08 | 0,0036 | 0,2934 | 0,0429 | 0,5608 | 5,E-05 | 0,1894 | 0,1581 | 0,0198 |
| 0,37 | -0,0021 | 0,0088 | 0,3023 | 2,E-04 | 0,2657 | 0,6210 | 4,E-08 | 0,0037 | 0,2986 | 0,0426 | 0,5760 | 5,E-05 | 0,1950 | 0,1624 | 0,0197 |
| 0,38 | -0,0027 | 0,0085 | 0,3107 | 2,E-04 | 0,2698 | 0,6379 | 4,E-08 | 0,0038 | 0,3038 | 0,0423 | 0,5913 | 5,E-05 | 0,2006 | 0,1670 | 0,0195 |
| 0,39 | -0,0034 | 0,0082 | 0,3194 | 2,E-04 | 0,2739 | 0,6547 | 4,E-08 | 0,0039 | 0,3090 | 0,0420 | 0,6067 | 6,E-05 | 0,2063 | 0,1715 | 0,0193 |
| 0,4 | -0,0041 | 0,0079 | 0,3281 | 2,E-04 | 0,2780 | 0,6716 | 4,E-08 | 0,0040 | 0,3142 | 0,0416 | 0,6220 | 6,E-05 | 0,2121 | 0,1762 | 0,0191 |

Continuación Tabla 19. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | MDH | MQO | NDH1 | NDH2 | PCK | PDH | PFK | PGI | PGK | PGL | PIT | PNT | PPC | PPS | PTA | PTS_0 | PTS_4 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0,1 | 2,0889 | 2,2914 | 0,2621 | 0,3657 | 0,1365 | 0,2419 | 0,0777 | 0,0572 | 0,1741 | 0,0425 | 0,0022 | 0,1037 | 0,0921 | 0,0000 | 0,0124 | 0,1000 | 0,1000 |
| 0,11 | 2,1396 | 2,3529 | 0,2732 | 0,3816 | 0,1384 | 0,2560 | 0,0858 | 0,0654 | 0,1906 | 0,0440 | 0,0073 | 0,0951 | 0,0921 | 0,0000 | 0,0129 | 0,1100 | 0,1100 |
| 0,12 | 2,1848 | 2,4075 | 0,2835 | 0,3963 | 0,1389 | 0,2691 | 0,0940 | 0,0737 | 0,2071 | 0,0455 | 0,0121 | 0,0853 | 0,0915 | 0,0000 | 0,0134 | 0,1200 | 0,1200 |
| 0,13 | 2,2256 | 2,4566 | 0,2932 | 0,4102 | 0,1383 | 0,2814 | 0,1021 | 0,0821 | 0,2235 | 0,0469 | 0,0166 | 0,0746 | 0,0907 | 0,0000 | 0,0139 | 0,1300 | 0,1300 |
| 0,14 | 2,2631 | 2,5015 | 0,3024 | 0,4235 | 0,1370 | 0,2930 | 0,1103 | 0,0905 | 0,2400 | 0,0483 | 0,0210 | 0,0632 | 0,0895 | 0,0000 | 0,0143 | 0,1400 | 0,1400 |
| 0,15 | 2,2979 | 2,5431 | 0,3114 | 0,4362 | 0,1351 | 0,3042 | 0,1184 | 0,0989 | 0,2564 | 0,0496 | 0,0252 | 0,0514 | 0,0883 | 0,0000 | 0,0148 | 0,1500 | 0,1500 |
| 0,16 | 2,3305 | 2,5820 | 0,3200 | 0,4486 | 0,1329 | 0,3151 | 0,1266 | 0,1074 | 0,2729 | 0,0509 | 0,0295 | 0,0392 | 0,0870 | 0,0000 | 0,0152 | 0,1600 | 0,1600 |
| 0,17 | 2,3611 | 2,6186 | 0,3285 | 0,4608 | 0,1304 | 0,3257 | 0,1348 | 0,1159 | 0,2893 | 0,0521 | 0,0336 | 0,0267 | 0,0857 | 0,0000 | 0,0156 | 0,1700 | 0,1700 |
| 0,18 | 2,3902 | 2,6533 | 0,3368 | 0,4728 | 0,1277 | 0,3361 | 0,1430 | 0,1245 | 0,3057 | 0,0533 | 0,0377 | 0,0140 | 0,0844 | 0,0000 | 0,0161 | 0,1800 | 0,1800 |
| 0,19 | 2,4177 | 2,6863 | 0,3451 | 0,4846 | 0,1249 | 0,3463 | 0,1512 | 0,1331 | 0,3222 | 0,0545 | 0,0418 | 0,0011 | 0,0831 | 0,0000 | 0,0165 | 0,1900 | 0,1900 |
| 0,2 | 2,4438 | 2,7177 | 0,3532 | 0,4963 | 0,1220 | 0,3563 | 0,1594 | 0,1418 | 0,3386 | 0,0556 | 0,0459 | -0,0119 | 0,0819 | 0,0000 | 0,0170 | 0,2000 | 0,2000 |
| 0,21 | 2,4686 | 2,7476 | 0,3613 | 0,5080 | 0,1190 | 0,3662 | 0,1676 | 0,1505 | 0,3550 | 0,0567 | 0,0500 | -0,0249 | 0,0808 | 0,0000 | 0,0174 | 0,2100 | 0,2100 |
| 0,22 | 2,4922 | 2,7761 | 0,3694 | 0,5196 | 0,1161 | 0,3760 | 0,1758 | 0,1593 | 0,3715 | 0,0577 | 0,0540 | -0,0380 | 0,0798 | 0,0000 | 0,0179 | 0,2199 | 0,2199 |
| 0,23 | 2,5145 | 2,8033 | 0,3775 | 0,5312 | 0,1132 | 0,3858 | 0,1841 | 0,1681 | 0,3880 | 0,0586 | 0,0581 | -0,0512 | 0,0789 | 0,0000 | 0,0183 | 0,2299 | 0,2299 |
| 0,24 | 2,5356 | 2,8292 | 0,3855 | 0,5428 | 0,1103 | 0,3954 | 0,1924 | 0,1770 | 0,4045 | 0,0595 | 0,0621 | -0,0645 | 0,0782 | 0,0000 | 0,0188 | 0,2399 | 0,2399 |
| 0,25 | 2,5555 | 2,8537 | 0,3936 | 0,5544 | 0,1074 | 0,4050 | 0,2007 | 0,1859 | 0,4210 | 0,0604 | 0,0662 | -0,0777 | 0,0775 | 0,0000 | 0,0192 | 0,2499 | 0,2499 |
| 0,26 | 2,5741 | 2,8770 | 0,4016 | 0,5660 | 0,1046 | 0,4145 | 0,2090 | 0,1949 | 0,4375 | 0,0611 | 0,0703 | -0,0910 | 0,0770 | 0,0000 | 0,0197 | 0,2599 | 0,2599 |
| 0,27 | 2,5916 | 2,8990 | 0,4097 | 0,5777 | 0,1019 | 0,4240 | 0,2174 | 0,2039 | 0,4541 | 0,0619 | 0,0743 | -0,1043 | 0,0767 | 0,0000 | 0,0202 | 0,2699 | 0,2699 |
| 0,28 | 2,6077 | 2,9196 | 0,4178 | 0,5894 | 0,0992 | 0,4333 | 0,2257 | 0,2130 | 0,4707 | 0,0625 | 0,0784 | -0,1176 | 0,0765 | 0,0000 | 0,0206 | 0,2799 | 0,2799 |
| 0,29 | 2,6227 | 2,9390 | 0,4259 | 0,6011 | 0,0966 | 0,4427 | 0,2341 | 0,2222 | 0,4873 | 0,0631 | 0,0824 | -0,1309 | 0,0764 | 0,0000 | 0,0211 | 0,2899 | 0,2899 |
| 0,3 | 2,6364 | 2,9571 | 0,4340 | 0,6128 | 0,0941 | 0,4519 | 0,2426 | 0,2314 | 0,5039 | 0,0637 | 0,0865 | -0,1443 | 0,0765 | 0,0000 | 0,0216 | 0,2999 | 0,2999 |
| 0,31 | 2,6489 | 2,9738 | 0,4421 | 0,6246 | 0,0917 | 0,4611 | 0,2510 | 0,2407 | 0,5206 | 0,0642 | 0,0905 | -0,1576 | 0,0768 | 0,0000 | 0,0221 | 0,3099 | 0,3099 |
| 0,32 | 2,6601 | 2,9892 | 0,4503 | 0,6364 | 0,0893 | 0,4702 | 0,2595 | 0,2501 | 0,5373 | 0,0646 | 0,0946 | -0,1709 | 0,0773 | 0,0000 | 0,0226 | 0,3199 | 0,3199 |
| 0,33 | 2,6701 | 3,0034 | 0,4584 | 0,6482 | 0,0871 | 0,4793 | 0,2680 | 0,2595 | 0,5540 | 0,0649 | 0,0987 | -0,1842 | 0,0779 | 0,0000 | 0,0232 | 0,3300 | 0,3299 |
| 0,34 | 2,6789 | 3,0162 | 0,4666 | 0,6601 | 0,0850 | 0,4882 | 0,2766 | 0,2689 | 0,5708 | 0,0652 | 0,1027 | -0,1975 | 0,0788 | 0,0000 | 0,0237 | 0,3399 | 0,3398 |
| 0,35 | 2,6865 | 3,0278 | 0,4748 | 0,6720 | 0,0830 | 0,4971 | 0,2852 | 0,2785 | 0,5875 | 0,0655 | 0,1068 | -0,2108 | 0,0798 | 0,0000 | 0,0242 | 0,3499 | 0,3498 |
| 0,36 | 2,6928 | 3,0381 | 0,4830 | 0,6839 | 0,0811 | 0,5059 | 0,2938 | 0,2881 | 0,6043 | 0,0657 | 0,1109 | -0,2240 | 0,0810 | 0,0000 | 0,0248 | 0,3598 | 0,3598 |
| 0,37 | 2,6981 | 3,0472 | 0,4912 | 0,6959 | 0,0793 | 0,5147 | 0,3024 | 0,2977 | 0,6209 | 0,0658 | 0,1149 | -0,2372 | 0,0824 | 0,0000 | 0,0253 | 0,3698 | 0,3698 |
| 0,38 | 2,7022 | 3,0552 | 0,4994 | 0,7079 | 0,0776 | 0,5234 | 0,3111 | 0,3074 | 0,6379 | 0,0658 | 0,1190 | -0,2506 | 0,0840 | 0,0000 | 0,0259 | 0,3798 | 0,3798 |
| 0,39 | 2,7053 | 3,0619 | 0,5077 | 0,7199 | 0,0761 | 0,5320 | 0,3198 | 0,3172 | 0,6547 | 0,0658 | 0,1231 | -0,2638 | 0,0858 | 0,0000 | 0,0265 | 0,3897 | 0,3897 |
| 0,4 | 2,7072 | 3,0675 | 0,5160 | 0,7319 | 0,0746 | 0,5405 | 0,3285 | 0,3270 | 0,6716 | 0,0657 | 0,1272 | -0,2770 | 0,0879 | 0,0000 | 0,0271 | 0,3997 | 0,3997 |

Continuación Tabla 19. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | PYK | RPE | RPI | S7P_E4P_TAL | S7P_R5P_TKT | SDH | SK | SQR | TPI |
|------------------|--------|--------|--------|-------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| 0,1 | 0,1131 | 0,0204 | 0,0130 | 0,0108 | 0,0107 | 0,1506 | 0,0719 | 0,1506 | 0,0777 |
| 0,11 | 0,1199 | 0,0204 | 0,0139 | 0,0109 | 0,0108 | 0,1571 | 0,0748 | 0,1571 | 0,0858 |
| 0,12 | 0,1257 | 0,0204 | 0,0148 | 0,0110 | 0,0110 | 0,1629 | 0,0777 | 0,1629 | 0,0939 |
| 0,13 | 0,1306 | 0,0203 | 0,0158 | 0,0111 | 0,0111 | 0,1682 | 0,0804 | 0,1682 | 0,1021 |
| 0,14 | 0,1349 | 0,0201 | 0,0168 | 0,0112 | 0,0112 | 0,1731 | 0,0832 | 0,1730 | 0,1102 |
| 0,15 | 0,1387 | 0,0199 | 0,0177 | 0,0113 | 0,0113 | 0,1776 | 0,0859 | 0,1776 | 0,1184 |
| 0,16 | 0,1422 | 0,0197 | 0,0187 | 0,0113 | 0,0114 | 0,1820 | 0,0887 | 0,1820 | 0,1265 |
| 0,17 | 0,1454 | 0,0194 | 0,0197 | 0,0114 | 0,0114 | 0,1862 | 0,0914 | 0,1862 | 0,1347 |
| 0,18 | 0,1484 | 0,0191 | 0,0206 | 0,0114 | 0,0114 | 0,1903 | 0,0943 | 0,1903 | 0,1429 |
| 0,19 | 0,1512 | 0,0188 | 0,0216 | 0,0114 | 0,0114 | 0,1944 | 0,0971 | 0,1944 | 0,1511 |
| 0,2 | 0,1539 | 0,0184 | 0,0225 | 0,0114 | 0,0114 | 0,1984 | 0,1000 | 0,1983 | 0,1593 |
| 0,21 | 0,1564 | 0,0180 | 0,0234 | 0,0114 | 0,0114 | 0,2023 | 0,1030 | 0,2023 | 0,1675 |
| 0,22 | 0,1588 | 0,0175 | 0,0243 | 0,0113 | 0,0114 | 0,2062 | 0,1060 | 0,2062 | 0,1757 |
| 0,23 | 0,1611 | 0,0170 | 0,0252 | 0,0113 | 0,0113 | 0,2101 | 0,1092 | 0,2101 | 0,1839 |
| 0,24 | 0,1634 | 0,0165 | 0,0260 | 0,0112 | 0,0112 | 0,2140 | 0,1124 | 0,2140 | 0,1922 |
| 0,25 | 0,1656 | 0,0160 | 0,0269 | 0,0111 | 0,0111 | 0,2179 | 0,1157 | 0,2179 | 0,2005 |
| 0,26 | 0,1677 | 0,0154 | 0,0277 | 0,0110 | 0,0110 | 0,2219 | 0,1191 | 0,2218 | 0,2088 |
| 0,27 | 0,1698 | 0,0147 | 0,0285 | 0,0109 | 0,0109 | 0,2258 | 0,1226 | 0,2258 | 0,2171 |
| 0,28 | 0,1718 | 0,0141 | 0,0293 | 0,0107 | 0,0108 | 0,2297 | 0,1261 | 0,2297 | 0,2255 |
| 0,29 | 0,1737 | 0,0134 | 0,0301 | 0,0106 | 0,0106 | 0,2337 | 0,1298 | 0,2337 | 0,2339 |
| 0,3 | 0,1757 | 0,0127 | 0,0309 | 0,0104 | 0,0104 | 0,2377 | 0,1335 | 0,2377 | 0,2423 |
| 0,31 | 0,1775 | 0,0119 | 0,0316 | 0,0102 | 0,0102 | 0,2417 | 0,1373 | 0,2417 | 0,2507 |
| 0,32 | 0,1793 | 0,0111 | 0,0324 | 0,0100 | 0,0100 | 0,2457 | 0,1412 | 0,2457 | 0,2592 |
| 0,33 | 0,1811 | 0,0103 | 0,0331 | 0,0098 | 0,0098 | 0,2497 | 0,1452 | 0,2497 | 0,2677 |
| 0,34 | 0,1828 | 0,0095 | 0,0338 | 0,0096 | 0,0096 | 0,2537 | 0,1492 | 0,2537 | 0,2762 |
| 0,35 | 0,1844 | 0,0086 | 0,0345 | 0,0093 | 0,0094 | 0,2578 | 0,1535 | 0,2577 | 0,2848 |
| 0,36 | 0,1860 | 0,0077 | 0,0351 | 0,0091 | 0,0091 | 0,2618 | 0,1578 | 0,2617 | 0,2934 |
| 0,37 | 0,1875 | 0,0068 | 0,0358 | 0,0088 | 0,0088 | 0,2658 | 0,1625 | 0,2658 | 0,3020 |
| 0,38 | 0,1890 | 0,0059 | 0,0364 | 0,0085 | 0,0085 | 0,2699 | 0,1669 | 0,2699 | 0,3106 |
| 0,39 | 0,1904 | 0,0049 | 0,0370 | 0,0082 | 0,0082 | 0,2740 | 0,1715 | 0,2740 | 0,3193 |
| 0,4 | 0,1918 | 0,0039 | 0,0377 | 0,0079 | 0,0079 | 0,2781 | 0,1762 | 0,2780 | 0,3280 |

Continuación Tabla 19. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para pequeñas variaciones de glucosa en torno al valor del flujo original ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | X5P_GAP_TKT | XCH_RMM_ACE | XCH_RMM_ACEx | XCH_RMM_GLC | XCH_RMM_P | ZWF |
|------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-----------|--------|
| 0,1 | 0,0205 | -6,E-06 | -6,E-06 | 0,1000 | 0,0022 | 0,0425 |
| 0,11 | 0,0205 | -4,E-06 | -4,E-06 | 0,1100 | 0,0073 | 0,0440 |
| 0,12 | 0,0204 | -3,E-06 | -3,E-06 | 0,1200 | 0,0121 | 0,0455 |
| 0,13 | 0,0203 | -2,E-06 | -2,E-06 | 0,1300 | 0,0166 | 0,0469 |
| 0,14 | 0,0201 | -6,E-07 | -6,E-07 | 0,1400 | 0,0210 | 0,0483 |
| 0,15 | 0,0200 | 5,E-07 | 5,E-07 | 0,1500 | 0,0252 | 0,0496 |
| 0,16 | 0,0197 | 1,E-06 | 1,E-06 | 0,1600 | 0,0295 | 0,0509 |
| 0,17 | 0,0194 | 2,E-06 | 2,E-06 | 0,1700 | 0,0336 | 0,0521 |
| 0,18 | 0,0191 | 3,E-06 | 3,E-06 | 0,1800 | 0,0377 | 0,0533 |
| 0,19 | 0,0188 | 4,E-06 | 4,E-06 | 0,1900 | 0,0418 | 0,0545 |
| 0,2 | 0,0184 | 5,E-06 | 5,E-06 | 0,2000 | 0,0459 | 0,0556 |
| 0,21 | 0,0180 | 6,E-06 | 6,E-06 | 0,2100 | 0,0500 | 0,0567 |
| 0,22 | 0,0175 | 7,E-06 | 7,E-06 | 0,2199 | 0,0540 | 0,0577 |
| 0,23 | 0,0170 | 8,E-06 | 8,E-06 | 0,2299 | 0,0581 | 0,0586 |
| 0,24 | 0,0165 | 9,E-06 | 9,E-06 | 0,2399 | 0,0622 | 0,0595 |
| 0,25 | 0,0159 | 1,E-05 | 1,E-05 | 0,2499 | 0,0662 | 0,0604 |
| 0,26 | 0,0153 | 1,E-05 | 1,E-05 | 0,2599 | 0,0703 | 0,0611 |
| 0,27 | 0,0147 | 1,E-05 | 1,E-05 | 0,2699 | 0,0743 | 0,0619 |
| 0,28 | 0,0140 | 1,E-05 | 1,E-05 | 0,2799 | 0,0784 | 0,0625 |
| 0,29 | 0,0133 | 1,E-05 | 1,E-05 | 0,2899 | 0,0824 | 0,0631 |
| 0,3 | 0,0126 | 2,E-05 | 2,E-05 | 0,2999 | 0,0865 | 0,0637 |
| 0,31 | 0,0119 | 2,E-05 | 2,E-05 | 0,3099 | 0,0906 | 0,0642 |
| 0,32 | 0,0111 | 2,E-05 | 2,E-05 | 0,3199 | 0,0946 | 0,0646 |
| 0,33 | 0,0103 | 2,E-05 | 2,E-05 | 0,3299 | 0,0987 | 0,0650 |
| 0,34 | 0,0094 | 2,E-05 | 2,E-05 | 0,3398 | 0,1027 | 0,0652 |
| 0,35 | 0,0085 | 2,E-05 | 2,E-05 | 0,3498 | 0,1068 | 0,0655 |
| 0,36 | 0,0076 | 3,E-05 | 3,E-05 | 0,3598 | 0,1109 | 0,0657 |
| 0,37 | 0,0067 | 3,E-05 | 3,E-05 | 0,3698 | 0,1150 | 0,0658 |
| 0,38 | 0,0058 | 3,E-05 | 3,E-05 | 0,3798 | 0,1190 | 0,0658 |
| 0,39 | 0,0048 | 3,E-05 | 3,E-05 | 0,3897 | 0,1231 | 0,0658 |
| 0,4 | 0,0038 | 3,E-05 | 3,E-05 | 0,3997 | 0,1272 | 0,0657 |

Tabla 20. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | ACCOA | ACO | ACP | AKG | BPG | CIT | DAP | E4P | F6P | FDP | FUM | G6P | GAP | GL6P | GLX | ICIT | KDPG | MAL | NAD |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0,034 | 0,000 | 0,002 | 0,020 | 0,008 | 0,001 | 0,019 | 0,007 | 0,024 | 0,001 | 0,036 | 0,066 | 0,005 | 0,000 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,179 | 1,518 |
| 8,38 | 0,658 | 0,260 | 0,038 | 0,947 | 0,012 | 0,750 | 1,424 | 0,389 | 0,601 | 3,033 | 0,404 | 2,893 | 0,376 | 0,024 | 0,005 | 0,826 | 0,796 | 1,925 | 1,011 |
| 16,75 | 0,658 | 0,260 | 0,039 | 0,947 | 0,012 | 0,750 | 1,424 | 0,389 | 0,602 | 3,034 | 0,404 | 2,898 | 0,376 | 0,024 | 0,005 | 0,827 | 0,797 | 1,925 | 1,011 |
| 33,5 | 0,659 | 0,260 | 0,039 | 0,947 | 0,012 | 0,751 | 1,424 | 0,389 | 0,602 | 3,034 | 0,403 | 2,900 | 0,376 | 0,024 | 0,005 | 0,827 | 0,798 | 1,924 | 1,011 |
| 50,25 | 0,659 | 0,260 | 0,039 | 0,947 | 0,012 | 0,751 | 1,424 | 0,389 | 0,603 | 3,035 | 0,403 | 2,901 | 0,376 | 0,024 | 0,005 | 0,827 | 0,798 | 1,924 | 1,011 |
| 67 | 0,659 | 0,260 | 0,039 | 0,947 | 0,012 | 0,751 | 1,424 | 0,389 | 0,603 | 3,035 | 0,403 | 2,902 | 0,376 | 0,024 | 0,005 | 0,827 | 0,798 | 1,924 | 1,011 |

Continuación Tabla 20. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | NADH | NADP | NADPH | OAA | PEP | PGA2 | PGA3 | PGN | PYR | Q | QH2 | R5P | RU5P | S7P | SUC | SUCCOA | X5P | ei | eiP |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| 0 | 0,052 | 0,205 | 0,052 | 0,039 | 0,288 | 0,097 | 0,173 | 0,007 | 0,035 | 0,554 | 0,446 | 0,025 | 0,077 | 0,098 | 0,029 | 0,004 | 0,113 | 0,000 | 0,007 |
| 8,38 | 0,559 | 0,126 | 0,131 | 0,044 | 0,169 | 0,088 | 0,183 | 0,987 | 0,553 | 0,118 | 0,882 | 0,221 | 0,730 | 0,220 | 0,779 | 0,127 | 1,107 | 0,005 | 0,002 |
| 16,75 | 0,559 | 0,126 | 0,131 | 0,044 | 0,168 | 0,088 | 0,183 | 0,989 | 0,553 | 0,118 | 0,882 | 0,222 | 0,731 | 0,221 | 0,779 | 0,127 | 1,109 | 0,005 | 0,002 |
| 33,5 | 0,559 | 0,126 | 0,131 | 0,044 | 0,168 | 0,087 | 0,183 | 0,991 | 0,554 | 0,118 | 0,882 | 0,222 | 0,732 | 0,221 | 0,779 | 0,127 | 1,109 | 0,005 | 0,002 |
| 50,25 | 0,559 | 0,126 | 0,131 | 0,044 | 0,168 | 0,087 | 0,183 | 0,991 | 0,554 | 0,118 | 0,882 | 0,222 | 0,732 | 0,221 | 0,780 | 0,127 | 1,110 | 0,005 | 0,002 |
| 67 | 0,559 | 0,126 | 0,131 | 0,044 | 0,168 | 0,087 | 0,183 | 0,991 | 0,554 | 0,118 | 0,882 | 0,222 | 0,732 | 0,221 | 0,779 | 0,127 | 1,110 | 0,005 | 0,002 |

Continuación Tabla 20. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | eiia | eiiaP | eiicb | eiicbP | hpr | hprP | icd | icdP | tal | talC3 | tkc | tkc2 | ADP | AMP | ATP | CAMP | P | MgADP | MgATP |
|------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 0,000 | 0,495 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,001 | 0,059 | 0,005 | 0,065 | 0,916 | 0,446 | 2,041 | 0,877 | 6,751 | 0,402 | 1,882 |
| 8,38 | 0,166 | 0,329 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,846 | 0,498 | 2,136 | 0,800 | 6,729 | 0,371 | 1,969 |
| 16,75 | 0,167 | 0,328 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,846 | 0,499 | 2,136 | 0,799 | 6,734 | 0,371 | 1,969 |
| 33,5 | 0,167 | 0,328 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,846 | 0,499 | 2,136 | 0,799 | 6,736 | 0,371 | 1,970 |
| 50,25 | 0,167 | 0,328 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,846 | 0,499 | 2,137 | 0,799 | 6,737 | 0,371 | 1,970 |
| 67 | 0,167 | 0,328 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,051 | 0,004 | 0,056 | 0,017 | 0,053 | 0,846 | 0,499 | 2,137 | 0,799 | 6,737 | 0,371 | 1,970 |

Continuación Tabla 20. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | MgFDP | FAD | FADH2 | ACE | GLCx | ACEx | Hout | GLCp | Pp | ACEp |
|------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| 0 | 0,000 | 0,525 | 0,475 | 5,E-05 | 9,E-07 | 6,E-05 | 5,E-05 | 1,E-07 | 10,024 | 5,E-05 |
| 8,38 | 0,445 | 0,009 | 0,991 | 7,E-04 | 8,E+00 | 7,E-04 | 6,E-05 | 7,5015 | 9,926 | 7,E-04 |
| 16,75 | 0,445 | 0,009 | 0,991 | 7,E-04 | 2,E+01 | 7,E-04 | 6,E-05 | 15,7243 | 9,926 | 7,E-04 |
| 33,5 | 0,446 | 0,009 | 0,991 | 7,E-04 | 3,E+01 | 7,E-04 | 6,E-05 | 32,1629 | 9,926 | 7,E-04 |
| 50,25 | 0,446 | 0,009 | 0,991 | 7,E-04 | 5,E+01 | 7,E-04 | 6,E-05 | 48,5752 | 9,926 | 7,E-04 |
| 67 | 0,446 | 0,009 | 0,991 | 7,E-04 | 7,E+01 | 7,E-04 | 6,E-05 | 64,9611 | 9,926 | 7,E-04 |

Tabla 21. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | ACEA | ACEB | ACK | ACEK_1 | ACEK_2 | ACN_1 | ACN_2 | ACS | ADK | ATP_MAIN | ATP_SYN | CYA | CYTBO | DOS | EDA | EDD | ENO |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0 | 0,0157 | 0,0157 | 0,0051 | 0,0017 | 0,0017 | 0,0468 | 0,0468 | 0,0051 | 0,0093 | 0,4415 | 0,3898 | 0,0061 | 0,1371 | 0,0073 | 0,0014 | 0,0014 | 0,0302 |
| 8,38 | 0,0719 | 0,0719 | 0,0713 | 0,0017 | 0,0017 | 0,4408 | 0,4407 | 0,0712 | 0,0779 | 0,7411 | 3,2476 | 0,0057 | 1,2902 | 0,0066 | 0,0343 | 0,0356 | 1,0336 |
| 16,75 | 0,0719 | 0,0719 | 0,0714 | 0,0017 | 0,0017 | 0,4408 | 0,4407 | 0,0713 | 0,0780 | 0,7404 | 3,2479 | 0,0057 | 1,2903 | 0,0066 | 0,0343 | 0,0356 | 1,0338 |
| 33,5 | 0,0719 | 0,0719 | 0,0714 | 0,0017 | 0,0017 | 0,4408 | 0,4408 | 0,0713 | 0,0780 | 0,7400 | 3,2480 | 0,0057 | 1,2903 | 0,0066 | 0,0344 | 0,0356 | 1,0339 |
| 50,25 | 0,0719 | 0,0719 | 0,0715 | 0,0017 | 0,0017 | 0,4408 | 0,4408 | 0,0714 | 0,0780 | 0,7398 | 3,2481 | 0,0057 | 1,2903 | 0,0066 | 0,0344 | 0,0356 | 1,0339 |
| 67 | 0,0719 | 0,0719 | 0,0715 | 0,0017 | 0,0017 | 0,4408 | 0,4408 | 0,0714 | 0,0780 | 0,7397 | 3,2481 | 0,0057 | 1,2903 | 0,0066 | 0,0344 | 0,0356 | 1,0339 |

Continuación Tabla 21. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | F6P_E4P_TKT | F6P_GAP_TAL | FBA | FBP | FUMA | GDH | GL6P_HYDROLYSIS | GLC_FEED | GLT | GND | GPM | GROWTH | ICD | LPD | MAD | |
|------------------|-------------|-------------|--------|--------|--------|--------|-----------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0 | 0,0085 | 0,0087 | 0,0074 | 0,0000 | 0,0470 | 0,0178 | | 4,E-09 | 0,0000 | 0,0468 | 0,0101 | 0,0259 | 1,E-11 | 0,0312 | 0,0313 | 0,0614 |
| 8,38 | -0,0199 | 0,0029 | 0,5607 | 0,0001 | 0,3728 | 1,1276 | | 1,E-07 | 0,0838 | 0,4408 | 0,0441 | 1,0336 | 1,E-04 | 0,3688 | 0,3009 | 0,0111 |
| 16,75 | -0,0198 | 0,0030 | 0,5607 | 0,0001 | 0,3728 | 1,1278 | | 1,E-07 | 0,1675 | 0,4408 | 0,0442 | 1,0338 | 1,E-04 | 0,3688 | 0,3009 | 0,0111 |
| 33,5 | -0,0198 | 0,0030 | 0,5608 | 0,0001 | 0,3728 | 1,1279 | | 1,E-07 | 0,3350 | 0,4408 | 0,0442 | 1,0339 | 1,E-04 | 0,3688 | 0,3009 | 0,0110 |
| 50,25 | -0,0198 | 0,0030 | 0,5608 | 0,0001 | 0,3728 | 1,1280 | | 1,E-07 | 0,5025 | 0,4408 | 0,0442 | 1,0339 | 1,E-04 | 0,3688 | 0,3009 | 0,0110 |
| 67 | -0,0198 | 0,0030 | 0,5608 | 0,0001 | 0,3728 | 1,1280 | | 1,E-07 | 0,6700 | 0,4408 | 0,0443 | 1,0339 | 1,E-04 | 0,3688 | 0,3009 | 0,0110 |

Continuación Tabla 21. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | MDH | MQO | NDH1 | NDH2 | PCK | PDH | PFK | PGI | PGK | PGL | PIT | PNT | PPC | PPS | PTA | PTS_0 | PTS_4 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0 | 1,2224 | 1,2242 | 0,0953 | 0,1305 | -0,0224 | 0,0628 | 0,0075 | -0,0101 | 0,0182 | 0,0113 | -0,0806 | 0,0527 | 0,0206 | 0,0000 | 0,0051 | 0,0000 | 0,0000 |
| 8,38 | 2,2943 | 2,7275 | 0,7291 | 1,0452 | 0,0955 | 0,7483 | 0,5618 | 0,5834 | 1,1276 | 0,0816 | 0,2474 | -0,6365 | 0,2154 | 0,0000 | 0,0714 | 0,6796 | 0,6797 |
| 16,75 | 2,2940 | 2,7273 | 0,7292 | 1,0453 | 0,0956 | 0,7484 | 0,5618 | 0,5834 | 1,1278 | 0,0817 | 0,2471 | -0,6367 | 0,2156 | 0,0000 | 0,0714 | 0,6796 | 0,6796 |
| 33,5 | 2,2939 | 2,7272 | 0,7292 | 1,0453 | 0,0956 | 0,7484 | 0,5619 | 0,5833 | 1,1279 | 0,0818 | 0,2470 | -0,6368 | 0,2156 | 0,0000 | 0,0715 | 0,6796 | 0,6796 |
| 50,25 | 2,2939 | 2,7271 | 0,7292 | 1,0454 | 0,0957 | 0,7485 | 0,5619 | 0,5833 | 1,1280 | 0,0818 | 0,2469 | -0,6369 | 0,2156 | 0,0000 | 0,0715 | 0,6795 | 0,6796 |
| 67 | 2,2939 | 2,7271 | 0,7292 | 1,0453 | 0,0957 | 0,7485 | 0,5619 | 0,5833 | 1,1279 | 0,0818 | 0,2469 | -0,6369 | 0,2157 | 0,0000 | 0,0715 | 0,6796 | 0,6796 |

Continuación Tabla 21. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | PYK | RPE | RPI | S7P_E4P_TAL | S7P_R5P_TKT | SDH | SK | SQR | TPI |
|------------------|--------|---------|--------|-------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| 0 | 0,0002 | 0,0091 | 0,0024 | 0,0086 | 0,0028 | 0,0469 | 0,0313 | 0,0468 | 0,0067 |
| 8,38 | 0,2015 | -0,0160 | 0,0597 | 0,0029 | 0,0031 | 0,3728 | 0,3009 | 0,3728 | 0,5605 |
| 16,75 | 0,2017 | -0,0160 | 0,0597 | 0,0030 | 0,0032 | 0,3728 | 0,3010 | 0,3728 | 0,5605 |
| 33,5 | 0,2018 | -0,0160 | 0,0597 | 0,0030 | 0,0032 | 0,3728 | 0,3008 | 0,3728 | 0,5605 |
| 50,25 | 0,2018 | -0,0159 | 0,0597 | 0,0030 | 0,0032 | 0,3728 | 0,3010 | 0,3728 | 0,5606 |
| 67 | 0,2018 | -0,0159 | 0,0597 | 0,0030 | 0,0032 | 0,3728 | 0,3006 | 0,3728 | 0,5606 |

Continuación Tabla 21. Flujos en estado estacionario ([mmol/s]), para grandes variaciones en los flujos de glucosa ([mmol/s]).

| Flujo de glucosa | X5P_GAP_TKT | XCH_RMM_ACE | XCH_RMM_ACEx | XCH_RMM_GLC | XCH_RMM_P | ZWF |
|------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-----------|--------|
| 0 | 0,0111 | -2,E-05 | -2,E-05 | 8,E-06 | -0,0807 | 0,0113 |
| 8,38 | -0,0167 | 1,E-04 | 1,E-04 | 0,6986 | 0,2474 | 0,0817 |
| 16,75 | -0,0167 | 1,E-04 | 1,E-04 | 0,7191 | 0,2471 | 0,0818 |
| 33,5 | -0,0166 | 1,E-04 | 1,E-04 | 0,7602 | 0,2470 | 0,0818 |
| 50,25 | -0,0166 | 1,E-04 | 1,E-04 | 0,8013 | 0,2470 | 0,0818 |
| 67 | -0,0166 | 1,E-04 | 1,E-04 | 0,8423 | 0,2469 | 0,0818 |

9.6. Anexo F: Comparación de las reacciones de los modelos cinéticos existentes

Tabla 22. Reacciones consideradas en los modelos cinéticos comparados. En azul están las reacciones que faltan en el modelo usado y en naranja las implementadas.

| | Chassagnole et al., 2002 [38] | Kadir et al., 2010 [39] | Kotte et al., 2010 [40] | Peskov et al., 2012 [41] | Jahan et al., 2016 [43] | Matsuoka et al., 2017 [42] | Modelo usado [12] |
|--|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------|
| PTS (Sistema de transferasa de glucosa) | PTS | PTS | | PTS | | | PTS_0 |
| | | | PTS_1 | | PTS_1 | PTS_1 | PTS_1 |
| | | | | | | | PTS_2 |
| | | | | | | | PTS_3 |
| | | | PTS_4 | | PTS_4 | PTS_4 | PTS_4 |
| EMP (Glicólisis y gluconeogénesis) | PGI | PGI | | PGI | PGI | PFK | PGI |
| | PFK | PFK | PFKA | PFKA | PFK | | PFK |
| | | | FDP (FBP) | FBP | FBP | FBP | FBP |
| | ALDO | ALDO | | FBA | FBA | FBA | FBA |
| | TIS | | EMP | TPI | GAPDH | EMP | TPI |
| | GAPDH | GAPDH | | GDH | | | GDH |
| | PGK | | | PGK | | | PGK |
| | PGluMu | | | GPM | | | GPM |
| | ENO | | ENO | ENO | | | ENO |
| | PK | PYK | PYKF | PYKF | PYKF | PYK | PYK |
| | | | PPS | PPSA | PPS | PPS | PPS |
| | PDH | PDH | PDH | PDH | PDH | PDH | PDH |
| | | GLK | | GLK | GLK | GLK | GLK |
| | | | | PYKA | NON_PTS | NON_PTS | |
| | | | | PFKB | | | |
| | | | GLPX | | | | |

Continuación Tabla 22. Reacciones consideradas en los modelos cinéticos comparados. En azul están las reacciones que faltan en el modelo usado y en naranja las implementadas.

| | | | | | | |
|--|-------|-------|---------|-------|-------------|-------------|
| PPP (Pentosas fosfato) | G6PDH | G6PDH | ZWF | G6PDH | G6PDH | ZWF |
| | | | PGL | PGL | | PGL |
| | | | | | | GL6P_HYDRO |
| | PGDH | 6PGDH | GND | 6PGDH | PGDH | GND |
| | RU5P | RPE | RPE | RU5P | RPE | RPE |
| | R5P | RPI | RPI | R5P | RPI | RPI |
| | TKA | TKTA | TKT | TKTA | TKTA | X5P_GAP_TKT |
| | TKB | TKTB | | TKTB | TKTB | F6P_E4P_TKT |
| | | | | | | S7P_R5P_TKT |
| | TA | TAL | TAL | TAL | TAL | F6P_GAP_TAL |
| | | | | | S7P_E4P_TAL | |
| EDP (Entner-Doudoroff) | | | EDD | EDD | | EDD |
| | | | EDA | EDA | | EDA |
| TCA (Ciclo del ácido tricarbóxico o Ciclo de Krebs) | | CS | GLTA | CS | CS | GLT |
| | | | | | | ACN_1 |
| | | | | ACNB | | ACN_2 |
| | | ICDH | ICD | | ICDH | ICDH |
| | | | ACEK_KI | | ACEK_KI | ACEK_1 |
| | | | ACEK_PH | | ACEK_PH | ACEK_2 |
| | | 2KGDH | AKG2MAL | AKG | AKGDH | AKGDH |
| | | | | | | LPD |
| | | | | | | SK |
| | | SDH | | SDH | SDH | SDH |
| | FUM | | FUMA | FUM | FRD | |
| | | | MQO | | | |
| | | | | | MQO | |
| | MDH | MDH | MDH | MDH | MDH | |
| | | | | | MDH | |

Continuación Tabla 22. Reacciones consideradas en los modelos cinéticos comparados. En azul están las reacciones que faltan en el modelo usado y en naranja las implementadas.

| | | | | | | | |
|---|-----------------------|-----|-----------|------|------------|---------------|----------|
| AR (Reacciones anapleróticas) | PEPCXYLASE | PPC | PPC | PPC | PPC | PPC | PPC |
| | SYNTH 1 (MUR,CHO SYN) | PCK | PCKA | PCKA | PCK | PCK | PCK |
| | SYNTH 2 (PYR->) | | MAEAB | MAEA | | | MAD |
| | | MEZ | | MAEB | MAEB | MAEB (MEZ) | |
| GS (Derivación a glioxilato) | | ICL | ACEA | ACEA | ACEA (ICL) | ACEA (ICL) | ACEA |
| | | MS | ACEB | ACEB | ACEB (MS) | ACEB (MS) | ACEB |
| OP (Fosforilación oxidativa) | | | | | | NUO/NDH | NADH_1 |
| | | | | | | CYO/CYD/CYTBO | NADH_2 |
| | | | | | | | SQR |
| | | | | | | | CYTBO |
| | | | | | | SYN_QH2 | ATP_SYN |
| NC & T (Conversión de nucleótidos y transhidrogenasas) | PGM | | | | | | PNT |
| | G1PAT | | | | | | ADK |
| | DAHPS | | | | | | ATP_NGAM |
| | RPPK | | CYA | | CYA | CYA | CYA |
| | G3PDH | | CAMP_DEGR | | CAMP_DEGR | CAMP_DEGR | DOS |
| | MET,TRP SYN | | | | | | |
| AC (Metabolismo de acetato) | | PTA | ACO2ACT | | PTA | PTACK | PTA |
| | | ACK | | | ACK | | ACK |
| | | ACS | ACS | | ACS | ACS | ACS |
| FP (Rutas fermentativas) | | | | | | LDH | |
| | | | | | | PFL | |
| | | | | | | ALDH | |
| | | | | | | ADH | |

Continuación Tabla 22. Reacciones consideradas en los modelos cinéticos comparados. En azul están las reacciones que faltan en el modelo usado y en naranja las implementadas.

| | | | |
|--|--|------------|----------------------|
| XCH (reacciones de transporte entre compartimentos) | | GLC_UPTAKE | XCH_GLC |
| | | ACT_EXCRET | XCH_P |
| | | ACT_UPTAKE | XCH_ACE _x |
| | | LAC_EXCRET | XCH_ACE _p |
| | | FOR_EXCRET | XCH_P _p |
| | | ETH_EXCRET | PIT |
| | | SUC_TRANS | |
| GROWTH (crecimiento) | | | GROWTH |

9.7. Anexo G: Resultados simulaciones con enzimas nuevas incorporadas

Tabla 23. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | ACCOA | ACO | ACP | AKG | BPG | CIT | DAP | E4P | F6P | FDP | FUM | G6P | GAP | GL6P | GLX | ICIT | KDPG | MAL | NAD |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|
| Modelo original | 0,155 | 0,031 | 0,014 | 0,586 | 0,066 | 0,087 | 0,437 | 0,131 | 0,263 | 0,281 | 0,215 | 0,865 | 0,117 | 3,E-03 | 0,009 | 0,102 | 0,087 | 1,042 | 1,411 |
| Con MAE B | 0,156 | 0,031 | 0,014 | 0,588 | 0,066 | 0,087 | 0,437 | 0,131 | 0,262 | 0,282 | 0,214 | 0,862 | 0,117 | 3,E-03 | 0,009 | 0,103 | 0,088 | 1,034 | 1,411 |
| Con SUC | 0,155 | 0,031 | 0,014 | 0,586 | 0,066 | 0,087 | 0,437 | 0,131 | 0,263 | 0,281 | 0,215 | 0,865 | 0,117 | 3,E-03 | 0,009 | 0,102 | 0,087 | 1,042 | 1,411 |
| Con LAC | 0,155 | 0,031 | 0,014 | 0,586 | 0,066 | 0,087 | 0,437 | 0,131 | 0,263 | 0,281 | 0,215 | 0,865 | 0,117 | 3,E-03 | 0,009 | 0,102 | 0,087 | 1,042 | 1,409 |
| Con ETH | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,000 | 0,000 | 1,549 | 0,059 | 0,002 | 3,414 | 0,000 | 0,006 | 0,418 | 2,E-04 | 0,511 | 0,000 | 2,206 | 0,000 | 0,000 |
| MAE B + SUC | 0,156 | 0,031 | 0,014 | 0,588 | 0,066 | 0,087 | 0,437 | 0,131 | 0,262 | 0,282 | 0,214 | 0,862 | 0,117 | 3,E-03 | 0,009 | 0,103 | 0,088 | 1,034 | 1,411 |
| MAE B + SUC + LAC | 0,156 | 0,031 | 0,014 | 0,588 | 0,066 | 0,087 | 0,437 | 0,131 | 0,262 | 0,282 | 0,214 | 0,863 | 0,117 | 3,E-03 | 0,009 | 0,103 | 0,088 | 1,034 | 1,409 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | 0,000 | 1,549 | 0,059 | 0,002 | 3,414 | 0,000 | 0,006 | 0,418 | 2,E-04 | 0,514 | 9,E-05 | 2,203 | 4,E-04 | 2,E-24 |

Continuación Tabla 23. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | NADH | NADP | NADPH | OAA | PEP | PGA2 | PGA3 | PGN | PYR | Q | QH2 | R5P | RU5P | S7P | SUC | SUCCOA | X5P | ei | eiP |
|--------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|
| Modelo original | 0,159 | 0,168 | 0,089 | 0,129 | 1,000 | 0,379 | 0,698 | 0,132 | 0,239 | 0,325 | 0,675 | 0,107 | 0,343 | 0,143 | 0,190 | 0,036 | 0,508 | 3,E-04 | 6,E-03 |
| Con MAE B | 0,159 | 0,168 | 0,089 | 0,127 | 0,995 | 0,378 | 0,695 | 0,132 | 0,240 | 0,326 | 0,674 | 0,107 | 0,342 | 0,142 | 0,191 | 0,036 | 0,506 | 3,E-04 | 6,E-03 |
| Con SUC | 0,159 | 0,168 | 0,089 | 0,129 | 1,000 | 0,379 | 0,698 | 0,132 | 0,239 | 0,325 | 0,675 | 0,107 | 0,343 | 0,143 | 0,190 | 0,036 | 0,508 | 3,E-04 | 6,E-03 |
| Con LAC | 0,159 | 0,168 | 0,089 | 0,129 | 1,000 | 0,379 | 0,698 | 0,132 | 0,239 | 0,325 | 0,675 | 0,107 | 0,343 | 0,143 | 0,190 | 0,036 | 0,508 | 3,E-04 | 6,E-03 |
| Con ETH | 0,000 | 0,173 | 0,084 | 0,005 | 0,006 | 0,002 | 0,003 | 0,009 | 2,658 | 0,614 | 0,386 | 0,006 | 0,019 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,029 | 7,E-03 | 9,E-07 |
| MAE B + SUC | 0,159 | 0,168 | 0,089 | 0,127 | 0,995 | 0,378 | 0,695 | 0,132 | 0,240 | 0,326 | 0,674 | 0,107 | 0,342 | 0,142 | 0,191 | 0,036 | 0,506 | 3,E-04 | 6,E-03 |
| MAE B + SUC + LAC | 0,159 | 0,168 | 0,089 | 0,127 | 0,995 | 0,378 | 0,695 | 0,131 | 0,240 | 0,326 | 0,674 | 0,107 | 0,342 | 0,142 | 0,191 | 0,036 | 0,506 | 3,E-04 | 6,E-03 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 2,E-23 | 0,173 | 0,084 | 0,005 | 0,006 | 0,002 | 0,003 | 0,009 | 2,654 | 0,614 | 0,386 | 0,006 | 0,019 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,029 | 7,E-03 | 9,E-07 |

Continuación Tabla 23. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | eiia | eiiaP | eiicb | eiicbP | hpr | hprP | icd | icdP | tal | talC3 | tkt | tktC2 | ADP | AMP | ATP |
|--------------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Modelo original | 0,014 | 0,481 | 5,E-05 | 3,E-04 | 2,E-04 | 5,E-03 | 5,E-04 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,597 | 0,186 | 2,573 |
| Con MAE B | 0,014 | 0,481 | 5,E-05 | 3,E-04 | 2,E-04 | 5,E-03 | 5,E-04 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,596 | 0,185 | 2,574 |
| Con SUC | 0,014 | 0,481 | 5,E-05 | 3,E-04 | 2,E-04 | 5,E-03 | 5,E-04 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,597 | 0,186 | 2,573 |
| Con LAC | 0,014 | 0,481 | 5,E-05 | 3,E-04 | 2,E-04 | 5,E-03 | 5,E-04 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,597 | 0,185 | 2,573 |
| Con ETH | 0,494 | 0,000 | 4,E-04 | 2,E-07 | 5,E-03 | 3,E-06 | 3,E-03 | 0,049 | 0,057 | 0,003 | 0,066 | 0,004 | 0,990 | 2,405 | 0,408 |
| MAE B + SUC | 0,014 | 0,481 | 5,E-05 | 3,E-04 | 2,E-04 | 5,E-03 | 5,E-04 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,596 | 0,185 | 2,574 |
| MAE B + SUC + LAC | 0,014 | 0,481 | 5,E-05 | 3,E-04 | 2,E-04 | 5,E-03 | 5,E-04 | 0,051 | 0,003 | 0,057 | 0,014 | 0,056 | 0,596 | 0,185 | 2,574 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 0,494 | 0,000 | 4,E-04 | 2,E-07 | 5,E-03 | 3,E-06 | 3,E-03 | 0,049 | 0,057 | 0,003 | 0,066 | 0,004 | 0,990 | 2,405 | 0,408 |

Continuación Tabla 23. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | CAMP | P | MgADP | MgATP | MgFDP | FAD | FADH2 | ACE | GLCx | ACEx | Hout | GLCp | Pp | ACEp |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|
| Modelo original | 0,925 | 9,760 | 0,262 | 2,372 | 0,041 | 0,253 | 0,747 | 2,E-04 | 0,027 | 2,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 9,983 | 2,E-04 |
| Con MAE B | 0,925 | 9,771 | 0,262 | 2,373 | 0,041 | 0,253 | 0,747 | 2,E-04 | 0,027 | 2,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 9,983 | 2,E-04 |
| Con SUC | 0,925 | 9,760 | 0,262 | 2,372 | 0,041 | 0,253 | 0,747 | 2,E-04 | 0,027 | 2,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 9,983 | 2,E-04 |
| Con LAC | 0,925 | 9,760 | 0,262 | 2,372 | 0,041 | 0,253 | 0,747 | 2,E-04 | 0,027 | 2,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 9,983 | 2,E-04 |
| Con ETH | 0,477 | 1,446 | 0,435 | 0,376 | 0,501 | 0,599 | 0,401 | 1,E-07 | 0,196 | 2,E-06 | 4,E-05 | 0,196 | 10,008 | 1,E-06 |
| MAE B + SUC | 0,925 | 9,771 | 0,262 | 2,373 | 0,041 | 0,253 | 0,747 | 2,E-04 | 0,027 | 2,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 9,983 | 2,E-04 |
| MAE B + SUC + LAC | 0,925 | 9,771 | 0,262 | 2,373 | 0,041 | 0,253 | 0,747 | 2,E-04 | 0,027 | 2,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 9,983 | 2,E-04 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 0,477 | 1,446 | 0,435 | 0,376 | 0,501 | 0,599 | 0,401 | 1,E-07 | 0,196 | 2,E-06 | 4,E-05 | 0,196 | 10,008 | 1,E-06 |

Continuación Tabla 23. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | FOR | FORp | FORx | LAC | LACp | LACx | SUCp | SUCx | ETH | ETHp | ETHx | AcAld |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Modelo original | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 2,2,E-01 | 2,2,E-01 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 |
| Con MAE B | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 2,2,E-01 | 2,2,E-01 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 |
| Con SUC | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-01 | 2,2,E-01 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 |
| Con LAC | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 2,1,E-04 | 2,1,E-04 | 2,0,E-04 | 2,2,E-01 | 2,2,E-01 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 |
| Con ETH | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 2,2,E-01 | 2,2,E-01 | 5,0,E-03 | 5,0,E-03 | 5,0,E-03 | 5,9,E-01 |
| MAE B + SUC | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-01 | 2,2,E-01 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 |
| MAE B + SUC + LAC | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 2,1,E-04 | 2,1,E-04 | 2,0,E-04 | 1,9,E-01 | 2,2,E-01 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 1,9,E-04 | 2,8,E-04 | 2,2,E-01 | 5,0,E-03 | 5,0,E-03 | 5,0,E-03 | 5,9,E-01 |

Tabla 24. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | ACEA | ACEB | ACK | ACEK_1 | ACEK_2 | ACN_1 | ACN_2 | ACS | ADK | ATP_MAIN | ATP_SYN | CYA | CYTBO | DOS | EDA | EDD | ENO |
|--------------------------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Modelo original | 0,0012 | 2,E-08 | 4,E-09 | 0,0017 | 0,0017 | 5,E-06 | 7,E-06 | 5,E-10 | 0,0071 | 1,0468 | 0,7535 | 0,0062 | 0,2594 | 0,0067 | -0,0445 | 0,0013 | 0,3734 |
| Con MAE B | 0,0012 | 2,E-07 | 5,E-08 | 0,0017 | 0,0017 | 5,E-06 | 7,E-06 | 5,E-09 | 0,0071 | 1,0458 | 0,7524 | 0,0062 | 0,2588 | 0,0067 | -0,0445 | 0,0013 | 0,3735 |
| Con SUC | 0,0012 | 2,E-08 | 3,E-11 | 0,0017 | 0,0017 | 5,E-06 | 7,E-06 | 4,E-10 | 0,0071 | 1,0468 | 0,7535 | 0,0062 | 0,2594 | 0,0067 | -0,0445 | 0,0013 | 0,3734 |
| Con LAC | 0,0012 | 1,E-08 | 3,E-09 | 0,0017 | 0,0017 | 5,E-06 | 8,E-06 | 3,E-10 | 0,0070 | 1,0223 | 0,7241 | 0,0062 | 0,2484 | 0,0066 | -0,0431 | 0,0013 | 0,3760 |
| Con ETH | 0,0006 | 4,E-12 | -7,E-10 | 0,0017 | 0,0017 | 5,E-06 | 7,E-06 | 8,E-14 | 0,0071 | 1,0468 | 0,7542 | 0,0062 | 0,2595 | 0,0066 | -0,0445 | 0,0013 | 0,3730 |
| MAE B + SUC | 0,0012 | 3,E-07 | 9,E-08 | 0,0017 | 0,0017 | 5,E-06 | 7,E-06 | 7,E-09 | 0,0071 | 1,0458 | 0,7524 | 0,0062 | 0,2588 | 0,0067 | -0,0445 | 0,0013 | 0,3735 |
| MAE B + SUC + LAC | 0,0012 | 9,E-08 | 3,E-08 | 0,0017 | 0,0017 | 6,E-06 | 8,E-06 | 2,E-09 | 0,0070 | 1,0214 | 0,7231 | 0,0062 | 0,2479 | 0,0066 | -0,0431 | 0,0013 | 0,3760 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 0,0006 | 0,E+00 | -1,E-10 | 0,0017 | 0,0017 | 5,E-06 | 7,E-06 | 0,E+00 | 0,0070 | 1,0205 | 0,7229 | 0,0062 | 0,2477 | 0,0065 | -0,0430 | 0,0013 | 0,3757 |

Continuación Tabla 24. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | F6P_E4P_TKT | F6P_GAP_TAL | FBA | FBP | FUMA | GDH | GL6P_HYDROLYSIS | GLC_FEED | GLT | GND | GPM | GROWTH | ICD | LPD |
|--------------------------------|-------------|-------------|--------|---------|--------|--------|-----------------|----------|---------|--------|--------|----------|---------|---------|
| Modelo original | 0,0217 | 0,0218 | 0,2001 | 6,0E-05 | 0,0012 | 0,3783 | 4,2E-08 | 0,0023 | 5,3E-08 | 0,0689 | 0,3751 | 1,0,E-12 | -0,0012 | 9,9E-11 |
| Con MAE B | 0,0217 | 0,0218 | 0,2002 | 6,0E-05 | 0,0012 | 0,3784 | 4,2E-08 | 0,0023 | 5,4E-07 | 0,0689 | 0,3752 | 1,0,E-11 | -0,0012 | 1,0E-09 |
| Con SUC | 0,0218 | 0,0218 | 0,2001 | 6,0E-05 | 0,0012 | 0,3783 | 4,2E-08 | 0,0023 | 4,4E-08 | 0,0689 | 0,3751 | 8,6,E-13 | -0,0012 | 8,9E-11 |
| Con LAC | 0,0218 | 0,0219 | 0,2006 | 5,9E-05 | 0,0012 | 0,3806 | 4,2E-08 | 0,0023 | 3,6E-08 | 0,0687 | 0,3776 | 6,7,E-13 | -0,0012 | 6,7E-11 |
| Con ETH | 0,0220 | 0,0221 | 0,1998 | 5,9E-05 | 0,0006 | 0,3778 | 4,3E-08 | 0,0023 | 1,1E-11 | 0,0697 | 0,3746 | 8,0,E-17 | -0,0006 | 2,6E-14 |
| MAE B + SUC | 0,0217 | 0,0218 | 0,2002 | 6,0E-05 | 0,0012 | 0,3784 | 4,2E-08 | 0,0023 | 7,7E-07 | 0,0689 | 0,3752 | 1,5,E-11 | -0,0012 | 1,5E-09 |
| MAE B + SUC + LAC | 0,0218 | 0,0218 | 0,2007 | 5,9E-05 | 0,0012 | 0,3807 | 4,2E-08 | 0,0023 | 2,3E-07 | 0,0687 | 0,3776 | 4,3,E-12 | -0,0012 | 4,5E-10 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 0,0219 | 0,0220 | 0,2003 | 5,8E-05 | 0,0006 | 0,3803 | 4,2E-08 | 0,0023 | 0,0E+00 | 0,0694 | 0,3772 | 0,0,E+00 | -0,0006 | 0,0E+00 |

Continuación Tabla 24. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | MAD | MDH | MQO | NDH1 | NDH2 | PCK | PDH | PFK | PGI | PGK | PGL | PIT | PNT | PPC | PPS | PTA |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Modelo original | 0,0811 | 1,6950 | 1,6149 | 0,2503 | 0,3473 | -0,0723 | 7,9E-08 | 0,2002 | 0,1572 | 0,3781 | 0,0706 | 0,0622 | 0,1383 | 0,0083 | 0,0005 | 4,4E-09 |
| Con MAE B | 0,0811 | 1,6938 | 1,6127 | 0,2503 | 0,3473 | -0,0734 | 8,1E-07 | 0,2002 | 0,1573 | 0,3782 | 0,0705 | 0,0621 | 0,1381 | 0,0083 | 0,0005 | 4,5E-08 |
| Con SUC | 0,0811 | 1,6950 | 1,6149 | 0,2503 | 0,3473 | -0,0723 | 7,1E-08 | 0,2002 | 0,1572 | 0,3781 | 0,0706 | 0,0622 | 0,1383 | 0,0083 | 0,0005 | 3,7E-09 |
| Con LAC | 0,0833 | 1,6645 | 1,5823 | 0,2421 | 0,3358 | -0,0746 | 5,4E-08 | 0,2007 | 0,1576 | 0,3805 | 0,0704 | 0,0595 | 0,1379 | 0,0082 | 0,0005 | 3,0E-09 |
| Con ETH | 0,0811 | 1,6969 | 1,6163 | 0,2509 | 0,3482 | -0,0728 | 2,1E-11 | 0,1998 | 0,1565 | 0,3776 | 0,0713 | 0,0631 | 0,1403 | 0,0084 | 0,0005 | 9,0E-13 |
| MAE B + SUC | 0,0811 | 1,6938 | 1,6127 | 0,2503 | 0,3473 | -0,0734 | 1,2E-06 | 0,2003 | 0,1573 | 0,3782 | 0,0705 | 0,0621 | 0,1381 | 0,0083 | 0,0005 | 6,4E-08 |
| MAE B + SUC + LAC | 0,0834 | 1,6635 | 1,5802 | 0,2422 | 0,3358 | -0,0756 | 3,6E-07 | 0,2007 | 0,1577 | 0,3805 | 0,0703 | 0,0594 | 0,1377 | 0,0082 | 0,0005 | 1,9E-08 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 0,0835 | 1,6645 | 1,5805 | 0,2426 | 0,3363 | -0,0762 | 0,0E+00 | 0,2004 | 0,1570 | 0,3801 | 0,0709 | 0,0604 | 0,1397 | 0,0084 | 0,0005 | 0,0E+00 |

Continuación Tabla 24. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | PTS_0 | PTS_4 | PYK | RPE | RPI | S7P_E4P_TAL | S7P_R5P_TKT | SDH | SK | SQR | TPI | X5P_GAP_TKT |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|-------------|--------|---------|--------|--------|-------------|
| Modelo original | 0,2300 | 0,2300 | 0,0589 | 0,0454 | 0,0228 | 0,0218 | 0,0226 | 0,0012 | 2,1E-10 | 0,0012 | 0,2002 | 0,0443 |
| Con MAE B | 0,2300 | 0,2300 | 0,0579 | 0,0453 | 0,0228 | 0,0218 | 0,0226 | 0,0012 | 3,3E-09 | 0,0012 | 0,2002 | 0,0443 |
| Con SUC | 0,2298 | 0,2300 | 0,0589 | 0,0454 | 0,0228 | 0,0218 | 0,0226 | 0,0012 | 5,3E-10 | 0,0012 | 0,2002 | 0,0443 |
| Con LAC | 0,2300 | 0,2300 | 0,0594 | 0,0453 | 0,0228 | 0,0219 | 0,0225 | 0,0012 | 1,4E-10 | 0,0012 | 0,2006 | 0,0443 |
| Con ETH | 0,2299 | 0,2300 | 0,0579 | 0,0459 | 0,0231 | 0,0221 | 0,0228 | 0,0006 | 1,5E-12 | 0,0006 | 0,1998 | 0,0448 |
| MAE B + SUC | 0,2300 | 0,2300 | 0,0579 | 0,0453 | 0,0228 | 0,0218 | 0,0226 | 0,0012 | 8,3E-09 | 0,0012 | 0,2002 | 0,0443 |
| MAE B + SUC + LAC | 0,2300 | 0,2300 | 0,0584 | 0,0453 | 0,0227 | 0,0218 | 0,0225 | 0,0012 | 2,5E-09 | 0,0012 | 0,2007 | 0,0443 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 0,2300 | 0,2300 | 0,0574 | 0,0457 | 0,0230 | 0,0220 | 0,0227 | 0,0006 | 0,0E+00 | 0,0006 | 0,2003 | 0,0447 |

Continuación Tabla 24. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | XCH_RMM_ACE | XCH_RMM_ACEx | XCH_RMM_GLC | XCH_RMM_P | ZWF | MAE_B | LDH | XCH_RMM_LACp | XCH_RMM_LACx |
|--------------------------------|-------------|--------------|-------------|-----------|--------|--------|--------|--------------|--------------|
| Modelo original | 2,8E-08 | 3,4E-08 | 0,2300 | 0,0622 | 0,0706 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Con MAE B | 6,4E-08 | 6,9E-08 | 0,2300 | 0,0621 | 0,0705 | 0,0010 | 0 | 0 | 0 |
| Con SUC | 2,6E-08 | 3,2E-08 | 0,2300 | 0,0622 | 0,0706 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Con LAC | 2,7E-08 | 3,3E-08 | 0,2300 | 0,0595 | 0,0704 | 0 | 0,0239 | 0,0237 | 0,0236 |
| Con ETH | 1,5E-08 | 1,9E-08 | 0,2300 | 0,0631 | 0,0713 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MAE B + SUC | 8,0E-08 | 8,5E-08 | 0,2300 | 0,0621 | 0,0705 | 0,0010 | 0 | 0 | 0 |
| MAE B + SUC + LAC | 4,2E-08 | 4,8E-08 | 0,2300 | 0,0594 | 0,0703 | 0,0010 | 0,0239 | 0,0236 | 0,0236 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | 1,5E-08 | 1,9E-08 | 0,2300 | 0,0604 | 0,0709 | 0,0010 | 0,0245 | 0,0243 | 0,0242 |

Continuación Tabla 24. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada combinación de enzimas incorporada.

| Enzimas | PFL | XCH_RMM_FORp | XCH_RMM_FORx | ALDH | ADH | XCH_RMM_ETHp | XCH_RMM_ETHx | XCH_RMM_SUCp | XCH_RMM_SUCx |
|-------------------------|-----|--------------|--------------|------|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Modelo original | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Con MAE B | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Con SUC | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5E-05 |
| Con LAC | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Con ETH | | 0 | 0 | 0 | 8,4E-12 | 5,7E-08 | 4,6E-08 | 4,6E-08 | 0 |
| MAE B + SUC | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5E-05 |
| MAE B + SUC + LAC | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5E-05 |
| MAE B + SUC + LAC + ETH | | 0 | 0 | 0 | 0 | 7,9E-09 | 6,6E-09 | 6,4E-09 | 1,3E-05 |

9.8. Anexo H: Estimación del parámetro K_{cat} de la enzima KDGK de *Vibrio splendidus*

En ensayos con la enzima KDGK se tiene una relación entre cantidad de sustrato (160 μmol), el tiempo (10 min) y cantidad de enzima (4 μg) [71]. Conociendo también que el peso molecular de la enzima es 35.038 g/mol [72], se puede calcular la constante catalítica de la siguiente forma:

$$k_{cat} = \frac{\text{moles sustrato}}{\text{moles enzima} * \text{tiempo}} * PM_{enzima} = \frac{160 [\mu\text{mol}]}{4 [\mu\text{g}] * 10[\text{min}]} * 35.038 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$$

$$k_{cat} = 2.335,87 [\text{s}^{-1}]$$

9.9. Anexo I: Estimación de la velocidad máxima de la enzima EDA de *Vibrio splendidus*

Primero se calculó un promedio entre los valores de actividad específica de la enzima EDA de *Azotobacter* (4,8 $\mu\text{mol/min/mg}$ [77]) y de *Sulfolobus solfataricus* (12,3 $\mu\text{mol/min/mg}$ [78]), obteniendo un valor de actividad específica promedio de 8,55 $\mu\text{mol/min/mg}$. Luego, se transformó la actividad específica en velocidad máxima considerando un estimado de 100 mg de enzima, teniendo en cuenta que el modelo asume en sus ecuaciones que siempre existe enzima suficiente para todas las reacciones que se simulen. El cálculo de la velocidad máxima se obtiene con el siguiente cálculo:

$$v_{m\acute{a}x} = 8,55 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mg}} \right] * 100[\text{mg}] = 0,01425 \left[\frac{\text{mmol}}{\text{s}} \right]$$

9.10. Anexo J: Modelo cinético de *E. coli* BAL1611

9.10.1. Nuevo sistema de ecuaciones diferenciales

$$d \frac{[ACCOA]}{dt} = PDH - GLT - ACEB + ACS - PTA - 2118 * GROWTH - PFL - ALDH + PDC$$

$$d \frac{[ACO]}{dt} = ACN_1 - ACN_2$$

$$d \frac{[ACP]}{dt} = - ACK + PTA$$

$$d \frac{[AKG]}{dt} = ICD - LPD - 610 * GROWTH$$

$$d \frac{[BPG]}{dt} = GDH - PGK$$

$$d \frac{[CIT]}{dt} = GLT - ACN_1$$

$$d \frac{[DAP]}{dt} = FBA - TPI$$

$$d \frac{[E4P]}{dt} = - F6P_E4P_TKT + S7P_E4P_TAL - 204 * GROWTH$$

$$d \frac{[F6P]}{dt} = PGI - PFK + F6P_E4P_TKT + F6P_GAP_TAL + FBP - 40 * GROWTH + MtlD$$

$$d \frac{[FDP]}{dt} = PFK - FBP - FBA$$

$$\begin{aligned}
d \frac{[FUM]}{dt} &= SDH - FUMA \\
d \frac{[G6P]}{dt} &= -PGI + \frac{PTS_4}{V_{cell}} - 116 * GROWTH - ZWF \\
d \frac{[GAP]}{dt} &= X5P_{GAP_{TKT}} - F6P_{GAP_{TAL}} + FBA + TPI - GDH + EDA - 73 * GROWTH + EDA_{Vibrio} \\
d \frac{[GL6P]}{dt} &= -PGL - GL6P_{HYDROLYSIS} + ZWF \\
d \frac{[GLX]}{dt} &= ACEA - ACEB \\
d \frac{[ICIT]}{dt} &= ACN_2 - ICD - ACEA \\
d \frac{[KDPG]}{dt} &= EDD - EDA + EDA_{Vibrio} \\
d \frac{[MAL]}{dt} &= -MAD + FUMA - MQO + MDH + ACEB + MAE_B \\
d \frac{[NAD]}{dt} &= -MAD - PDH - LPD - GDH + \frac{NDH1}{V_{cell}} - PNT + NDH2 - 2004 * GROWTH + LDH + ALDH + ADH - MtlD - PDC + AdhB + DehR \\
d \frac{[NADH]}{dt} &= MAD + PDH + LPD + GDH - \frac{NDH1}{V_{cell}} + PNT - NDH2 + 2004 * GROWTH - LDH - ALDH - ADH + MtlD + PDC - AdhB - DehR \\
d \frac{[NADP]}{dt} &= -GND - ICD + PNT + 10169 * GROWTH - ZWF \\
d \frac{[NADPH]}{dt} &= GND + ICD - PNT - 10169 * GROWTH + ZWF \\
d \frac{[OAA]}{dt} &= PPC - PCK - GLT + MQO - MDH - 1010 * GROWTH \\
d \frac{[PEP]}{dt} &= -PPC + PCK + PPS - PTS_0 - 293 * GROWTH + ENO - PYK \\
d \frac{[PGA2]}{dt} &= GPM - ENO \\
d \frac{[PGA3]}{dt} &= PGK - 845 * GROWTH - GPM \\
d \frac{[PGN]}{dt} &= PGL - GND - EDD + GL6P_{HYDROLYSIS} \\
d \frac{[PYR]}{dt} &= -PPS + MAD - PDH + EDA + PTS_0 - 1601 * GROWTH + PYK + MAE_B - LDH - PFL - PDC + EDA_{Vibrio} \\
d \frac{[Q]}{dt} &= -MQO + MDH - \frac{NDH1}{V_{cell}} + 2 * \frac{CYTBO}{V_{cell}} - SQR - NDH2 \\
d \frac{[QH2]}{dt} &= MQO - MDH + \frac{NDH1}{V_{cell}} - 2 * \frac{CYTBO}{V_{cell}} + SQR + NDH2 \\
d \frac{[R5P]}{dt} &= RPI - S7P_{R5P_{TKT}} - 507 * GROWTH \\
d \frac{[RU5P]}{dt} &= GND - RPE - RPI \\
d \frac{[S7P]}{dt} &= S7P_{R5P_{TKT}} - S7P_{E4P_{TAL}} \\
d \frac{[SUC]}{dt} &= SK - SDH + ACEA - \frac{XCH_{RMM}_{SUCp}}{V_{cell}} \\
d \frac{[SUCCOA]}{dt} &= LPD - SK \\
d \frac{[X5P]}{dt} &= RPE - X5P_{GAP_{TKT}} \\
d \frac{[ei]}{dt} &= -PTS_0 + k1_{PTS_1} * hpr * eiP - k2_{PTS_1} * hprP * ei \\
d \frac{[eiP]}{dt} &= PTS_0 - k1_{PTS_1} * hpr * eiP + k2_{PTS_1} * hprP * ei \\
d \frac{[eiia]}{dt} &= -k1_{PTS_2} * eiia * hprP + k2_{PTS_2} * eiiaP * hpr + k1_{PTS_3} * eiicb * eiiaP - k2_{PTS_3} * eiicbP * eiia \\
d \frac{[eiiaP]}{dt} &= k1_{PTS_2} * eiia * hprP - k2_{PTS_2} * eiiaP * hpr - k1_{PTS_3} * eiicb * eiiaP + k2_{PTS_3} * eiicbP * eiia \\
d \frac{[eiicb]}{dt} &= -k1_{PTS_3} * eiicb * eiiaP + k2_{PTS_3} * eiicbP * eiia + \frac{PTS_4}{V_{cell}} \\
d \frac{[eiicbP]}{dt} &= k1_{PTS_3} * eiicb * eiiaP - k2_{PTS_3} * eiicbP * eiia - \frac{PTS_4}{V_{cell}} \\
d \frac{[hpr]}{dt} &= -k1_{PTS_1} * hpr * eiP + k2_{PTS_1} * hprP * ei + k1_{PTS_2} * eiia * hprP - k2_{PTS_2} * eiiaP * hpr \\
d \frac{[hprP]}{dt} &= k1_{PTS_1} * hpr * eiP - k2_{PTS_1} * hprP * ei - k1_{PTS_2} * eiia * hprP + k2_{PTS_2} * eiiaP * hpr \\
d \frac{[icd]}{dt} &= -ACEK_1 + ACEK_2
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
d \frac{[icdP]}{dt} &= ACEK_1 - ACEK_2 \\
d \frac{[tal]}{dt} &= F6P_GAP_TAL - S7P_E4P_TAL \\
d \frac{[talC3]}{dt} &= -F6P_GAP_TAL + S7P_E4P_TAL \\
d \frac{[tkk]}{dt} &= -X5P_GAP_TKT + F6P_E4P_TKT + S7P_R5P_TKT \\
d \frac{[tkkC2]}{dt} &= X5P_GAP_TKT - F6P_E4P_TKT - S7P_R5P_TKT \\
d \frac{[ADP]}{dt} &= PFK + PCK - SK + ACEK_1 + 2 * ADK - \frac{ATP_SYN}{V_{cell}} - ACK - PGK + 30508 * GROWTH + \\
&ATP_MAIN - PYK + KDGK \\
d \frac{[AMP]}{dt} &= PPS - ADK + DOS + ACS \\
d \frac{[ATP]}{dt} &= -PFK - PCK - PPS + SK - ACEK_1 - ADK + \frac{ATP_SYN}{V_{cell}} - CYA + ACK - ACS + PGK - 30508 * \\
&GROWTH - ATP_MAIN + PYK - KDGK \\
d \frac{[CAMP]}{dt} &= CYA - DOS \\
d \frac{[P]}{dt} &= FBP + PPC + PPS - SK + ACEK_2 - GDH - \frac{ATP_SYN}{V_{cell}} + 2 * CYA + 2 * ACS - PTA + 30508 * \\
&GROWTH + ATP_MAIN + \frac{PIT}{V_{cell}} \\
d \frac{[MgADP]}{dt} &= 0 \\
d \frac{[MgATP]}{dt} &= 0 \\
d \frac{[MgFDP]}{dt} &= 0 \\
d \frac{[FAD]}{dt} &= -SDH + SQR \\
d \frac{[FADH2]}{dt} &= SDH - SQR \\
d \frac{[ACE]}{dt} &= ACK - ACS - \frac{XCH_RMM_ACE}{V_{cell}} \\
d \frac{[GLCx]}{dt} &= GLC_FEED - \frac{XCH_RMM_GLC}{V_{xcell}} \\
d \frac{[ACEx]}{dt} &= -k1_ACE_OUT * ACEx + \frac{XCH_RMM_ACEx}{V_{xcell}} \\
d \frac{[Hout]}{dt} &= \frac{4*NDH1 - 4*ATP_SYN + 8*CYTBO - PIT}{V_{peri}} \\
d \frac{[GLCp]}{dt} &= \frac{-PTS_4 + XCH_RMM_GLC}{V_{peri}} \\
d \frac{[Pp]}{dt} &= \frac{-PIT + XCH_RMM_P}{V_{peri}} \\
d \frac{[ACEp]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_ACE - XCH_RMM_ACEx}{V_{peri}} \\
d \frac{[FOR]}{dt} &= PFL - \frac{XCH_RMM_FORp}{V_{cell}} \\
d \frac{[FORp]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_FORp - XCH_RMM_FORx}{V_{peri}} \\
d \frac{[FORx]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_FORx}{V_{xcell}} \\
d \frac{[LAC]}{dt} &= LDH - \frac{XCH_RMM_LACp}{V_{cell}} \\
d \frac{[LACp]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_LACp - XCH_RMM_LACx}{V_{peri}} \\
d \frac{[LACx]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_LACx}{V_{xcell}} \\
d \frac{[SUCp]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_SUCp - XCH_RMM_SUCx}{V_{peri}} \\
d \frac{[SUCx]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_SUCx}{V_{xcell}} \\
d \frac{[ETH]}{dt} &= ADH - \frac{XCH_RMM_ETHp}{V_{cell}} + AdhB \\
d \frac{[ETHp]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_ETHp - XCH_RMM_ETHx}{V_{peri}} \\
d \frac{[ETHx]}{dt} &= \frac{XCH_RMM_ETHx}{V_{xcell}} \\
d \frac{[AcAld]}{dt} &= ALDH - ADH - AdhB
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}d \frac{[DEHU]}{dt} &= -DehR + \frac{XCH_RMM_DEHU}{V_{cell}} \\d \frac{[DEHU]_p}{dt} &= \frac{XCH_RMM_DEHU_p - XCH_RMM_DEHU}{V_{peri}} \\d \frac{[DEHU]_x}{dt} &= DEHU_FEED - \frac{XCH_RMM_DEHU_p}{V_{xcell}} \\d \frac{[KDG]}{dt} &= DehR - KDGK \\d \frac{[MANI]}{dt} &= -MtLD + \frac{XCH_RMM_MANI}{V_{cell}} \\d \frac{[MANI]_p}{dt} &= \frac{XCH_RMM_MANI_p - XCH_RMM_MANI}{V_{peri}} \\d \frac{[MANI]_x}{dt} &= MANI_FEED - \frac{XCH_RMM_MANI_p}{V_{xcell}}\end{aligned}$$

9.10.2. Velocidades enzimáticas incorporadas

i. MAE_B

$$Mez_Vmax = 0,70745$$

$$Mez_Kmal = 0,00624$$

$$Mez_KACCOA = 3,64$$

$$Mez_KCAMP = 6,54$$

$$Mez_L = 104000$$

$$Mez_n = 1,33$$

$$MAE_B = Mez_{Vmax} * \left(\frac{MAL}{Mez_{Kmal}} \right) * \frac{\left(1 + \frac{MAL}{Mez_{Kmal}} \right)^{Mez_n - 1}}{\left(\left(1 + \frac{MAL}{Mez_{Kmal}} \right)^{Mez} + Mez_L * \left(1 + \frac{ACCOA}{Mez_{KACCOA}} + \frac{CAMP}{Mez_{KCAMP}} \right)^{Mez} \right)_n}$$

ii. LDH

$$Vmax_LDH = 51,7$$

$$Km_NADH_LDH = 0,9$$

$$Km_PYR_LDH = 26,7$$

$$n_NADH_LDH = 3$$

$$n_PYR_LDH = 2$$

$$LDH = Vmax_{LDH} * \left(\frac{NADH_{NADH_LDH}^n}{Km_{NADH_LDH} * NADH_{NADH_LDH}^n + NADH_{NADH_LDH}^n} \right) * \left(\frac{PYR_{PYR_LDH}^n}{Km_{PYR_LDH} * PYR_{PYR_LDH}^n + PYR_{PYR_LDH}^n} \right)$$

iii. XCH_RMM_LACp

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_LACp = Vmax * \frac{\frac{LAC}{Km} - \frac{LACp}{Km}}{1 + \frac{LAC}{Km} + \frac{LACp}{Km}}$$

iv. XCH_RMM_LACx

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_LACx = Vmax * \frac{\frac{LACp}{Km} - \frac{LACx}{Km}}{1 + \frac{LACp}{Km} + \frac{LACx}{Km}}$$

v. PFL

$$Vmaxf_Pfl = 14,7$$

$$Vmaxr_Pfl = 3,4$$

$$K_{pyr_Pfl} = 4,5$$

$$KCOA_Pfl = 0,7816$$

$$KACCOA_Pfl = 5,8621$$

$$Kfor_Pfl = 1,1276$$

$$K_A_ArcA_Q = 0,5$$

$$n_ArcA = -5$$

$$K_A_FNR_O2 = 5,0E-6$$

$$n_FNR = -5$$

$$k_O2 = 0,001$$

$$TF_{Fnr} = \frac{(k_{O2} * O2)_{FNR}^n}{K_{AFNR} O_{2FNR}^n + (k_{O2} * O2)_{FNR}^n}$$

$$TF_{ArcA} = \frac{Q_{ArcA}^n}{K_{AArcA} Q_{ArcA}^n + Q_{ArcA}^n}$$

$$PFL = \frac{(TF_{Fnr} + TF_{ArcA}) * Vmax_{f_{Pfl}} * PYR * COA}{(PYR * COA + K_{pyr_{Pfl}} * COA + KCOA_{Pfl} * PYR)} - \frac{(TF_{Fnr} + TF_{ArcA}) * Vmax_{r_{Pfl}} * ACCOA * FOR}{ACCOA * FOR + KACCOA_{Pfl} * FOR + Kfor_{Pfl} * ACCOA}$$

vi. XCH_RMM_FORp

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_FORp = Vmax * \frac{\frac{FOR}{Km} - \frac{FORp}{Km}}{1 + \frac{FOR}{Km} + \frac{FORp}{Km}}$$

vii. XCH_RMM_FORx

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_FORx = Vmax * \frac{\frac{FORp}{Km} - \frac{FORx}{Km}}{1 + \frac{FORp}{Km} + \frac{FORx}{Km}}$$

viii. ALDH

$$Vmax_ALDH = 63,9$$

$$KACCOA_ALDH = 0,0124$$

$$Knadh_ALDH = 0,443$$

$$Knad_ALDH = 0,1418$$

$$KCOA_ALDH = 0,0142$$

$$Kacald_ALDH = 17,7305$$

$$Keq_ALDH = 2,7730E+01$$

$$ALDH = \frac{\left(\frac{Vmax_{ALDH}}{KACCOA_{ALDH} * Knadh_{ALDH}}\right) * ACCOA * NADH - \left(\frac{COA * NAD * AcAld}{Keq_{ALDH}}\right)}{\left(1.0 + \left(\frac{NAD}{Knad_{ALDH}}\right) + \left(\frac{NADH}{Knadh_{ALDH}}\right)\right) * \left(1.0 + \left(\frac{ACCOA}{KACCOA_{ALDH}}\right) + \left(\frac{COA}{KCOA_{ALDH}}\right) + \left(\frac{AcAld}{Kacald_{ALDH}}\right) + \left(\frac{AcAld * COA}{Kacald_{ALDH} * KCOA_{ALDH}}\right)\right)}$$

ix. ADH

$$Vmax_ADH = 57,97$$

$$Kacald_ADH = 0,0532$$

$$Knadh_ADH = 2,1$$

$$Knad_ADH = 0,1418$$

$$Keth_ADH = 7,1065E-04$$

$$Keq_ADH = 2,1906E+04$$

$$ADH = \frac{\left(\frac{Vmax_{ADH}}{Kacald_{ADH} * Knadh_{ADH}}\right) * \left(AcAld * NADH - \left(\frac{ETH * NAD}{Keq_{ADH}}\right)\right)}{\left(1.0 + \left(\frac{NAD}{Knad_{ADH}}\right) + \left(\frac{NADH}{Knadh_{ADH}}\right)\right) * \left(1.0 + \left(\frac{AcAld}{Kacald_{ADH}}\right) + \left(\frac{ETH}{Keth_{ADH}}\right)\right)}$$

x. XCH_RMM_ETHp

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_ETHp = Vmax * \frac{\frac{ETH}{Km} - \frac{ETHp}{Km}}{1 + \frac{ETH}{Km} + \frac{ETHp}{Km}}$$

xi. XCH_RMM_ETHx

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_ETHx = Vmax * \frac{\frac{ETHp}{Km} - \frac{ETHx}{Km}}{1 + \frac{ETHp}{Km} + \frac{ETHx}{Km}}$$

xii. XCH_RMM_SUC

$$Vmax = 0,5$$

$$Km = 16$$

$$XCH_RMM_SUCp = Vmax * \frac{SUC}{Km + SUC}$$

$$XCH_RMM_SUCx = Vmax * \frac{SUCp}{Km + SUCp}$$

xiii. DehR

$$Km = 0,175$$

$$Kcat = 6,88$$

$$E = 0,001$$

$$DehR = Kcat * E * \frac{DEHU}{Km + DEHU}$$

xiv. KDGK

$$Km = 0,5$$

$$Kcat = 1167,94$$

$$E = 0,001$$

$$KDGK = Kcat * E * \frac{KDG}{Km + KDG}$$

xv. XCH_RMM_DEHUp

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_DEHUp = Vmax * \frac{\frac{DEHUx}{Km} - \frac{DEHUp}{Km}}{1 + \frac{DEHUx}{Km} + \frac{DEHUp}{Km}}$$

xvi. XCH_RMM_DEHU

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_DEHU = Vmax * \frac{\frac{DEHU_p}{Km} - \frac{DEHU}{Km}}{1 + \frac{DEHU_p}{Km} + \frac{DEHU}{Km}}$$

xvii. MtlD

$$Km = 0,4586$$

$$Kcat = 0,0019$$

$$E = 0,001$$

$$MtlD = Kcat * E * \frac{MANI}{Km + MANI}$$

xviii. XCH_RMM_MANIp

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_MANIp = Vmax * \frac{\frac{MANIx}{Km} - \frac{MANIp}{Km}}{1 + \frac{MANIx}{Km} + \frac{MANIp}{Km}}$$

xix. XCH_RMM_MANI

$$Vmax = 100$$

$$Km = 10$$

$$XCH_RMM_MANI = Vmax * \frac{\frac{MANIp}{Km} - \frac{MANI}{Km}}{1 + \frac{MANIp}{Km} + \frac{MANI}{Km}}$$

xx. PDC

$$Km = 1,1$$

$$Kcat = 486$$

$$E = 0,001$$

$$PDC = Kcat * E * \frac{PYR}{Km + PYR}$$

xxi. AdhB

$$Vm_ETH = 820$$

$$Kma_ETH = 0.110$$

$$Kmb_ETH = 27$$

$$Kia_ETH = 0.14$$

$$Vm_AcAld = 11000$$

$$Kma_AcAld = 0.012$$

$$Kmb_AcAld = 1.3$$

$$Kia_AcAld = 0.018$$

$$AdhB = \frac{1}{\frac{1}{Vm_AcAld} * \left(1 + \frac{Kma_AcAld}{NADH} + \frac{Kmb_AcAld}{AcAld} + Kma_AcAld * \frac{Kia_AcAld}{NADH * AcAld}\right)} - \frac{1}{\frac{1}{Vm_ETH} * \left(1 + \frac{Kma_ETH}{NAD} + \frac{Kmb_ETH}{ETH} + Kma_ETH * \frac{Kia_ETH}{NAD * ETH}\right)}$$

xxii. EDA_Vibrio

$$Km = 0,103$$

$$Vmax = 0,01425$$

$$EDA_Vibrio = Vmax * \frac{KDPG}{Km + KDPG}$$

9.11. Anexo K: Esquemas de las simulaciones para estudiar *in silico* a la *E. coli* BAL1611

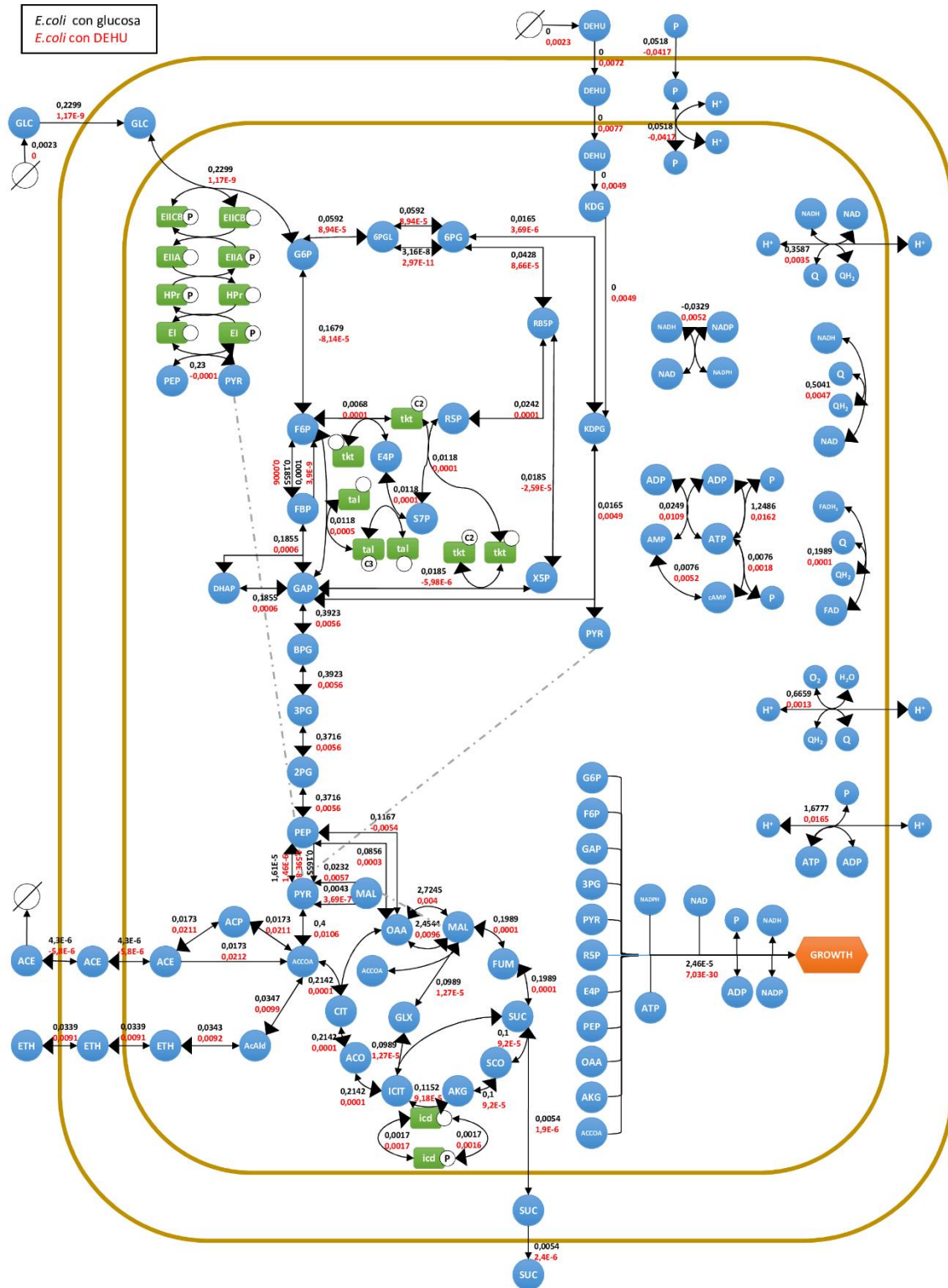


Figura 63. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* con DEHU versus *E. coli* con glucosa.

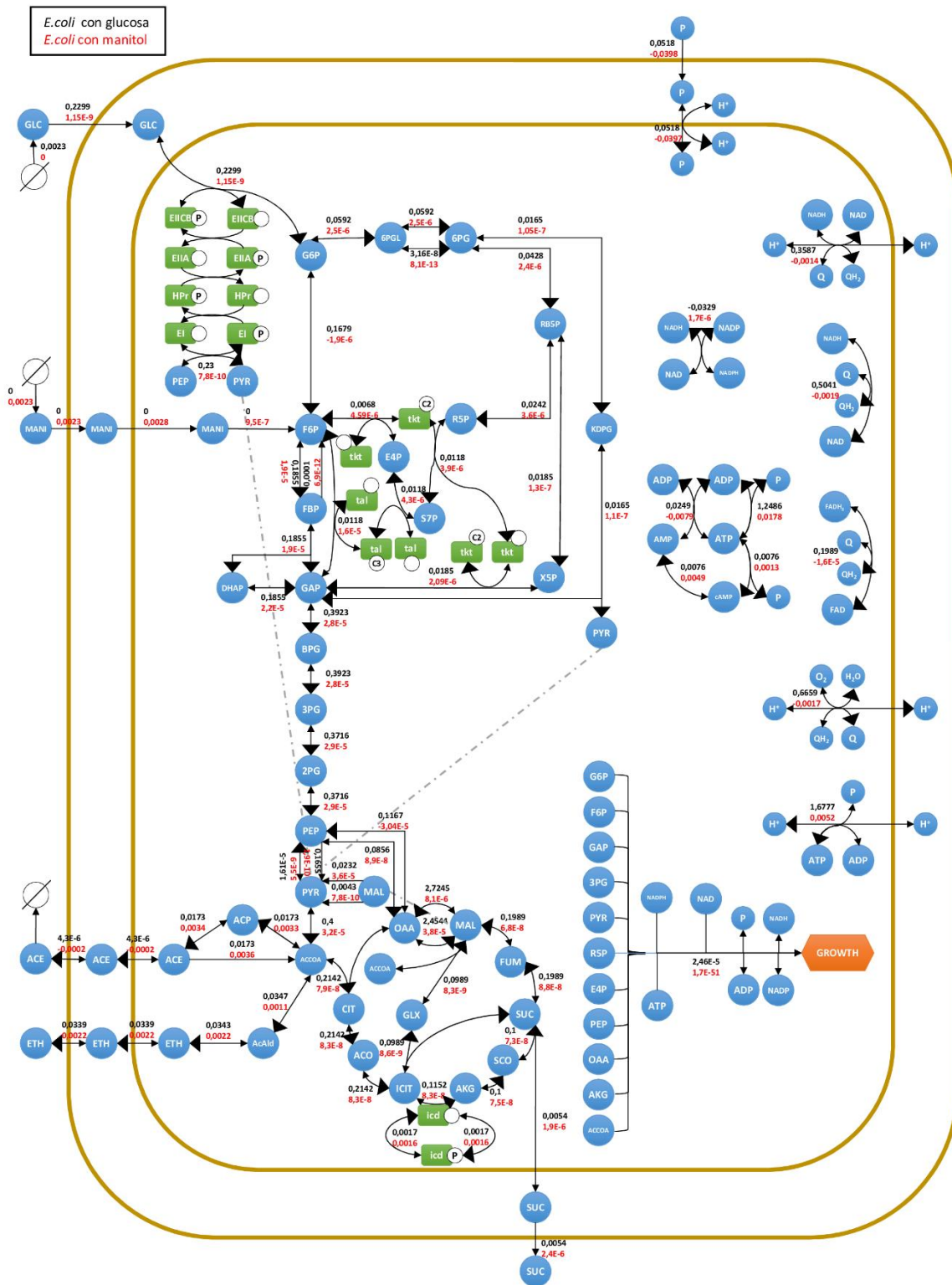


Figura 64. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* con manitol versus *E. coli* con glucosa.

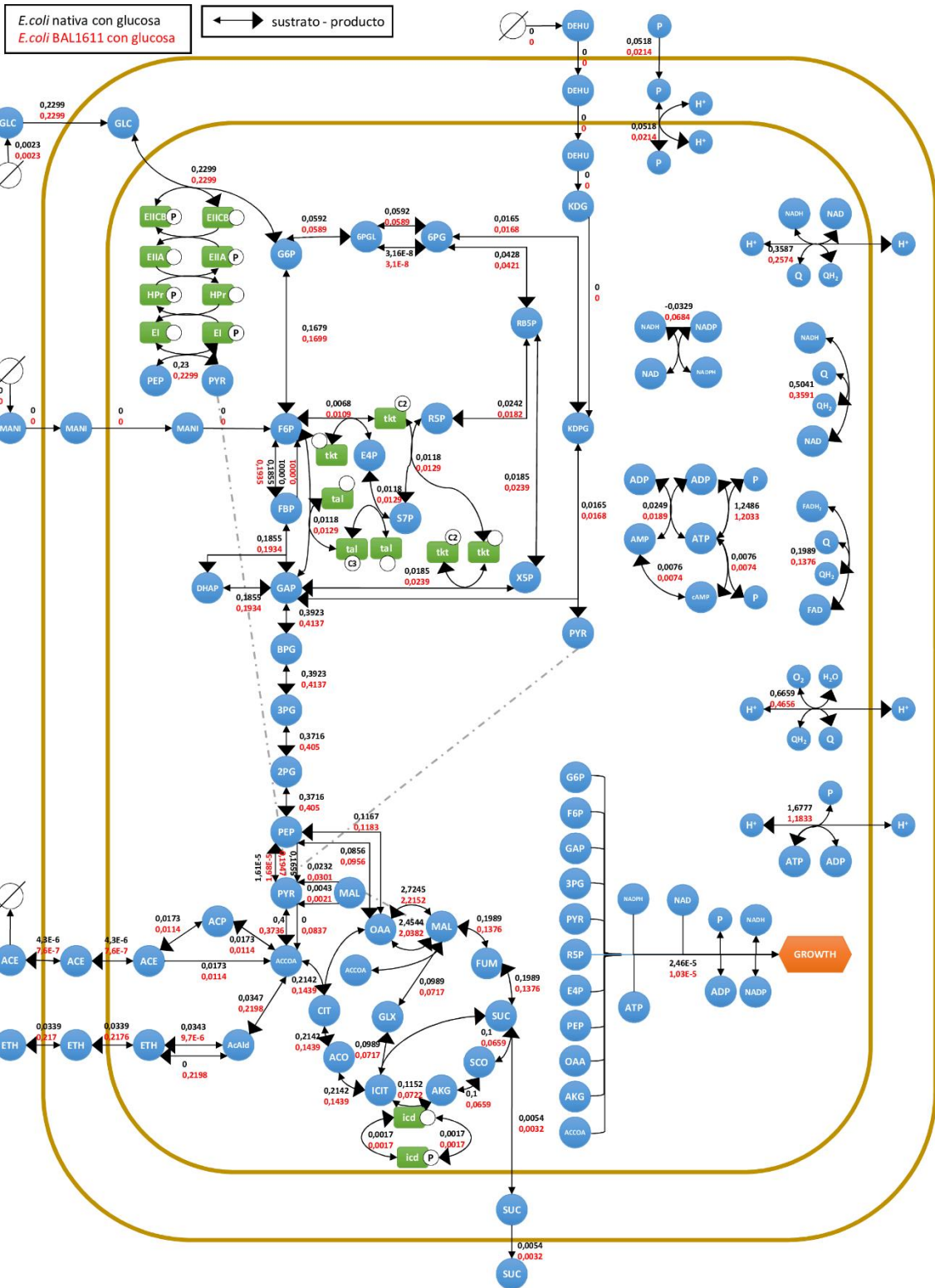


Figura 65. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli nativa* versus *E. coli BAL1611*, con glucosa.

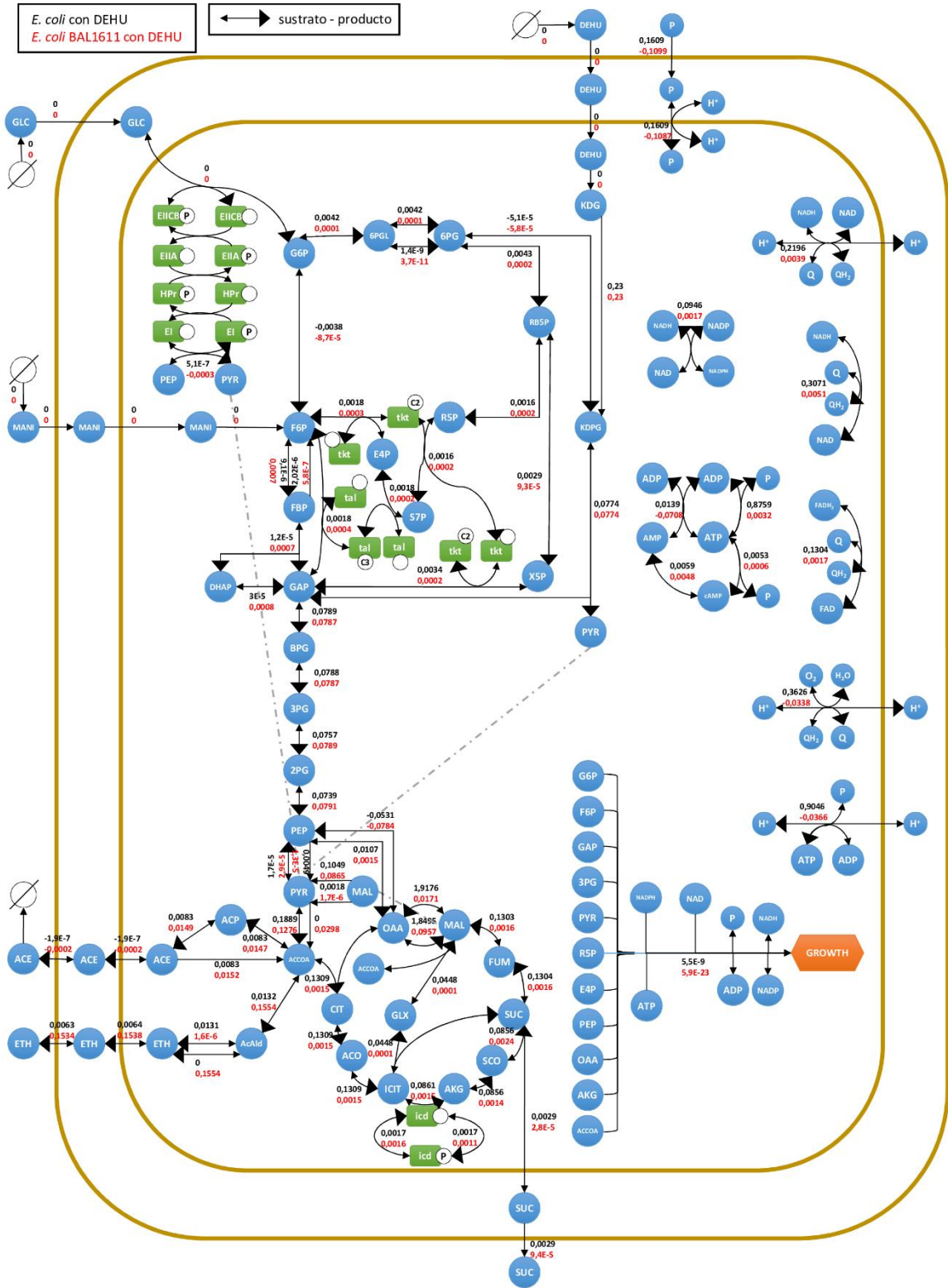


Figura 66. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* sin producción de etanol versus *E. coli* BAL1611, con DEHU.

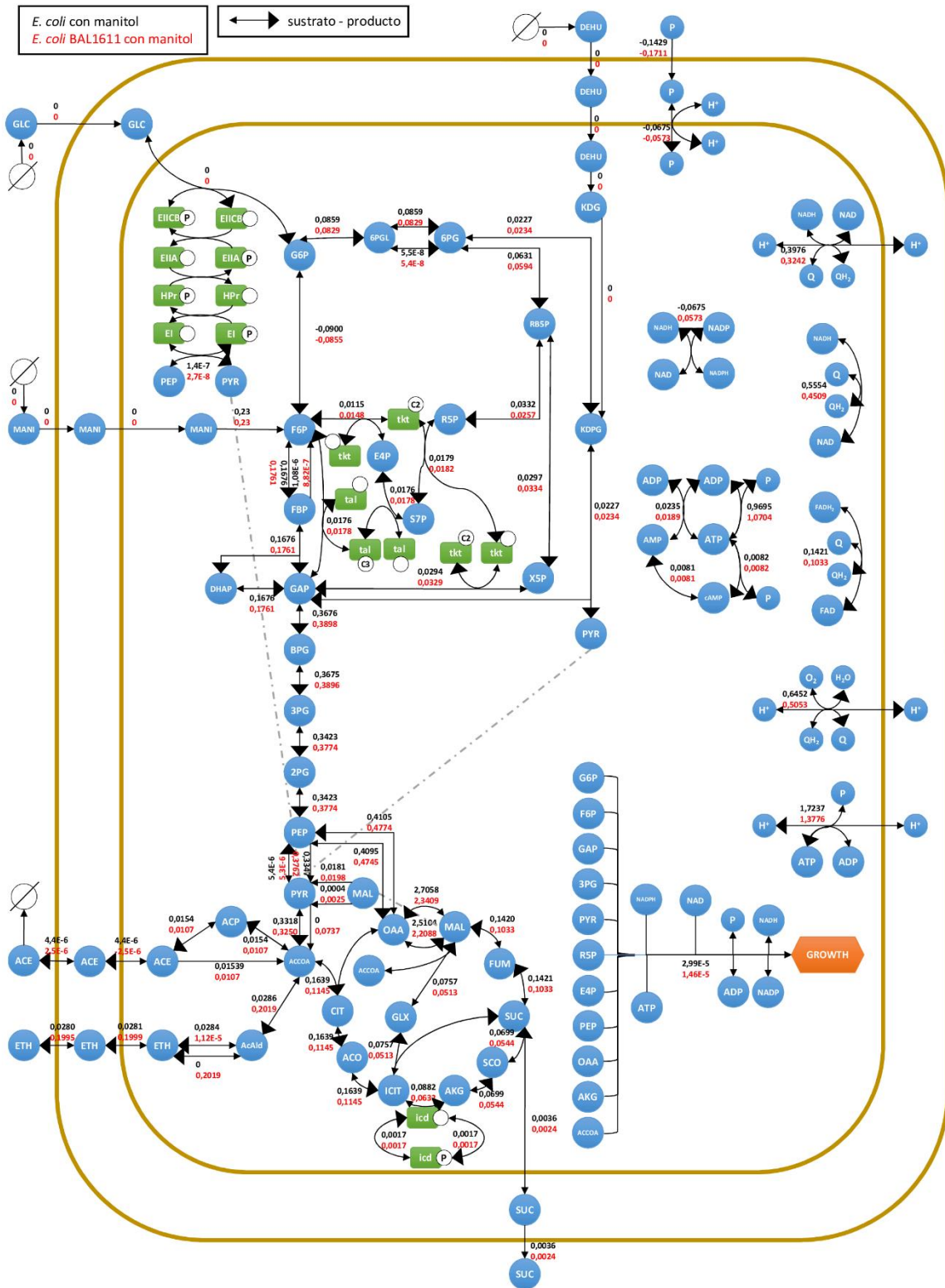


Figura 67. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* sin producción de etanol versus *E. coli* BAL1611, con manitol.

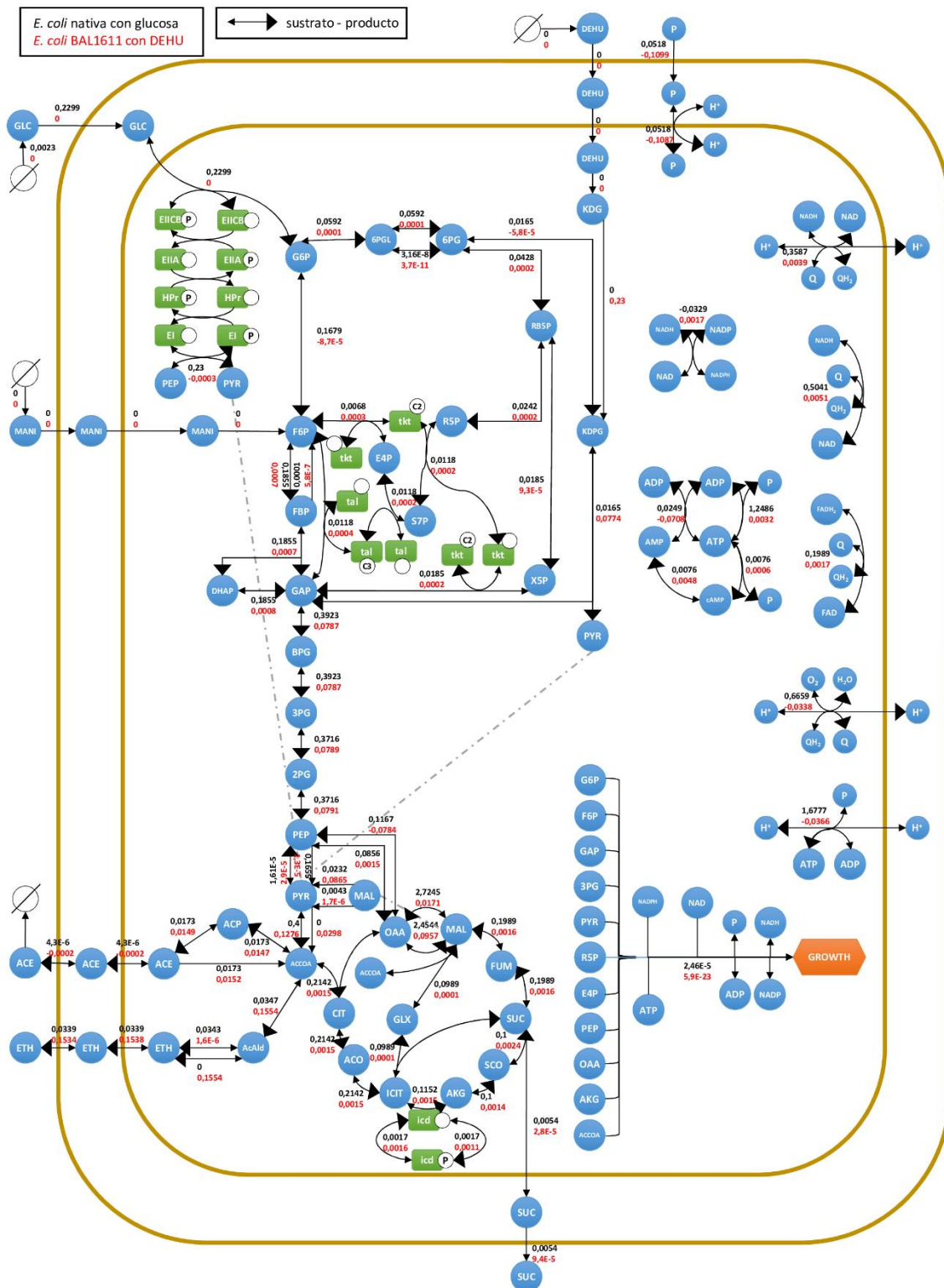


Figura 68. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* nativa con glucosa versus *E. coli* BAL1611 con DEHU puro.

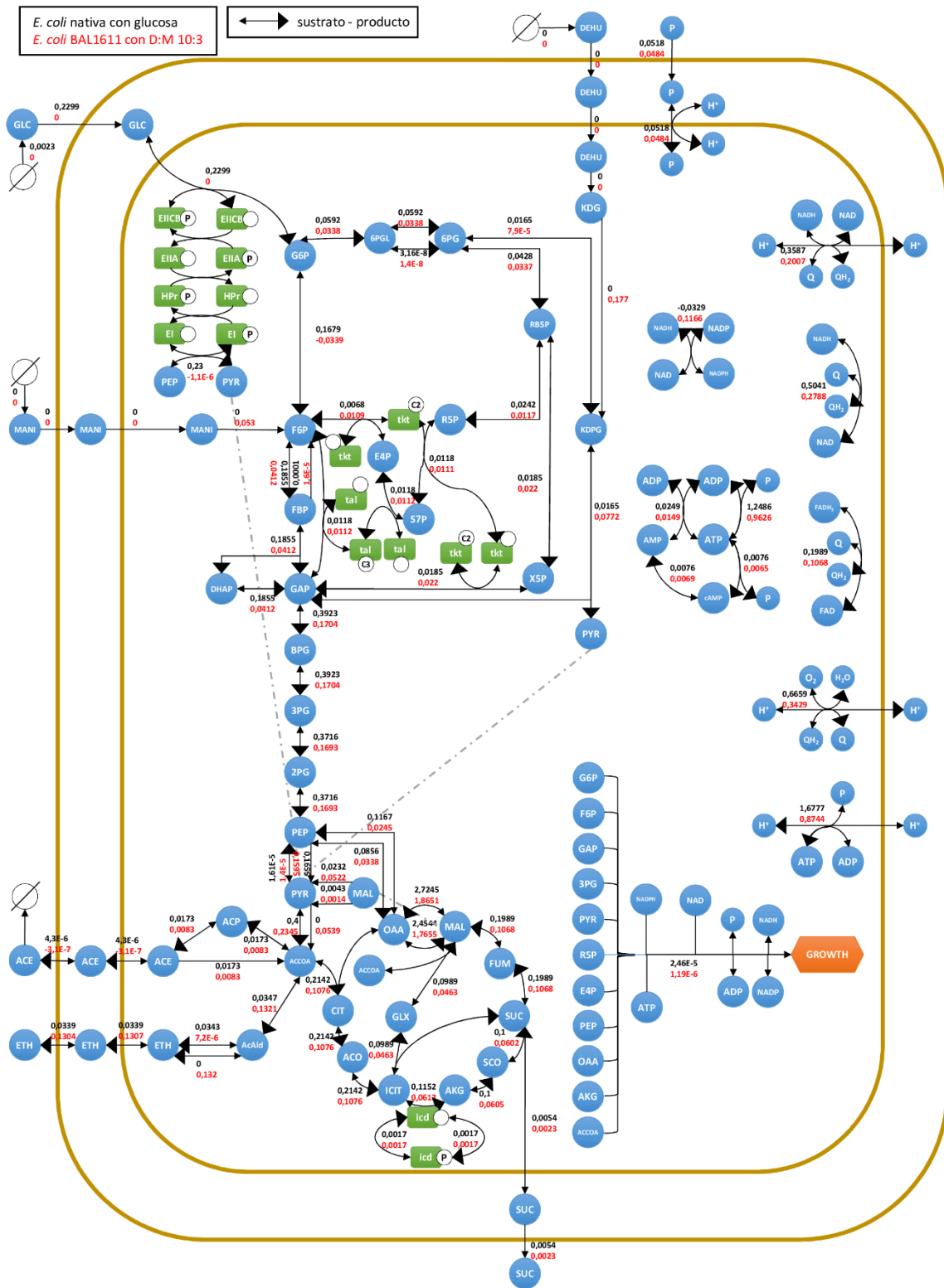


Figura 69. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* nativa con glucosa versus *E. coli* BAL1611 con DEHU:manitol 10:3.

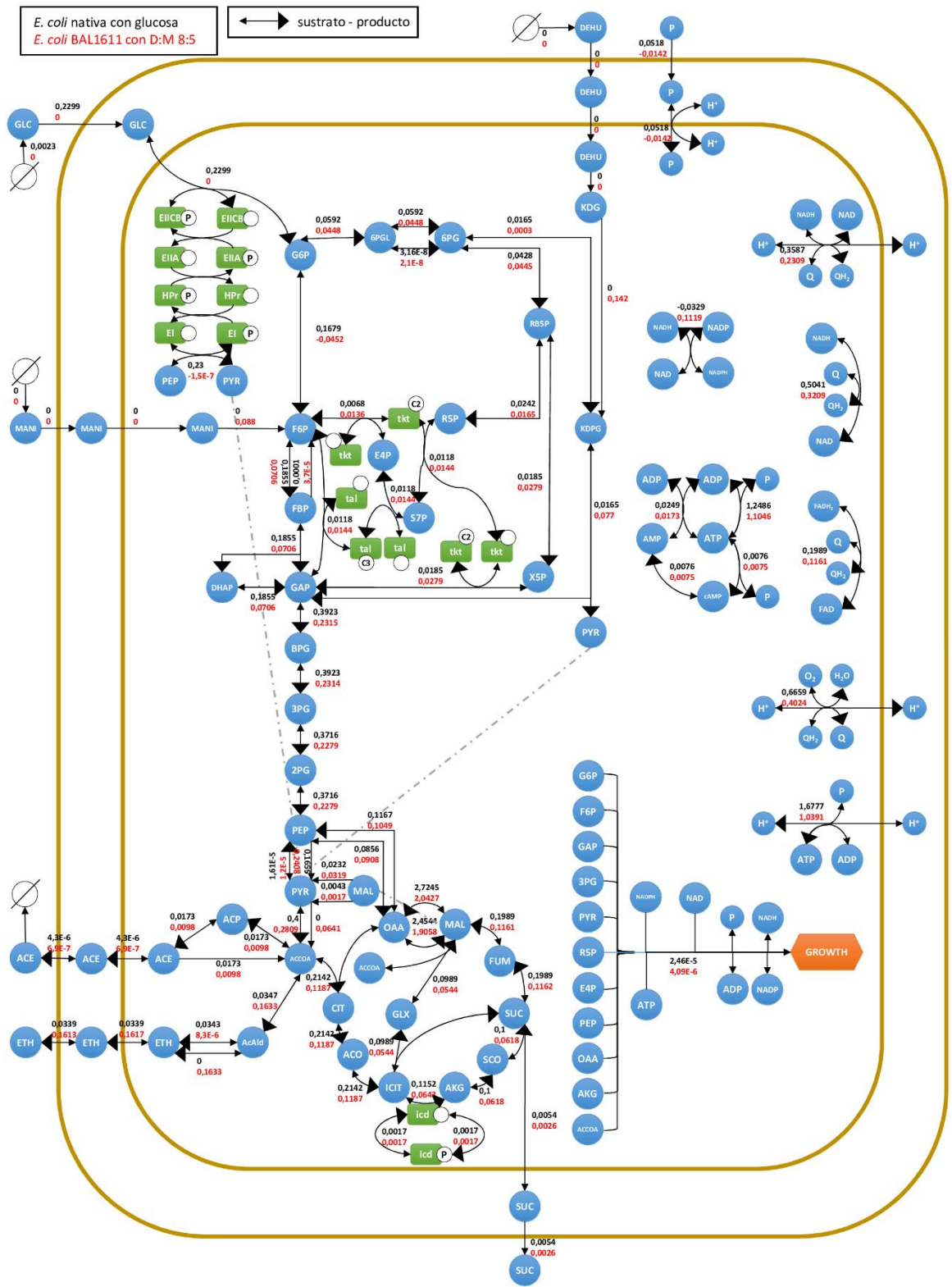


Figura 70. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* nativa con glucosa versus *E. coli* BAL1611 con DEHU:manitol 8:5.

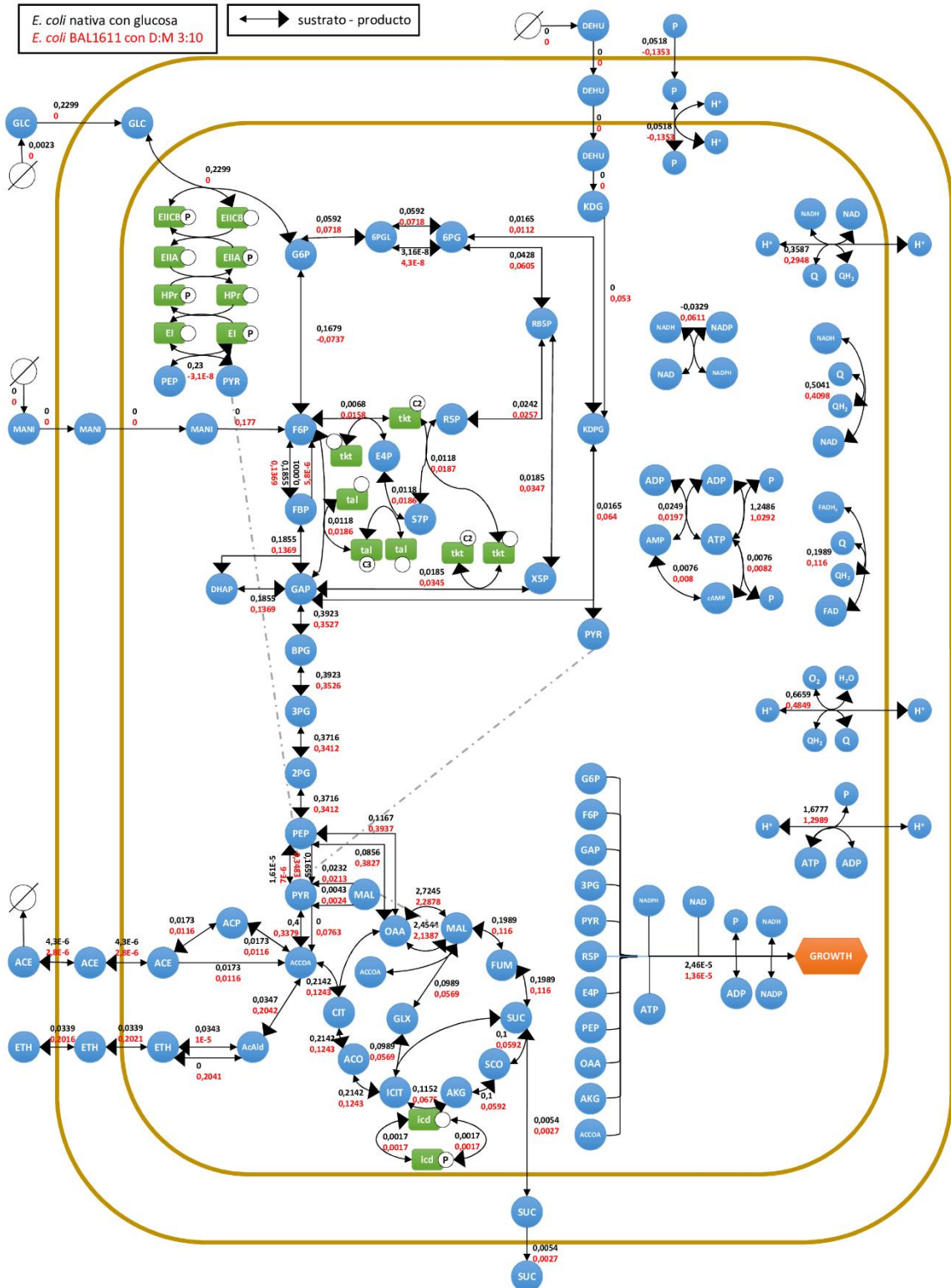


Figura 72. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* nativa con glucosa versus *E. coli* BAL1611 con DEHU:manitol 3:10.

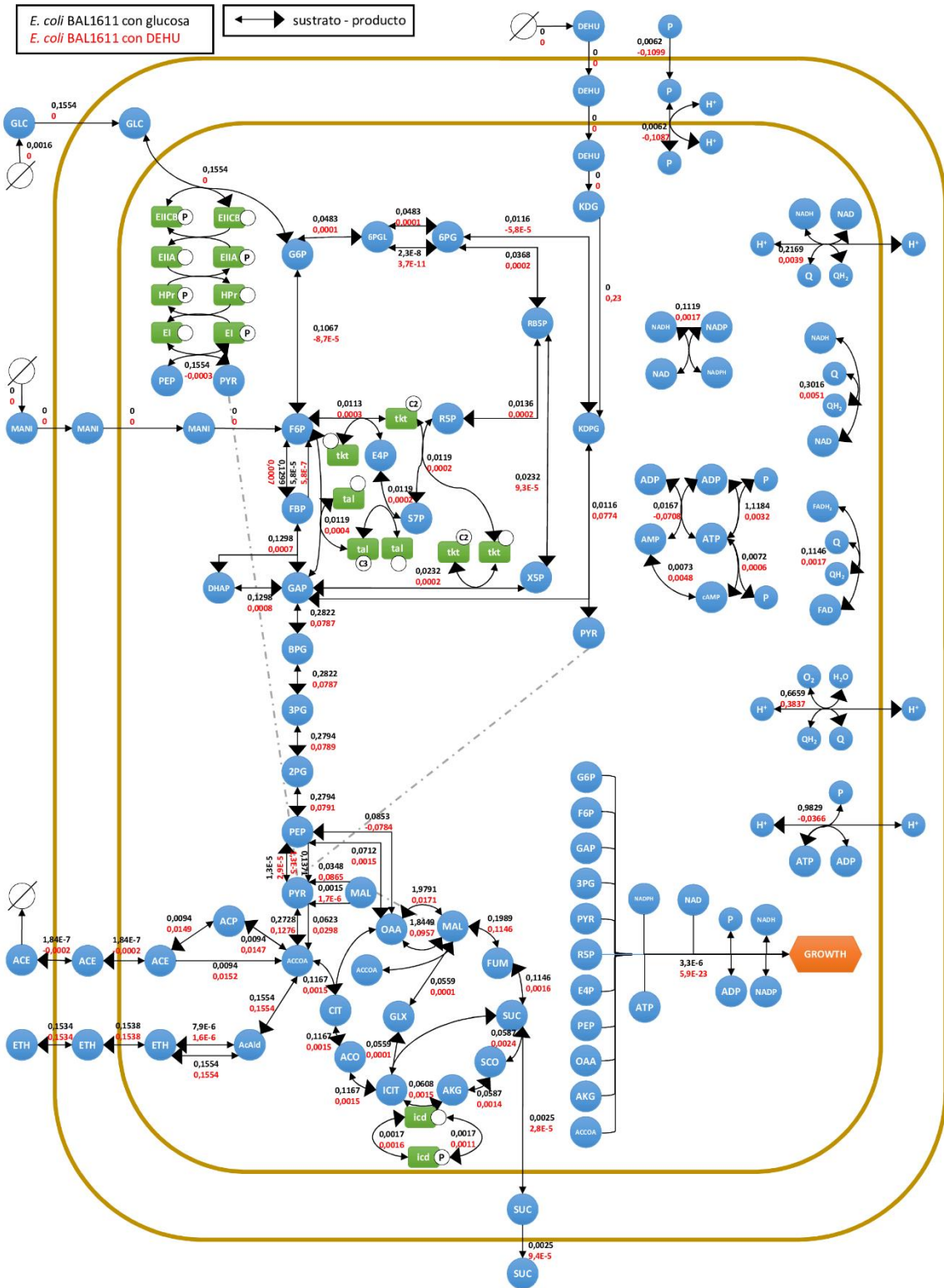


Figura 74. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* BAL1611 con glucosa versus *E. coli* BAL1611 con DEHU puro, considerando en ambos casos la misma producción de etanol.

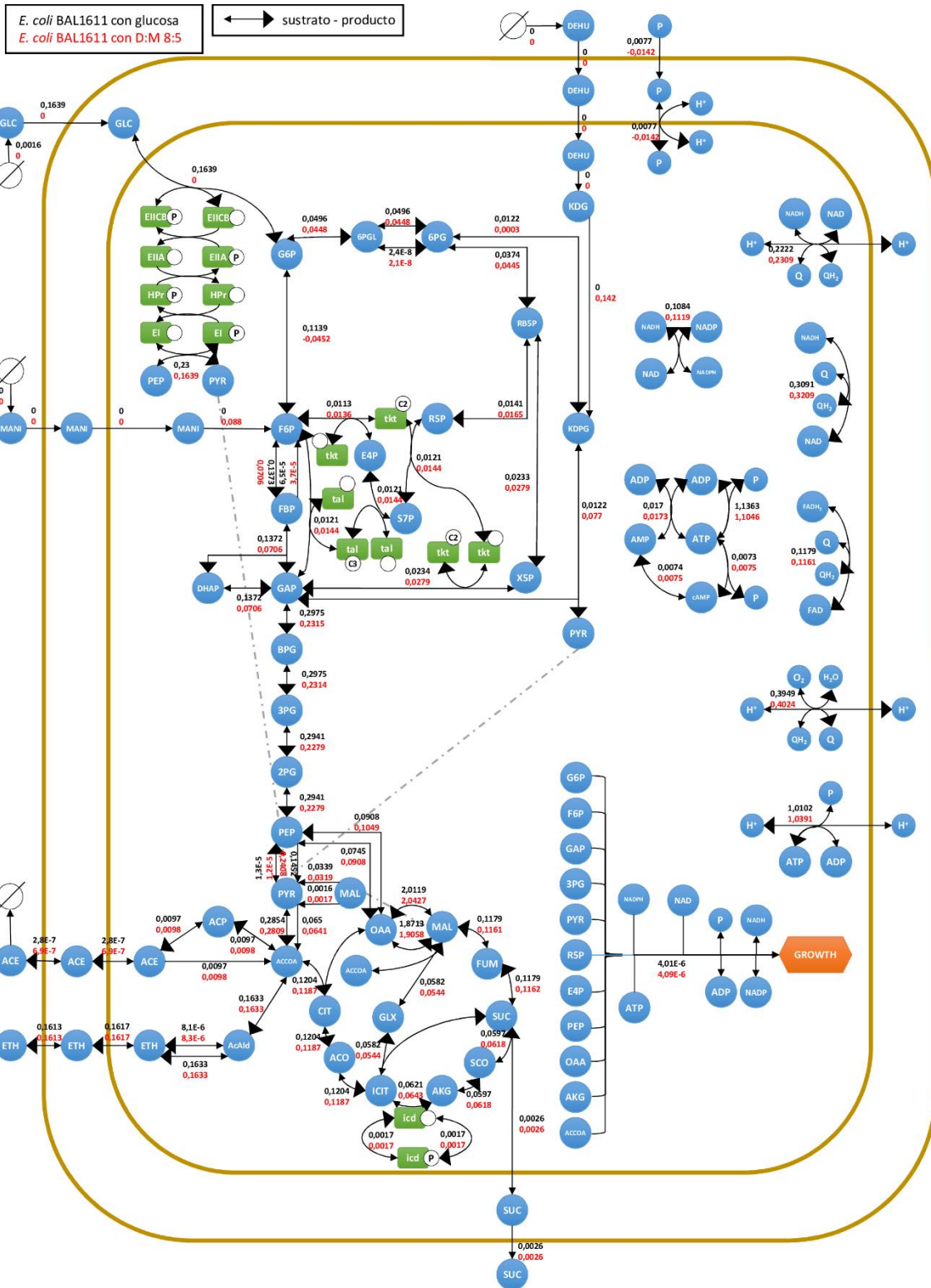


Figura 76. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* BAL1611 con glucosa versus *E. coli* BAL1611 con DEHU:manitol 8:5, considerando en ambos casos la misma producción de etanol.

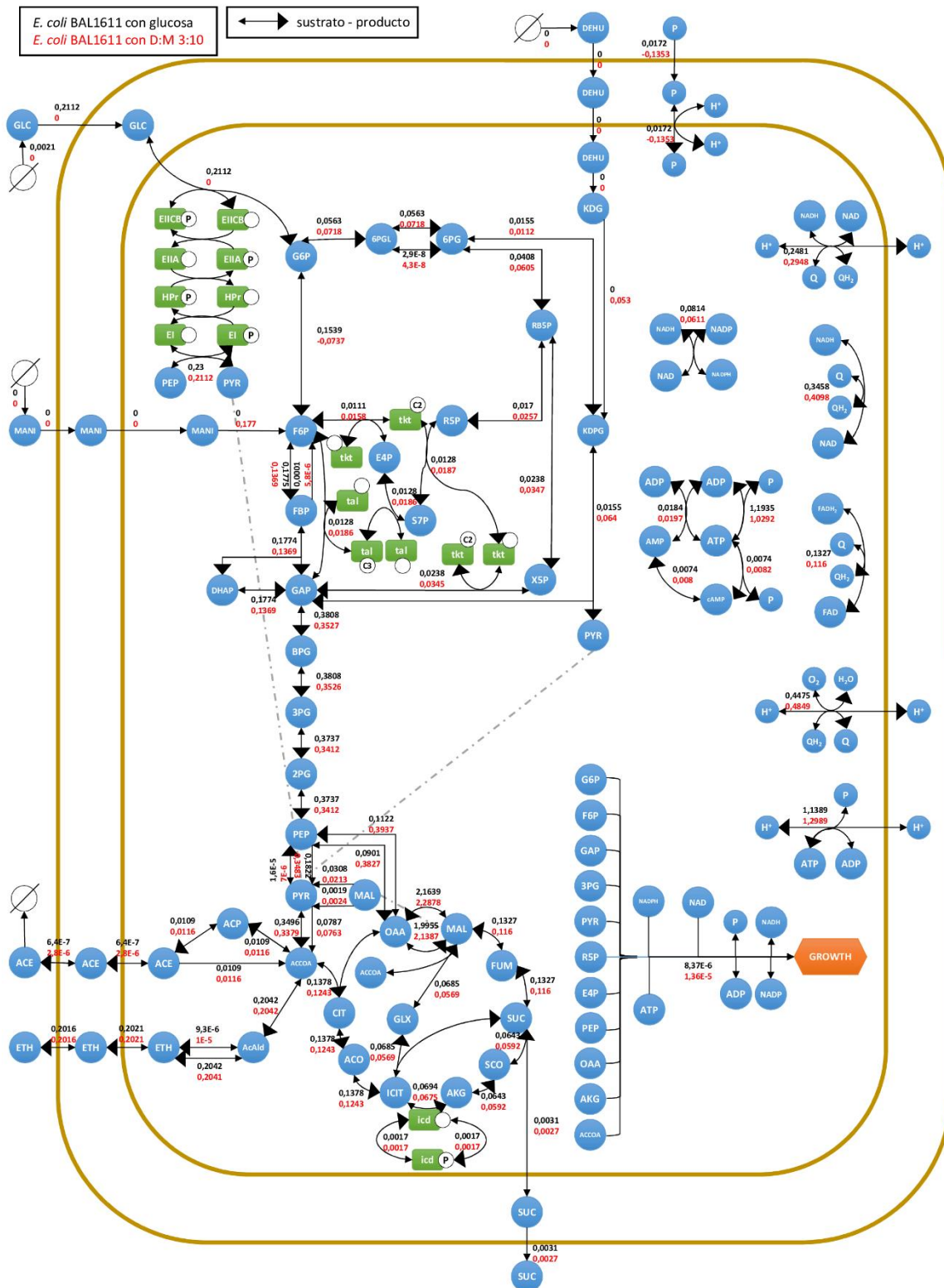


Figura 78. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* BAL1611 con glucosa versus *E. coli* BAL1611 con DEHU:manitol 3:10, considerando en ambos casos la misma producción de etanol.

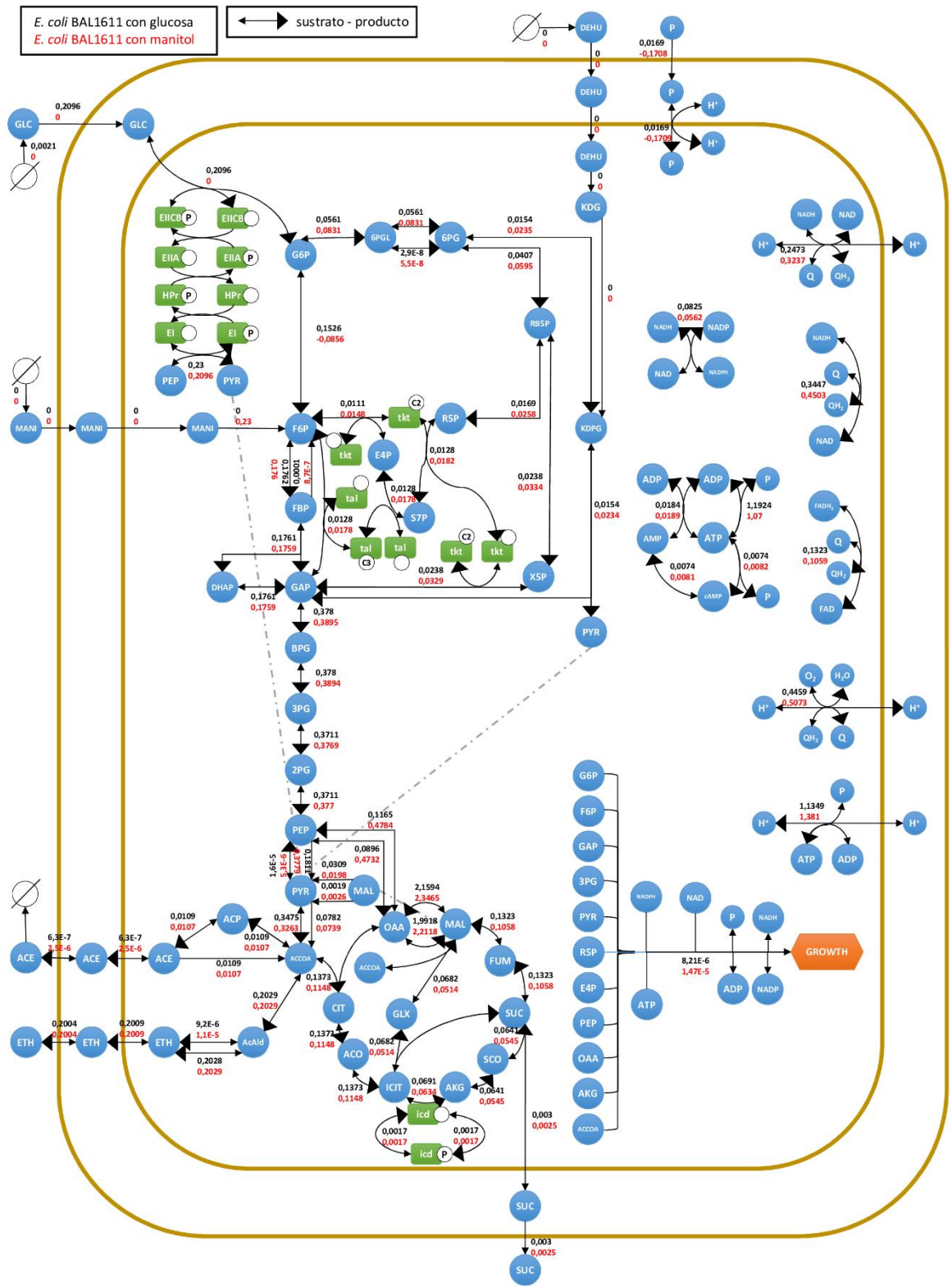


Figura 79. Esquema gráfico de los flujos para la simulación de *E. coli* BAL1611 con glucosa versus *E. coli* BAL1611 con manitol puro, considerando en ambos casos la misma producción de etanol.

9.12. Anexo L: Comparación de los componentes de la velocidad de crecimiento

Tabla 25. Comparación de los componentes de la velocidad de crecimiento. En rojo, los componentes con mayor cambio porcentual con respecto a la E. coli nativa.

| | <i>E. coli</i> nativa + glucosa | BAL1611 + DEHU | Cambio porcentual |
|-------------------------|------------------------------------|----------------|----------------------|
| $\frac{G6P}{KmG6P}$ | 0.707 | 2.48E - 4 | ↓ 99.96% |
| $\frac{E4P}{KmE4P}$ | 0.0809 | 1.35E - 3 | ↓ 98.33% |
| $\frac{PGA3}{KmPGA3}$ | 9.1784 | 0.3439 | ↓ 96.25% |
| $\frac{OAA}{KmOAA}$ | 5.3674 | 1.07E - 3 | ↓ 99.98% |
| $\frac{AKG}{KmAKG}$ | 0.1049 | 7.8E - 5 | ↓ 99.93% |
| $\frac{PYR}{KmPYR}$ | 53.5887 | 15.4989 | ↓ 71.08% |
| $\frac{R5P}{KmR5P}$ | 5.0815 | 0.0424 | ↓ 99.17% |
| $\frac{PEP}{KmPEP}$ | 2.1888 | 0.0869 | ↓ 96.03% |
| $\frac{GAP}{KmGAP}$ | 4.7678 | 0.9375 | ↓ 80.34% |
| $\frac{F6P}{KmF6P}$ | 0.7093 | 2.73E - 4 | ↓ 99.96% |
| $\frac{NADPH}{KmNADPH}$ | 0.0244 | 7.67E - 3 | ↓ 68.57% |
| $\frac{ACCOA}{KmACCOA}$ | 2.9328 | 5.7868 | ↑ 97.31% |
| $\frac{NAD}{KmNAD}$ | 0.5038 | 0.5445 | ↑ 8.08% |
| $\frac{ATP}{KmATP}$ | 54.7125 | 4.585 | ↓ 91.62% |

9.13. Anexo M: Resultados de las simulaciones con poder reductor en la producción de etanol

Tabla 26. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | ACCOA | ACO | ACP | AKG | BPG | CIT | DAP | E4P | F6P | FDP | FUM | G6P | GAP | GL6P | GLX | ICIT | KDPG | MAL | NAD |
|------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| D:M 1:0 - NADH | 0,316 | 2,E-04 | 0,005 | 0,022 | 0,001 | 0,001 | 0,107 | 0,008 | 0,001 | 0,016 | 0,009 | 0,004 | 0,029 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 23,261 | 0,043 | 1,537 |
| D:M 10:3 - NADH | 0,080 | 0,007 | 0,004 | 0,289 | 0,045 | 0,019 | 0,200 | 0,063 | 0,141 | 0,058 | 0,073 | 0,376 | 0,054 | 0,001 | 0,004 | 0,022 | 17,679 | 0,356 | 1,498 |
| D:M 8:5 - NADH | 0,086 | 0,008 | 0,007 | 0,283 | 0,069 | 0,022 | 0,267 | 0,087 | 0,213 | 0,104 | 0,088 | 0,562 | 0,072 | 0,002 | 0,005 | 0,026 | 10,975 | 0,425 | 1,487 |
| D:M 5:8 - NADH | 0,087 | 0,008 | 0,012 | 0,241 | 0,107 | 0,022 | 0,360 | 0,124 | 0,331 | 0,190 | 0,108 | 0,861 | 0,097 | 0,004 | 0,005 | 0,026 | 1,987 | 0,527 | 1,473 |
| D:M 3:10 - NADH | 0,082 | 0,006 | 0,014 | 0,191 | 0,129 | 0,018 | 0,392 | 0,142 | 0,404 | 0,226 | 0,116 | 1,047 | 0,105 | 0,004 | 0,005 | 0,021 | 0,314 | 0,568 | 1,467 |
| D:M 0:1 - NADH | 0,074 | 0,005 | 0,018 | 0,121 | 0,172 | 0,013 | 0,438 | 0,172 | 0,552 | 0,283 | 0,128 | 1,422 | 0,118 | 0,005 | 0,004 | 0,015 | 0,093 | 0,629 | 1,455 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0,408 | 5,E-05 | 0,005 | 0,046 | 0,001 | 0,000 | 0,103 | 0,004 | 4,E-04 | 0,015 | 0,006 | 0,001 | 0,028 | 1,E-05 | 5,E-05 | 4,E-05 | 23,010 | 0,027 | 1,539 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0,079 | 0,005 | 0,004 | 0,342 | 0,045 | 0,014 | 0,195 | 0,059 | 0,136 | 0,055 | 0,074 | 0,353 | 0,053 | 0,001 | 0,004 | 0,016 | 17,695 | 0,361 | 1,496 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0,085 | 0,007 | 0,007 | 0,323 | 0,071 | 0,019 | 0,263 | 0,085 | 0,213 | 0,101 | 0,090 | 0,552 | 0,071 | 0,002 | 0,005 | 0,022 | 11,000 | 0,435 | 1,485 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0,086 | 0,007 | 0,012 | 0,264 | 0,110 | 0,020 | 0,358 | 0,123 | 0,333 | 0,187 | 0,110 | 0,860 | 0,096 | 0,004 | 0,005 | 0,023 | 2,028 | 0,537 | 1,471 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0,082 | 0,006 | 0,014 | 0,204 | 0,131 | 0,017 | 0,390 | 0,141 | 0,406 | 0,223 | 0,117 | 1,045 | 0,105 | 0,004 | 0,005 | 0,020 | 0,321 | 0,574 | 1,465 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0,074 | 0,005 | 0,018 | 0,121 | 0,172 | 0,013 | 0,438 | 0,172 | 0,552 | 0,283 | 0,128 | 1,422 | 0,118 | 0,005 | 0,004 | 0,015 | 0,093 | 0,629 | 1,455 |

Continuación Tabla 26. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | NADH | NADP | NADPH | OAA | PEP | PGA2 | PGA3 | PGN | PYR | Q | QH2 | R5P | RU5P | S7P | SUC | SUCCOA | X5P | ei | eiP |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| D:M 1:0 - NADH | 0,033 | 0,223 | 0,034 | 0,000 | 0,063 | 0,023 | 0,042 | 0,001 | 0,108 | 0,624 | 0,376 | 0,003 | 0,010 | 0,000 | 0,026 | 0,003 | 0,014 | 0,003 | 0,004 |
| D:M 10:3 - NADH | 0,072 | 0,178 | 0,079 | 0,266 | 1,473 | 0,524 | 0,943 | 0,048 | 0,153 | 0,484 | 0,516 | 0,067 | 0,211 | 0,106 | 0,085 | 0,015 | 0,309 | 1,E-04 | 0,007 |
| D:M 8:5 - NADH | 0,083 | 0,174 | 0,083 | 0,229 | 1,437 | 0,521 | 0,944 | 0,086 | 0,179 | 0,457 | 0,543 | 0,095 | 0,299 | 0,161 | 0,091 | 0,016 | 0,437 | 2,E-04 | 0,007 |
| D:M 5:8 - NADH | 0,097 | 0,175 | 0,082 | 0,229 | 1,353 | 0,503 | 0,920 | 0,155 | 0,206 | 0,429 | 0,571 | 0,136 | 0,429 | 0,250 | 0,091 | 0,015 | 0,628 | 2,E-04 | 0,007 |
| D:M 3:10 - NADH | 0,103 | 0,174 | 0,083 | 0,226 | 1,309 | 0,492 | 0,901 | 0,169 | 0,204 | 0,419 | 0,581 | 0,153 | 0,483 | 0,299 | 0,086 | 0,014 | 0,709 | 2,E-04 | 0,007 |
| D:M 0:1 - NADH | 0,115 | 0,168 | 0,089 | 0,200 | 1,242 | 0,473 | 0,870 | 0,207 | 0,196 | 0,402 | 0,598 | 0,189 | 0,594 | 0,413 | 0,077 | 0,013 | 0,872 | 2,E-04 | 0,007 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0,031 | 0,440 | 0,000 | 0,000 | 0,051 | 0,019 | 0,034 | 0,000 | 0,106 | 0,630 | 0,370 | 0,002 | 0,008 | 3,E-04 | 0,028 | 0,004 | 0,012 | 0,003 | 0,003 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0,074 | 0,205 | 0,052 | 0,245 | 1,427 | 0,506 | 0,912 | 0,057 | 0,148 | 0,480 | 0,520 | 0,075 | 0,238 | 0,126 | 0,084 | 0,015 | 0,346 | 1,E-04 | 0,007 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0,085 | 0,194 | 0,063 | 0,216 | 1,404 | 0,509 | 0,922 | 0,098 | 0,177 | 0,453 | 0,547 | 0,103 | 0,328 | 0,185 | 0,091 | 0,016 | 0,477 | 2,E-04 | 0,007 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0,099 | 0,186 | 0,071 | 0,223 | 1,338 | 0,498 | 0,909 | 0,168 | 0,205 | 0,426 | 0,574 | 0,143 | 0,452 | 0,270 | 0,091 | 0,015 | 0,658 | 2,E-04 | 0,007 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0,105 | 0,180 | 0,077 | 0,223 | 1,302 | 0,489 | 0,896 | 0,177 | 0,204 | 0,417 | 0,583 | 0,157 | 0,497 | 0,312 | 0,086 | 0,014 | 0,727 | 2,E-04 | 0,007 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0,115 | 0,168 | 0,089 | 0,200 | 1,242 | 0,473 | 0,870 | 0,207 | 0,196 | 0,402 | 0,598 | 0,189 | 0,594 | 0,413 | 0,077 | 0,013 | 0,872 | 2,E-04 | 0,007 |

Continuación Tabla 26. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | eiia | eiiaP | eiicb | eiicbP | hpr | hprP | icd | icdP | tal | talC3 | tkc | tkc2 | ADP | AMP | ATP | CAMP | P |
|------------------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| D:M 1:0 - NADH | 0,010 | 0,484 | 3,E-06 | 4,E-04 | 1,E-04 | 0,005 | 0,002 | 0,050 | 0,041 | 0,019 | 0,048 | 0,022 | 1,189 | 1,633 | 0,819 | 0,639 | 2,360 |
| D:M 10:3 - NADH | 3,E-04 | 0,495 | 8,E-08 | 4,E-04 | 4,E-06 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,012 | 0,058 | 0,936 | 0,472 | 2,070 | 0,801 | 5,529 |
| D:M 8:5 - NADH | 4,E-04 | 0,494 | 1,E-07 | 4,E-04 | 5,E-06 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,011 | 0,059 | 0,716 | 0,252 | 2,424 | 0,888 | 8,521 |
| D:M 5:8 - NADH | 5,E-04 | 0,494 | 1,E-07 | 4,E-04 | 7,E-06 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,011 | 0,059 | 0,502 | 0,128 | 2,699 | 0,950 | 14,236 |
| D:M 3:10 - NADH | 5,E-04 | 0,494 | 1,E-07 | 4,E-04 | 7,E-06 | 0,005 | 0,000 | 0,052 | 0,002 | 0,058 | 0,010 | 0,060 | 0,425 | 0,097 | 2,792 | 0,967 | 17,603 |
| D:M 0:1 - NADH | 5,E-04 | 0,494 | 1,E-07 | 4,E-04 | 7,E-06 | 0,005 | 0,000 | 0,052 | 0,001 | 0,059 | 0,009 | 0,061 | 0,323 | 0,064 | 2,912 | 0,981 | 23,509 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0,015 | 0,480 | 4,E-06 | 4,E-04 | 2,E-04 | 0,005 | 0,002 | 0,050 | 0,052 | 0,008 | 0,051 | 0,019 | 1,117 | 1,861 | 0,658 | 0,643 | 1,968 |
| D:M 10:3 - NADPH | 3,E-04 | 0,495 | 7,E-08 | 4,E-04 | 4,E-06 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,011 | 0,059 | 0,910 | 0,437 | 2,118 | 0,815 | 5,736 |
| D:M 8:5 - NADPH | 4,E-04 | 0,494 | 1,E-07 | 4,E-04 | 5,E-06 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,011 | 0,059 | 0,687 | 0,230 | 2,464 | 0,899 | 8,865 |
| D:M 5:8 - NADPH | 5,E-04 | 0,494 | 1,E-07 | 4,E-04 | 7,E-06 | 0,005 | 0,001 | 0,051 | 0,002 | 0,058 | 0,010 | 0,060 | 0,486 | 0,121 | 2,718 | 0,955 | 14,610 |
| D:M 3:10 - NADPH | 5,E-04 | 0,494 | 1,E-07 | 4,E-04 | 7,E-06 | 0,005 | 0,000 | 0,052 | 0,002 | 0,058 | 0,010 | 0,060 | 0,417 | 0,094 | 2,800 | 0,969 | 17,844 |
| D:M 0:1 - NADPH | 5,E-04 | 0,494 | 1,E-07 | 4,E-04 | 7,E-06 | 0,005 | 0,000 | 0,052 | 0,001 | 0,059 | 0,009 | 0,061 | 0,323 | 0,064 | 2,912 | 0,981 | 23,509 |

Continuación Tabla 26. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | MgADP | MgATP | MgFDP | FAD | FADH2 | ACE | GLCx | ACEx | Hout | GLCp | Pp | ACEp | FOR | FORp | FORx |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-----|------|------|
| D:M 1:0 - NADH | 0,522 | 0,755 | 0,002 | 0,594 | 0,406 | 4,E-04 | 0,006 | 2,E-04 | 3,E-05 | 0,004 | 10,039 | 3,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 10:3 - NADH | 0,411 | 1,908 | 0,009 | 0,434 | 0,566 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 9,989 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 8:5 - NADH | 0,314 | 2,234 | 0,015 | 0,406 | 0,594 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 10,008 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 5:8 - NADH | 0,221 | 2,488 | 0,028 | 0,379 | 0,621 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 10,032 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 3:10 - NADH | 0,186 | 2,573 | 0,033 | 0,371 | 0,629 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 10,041 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 0:1 - NADH | 0,142 | 2,685 | 0,042 | 0,359 | 0,641 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 10,051 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0,491 | 0,606 | 0,002 | 0,601 | 0,399 | 4,E-04 | 0,006 | 2,E-04 | 2,E-05 | 0,004 | 10,186 | 3,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0,399 | 1,952 | 0,008 | 0,430 | 0,570 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 9,990 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0,302 | 2,271 | 0,015 | 0,402 | 0,598 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 10,008 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0,214 | 2,505 | 0,027 | 0,376 | 0,624 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 10,032 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0,183 | 2,581 | 0,033 | 0,369 | 0,631 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 10,041 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0,142 | 2,685 | 0,042 | 0,359 | 0,641 | 1,E-04 | 0,006 | 1,E-04 | 5,E-05 | 0,004 | 10,051 | 1,E-04 | 0 | 0 | 0 |

Continuación Tabla 26. Concentración de cada metabolito ([mmol/L]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | LAC | LACp | LACx | SUCp | SUCx | ETH | ETHp | ETHx | AcAld | DEHU | DEHU _p | DEHU _x | KDG | MANI | MANI _p | MANI _x |
|------------------|-----|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------------------|-------------------|-----|------|-------------------|-------------------|
| D:M 1:0 - NADH | 0 | 0 | 0 | 0,051 | 0,221 | 0,216 | 0,199 | 0,182 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 10:3 - NADH | 0 | 0 | 0 | 0,085 | 0,222 | 0,300 | 0,286 | 0,272 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 8:5 - NADH | 0 | 0 | 0 | 0,091 | 0,222 | 0,357 | 0,340 | 0,323 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 5:8 - NADH | 0 | 0 | 0 | 0,091 | 0,222 | 0,422 | 0,401 | 0,381 | 0,002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 3:10 - NADH | 0 | 0 | 0 | 0,086 | 0,222 | 0,435 | 0,413 | 0,392 | 0,002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 0:1 - NADH | 0 | 0 | 0 | 0,077 | 0,221 | 0,442 | 0,420 | 0,398 | 0,002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0 | 0 | 0 | 0,044 | 0,220 | 0,223 | 0,204 | 0,186 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0 | 0 | 0 | 0,084 | 0,222 | 0,305 | 0,291 | 0,277 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0 | 0 | 0 | 0,091 | 0,222 | 0,366 | 0,348 | 0,331 | 0,001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0 | 0 | 0 | 0,091 | 0,222 | 0,429 | 0,408 | 0,387 | 0,002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0 | 0 | 0 | 0,086 | 0,222 | 0,438 | 0,417 | 0,396 | 0,002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0 | 0 | 0 | 0,077 | 0,221 | 0,442 | 0,420 | 0,398 | 0,002 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 27. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | ACEA | ACEB | ACK | ACEK_1 | ACEK_2 | ACN_1 | ACN_2 | ACS | ADK | ATP_MAIN | ATP_SYN | CYA | CYTBO | DOS | EDA | EDD |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|----------|---------|--------|---------|--------|--------|---------|
| D:M 1:0 - NADH | 0,0064 | 0,0066 | 0,0327 | 0,0016 | 0,0017 | 0,0298 | 0,0299 | 0,0317 | -0,0320 | 0,0600 | 0,0000 | 0,0025 | -0,0214 | 0,0053 | 0,0773 | -0,0001 |
| D:M 10:3 - NADH | 0,0552 | 0,0552 | 0,0098 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1259 | 0,1259 | 0,0098 | 0,0163 | 0,8400 | 0,7452 | 0,0063 | 0,3015 | 0,0066 | 0,0772 | 0,0001 |
| D:M 8:5 - NADH | 0,0608 | 0,0608 | 0,0113 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1332 | 0,1332 | 0,0113 | 0,0187 | 0,9686 | 0,9297 | 0,0073 | 0,3668 | 0,0074 | 0,0769 | 0,0004 |
| D:M 5:8 - NADH | 0,0620 | 0,0620 | 0,0125 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1347 | 0,1347 | 0,0125 | 0,0204 | 0,9517 | 1,1497 | 0,0080 | 0,4380 | 0,0079 | 0,0737 | 0,0038 |
| D:M 3:10 - NADH | 0,0581 | 0,0581 | 0,0121 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1274 | 0,1274 | 0,0121 | 0,0201 | 0,9566 | 1,2385 | 0,0081 | 0,4638 | 0,0080 | 0,0560 | 0,0138 |
| D:M 0:1 - NADH | 0,0064 | 0,0066 | 0,0327 | 0,0016 | 0,0017 | 0,0298 | 0,0299 | 0,0317 | -0,0320 | 0,0600 | 0,0000 | 0,0025 | -0,0214 | 0,0053 | 0,0773 | -0,0001 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0,0008 | 0,0008 | 0,0379 | 0,0016 | 0,0017 | 0,0175 | 0,0175 | 0,0369 | -0,0176 | 0,0683 | 0,6287 | 0,0020 | -0,0335 | 0,0053 | 0,0773 | -0,0001 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0,0481 | 0,0481 | 0,0096 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1236 | 0,1236 | 0,0096 | 0,0162 | 0,8880 | 0,7751 | 0,0064 | 0,3109 | 0,0067 | 0,0772 | 0,0001 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0,0565 | 0,0565 | 0,0111 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1320 | 0,1320 | 0,0111 | 0,0186 | 1,0251 | 0,9627 | 0,0074 | 0,3777 | 0,0074 | 0,0769 | 0,0005 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0,0598 | 0,0598 | 0,0123 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1341 | 0,1341 | 0,0123 | 0,0203 | 0,9919 | 1,1730 | 0,0080 | 0,4458 | 0,0079 | 0,0738 | 0,0040 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0,0569 | 0,0569 | 0,0120 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1270 | 0,1270 | 0,0120 | 0,0200 | 0,9799 | 1,2516 | 0,0081 | 0,4682 | 0,0080 | 0,0564 | 0,0143 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0,0513 | 0,0513 | 0,0107 | 0,0017 | 0,0017 | 0,1145 | 0,1145 | 0,0107 | 0,0189 | 1,0704 | 1,3776 | 0,0082 | 0,5053 | 0,0081 | 0,0234 | 0,0234 |

Continuación Tabla 27. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | ENO | F6P_E4P_TKT | F6P_GAP_TAL | FBA | FBP | FUMA | GDH | GL6P_HYDROLYSIS | GLC_FEED | GLT | GND | GPM | GROWTH | ICD | LPD |
|------------------|--------|-------------|-------------|--------|--------|--------|--------|-----------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| D:M 1:0 - NADH | 0,1029 | 0,0017 | 0,0030 | 0,0044 | 1,E-06 | 0,0456 | 0,0990 | 4,E-10 | 0 | 0,0288 | 0,0013 | 0,1015 | 4,E-16 | 0,0221 | 0,0328 |
| D:M 10:3 - NADH | 0,1814 | 0,0110 | 0,0113 | 0,0405 | 2,E-05 | 0,1221 | 0,1831 | 1,E-08 | 0 | 0,1259 | 0,0345 | 0,1814 | 2,E-06 | 0,0707 | 0,0696 |
| D:M 8:5 - NADH | 0,2382 | 0,0135 | 0,0146 | 0,0693 | 4,E-05 | 0,1270 | 0,2428 | 2,E-08 | 0 | 0,1332 | 0,0456 | 0,2382 | 5,E-06 | 0,0723 | 0,0690 |
| D:M 5:8 - NADH | 0,3136 | 0,0160 | 0,0185 | 0,1108 | 3,E-05 | 0,1244 | 0,3240 | 3,E-08 | 0 | 0,1347 | 0,0597 | 0,3136 | 1,E-05 | 0,0727 | 0,0652 |
| D:M 3:10 - NADH | 0,3395 | 0,0150 | 0,0178 | 0,1352 | 9,E-06 | 0,1163 | 0,3511 | 4,E-08 | 0 | 0,1274 | 0,0582 | 0,3394 | 1,E-05 | 0,0693 | 0,0609 |
| D:M 0:1 - NADH | 0,1029 | 0,0017 | 0,0030 | 0,0044 | 1,E-06 | 0,0456 | 0,0990 | 4,E-10 | 0 | 0,0288 | 0,0013 | 0,1015 | 4,E-16 | 0,0221 | 0,0328 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0,0967 | 0,0015 | 0,0020 | 0,0017 | 1,E-06 | 0,0468 | 0,0951 | 7,E-10 | 0 | 0,0175 | 0,0021 | 0,0961 | 4,E-17 | 0,0167 | 0,0428 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0,1775 | 0,0165 | 0,0167 | 0,0355 | 2,E-05 | 0,1202 | 0,1787 | 2,E-08 | 0 | 0,1236 | 0,0504 | 0,1776 | 1,E-06 | 0,0755 | 0,0747 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0,2356 | 0,0184 | 0,0193 | 0,0652 | 4,E-05 | 0,1264 | 0,2395 | 3,E-08 | 0 | 0,1320 | 0,0593 | 0,2356 | 5,E-06 | 0,0755 | 0,0728 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0,3119 | 0,0192 | 0,0216 | 0,1079 | 2,E-05 | 0,1242 | 0,3216 | 4,E-08 | 0 | 0,1341 | 0,0687 | 0,3119 | 1,E-05 | 0,0743 | 0,0672 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0,3380 | 0,0169 | 0,0196 | 0,1331 | 8,E-06 | 0,1161 | 0,3494 | 5,E-08 | 0 | 0,1270 | 0,0635 | 0,3380 | 1,E-05 | 0,0701 | 0,0619 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0,3774 | 0,0148 | 0,0178 | 0,1761 | 9,E-07 | 0,1033 | 0,3898 | 5,E-08 | 0 | 0,1145 | 0,0594 | 0,3774 | 1,E-05 | 0,0632 | 0,0544 |

Continuación Tabla 27. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | MAD | MDH | MQO | NDH1 | NDH2 | PCK | PDH | PFK | PGI | PGK | PGL | PIT | PNT | PPC | PPS | PTA | PTS_0 |
|------------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|-------|
| D:M 1:0 - NADH | 0,1394 | 0,4571 | 0,3880 | -0,0110 | -0,0147 | -0,0917 | 0,1882 | 0,0044 | -0,0005 | 0,0990 | 0,0011 | -0,1150 | 0,0281 | 0,0160 | 2,E-05 | 0,0327 | 0 |
| D:M 10:3 - NADH | 0,0557 | 1,6219 | 1,7423 | 0,1512 | 0,2094 | 0,0322 | 0,2592 | 0,0405 | -0,0348 | 0,1831 | 0,0346 | 0,0361 | 0,1208 | 0,0397 | 2,E-05 | 0,0098 | 0 |
| D:M 8:5 - NADH | 0,0327 | 1,7882 | 1,9419 | 0,1898 | 0,2632 | 0,1191 | 0,3000 | 0,0694 | -0,0466 | 0,2428 | 0,0460 | -0,0251 | 0,1085 | 0,1041 | 1,E-05 | 0,0113 | 0 |
| D:M 5:8 - NADH | 0,0233 | 1,9945 | 2,1555 | 0,2473 | 0,3433 | 0,3070 | 0,3401 | 0,1109 | -0,0651 | 0,3240 | 0,0635 | -0,1057 | 0,0708 | 0,2932 | 9,E-06 | 0,0125 | 0 |
| D:M 3:10 - NADH | 0,0216 | 2,0798 | 2,2304 | 0,2766 | 0,3841 | 0,3972 | 0,3369 | 0,1352 | -0,0739 | 0,3511 | 0,0720 | -0,1374 | 0,0585 | 0,3880 | 7,E-06 | 0,0121 | 0 |
| D:M 0:1 - NADH | 0,1394 | 0,4571 | 0,3880 | -0,0110 | -0,0147 | -0,0917 | 0,1882 | 0,0044 | -0,0005 | 0,0990 | 0,0011 | -0,1150 | 0,0281 | 0,0160 | 2,E-05 | 0,0327 | 0 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0,1299 | 0,3321 | 0,2512 | -0,0202 | -0,0284 | -0,0823 | 0,1846 | 0,0017 | -0,0019 | 0,0949 | 0,0020 | 0,2546 | -0,1886 | 0,0160 | 3,E-05 | 0,0365 | 0 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0,0520 | 1,6531 | 1,7681 | 0,1620 | 0,2246 | 0,0321 | 0,2520 | 0,0355 | -0,0506 | 0,1787 | 0,0505 | 0,0347 | -0,0134 | 0,0421 | 2,E-05 | 0,0096 | 0 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0,0311 | 1,8215 | 1,9717 | 0,2006 | 0,2783 | 0,1248 | 0,2969 | 0,0652 | -0,0603 | 0,2395 | 0,0598 | -0,0269 | 0,0067 | 0,1112 | 1,E-05 | 0,0111 | 0 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0,0229 | 2,0178 | 2,1768 | 0,2547 | 0,3537 | 0,3139 | 0,3392 | 0,1080 | -0,0744 | 0,3216 | 0,0728 | -0,1065 | 0,0106 | 0,3007 | 9,E-06 | 0,0124 | 0 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0,0214 | 2,0927 | 2,2420 | 0,2808 | 0,3901 | 0,3992 | 0,3363 | 0,1331 | -0,0797 | 0,3493 | 0,0779 | -0,1376 | 0,0217 | 0,3905 | 7,E-06 | 0,0120 | 0 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0,0198 | 2,2088 | 2,3410 | 0,3242 | 0,4510 | 0,4774 | 0,3250 | 0,1762 | -0,0855 | 0,3896 | 0,0829 | -0,1712 | 0,0573 | 0,4745 | 5,E-06 | 0,0107 | 0 |

Continuación Tabla 27. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | PTS_4 | PYK | RPE | RPI | S7P_E4P_TAL | S7P_R5P_TKT | SDH | SK | SQR | TPI | X5P_GAP_TKT | XCH_RMM_ACE | XCH_RMM_ACEx |
|------------------|-------|--------|--------|--------|-------------|-------------|--------|---------|--------|--------|-------------|-------------|--------------|
| D:M 1:0 - NADH | 0 | 2,E-06 | 0,0010 | 0,0009 | 0,0012 | 0,0011 | 0,0439 | 0,0346 | 0,0535 | 0,0044 | 0,0018 | 0,0010 | 0,0009 |
| D:M 10:3 - NADH | 0 | 0,1732 | 0,0223 | 0,0123 | 0,0114 | 0,0113 | 0,1221 | 0,0695 | 0,1221 | 0,0405 | 0,0223 | -2,E-07 | -2,E-07 |
| D:M 8:5 - NADH | 0 | 0,2515 | 0,0282 | 0,0174 | 0,0146 | 0,0146 | 0,1270 | 0,0690 | 0,1270 | 0,0693 | 0,0282 | 9,E-07 | 9,E-07 |
| D:M 5:8 - NADH | 0 | 0,3239 | 0,0347 | 0,0248 | 0,0185 | 0,0186 | 0,1244 | 0,0652 | 0,1244 | 0,1108 | 0,0346 | 3,E-06 | 3,E-06 |
| D:M 3:10 - NADH | 0 | 0,3446 | 0,0331 | 0,0250 | 0,0178 | 0,0179 | 0,1163 | 0,0609 | 0,1163 | 0,1352 | 0,0329 | 3,E-06 | 3,E-06 |
| D:M 0:1 - NADH | 0 | 2,E-06 | 0,0010 | 0,0009 | 0,0012 | 0,0011 | 0,0439 | 0,0346 | 0,0535 | 0,0044 | 0,0018 | 0,0010 | 0,0009 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0 | 0,0000 | 0,0014 | 0,0011 | 0,0013 | 0,0012 | 0,0464 | -0,0219 | 0,0520 | 0,0018 | 0,0021 | 0,0011 | 0,0011 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0 | 0,1671 | 0,0331 | 0,0173 | 0,0167 | 0,0167 | 0,1202 | 0,0745 | 0,1202 | 0,0355 | 0,0331 | -3,E-07 | -3,E-07 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0 | 0,2479 | 0,0377 | 0,0216 | 0,0193 | 0,0193 | 0,1264 | 0,0728 | 0,1264 | 0,0652 | 0,0377 | 9,E-07 | 9,E-07 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0 | 0,3219 | 0,0411 | 0,0276 | 0,0216 | 0,0217 | 0,1242 | 0,0672 | 0,1242 | 0,1079 | 0,0409 | 3,E-06 | 3,E-06 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0 | 0,3429 | 0,0368 | 0,0266 | 0,0196 | 0,0198 | 0,1162 | 0,0619 | 0,1162 | 0,1331 | 0,0366 | 3,E-06 | 3,E-06 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0 | 0,3762 | 0,0334 | 0,0257 | 0,0178 | 0,0182 | 0,1033 | 0,0544 | 0,1033 | 0,1761 | 0,0330 | 2,E-06 | 2,E-06 |

Continuación Tabla 27. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | XCH_RMM_GLC | XCH_RMM_P | ZWF | MAE_B | LDH | XCH_RMM_LACp | XCH_RMM_LACx | PFL | XCH_RMM_FORp | XCH_RMM_FORx |
|------------------|-------------|-----------|--------|--------|-----|--------------|--------------|-----|--------------|--------------|
| D:M 1:0 - NADH | 0 | -0,1292 | 0,0011 | 0,0001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 10:3 - NADH | 0 | 0,0361 | 0,0346 | 0,0012 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 8:5 - NADH | 0 | -0,0251 | 0,0460 | 0,0015 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 5:8 - NADH | 0 | -0,1057 | 0,0635 | 0,0020 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 3:10 - NADH | 0 | -0,1374 | 0,0720 | 0,0022 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 0:1 - NADH | 0 | -0,1292 | 0,0011 | 0,0001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0 | -0,6162 | 0,0020 | 4,E-05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0 | 0,0347 | 0,0505 | 0,0013 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0 | -0,0269 | 0,0598 | 0,0016 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0 | -0,1065 | 0,0728 | 0,0021 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0 | -0,1376 | 0,0779 | 0,0023 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0 | -0,1711 | 0,0829 | 0,0025 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Continuación Tabla 27. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | ALDH | ADH | XCH_RMM_ETHp | XCH_RMM_ETHx | XCH_RMM_SUCp | XCH_RMM_SUCx | DehR | KDGK |
|------------------|--------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------|
| D:M 1:0 – NADH | 0,1636 | 2,E-06 | 0,1619 | 0,1614 | 0,0008 | 0,0016 | 0,2300 | 0,2300 |
| D:M 10:3 – NADH | 0,1334 | 6,E-06 | 0,1320 | 0,1317 | 0,0026 | 0,0026 | 0,1770 | 0,1770 |
| D:M 8:5 – NADH | 0,1625 | 7,E-06 | 0,1608 | 0,1604 | 0,0028 | 0,0028 | 0,1420 | 0,1420 |
| D:M 5:8 – NADH | 0,1941 | 9,E-06 | 0,1922 | 0,1917 | 0,0028 | 0,0028 | 0,0880 | 0,0880 |
| D:M 3:10 – NADH | 0,1981 | 1,E-05 | 0,1961 | 0,1956 | 0,0027 | 0,0027 | 0,0530 | 0,0530 |
| D:M 0:1 – NADH | 0,1636 | 2,E-06 | 0,1619 | 0,1614 | 0,0008 | 0,0016 | 0,2300 | 0,2300 |
| D:M 1:0 – NADPH | 0,1797 | 1,E-06 | 0,1781 | 0,1776 | 0,0009 | 0,0014 | 0,2300 | 0,2300 |
| D:M 10:3 – NADPH | 0,1353 | 6,E-06 | 0,1340 | 0,1336 | 0,0026 | 0,0026 | 0,1770 | 0,1770 |
| D:M 8:5 – NADPH | 0,1663 | 8,E-06 | 0,1647 | 0,1642 | 0,0028 | 0,0028 | 0,1420 | 0,1420 |
| D:M 5:8 – NADPH | 0,1974 | 9,E-06 | 0,1954 | 0,1949 | 0,0028 | 0,0028 | 0,0880 | 0,0880 |
| D:M 3:10 – NADPH | 0,1998 | 1,E-05 | 0,1979 | 0,1974 | 0,0027 | 0,0027 | 0,0530 | 0,0530 |
| D:M 0:1 – NADPH | 0,2020 | 1,E-05 | 0,2000 | 0,1995 | 0,0024 | 0,0024 | 0,0000 | 0,0000 |

Continuación Tabla 27. Flujos ([mmol/s]) en estado estacionario, para cada simulación con proporciones diferentes de DEHU y manitol (D:M), y utilizando NADH o NADPH en la reacción DehR.

| Simulación | XCH_RMM_DEHUp | XCH_RMM_DEHUX | MtID | XCH_RMM_MANIp | XCH_RMM_MANI | PDC | AdhB | MANI_FEED | DEHU_FEED |
|------------------|---------------|---------------|--------|---------------|--------------|--------|--------|-----------|-----------|
| D:M 1:0 - NADH | 0 | 0 | 0,0000 | 0 | 0 | 0,0434 | 0,1638 | 0 | 0 |
| D:M 10:3 - NADH | 0 | 0 | 0,0530 | 0 | 0 | 0,0592 | 0,1334 | 0 | 0 |
| D:M 8:5 - NADH | 0 | 0 | 0,0880 | 0 | 0 | 0,0681 | 0,1624 | 0 | 0 |
| D:M 5:8 - NADH | 0 | 0 | 0,1420 | 0 | 0 | 0,0767 | 0,1941 | 0 | 0 |
| D:M 3:10 - NADH | 0 | 0 | 0,1770 | 0 | 0 | 0,0760 | 0,1981 | 0 | 0 |
| D:M 0:1 - NADH | 0 | 0 | 0,0000 | 0 | 0 | 0,0434 | 0,1638 | 0 | 0 |
| D:M 1:0 - NADPH | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0426 | 0,1797 | 0 | 0 |
| D:M 10:3 - NADPH | 0 | 0 | 0,0530 | 0 | 0 | 0,0577 | 0,1353 | 0 | 0 |
| D:M 8:5 - NADPH | 0 | 0 | 0,0880 | 0 | 0 | 0,0674 | 0,1663 | 0 | 0 |
| D:M 5:8 - NADPH | 0 | 0 | 0,1420 | 0 | 0 | 0,0765 | 0,1973 | 0 | 0 |
| D:M 3:10 - NADPH | 0 | 0 | 0,1770 | 0 | 0 | 0,0759 | 0,1998 | 0 | 0 |
| D:M 0:1 - NADPH | 0 | 0 | 0,2300 | 0 | 0 | 0,0737 | 0,2020 | 0 | 0 |

9.14. Anexo N: Simulaciones de la optimización de la producción de etanol

Debido a la gran cantidad de datos generados en estas simulaciones, se decidió no incluir las tablas con los distintos valores numéricos obtenidos. No obstante, se presenta a continuación los códigos de Matlab utilizados para las simulaciones, en caso de querer ser reproducidas.

9.14.1. Una mutación

9.14.1.1. Gráficos de los sistemas sin restricción

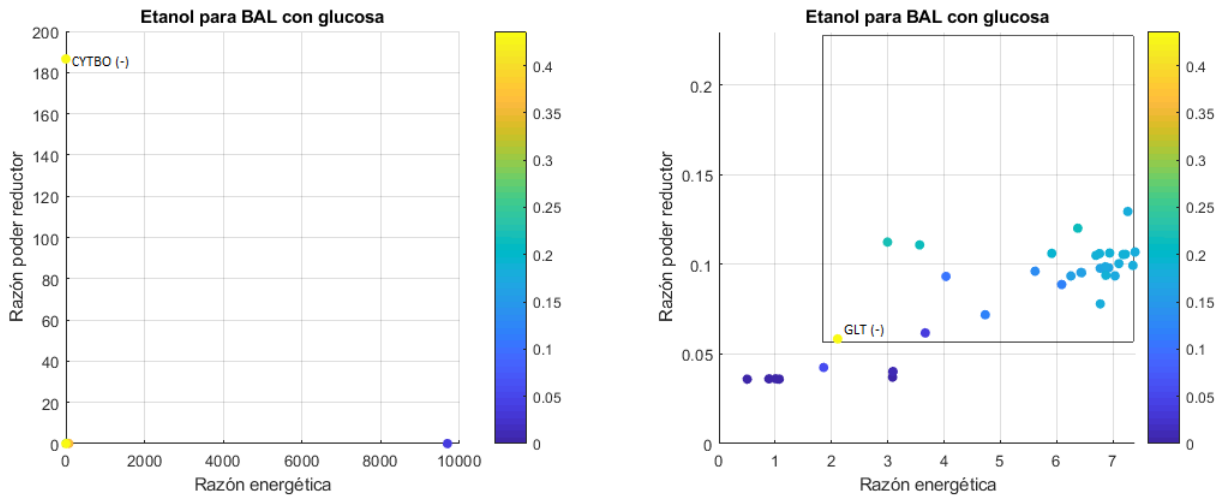


Figura 80. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

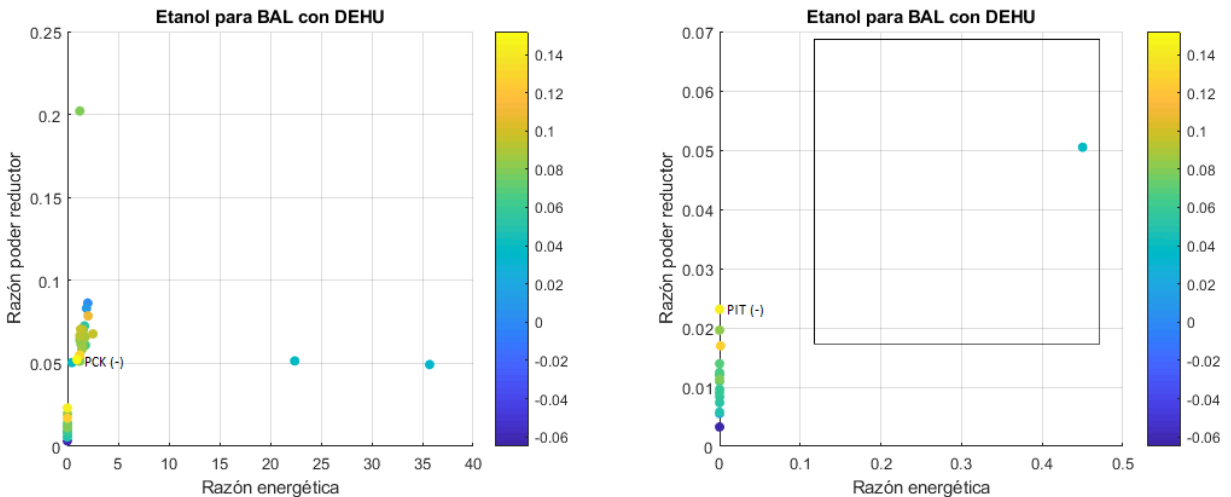


Figura 81. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con DEHU como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

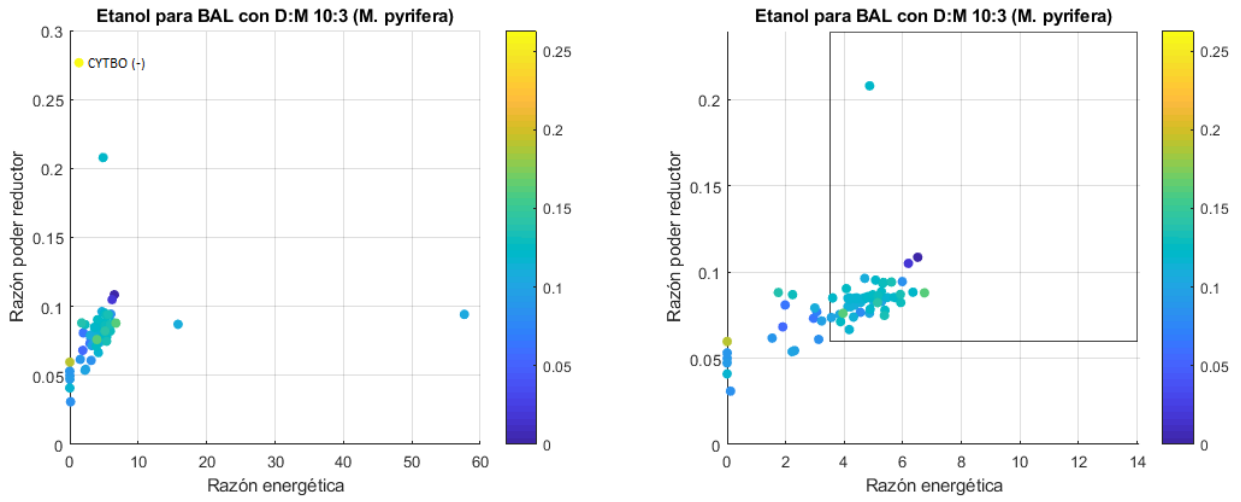


Figura 82. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada para la proporción de *M. pyrifer* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

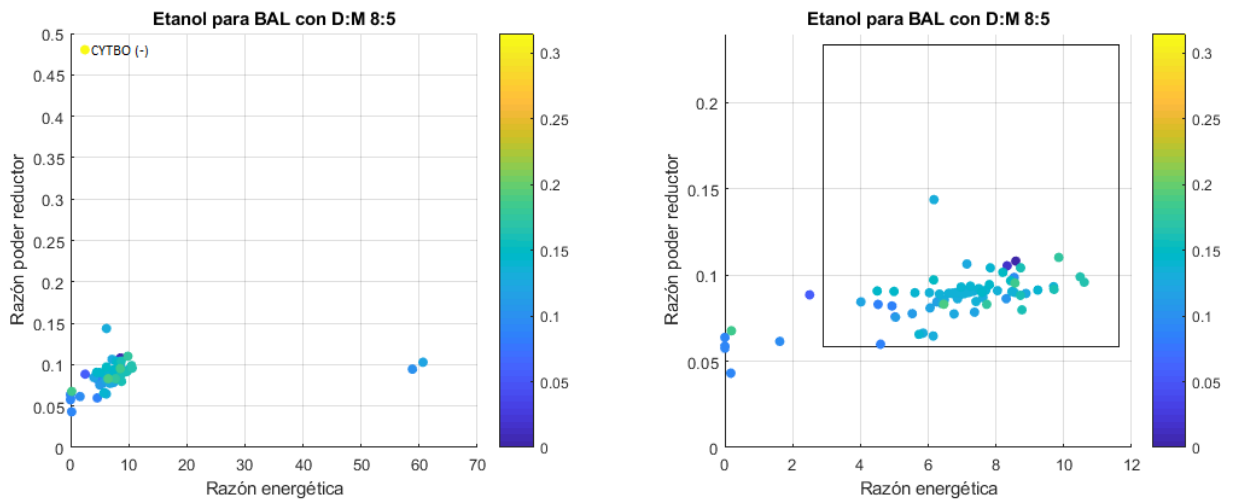


Figura 83. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con DEHU:manitol en la proporción 8:5 como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

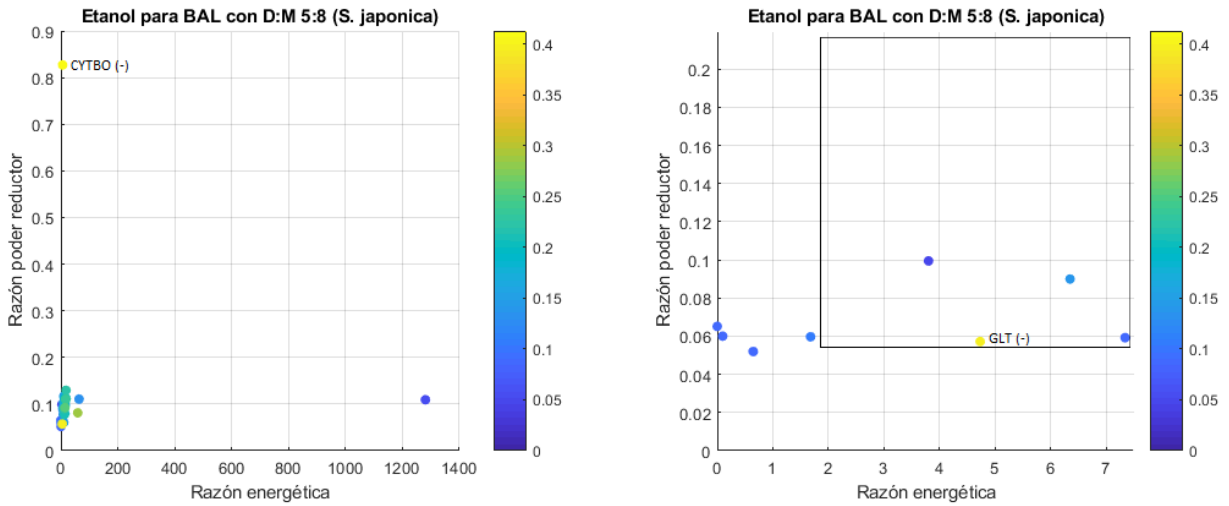


Figura 84. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con la proporción de *S. japonica* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

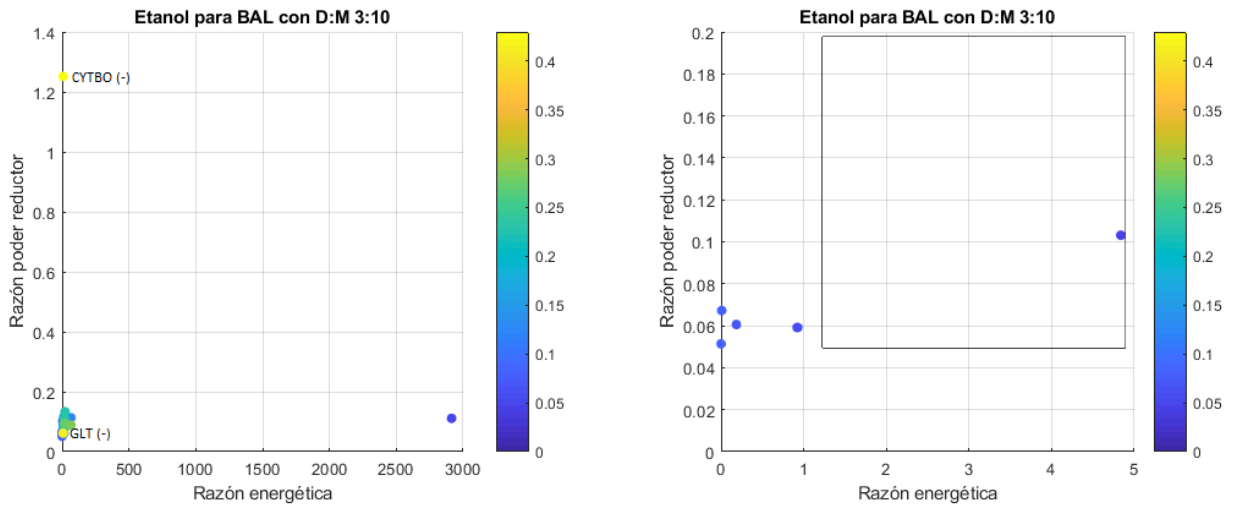


Figura 85. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con *DEHU:manitol* en la proporción 3:10 como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

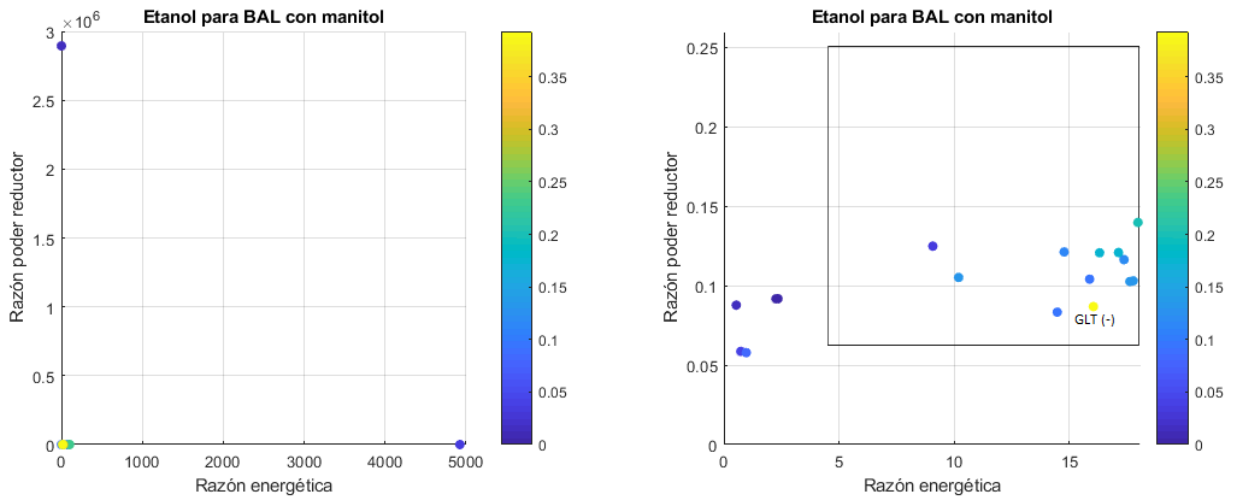


Figura 86. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con manitol como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

9.14.1.2. Códigos de Matlab

```
function generate(n, genes, output, fileID)
% n: número de mutaciones
% genes: vector de número de genes
% output: arreglo de respuesta, inicialmente es un vector vacío
% fileID: archivo en el cual se cargan los datos
%%
if n == 0
    g = sprintf('%d ', output);
    fprintf(fileID, '%s\n', g);
else
    gen = genes(1);
    if length(genes) > n
        generate(n, genes(2:end), output, fileID) ;
    end
    generate(n-1, genes(2:end), [output gen 0], fileID) ;
    generate(n-1, genes(2:end), [output gen 2], fileID) ;
end
end

function v = Velocidades2 (y)
% y: vector de metabolitos [mmol/L]
% Función que entrega las velocidades enzimáticas (flujos) para cada enzima
presente en el modelo [mmol/s]

%% Parámetros y constantes necesarias
Vcell = 1; %litros
Vxcell = 100; %litros
Vperi = 0.25; %litros
COA = 0.5; %mmol/L
HCO3 = 1.4; %mmol/L
MG = 1; %mmol/L
ASP = 1.17; %mmol/L
```

```

MN = 0.3; %mmol/L
Hin = 3.16229E-05; %mmol/L
CYS = 0.085; %mmol/L
O2 = 0.21; %mmol/L
Px = 10; %mmol/L
KdADPMg = 1.27771;
KdATPMg = 0.0847634;
KdFDPMg = 5.81;
k1_PTS_1 = 20000; %L/(mmol*s)
k2_PTS_1 = 8000; %L/(mmol*s)
k1_PTS_2 = 61000; %L/(mmol*s)
k2_PTS_2 = 47000; %L/(mmol*s)
k1_PTS_3 = 11000; %L/(mmol*s)
k2_PTS_3 = 4000; %L/(mmol*s)
k1_ACE_OUT = 5.56E-05; %1/s

```

% Metabolitos

```

ACCOA = y(1); ACO = y(2); ACP = y(3); AKG = y(4); BPG = y(5); CIT = y(6);
DAP = y(7); E4P = y(8); F6P = y(9); FDP = y(10); FUM = y(11); G6P = y(12);
GAP = y(13); GL6P = y(14); GLX = y(15); ICIT = y(16); KDPG = y(17);
MAL = y(18); NAD = y(19); NADH = y(20); NADP = y(21); NADPH = y(22);
OAA = y(23); PEP = y(24); PGA2 = y(25); PGA3 = y(26); PGN = y(27);
PYR = y(28); Q = y(29); QH2 = y(30); R5P = y(31); RU5P = y(32); S7P = y(33);
SUC = y(34); SUCCOA = y(35); X5P = y(36); ei = y(37); eiP = y(38);
eiiA = y(39); eiiAP = y(40); eiicb = y(41); eiicbP = y(42); hpr = y(43);
hprP = y(44); icd = y(45); icdP = y(46); tal = y(47); talC3 = y(48);
tkt = y(49); tktC2 = y(50); ADP = y(51); AMP = y(52); ATP = y(53);
CAMP = y(54); P = y(55); MgADP = MG.*ADP./(KdADPMg+MG); %mmol/L
MgATP = MG.*ATP./(KdATPMg+MG); %mmol/L MgFDP = MG.*FDP./(KdFDPMg+MG); %mmol/L
FAD = y(59); FADH2 = y(60); ACE = y(61); GLCx = y(62); ACEX = y(63);
Hout = y(64); GLCp = y(65); Pp = y(66); ACEp = y(67); FOR = y(68);
FORp = y(69); FORx = y(70); LAC = y(71); LACp = y(72); LACx = y(73);
SUCp = y(74); SUCx = y(75); ETH = y(76); ETHp = y(77); ETHx = y(78);
AcAld = y(79); DEHU = y(80); DEHUup = y(81); DEHUx = y(82); KDG = y(83);
MANI = y(84); MANIp = y(85); MANIx = y(86);

```

% Enzimas

```

%ACEA (GLX: producto - ICIT: sustrato - PEP: modificador - PGA3: modificador -
SUC: producto)

```

% Parámetros

```

KdICITsuc = 0.00489074; KdPEP = 1.05105; KdPEPglx = 0.0358555;
KdPEPicit = 0.164263; KdPGA3 = 0.8; KdSUC = 0.53053; Keq = 8.8088;
KmGLX = 0.13013; KmICIT = 0.063063; KmSUC = 0.58941; Vmax = 1.52595;

```

% Cinética

```

ACEA = Vmax*(ICIT-
GLX*SUC/Keq)/KmICIT/(1+ICIT/KmICIT*(1+PEP/KdPEPicit)+SUC/KdSUC*(1+ICIT/KdICITs
uc)+KmSUC/KdSUC*(GLX/KmGLX)*(1+PEP/KdPEPglx)+GLX/KmGLX*(SUC/KdSUC)+PEP/KdPEP+P
GA3/KdPGA3);

```

```

%ACEB (ACCOA: sustrato - COA: producto - GLX: sustrato - MAL: producto)

```

% Parámetros

```

Keq= 230000; KmACCOA= 0.009; KmCOA= 10.5652; KmGLX= 0.021;
KmMAL= 15.0572; Vmax= 0.352769;

```

% Cinética

```

ACEB = Vmax*(ACCOA*GLX-
COA*MAL/Keq)/(KmACCOA*KmGLX)/((1+ACCOA/KmACCOA)*(1+GLX/KmGLX)+(1+COA/KmCOA)*(1
+MAL/KmMAL)-1);

```

```

%ACK (ACE: producto - ACP: sustrato - ADP: sustrato - ATP: producto -
cell:volumen)
% Parámetros
Keq= 174; KmACE= 7; KmACP= 0.16; KmADP= 0.5; KmATP= 0.07;
Vmax= 7.23;
% Cinética
ACK = Vcell*Vmax*(ACP*ADP-
ACE*ATP/Keq)/(KmACP*KmADP)/((1+ACP/KmACP+ACE/KmACE)*(1+ADP/KmADP+ATP/KmATP));

%ACEK_1 (ADP: producto - ATP: sustrato - icd: sustrato - icdP: producto)
% Parámetros
Keq= 888; k= 1.25457;
% Cinética
ACEK_1 = k*(ATP*icd-ADP*icdP/Keq);

%ACEK_2 (P: producto - icd: producto - icdP: sustrato)
% Parámetros
Keq= 400; k= 0.0332;
% Cinética
ACEK_2 = k*(icdP-P*icd/Keq);

%ACN_1 (ACO: producto - CIT: sustrato - ICIT: modificador)
% Parámetros
Keq= 0.384503; KmACO= 0.02001; KmCIT= 0.0628882; KmICIT= 9.31352;
Vmax= 9.72413;
% Cinética
ACN_1 = (Vmax*(CIT-ACO/Keq)/KmCIT)/(1+CIT/KmCIT+ACO/KmACO+ICIT/KmICIT);

%ACN_2 (ACO: sustrato - CIT: modificador - ICIT: producto)
% Parámetros
Keq= 3.49183; KmACO= 0.02001; KmCIT= 0.0628882; KmICIT= 9.31352;
Vmax= 9.86571;
% Cinética
ACN_2 = (Vmax*(ACO-ICIT/Keq)/KmACO)/(1+CIT/KmCIT+ACO/KmACO+ICIT/KmICIT);

%ACS (ACE: sustrato - ATP: sustrato - COA: sustrato - cell: volumen)
% Parámetros
KmACE= 0.07; KmATP= 0.1; KmCOA= 0.01; Vmax= 7.3;
% Cinética
ACS =
(Vcell*Vmax*ACE*ATP*COA/(KmACE*KmATP*KmCOA))/((1+ACE/KmACE)*(1+ATP/KmATP)*(1+COA/KmCOA));

%ADK (ADP: producto - AMP: sustrato - ATP: sustrato)
% Parámetros
Keq= 0.962758; k= 0.242256;
% Cinética
ADK = k*(AMP*ATP-ADP^2/Keq);

%ATP_MAIN (ADP: producto - P: producto - ATP: sustrato)
% Parámetros
Vmax= 1.30166; Keq= 3.63369;
% Cinética
ATP_MAIN = Vmax*(ATP-ADP*P/Keq);

```

```

%CYA (ATP: sustrato - CAMP: producto - P: producto - eiaaP: modificador)
% Parámetros
Keq= 2591.19; k= 0.00414418; KaeiaaP= 0.180981;
% Cinética
CYA = (k*(ATP-CAMP*P^2/Keq)*eiaaP)/(eiaaP+KaeiaaP);

%DOS (AMP: producto - CAMP: sustrato)
% Parámetros
k= 0.00828; Keq= 674.242;
% Cinética
DOS = k*(CAMP-AMP/Keq);

%EDA (GAP: producto - KDPG: sustrato - PYR: producto)
% Parámetros
Keq= 0.5; KmGAP= 86.678; KmKDPG= 0.06; KmPYR= 10; Vmax= 0.0775241;
% Cinética
EDA = Vmax*(KDPG-
GAP*PYR/Keq)/KmKDPG/(1+KDPG/KmKDPG+(1+GAP/KmGAP)*(1+PYR/KmPYR)-1);

%EDD (KDPG: producto - PGN: sustrato)
% Parámetros
Keq= 1000; KmKDPG= 0.318316; KmPGN= 0.6; Vmax= 0.111359;
% Cinética
EDD = (Vmax*(PGN-KDPG/Keq)/KmPGN)/(1+PGN/KmPGN+KDPG/KmKDPG);

%ENO (PEP: producto - PGA2: sustrato)
% Parámetros
Keq= 3; KmPEP= 0.1; KmPGA2= 0.1; Vmax= 11.7189;
% Cinética
ENO = (Vmax*(PGA2-PEP/Keq)/KmPGA2)/(1+PGA2/KmPGA2+PEP/KmPEP);

%F6P_E4P_TKT (E4P: sustrato - F6P: producto - tkt: producto - tktC2: sustrato)
% Parámetros
Keq= 0.5005; kcat= 40.0002;
% Cinética
F6P_E4P_TKT = kcat*(E4P*tktC2-F6P*tkt/Keq);

%F6P_GAP_TAL (F6P: producto - GAP: sustrato - tal: producto - talC3: sustrato)
% Parámetros
Keq= 0.11011; kcat= 119.992;
% Cinética
F6P_GAP_TAL = kcat*(GAP*talC3-F6P*tal/Keq);

%FBA (DAP: producto - FDP: sustrato - GAP: producto - PEP: modificador)
% Parámetros
Keq= 0.18981; KmDAP= 0.13001; KmFDP= 0.12012; KmGAP= 0.13001;
KmPEP= 0.5; Vmax= 21.6978;
% Cinética
FBA = (Vmax*(FDP-
DAP*GAP/Keq)/KmFDP)/(1+FDP/KmFDP+DAP/KmDAP+DAP*GAP/(KmDAP*KmGAP)+PEP/KmPEP);

%FBP (AMP: modificador - F6P: producto - FDP: sustrato - MG: modificador -
MgFDP: modificador - P: producto)
% Parámetros

```

```

KirAMP= 0.00122122; KirAMPFDP= 0.256256; KirF6P= 1.12112;
KirF6PMg= 0.384615; KirFDP= 1.35327; KirFDPMg= 0.75924;
KirFDPMgMg= 0.356356; KirP= 3.16316; KirPF6P= 6.60538;
KirPF6PMg= 48.4484; KirPMg= 0.856; KitAMP= 0.000255; KitAMPFDP= 690;
KitF6P= 0.304; KitF6PMg= 315; KitFDP= 0.043101; KitFDPMg= 0.00642;
KitFDPMgMg= 100; KitP= 0.642; KitPF6P= 0.00689; KitPF6PMg= 16.5;
KitPMg= 539; KmrFDP= 0.0636141; KmrMg= 0.039039; KmtFDP= 1.00E-05;
KmtMg= 55.055; L0= 0.000815; Vmax= 0.215583; n= 4; KdFDPMg= 5.81;
% Cinética
FBP =
Vmax*n*MgFDP/KirFDPMg/(1+KmrFDP/KirFDP*(MG/KmrMg)+P/KirP+P/KirP*(MG/KirPMg)+F6P/KirF6P+F6P/KirF6P*(MG/KirF6PMg)+P/KirP*(F6P/KirPF6P)+P/KirP*(F6P/KirPF6P)*(MG/KirPF6PMg)+(FDP-MgFDP)/KirFDP+KdFDPMg/KmrMg*(MgFDP/KirFDP)+AMP/KirAMP+MgFDP/KirFDPMg+MgFDP/KirFDPMg*(MG/KirFDPMgMg)+AMP/KirAMP*((FDP-MgFDP)/KirAMPFDP))/(1+L0*((1+KmtFDP/KitFDP*(MG/KmtMg)+P/KitP+P/KitP*(MG/KitPMg)+F6P/KitF6P+F6P/KitF6P*(MG/KitF6PMg)+P/KitP*(F6P/KitPF6P)+P/KitP*(F6P/KitPF6P)*(MG/KitPF6PMg)+(FDP-MgFDP)/KitFDP+KdFDPMg/KmtMg*(MgFDP/KitFDP)+AMP/KitAMP+MgFDP/KitFDPMg+MgFDP/KitFDPMg*(MG/KitFDPMgMg)+AMP/KitAMP*((FDP-MgFDP)/KitAMPFDP))/(1+KmrFDP/KirFDP*(MG/KmrMg)+P/KirP+P/KirP*(MG/KirPMg)+F6P/KirF6P+F6P/KirF6P*(MG/KirF6PMg)+P/KirP*(F6P/KirPF6P)+P/KirP*(F6P/KirPF6P)*(MG/KirPF6PMg)+(FDP-MgFDP)/KirFDP+KdFDPMg/KmrMg*(MgFDP/KirFDP)+AMP/KirAMP+MgFDP/KirFDPMg+MgFDP/KirFDPMg*(MG/KirFDPMgMg)+AMP/KirAMP*((FDP-MgFDP)/KirAMPFDP)))^n);
%FUMA (FUM: sustrato - MAL: producto)
% Parámetro
Keq= 4.99966; KmFUM= 0.6; KmMAL= 0.7; Vmax= 53.3414;
% Cinética
FUMA = (Vmax*(FUM-MAL/Keq)/KmFUM)/(1+FUM/KmFUM+MAL/KmMAL);
%GDH (BPG: producto - GAP: sustrato - NAD: sustrato - NADH: producto - P: sustrato)
% Parámetros
Keq= 20; KmBPG= 0.2; KmGAP= 2.47265; KmNAD= 0.0110454; KmNADH= 3.69797;
KmP= 0.017; Vmax= 8.66573;
% Cinética
GDH = (Vmax*(P*GAP*NAD-BPG*NADH/Keq)/(KmP*KmGAP*KmNAD))/((1+P/KmP)*(1+GAP/KmGAP)*(1+NAD/KmNAD)+(1+BPG/KmBPG)*(1+NADH/KmNADH)-1);
%GL6P_HYDROLYSIS (GL6P: sustrato - PGN: producto)
% Parámetros
KGl6Phydrol= 0.000167; KeqGl6Phydrol= 42.8;
% Cinética
GL6P_HYDROLYSIS = KGl6Phydrol*(GL6P-PGN/KeqGl6Phydrol);
%GLT (ACCOA: sustrato - AKG: modificador - ATP: modificador - CIT: producto - COA: producto - NADH: modificador - OAA: sustrato)
% Parámetros
KdACCOA0= 0.699309; KdcsCIT= 7.38128; KdcsCOA= 0.00174282;
KdcsOAA= 0.154601; Keq= 83067.1; Ki1AKG= 0.0150083;
Ki1NADH= 0.000330313; Ki2AKG= 0.256252; Ki2NADH= 0.0504;
KiATP= 0.579939; KmACCOA0= 0.119974; KmOAA0= 0.00123458;
KmcscIT= 1.15715; KmcscOA= 9.63E-05; Vmax= 57.0584;

```


% Cinética

GLT = Vmax*(ACCOA*OAA-
CIT*COA/Keq) / (KdACCOA0*KmOAA0) / (ACCOA/KdACCOA0*(1+AKG/Ki1AKG+NADH/Ki1NADH)+ACC
OA/KdACCOA0*(OAA/KmOAA0)*(1+AKG/Ki2AKG+NADH/Ki2NADH)+(1+ATP/KiATP)*(1+KmACCOA0
/KdACCOA0*(OAA/KmOAA0))+KmcscOA/KdcsCOA*(CIT/KmcscIT)+KmcscOA/KdcsCOA*(ACCOA/K
dACCOA0)*(CIT/KmcscIT)+COA/KdcsCOA+CIT/KmcscIT*(OAA/KmOAA0)+ACCOA/KdACCOA0*(CI
T/KdcsCIT)*(OAA/KmOAA0)+KmACCOA0/KdACCOA0*(COA/KdcsCOA)*(OAA/KmOAA0)+CIT/Kmcsc
IT*(COA/KdcsCOA)*(OAA/KdcsOAA));

%GND (ATP: modificador - FDP: modificador - HCO3: producto - NADP: sustrato -
NADPH: producto - PGN: sustrato - RU5P: producto)

% Parámetros

KdHCO3= 58.8951; KdHCO3NADPH= 9.7257; KdNADP= 0.116989;
KdNADPH= 0.00340034; KdRU5P= 0.0440044; KefATP= 0.0650065;
KefFbP= 0.0129987; KefNADPATP= 0.139986; KefNADPFbP= 0.00519948;
Keq= 49.962; KmHCO3= 6.41899; KmNADP= 0.049; KmNADPH= 68.3828;
KmPGN= 0.093; KmRU5P= 45.1977; Vmax= 4.08105;

% Cinética

GND = Vmax*(NADP*PGN-
NADPH*RU5P*HCO3/Keq) / (KdNADP*KmPGN) / (1+NADP/KdNADP+FDP/KefFbP+NADP/KdNADP*(FDP
/KefNADPFbP)+KmNADP/KdNADP*(PGN/KmPGN)+NADP/KdNADP*(PGN/KmPGN)+ATP/KefATP+ATP/
KefNADPATP*(KmNADP/KdNADP)*(PGN/KmPGN)+HCO3/KdHCO3+NADPH/KdNADPH+RU5P/KdRU5P+H
CO3/KdHCO3*(NADPH/KdHCO3NADPH)+HCO3/KdHCO3*(KmNADPH/KdHCO3NADPH)*(RU5P/KmRU5P)
+HCO3/KdHCO3*(NADPH/KdHCO3NADPH)*(RU5P/KmRU5P)+KmHCO3/KdHCO3*(NADPH/KdHCO3NADP
H*(RU5P/KmRU5P)));

%GPM (PGA2: producto - PGA3: sustrato)

% Parámetros

Keq= 0.565818; KmPGA2= 1.9153; KmPGA3= 0.115; Vmax= 10.9934;

% Cinética

GPM = (Vmax*(PGA3-PGA2/Keq)/KmPGA3) / (1+PGA3/KmPGA3+PGA2/KmPGA2);

%GROWTH (G6P: sustrato - E4P: sustrato - PGA3: sustrato - OAA: sustrato - AKG:
sustrato - PYR: sustrato - R5P: sustrato - PEP: sustrato - GAP: sustrato -
% F6P: sustrato - NADPH: sustrato - ACCOA: sustrato - NAD: sustrato - ATP:
sustrato)

% Parámetros

Vmax= 9.74137; KmG6P= 1.20911; KmE4P= 1.63298; KmPGA3= 0.0764619;
KmOAA= 0.0248351; KmAKG= 5.11989; KmPYR= 0.00463904; KmR5P= 0.021234;
KmPEP= 0.457734; KmGAP= 0.024854; KmF6P= 0.366423; KmNADPH= 3.59774;
KmACCOA= 0.0494404; KmNAD= 2.82239; KmATP= 0.0468266;

% Cinética

GROWTH = Vmax * G6P * E4P * PGA3 * OAA * AKG * PYR * R5P * PEP * GAP * F6P *
NADPH * ACCOA * NAD * ATP / (KmG6P * KmE4P * KmPGA3 * KmOAA * KmAKG * KmPYR *
KmR5P * KmPEP * KmGAP * KmF6P * KmNADPH * KmACCOA * KmNAD * KmATP) /
((1+G6P/KmG6P)*(1+E4P/KmE4P)*(1+PGA3/KmPGA3)*(1+OAA/KmOAA)*(1+AKG/KmAKG)*(1+PY
R/KmPYR)*(1+R5P/KmR5P)*(1+PEP/KmPEP)*(1+GAP/KmGAP)*(1+F6P/KmF6P)*(1+NADPH/KmNA
DPH)*(1+ACCOA/KmACCOA)*(1+NAD/KmNAD)*(1+ATP/KmATP));

%ICD (AKG: producto - ICIT: sustrato - NADP: sustrato - NADPH: producto - icd:
modificador)

% Parámetros

Keq= 28.1631; KmAKG= 0.038038; KmICIT= 0.010989; KmNADP= 0.005994;
KmNADPH= 0.000683333; kcat= 2461.97;

% cinética

```

ICD = (icd*kcat*(ICIT*NADP-
AKG*NADPH/Keq) / (KmICIT*KmNADP)) / ((1+ICIT/KmICIT) * (1+NADP/KmNADP) + (1+AKG/KmAKG)
* (1+NADPH/KmNADPH) - 1);

%LPD (AKG: sustrato - COA: sustrato - NAD: sustrato)
% Parámetros
KdAKG= 14.9386; KmAKG= 0.020002; KmCOA= 0.0760076; KmNAD= 0.0980098;
Vmax= 0.0684413; alpha= 16.4304;
% Cinética
LPD = Vmax*COA*AKG*NAD*(1-
AKG/KdAKG) / (KmCOA*KmAKG*KmNAD) / (COA/KmCOA* (AKG/KmAKG) +COA/KmCOA* (NAD/KmNAD) +AK
G/KmAKG* (NAD/KmNAD) +COA/KmCOA* (AKG/KmAKG) * (NAD/KmNAD) -
AKG/KdAKG* (COA/KmCOA* (AKG/KmAKG) +AKG/KmAKG* (NAD/KmNAD) +alpha* (COA/KmCOA) * (AKG/
KmAKG) * (NAD/KmNAD) ));

%MAD (ACCOA: modificador - ASP: modificador - ATP: modificador - COA:
modificador - MAL: sustrato - MG: modificador - MN: modificador - NAD:
sustrato)
% Parámetros
KefrACCOA= 1.83336; KefrASP= 0.362142; KefrATP= 88.9752;
KefrCOA= 0.268; KeftACCOA= 0.197; KeftASP= 0.583; KeftATP= 0.26;
KeftCOA= 0.268; KirNAD= 0.636457; KitNAD= 0.990398; KmrMAL= 0.212913;
KmrMg= 0.191871; KmrMn= 0.272568; KmrNAD= 1.36636; KmtMAL= 0.093;
KmtMg= 2.37681; KmtMn= 0.410198; KmtNAD= 0.108; L0= 19.9; Vmax= 6.64269;
n= 4;
% Cinética
MAD =
Vmax*n*MAL*NAD / (KmrMAL*KirNAD) / (1+KmrNAD/KirNAD* (MAL/KmrMAL) +NAD/KirNAD+MAL/Km
rMAL* (NAD/KirNAD)) * ( (MG/KmrMg+MN/KmrMn) / (1+MG/KmrMg+MN/KmrMn)) / (1+L0* ( (1+ASP/K
eftASP) * (1+MG/KmtMg+MN/KmtMn) * (1+ATP/KeftATP) * (1+ACCOA/KeftACCOA+COA/KeftCOA) *
(1+KmtNAD/KitNAD* (MAL/KmtMAL) +NAD/KitNAD+MAL/KmtMAL* (NAD/KitNAD)) / ((1+ASP/Kefr
ASP) * (1+MG/KmrMg+MN/KmrMn) * (1+ATP/KefrATP) * (1+ACCOA/KefrACCOA+COA/KefrCOA) * (1+
KmrNAD/KirNAD* (MAL/KmrMAL) +NAD/KirNAD+MAL/KmrMAL* (NAD/KirNAD)))) ^n);

%MDH (MAL: producto - NAD: modificador - NADH: modificador - OAA: sustrato)
% Parámetros
Keq= 100000; KiNAD= 0.0233122; KiNADH= 0.000196981; KiOAA= 2.46446;
KmMAL= 0.86; KmNAD= 0.64; KmNADH= 0.003; KmOAA= 0.001; Vmax= 6.11492;
% Cinética
MDH = Vmax*(NADH*OAA-
MAL*NAD/Keq) / (KiNADH*KmOAA) / (1+KmNAD/KiNAD* (MAL/KmMAL) +NAD/KiNAD+MAL/KmMAL* (NA
D/KiNAD) +NADH/KiNADH+KmNAD/KiNAD* (MAL/KmMAL) * (NADH/KiNADH) +KmNADH/KiNADH* (OAA/
KmOAA) +KmNADH/KiNADH* (NAD/KiNAD) * (OAA/KmOAA) +MAL*NAD*OAA / (KiNAD*KiOAA*KmMAL) +N
ADH/KiNADH* (OAA/KmOAA) +Keq* (KiNADH*KmOAA / (KiNAD*KmMAL)) * (KmNAD/KiNAD) * (MAL/KmM
AL) * (NADH/KmNADH) * (OAA/KiOAA)); % (corcho)

%MQO (MAL: sustrato - OAA: producto - Q: sustrato - QH2: producto)
% Parámetros
Keq= 9; KmMAL= 0.435; KmOAA= 75.8036; KmQ= 0.0414; KmQH2= 8.77942;
Vmax= 4.62283;
% Cinética
MQO = (Vmax*(MAL*Q-
OAA*QH2/Keq) / (KmMAL*KmQ)) / ((1+MAL/KmMAL) * (1+Q/KmQ) + (1+OAA/KmOAA) * (1+QH2/KmQH2)
-1);

%NDH2 (NADH: sustrato - Q: sustrato - NAD: producto - QH2: producto)

```

```

% Parámetros
Vmax= 30.8306; Keq= 27.6193;
% Cinética
NDH2 = Vmax*(NADH*Q-NAD*QH2/Keq);

%PCK (ADP: producto - HCO3: producto - MgADP: modificador - MgATP: modificador
- OAA: sustrato - PEP: producto)
% Parámetros
Keq= 1.88166; KmADP= 0.04997; KmATP= 0.0600418; KmHCO3= 2.6319;
KmOAA= 0.66966; KmPEP= 0.0699833; Vmax= 8.08777;
% Cinética
PCK = Vmax*(MgATP*OAA-
HCO3*MgADP*PEP/Keq) / (KmATP*KmOAA) / (1+HCO3/KmHCO3+HCO3/KmHCO3*(ADP/KmADP)+MgADP
/KmADP+MgATP/KmATP+OAA/KmOAA+MgATP/KmATP*(OAA/KmOAA)+HCO3/KmHCO3*(PEP/KmPEP)+P
EP/KmPEP+HCO3/KmHCO3*(MgADP/KmADP)*(PEP/KmPEP)+MgADP/KmADP*(PEP/KmPEP));

%PDH (ACCOA: producto - COA: sustrato - HCO3: producto - NAD: sustrato - NADH:
producto - PYR: sustrato)
% Parámetros
Keq= 3138.16; KmACCOA= 10.174; KmCOA= 0.00500461; KmHCO3= 0.00545112;
KmNAD= 0.00999; KmNADH= 6.63512; KmPYR= 2; Vmax= 961.706;
% Cinética
PDH = Vmax*(COA*NAD*PYR-
ACCOA*NADH*HCO3/Keq) / (KmCOA*KmNAD*KmPYR) / (ACCOA/KmACCOA+NADH/KmNADH+ACCOA/KmAC
COA*(NADH/KmNADH)+COA/KmCOA*(NADH/KmNADH)+ACCOA/KmACCOA*(COA/KmCOA)*(NADH/KmNA
DH)+NAD/KmNAD*(NADH/KmNADH)+COA/KmCOA*(NAD/KmNAD)*(NADH/KmNADH)+ACCOA/KmACCOA*
(PYR/KmPYR)+ACCOA/KmACCOA*(COA/KmCOA)*(PYR/KmPYR)+COA/KmCOA*(1+NAD/KmNAD)*(PYR
/KmPYR)+NAD/KmNAD*(1+COA/KmCOA+PYR/KmPYR)) / (1+HCO3/KmHCO3);

%PFK (ATP: sustrato - F6P: sustrato - FDP: producto - MgADP: modificador -
MgATP: modificador - PEP: modificador)
% Parámetros
KefrADP= 0.0735264; KefrPEP= 19.98; KeftADP= 9.009;
KeftPEP= 0.26026; Keq= 1998; KirADP= 54.945; KirATP= 2.50E-05;
KirF6P= 1.84615; KirFDP= 0.045954; KitADP= 80.08; KitATP= 0.014014;
KitF6P= 0.00856856; KitFDP= 50.5505; KmrADP= 0.690009; KmrATPMg= 8.12E-05;
KmrF6P= 2.05E-05; KmrFDP= 10.01; KmtADP= 2.002; KmtATPMg= 3.34334;
KmtF6P= 32.967; KmtFDP= 9.99; L0= 14.0851; Vmax= 0.185253; Wr= 0.0237041;
Wt= 0.146735; n= 4;
% Cinética
PFK = Vmax*n*(MgATP*F6P-
MgADP*FDP/Keq) / (KirF6P*KmrATPMg) / (1+KmrFDP/KirFDP*(MgADP/KmrADP)+KmrF6P/KirF6P
*(MgATP/KmrATPMg)+KmrFDP/KirFDP*(MgADP/KmrADP)*(F6P/KirF6P)+MgATP/KmrATPMg*(F6
P/KirF6P)+MgADP/KirADP*(MgATP/KmrATPMg)*(F6P/KirF6P)+(1+(ATP-
MgATP)/KirATP)*(F6P/KirF6P)+FDP/KirFDP+MgADP/KmrADP*(FDP/KirFDP)+KmrF6P/KirF6P
*(MgATP/KmrATPMg)*(FDP/KirFDP)+Wr*(KmrF6P/KirF6P)*(MgADP/KirADP)*(MgATP/KmrATP
Mg)*(FDP/KmrFDP)) / (1+L0*((1+KmtFDP/KitFDP*(MgADP/KmtADP)+KmtF6P/KitF6P*(MgATP/
KmtATPMg)+KmtFDP/KitFDP*(MgADP/KmtADP)*(F6P/KitF6P)+MgATP/KmtATPMg*(F6P/KitF6P
)+MgADP/KitADP*(MgATP/KmtATPMg)*(F6P/KitF6P)+(1+(ATP-
MgATP)/KitATP)*(F6P/KitF6P)+FDP/KitFDP+MgADP/KmtADP*(FDP/KitFDP)+KmtF6P/KitF6P
*(MgATP/KmtATPMg)*(FDP/KitFDP)+Wt*(KmtF6P/KitF6P)*(MgADP/KitADP)*(MgATP/KmtATP
Mg)*(FDP/KmtFDP))*(1+MgADP/KeftADP+PEP/KeftPEP+MgADP/KeftADP*(PEP/KeftPEP)) / ((
1+KmrFDP/KirFDP*(MgADP/KmrADP)+KmrF6P*MgATP/(KirF6P*KmrATPMg)+KmrFDP/KirFDP*(M
gADP/KmrADP)*(F6P/KirF6P)+MgATP/KmrATPMg*(F6P/KirF6P)+MgADP/KirADP*(MgATP/KmrA
TPMg)*(F6P/KirF6P)+(1+(ATP-
MgATP)/KirATP)*(F6P/KirF6P)+FDP/KirFDP+MgADP/KmrADP*(FDP/KirFDP)+KmrF6P/KirF6P
*(MgATP/KmrATPMg)*(FDP/KirFDP)+Wr*(KmrF6P/KirF6P)*(MgADP/KirADP)*(MgATP/KmrATP

```

```
Mg) * (FDP/KmrFDP)) * (1+MgADP/KefrADP+PEP/KefrPEP+MgADP/KefrADP * (PEP/KefrPEP))) ^
n);
```

```
%PGI (F6P: producto - G6P: sustrato - PEP: modificador - PGN: modificador)
```

```
% Parámetros
```

```
Keq = 0.36; KmF6P= 0.147; KmG6P= 0.28; KmPEP= 1.999; Vmax= 2.32456;
KmPGN= 0.515958;
```

```
% Cinética
```

```
PGI = (Vmax * (G6P - F6P / Keq) / KmG6P) / (1 + F6P / KmF6P + G6P / KmG6P + PEP / KmPEP + PGN / KmPGN);
```

```
%PGK (BPG: sustrato - MgADP: modificador - MgATP: modificador - PGA3:
producto)
```

```
% Parámetros
```

```
Keq= 99.9925; KmADPMg= 0.085416; KmATPMg= 3.47737;
KmBPG= 0.0113296; KmPGA3= 2.45722; Vmax= 16.1089;
```

```
% Cinética
```

```
PGK = (Vmax * (MgADP * BPG -
MgATP * PGA3 / Keq) / (KmADPMg * KmBPG)) / (1 + MgADP / KmADPMg + BPG / KmBPG + (MgADP * BPG / KmADPMg
) / KmBPG + MgATP / KmATPMg + PGA3 / KmPGA3 + (MgATP * PGA3 / KmATPMg) / KmPGA3);
```

```
%PGL (G6P: modificador - GL6P: sustrato - PGN: producto)
```

```
% Parámetros
```

```
Keq= 42.7572; KiG6P= 2.0001; KmGL6P= 0.022977; KmPGN= 9.99;
Vmax= 11.5967;
```

```
% Cinética
```

```
PGL = (Vmax * (GL6P - PGN / Keq) / KmGL6P) / (1 + GL6P / KmGL6P + PGN / KmPGN + G6P / KiG6P);
```

```
%PNT (NAD: sustrato - NADH: producto - NADP: producto - NADPH: sustrato)
```

```
% Parámetros
```

```
Keq= 0.181891; k= 2.49441;
```

```
% Cinética
```

```
PNT = k * (NAD * NADPH - NADH * NADP / Keq);
```

```
%PPC (ACCOA: modificador - ASP: modificador - CIT: modificador - CYS:
modificador - FDP: modificador - FUM: modificador - HCO3: sustrato - MAL:
modificador - OAA: producto - P: producto - PEP: sustrato - SUC: modificador)
```

```
% Parámetros
```

```
KdrOAA= 4.35404; KdrPEP= 655.591; KdtOAA= 17.9127; KdtPEP= 0.0121991;
KefrACCOA= 0.140029; KefrASP= 0.389183; KefrCIT= 34.4277;
KefrCYS= 0.000448843; KefrFDP= 9.99126; KefrFDPACCOA= 0.0156251;
KefrFUM= 2.7475; KefrMAL= 0.23002; KefrSUC= 22.9834;
KeftACCOA= 1.27598; KeftASP= 27.4729; KeftCIT= 0.521945;
KeftCYS= 0.977374; KeftFDP= 13.2064; KeftFDPACCOA= 47.7563;
KeftFUM= 9.76119; KeftMAL= 0.737283; KeftSUC= 107.18;
Keq= 149.705; KmrHCO3= 0.00219811; KmrOAA= 13.0469;
KmrP= 0.663356; KmrPEP= 3.20089; KmtHCO3= 0.00220031;
KmtOAA= 6.80995; KmtP= 0.285131; KmtPEP= 5.12497; L0= 6.37E-06;
Vmax= 21.439; n= 4.00319;
```

```
% Cinética
```

```
PPC = Vmax * n * (PEP * HCO3 -
OAA * P / Keq) / (KdrPEP * KmrHCO3) / (1 + KmrPEP / KdrPEP * (HCO3 / KmrHCO3) + KmrOAA / KdrOAA * (P / K
mrP) + OAA / KdrOAA + P / KmrP * (OAA / KdrOAA) + HCO3 / KmrHCO3 * (PEP / KdrPEP) + PEP / KdrPEP) / (1 + L
0 * ((1 + ACCOA / KeftACCOA + FDP / KeftFDP + FDP / KeftFDP * (ACCOA / KeftFDPACCOA)) * (1 + KmtPEP /
KdtPEP * (HCO3 / KmtHCO3) + KmtOAA / KdtOAA * (P / KmtP) + OAA / KdtOAA + P / KmtP * (OAA / KdtOAA) + HC
O3 / KmtHCO3 * (PEP / KdtPEP) + PEP / KdtPEP) * (1 + ASP / KeftASP + CYS / KeftCYS + CIT / KeftCIT + FUM
/ KeftFUM + MAL / KeftMAL + SUC / KeftSUC) / ((1 + ACCOA / KefrACCOA + FDP / KefrFDP + FDP / KefrFDP *
```

```
(ACCOA/KefrFDPACCOA)) * (1+KmrPEP/KdrPEP* (HCO3/KmrHCO3)+KmrOAA/KdrOAA* (P/KmrP)+OAA/KdrOAA+P/KmrP* (OAA/KdrOAA)+HCO3/KmrHCO3* (PEP/KdrPEP)+PEP/KdrPEP) * (1+ASP/KefrASP+CYS/KefrCYS+CIT/KefrCIT+FUM/KefrFUM+MAL/KefrMAL+SUC/KefrSUC))) ^n);
```

```
%PPS (ADP: modificador - AKG: modificador - AMP: producto - ATP: sustrato - MG: modificador - MgADP: modificador - MgATP: modificador - OAA: modificador - P: producto - PEP: producto - PYR: sustrato)
```

```
% Parámetros
```

```
KdAMP= 1480; KdATPMgPPS= 0.0549; KdMg= 36.9; KdP= 346; KdPEP= 95.7;
KdPYR= 2740; KefADP= 0.0283; KefAKG= 0.274; KefATP= 0.000628; KefOAA= 0.796;
Keq= 200000; KmAMP= 0.000384; KmATPMg= 0.0549; KmP= 84.4;
KmPEP= 20.7; KmPYR= 0.229; Vmax= 0.0163772; W= 10; alpha= 38900;
KdADPMg= 1.27771; KdATPMg= 0.0847634;
```

```
% Cinética
```

```
PPS = Vmax*(MgATP*PYR-
AMP*PEP*P*Mg/Keq) / (KmATPMg*KmPYR) / (MgATP/KmATPMg+alpha*(P/KdP) * (MgATP/KmATPMg)
+alpha*(AMP/KdAMP) * (MgATP/KmATPMg)+alpha*(P/KdP) * (AMP/KdAMP) * (MgATP/KmATPMg) +a
lpha*(MG/KdMg) * (P/KmP) * (AMP/KdAMP) * (MgATP/KdATPMgPPS) / (W*(1+MG/KdMg)) +MgATP/Km
ATPMg* (AKG/KefAKG) + (1+MG/KdMg) * (AKG/KefAKG) * (PEP/KmPEP) /W+MgATP/KmATPMg* (OAA/K
efOAA) + (1+MG/KdMg) * (OAA/KefOAA) * (PEP/KmPEP) /W+MG/KdMg* (P/KmP) * (AMP/KdAMP) /W+al
pha*(P/KdP) * (AMP/KdAMP) * (PEP/KmPEP) /W+alpha*(MG/KdMg) * (P/KmP) * (AMP/KdAMP) * (PEP
/KmPEP) /W+alpha*(1+MG/KdMg) * (KmAMP/KdAMP* (P/KmP) * (PEP/KmPEP)+AMP/KdAMP* (PEP/Km
PEP)) /W+ (1+MG/KdMg) * (PYR/KmPYR)+MgATP/KmATPMg* (PYR/KmPYR)+KdADPMg/KdMg* (P/KmP)
* (MgADP/KefADP) * (AMP/KdAMP) / (W*(1+MG/KdMg)) + (ADP-
MgADP) /KefADP* (PYR/KmPYR)+KdATPMg/KdMg* (P/KmP) * (AMP/KdAMP) * (MgATP/KefATP) / (W*(
1+MG/KdMg)) + (ATP-
MgATP) /KefATP* (PYR/KmPYR) + (1+MG/KdMg) * (PEP/KmPEP) /W+alpha*(1+MG/KdMg) * (PEP/KdP
EP) * (PYR/KmPYR) + (1+MG/KdMg) * (PYR/KdPYR) * (PEP/KmPEP) /W);
```

```
%PTA (ACCOA: sustrato - ACP: producto - COA: producto - P: sustrato)
```

```
% Parámetros
```

```
Keq= 0.0053952; KiACCOA= 0.2; KiACP= 0.2; KiCOA= 0.029;
KiP= 13.54; KmACP= 0.7; KmP= 6.1; Vmax= 2.7;
```

```
% Cinética
```

```
PTA = Vmax*(ACCOA*P-
ACP*COA/Keq) / (KiACCOA*KmP) / (1+ACCOA/KiACCOA+P/KiP+ACP/KiACP+COA/KiCOA+ACCOA*P/
(KiACCOA*KmP)+ACP*COA/(KmACP*KiCOA));
```

```
%PTS_0 (PEP: sustrato - PYR: producto - ei: sustrato - eiP: producto)
```

```
% Parámetros
```

```
KmPEP= 0.6; KmPYR= 1; kF= 12000; kR= 8000;
```

```
% Cinética
```

```
PTS_0 = (kF*ei*PEP^2) / (KmPEP^2+PEP^2) - (kR*eiP*PYR^2) / (KmPYR^2+PYR^2);
```

```
%PTS_4 (G6P: producto - GLCp: sustrato - cell: volumen - eiicb: producto - eiicbP: sustrato)
```

```
% Parámetros
```

```
KmG6P= 2125.91; KmGLC= 0.02; kF= 4000; kR= 1.00E-05;
```

```
% Cinética
```

```
PTS_4 = Vcell*(kF*eiicbP*GLCp/(KmGLC+GLCp)-kR*eiicb*G6P/(KmG6P+G6P));
```

```
%PYK (ADP: sustrato - FDP: modificador - G6P: modificador - GL6P: modificador
- MgADP: modificador - MgATP: modificador - PEP: sustrato - PYR: producto
% R5P: modificador - RU5P: modificador - S7P: modificador - SUCCOA:
modificador - X5P: modificador)
```

```
% Parámetros
```

```

KefrFDP= 0.449149; KefrG6P= 0.158746; KefrGL6P= 0.150482;
KefrR5P= 9.33254; KefrRU5P= 1.53591; KefrS7P= 0.0785955;
KefrX5P= 0.677374; KeftATP= 3.69117; KeftSUCCOA= 8.26406;
KirADP= 0.517585; KirATP= 96.0333; KirPEP= 0.181056; KirPYR= 15.1403;
KirPyrATP= 230.781; KitADP= 0.224911; KitATP= 0.039564; KitPEP= 0.465672;
KitPYR= 0.2499; KitPyrATP= 11.3691; KmrADPMg= 0.326144; KmrPEP= 5.56E-07;
KmtADPMg= 0.054678; KmtPEP= 0.11475; L0= 50.4818; Vmax= 0.74716;
n= 4;
% Cinética
PYK =
Vmax*n*PEP*MgADP/(KirPEP*KmrADPMg)/(1+KmrPEP/KirPEP*(MgADP/KmrADPMg)+MgATP/Kir
ATP+MgADP/KmrADPMg*(PEP/KirPEP)+KmrADPMg/KmrADPMg*(1+(ADP-
MgADP)/KirADP)*(PEP/KirPEP)+PYR/KirPYR+MgATP/KirPyrATP*(PYR/KirPYR))/(1+L0*((1
+KmtPEP/KitPEP*(MgADP/KmtADPMg)+MgATP/KitATP+MgADP*PEP/(KitPEP*KmtADPMg)+(1+(A
DP-
MgADP)/KitADP)*(PEP/KitPEP)+PYR/KitPYR+MgATP/KitPyrATP*(PYR/KitPYR))*(1+SUCCOA
/KeftSUCCOA+MgATP*SUCCOA/(KeftATP*KeftSUCCOA))/(1+KmrPEP/KirPEP*(MgADP/KmrADP
Mg)+MgATP/KirATP+MgADP/KmrADPMg*(PEP/KirPEP)+(1+(ADP-
MgADP)/KirADP)*(PEP/KirPEP)+PYR/KirPYR+MgATP/KirPyrATP*(PYR/KirPYR))*(1+FDP/Ke
frFDP+G6P/KefrG6P+GL6P/KefrGL6P+R5P/KefrR5P+RU5P/KefrRU5P+S7P/KefrS7P+X5P/Kefr
X5P)))^n);

%RPE (RU5P: sustrato - X5P: producto)
% Parámetros
Keq= 1.5015; KmRU5P= 0.872522; KmX5P= 0.893607; Vmax= 6.00103;
% Cinética
RPE = (Vmax*(RU5P-X5P/Keq)/KmRU5P)/(1+RU5P/KmRU5P+X5P/KmX5P);

%RPI (E4P: modificador - R5P: producto - RU5P: sustrato)
% Parámetros
Keq= 0.330093; KmE4P= 0.67067; KmR5P= 3.09715; KmRU5P= 4.40263;
Vmax= 8;
% Cinética
RPI = (Vmax*(RU5P-R5P/Keq)/KmRU5P)/(1+RU5P/KmRU5P+R5P/KmR5P+E4P/KmE4P);

%S7P_E4P_TAL (E4P: producto - S7P: sustrato - tal: sustrato - talC3: producto)
% Parámetros
Keq= 26.6266; kcat= 99.9991;
% Cinética
S7P_E4P_TAL = kcat*(S7P*tal-E4P*talC3/Keq);

%S7P_R5P_TKT (R5P: sustrato - S7P: producto - tkt: producto - tktC2: sustrato)
% Parámetros
Keq= 0.33033; kcat= 199.979;
% Cinética
S7P_R5P_TKT = kcat*(R5P*tktC2-S7P*tkt/Keq);

%SDH (FUM: producto - Q: sustrato - QH2: producto - SUC: sustrato)
% Parámetros
KefFUM= 0.067048; KefSUC= 0.0322425; Keq= 2250; KmFUM= 1.36019;
KmQ= 0.00160718; KmQH2= 0.00611663; KmSUC= 0.805727; Vmax= 1.56184;
% Cinética
SDH = Vmax*(SUC*Q-
FUM*QH2/Keq)/(KefSUC*KmQ)/(1+FUM/KefFUM+KmSUC/KefSUC*(Q/KmQ)+KmFUM/KefFUM*(QH2
/KmQH2)+FUM/KefFUM*(QH2/KmQH2)+SUC/KefSUC+SUC/KefSUC*(Q/KmQ));

```

```

%SK (ADP: Sustrato - ATP: Producto - COA: Producto - P: Sustrato - SUC:
Producto - SUCCOA: Sustrato)
% Parámetros
Keq= 1.15994; KmADP= 0.00868475; KmATP= 0.102321; KmCOA= 0.255019;
KmP= 0.914709; KmSUC= 0.800744; KmSUCCOA= 0.0085; Vmax= 76.8163;
% Cinética
SK = Vmax*(ADP*SUCCOA*P-
ATP*COA*SUC/Keq) / (KmADP*KmSUCCOA*KmP) / ((1+ADP/KmADP) * (1+SUCCOA/KmSUCCOA) * (1+P/
KmP) + (1+ATP/KmATP) * (1+COA/KmCOA) * (1+SUC/KmSUC) - 1);

%SQR (FADH2: sustrato - Q: sustrato - FAD: producto - QH2: producto)
% Parámetros
Keq= 0.94033; Vmax= 3.41617;
% Cinética
SQR = Vmax*(FADH2*Q-FAD*QH2/Keq);

%TPI (DAP: sustrato - GAP: producto)
% Parámetros
Keq= 0.270203; KmDAP= 0.01; KmGAP= 1.89301; Vmax= 24.1843;
% Cinética
TPI = (Vmax*(DAP-GAP/Keq)/KmDAP) / (1+DAP/KmDAP+GAP/KmGAP);

%X5P_GAP_TKT (GAP: producto - X5P: sustrato - tkt: sustrato - tktC2: producto)
% Parámetros
Keq= 1.001; kcat= 40;
% Cinética
X5P_GAP_TKT = kcat*(tkt*X5P-GAP*tktC2/Keq);

%XCH_RMM_ACE (ACE: sustrato - ACEp: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_ACE = Vmax*(ACE/Km-ACEp/Km) / (1+ACE/Km+ACEp/Km);

%XCH_RMM_ACEx (ACEp: sustrato - ACEx: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_ACEx = Vmax*(ACEp/Km-ACEx/Km) / (1+ACEp/Km+ACEx/Km);

%XCH_RMM_GLC (GLCx: sustrato - GLCp: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_GLC = Vmax*(GLCx/Km-GLCp/Km) / (1+GLCx/Km+GLCp/Km);

%XCH_RMM_P (Px: sustrato - Pp: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_P = Vmax*(Px/Km-Pp/Km) / (1+Px/Km+Pp/Km);

%ZWF (G6P: sustrato - GL6P: producto - NADP: sustrato - NADPH: producto)
% Parámetros
KdG6P= 0.192; KdGL6P= 0.02; Keq= 6.00E+10; KmG6P= 0.118525;
KmGL6P= 0.328629; KmNADP= 0.0274; KmNADPH= 0.0168; Vmax= 0.2658;

```

```

% Cinética
ZWF = Vmax*(G6P*NADP-
GL6P*NADPH/Keq)/(KdG6P*KmNADP)/(1+G6P/KdG6P+KmG6P/KdG6P*(NADP/KmNADP)+G6P/KdG6
P*(NADP/KmNADP)+KmGL6P/KdGL6P*(NADPH/KmNADPH)+GL6P/KdGL6P*(NADPH/KmNADPH));

% Enzimas nuevas
%MAE_B (MAL: sustrato - ACCOA: modificador - CAMP: modificador)
% Parámetros
Mez_Vmax = 0.707450; % [umol/g.s]
Mez_Kmal = 0.006240; % [umol/g]
Mez_KACCOA = 3.640000; % [umol/g]
Mez_KCAMP = 6.540000; % [umol/g]
Mez_L = 104000.000000; %
Mez_n = 1.330000; %
%Cinética
MAE_B = Mez_Vmax * (MAL/Mez_Kmal) * (1+MAL/Mez_Kmal)^(Mez_n-1) /
((1+MAL/Mez_Kmal)^Mez_n+Mez_L*(1+ACCOA/Mez_KACCOA+CAMP/Mez_KCAMP)^Mez_n);

%LACTATO
%LDH (NADH: modificador - PYR: sustrato)
% Parámetros
Vmax_LDH = 51.7; % [umol/g.s]
Km_NADH_LDH = 0.9; % [umol/g]
Km_PYR_LDH = 26.7; % [umol/g]
n_NADH_LDH = 3.0; %
n_PYR_LDH = 2.0; %
%Cinética
LDH = Vmax_LDH * (NADH^n_NADH_LDH/(Km_NADH_LDH^n_NADH_LDH + NADH^n_NADH_LDH))
* (PYR^n_PYR_LDH/(Km_PYR_LDH^n_PYR_LDH + PYR^n_PYR_LDH));

%XCH_RMM_LACp (LAC: sustrato - LACp: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_LACp = Vmax*(LAC/Km-LACp/Km)/(1+LAC/Km+LACp/Km);

%XCH_RMM_LACx (LACp: sustrato - LACx: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
XCH_RMM_LACx = Vmax*(LACp/Km-LACx/Km)/(1+LACp/Km+LACx/Km);

%FORMIATO
%PFL (PYR: sustrato - COA: modificador - ACCOA: modificador - FOR: producto -
O2: modificador - Q: modificador)
% Parámetros
Vmaxf_Pfl = 14.7; % [umol/g.s]
Vmaxr_Pfl = 3.4; % [umol/g.s]
Kpyr_Pfl = 4.5; % [umol/g]
KCOA_Pfl = 0.7816; % [umol/g]
KACCOA_Pfl = 5.8621; % [umol/g]
Kfor_Pfl = 1.1276; % [g/l]
K_A_ArcA_Q = 0.5; % [umol/g]
n_ArcA = -5.0; %
K_A_FNR_O2 = 5.0e-6; % [mM]
n_FNR = -5.0; %
k_O2 = 0.001;

```



```

% Cinética
TF_Fnr = ((k_O2*O2)^n_FNR)/(K_A_FNR_O2^n_FNR+(k_O2*O2)^n_FNR);
TF_ArcA = (Q^n_ArcA)/(K_A_ArcA_Q^n_ArcA+Q^n_ArcA);
PFL =
((TF_Fnr+TF_ArcA)*Vmaxf_Pfl*PYR*COA)/((PYR*COA+Kpyr_Pfl*COA+KCOA_Pfl*PYR)) -
((TF_Fnr+TF_ArcA)*Vmaxr_Pfl*ACCOA*FOR)/(ACCOA*FOR+KACCOA_Pfl*FOR+Kfor_Pfl*ACCOA);

% XCH_RMM_FORp (FOR: sustrato - FORp: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_FORp = Vmax*(FOR/Km-FORp/Km)/(1+FOR/Km+FORp/Km);

% XCH_RMM_FORx (FORp: sustrato - FORx: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_FORx = Vmax*(FORp/Km-FORx/Km)/(1+FORp/Km+FORx/Km);

% ETANOL
% ALDH (ACCOA: sustrato - NADH: modificador - COA: producto - NAD: modificador - AcAld: producto)
% Parámetros
Vmax_ALDH = 63.9; % [umol/g.s] es lo mismo que mmol/L!!
KACCOA_ALDH = 0.0124; % [umol/g]
Knadh_ALDH = 0.443; % [umol/g]
Knad_ALDH = 0.1418; % [umol/g]
KCOA_ALDH = 0.0142; % [umol/g]
Kacald_ALDH = 17.7305; % [umol/g]
Keq_ALDH = 2.7730e+01; % [umol/g]
% Cinética
ALDH = (Vmax_ALDH/(KACCOA_ALDH*Knadh_ALDH))*(ACCOA*NADH-
((COA*NAD*AcAld)/Keq_ALDH))/((1.0+(NAD/Knad_ALDH)+(NADH/Knadh_ALDH))*(1.0+(ACCOA/KACCOA_ALDH)+(COA/KCOA_ALDH)+(AcAld/Kacald_ALDH)+((AcAld*COA)/(Kacald_ALDH*KCOA_ALDH))));

% ADH (AcAld: sustrato - NADH: modificador - NAD: modificador - ETH: producto)
% Parámetros
Vmax_ADH = 57.97; % [umol/g.s]
Kacald_ADH = 0.0532; % [umol/g]
Knadh_ADH = 2.1; % [umol/g]
Knad_ADH = 0.1418; % [umol/g]
Keth_ADH = 7.1065e-04; % [g/l]
Keq_ADH = 2.1906e+04; % [umol/g]
% Cinética
ADH = ((Vmax_ADH/(Kacald_ADH*Knadh_ADH))*(AcAld*NADH-
((ETH*NAD)/Keq_ADH)))/((1.0+(NAD/Knad_ADH)+(NADH/Knadh_ADH))*(1.0+(AcAld/Kacald_ADH)+(ETH/Keth_ADH)));

% XCH_RMM_ETHp (ETH: sustrato - ETHp: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_ETHp = Vmax*(ETH/Km-ETHp/Km)/(1+ETH/Km+ETHp/Km);

```

```

% XCH_RMM_ETHx (ETHp: sustrato - ETHx: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_ETHx = Vmax*(ETHp/Km-ETHx/Km)/(1+ETHp/Km+ETHx/Km);

% SALIDA DE SUCCINATO
%XCH_RMM_SUC (S: sustrato, SUC o SUCp)
% Parámetros
Vmax= 0.5; %[umol/g*s]
Km= 16; %[umol/g]
XCH_RMM_SUCp = Vmax*SUC/(Km+SUC);
XCH_RMM_SUCx = Vmax*SUCp/(Km+SUCp);

% ENZIMAS DE BAL1611
% DehR (DEHU: sustrato - KDG: producto)
% Parámetros (estimados desde otras kinasas de ácidos urónicos)
% Ensayo sensibilidad
Km = 0.175; Kcat = 6.88; E = 0.001;
% Cinética
DehR = Kcat*E*DEHU/(Km+DEHU);

% KDGK (KDG: sustrato - KDPG: producto)
% Parámetros
% Ensayo sensibilidad
Km = 0.5; Kcat = 1167.94; E = 0.001;
% Cinética
KDGK = Kcat*E*KDG/(Km+KDG);

% XCH_RMM_DEHUp (DEHUx: sustrato - DEHUp: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_DEHUp = Vmax*(DEHUx/Km-DEHUp/Km)/(1+DEHUx/Km+DEHUp/Km);

% XCH_RMM_DEHU (DEHUp: sustrato - DEHU: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_DEHU = Vmax*(DEHUp/Km-DEHU/Km)/(1+DEHUp/Km+DEHU/Km);

% Mt1D (MANI: sustrato - F6P: producto)
% Parámetros
% Ensayo sensibilidad
Km = 0.4586; Kcat = 0.0019; E = 0.001;
% Cinética
Mt1D = Kcat*E*MANI/(Km+MANI);

% XCH_RMM_MANIp (MANIx: sustrato - MANIp: producto)
% Parámetros
Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_MANIp = Vmax*(MANIx/Km-MANIp/Km)/(1+MANIx/Km+MANIp/Km);

% XCH_RMM_MANI (MANIp: sustrato - MANI: producto)
% Parámetros

```

```

Vmax= 100; Km= 10;
% Cinética
XCH_RMM_MANI = Vmax*(MANIp/Km-MANI/Km)/(1+MANIp/Km+MANI/Km);

%PDC (PYR: sustrato - ACCOA: producto)
% Parámetros
Km = 1.1; Kcat = 486; E = 0.001;
% Cinética
PDC = Kcat*E*PYR/(Km+PYR);

%AdhB (AcAld: sustrato - ETH: producto)
% Parámetros
Vm_ETH = 820; Kma_ETH = 0.110; Kmb_ETH = 27; Kia_ETH = 0.14; Vm_AcAld = 11000;
Kma_AcAld = 0.012; Kmb_AcAld = 1.3; Kia_AcAld = 0.018;
% Cinética
AdhB =
1/(1/Vm_AcAld*(1+Kma_AcAld/NADH+Kmb_AcAld/AcAld+Kma_AcAld*Kia_AcAld/(NADH*AcAld)))-1/(1/Vm_ETH*(1+Kma_ETH/NAD+Kmb_ETH/ETH+Kma_ETH*Kia_ETH/(NAD*ETH)));

%EDA_Vibrio (GAP: producto - KDPG: sustrato - PYR: producto)
% Parámetros (promedio de azotobacter y sulfolobus)
Km = 0.103; %[mM]
Vmax = 0.01425; %[mmol/s]
% Cinética (Michaeliana)
EDA_Vibrio = Vmax*KDPG/(Km+KDPG);

%Velocidades creadas para metabolitos ei, eiP, etc
%k1_PTS1
k1_PTS1 = k1_PTS_1*hpr*eiP;

%k2_PTS1
k2_PTS1 = k2_PTS_1*hprP*ei;

%k1_PTS2
k1_PTS2 = k1_PTS_2*eiia*hprP;

%k2_PTS2
k2_PTS2 = k2_PTS_2*eiiaP*hpr;

%k1_PTS3
k1_PTS3 = k1_PTS_3*eiicb*eiiaP;

%k2_PTS3
k2_PTS3 = k2_PTS_3*eiicbP*eiia;

%ACE_OUT
ACE_OUT = k1_ACE_OUT*ACEx;

%ATP_SYN (Hin: modificador - Hout: modificador - ADP: sustrato - P: sustrato -
ATP: producto)
% Parámetros
Vmax= 108.733; Keq= 49.8315;
% Cinética

```

```

ATP_SYN = (Vmax*(ADP*P-
ATP/Keq)*abs(log(Hout/Hin)/log(10))* (log(Hout/Hin)/log(10))^3)/(1+(log(Hout/Hi
n)/log(10))^4);

%CYTBO (Hin: modificador - Hout: modificador - O2: sustrato, fijo - QH2:
sustrato - Q: producto)
% Parámetros
Vmax= 8.54045; Keq= 12.067;
% Cinética
CYTBO = Vmax*(QH2^2*O2-
Q^2/Keq)*(log(Hout/Hin)/log(10)+0.5)/(1.5*0.5^(2.5)+(log(Hout/Hin)/log(10)+0.5
)^(2.5));

%NDH1 (Hin: modificador - Hout: modificador - NADH: sustrato - Q: sustrato -
NAD: producto - QH2: producto)
% Parámetros
Vmax= 23.0735; Keq= 27.6193;
% Cinética
NDH1 = Vmax*(NADH*Q-
NAD*QH2/Keq)*(log(Hout/Hin)/log(10)+0.5)/(1.5*0.5^(2.5)+(log(Hout/Hin)/log(10)
+0.5)^(2.5));

%PIT (Hout: Modificador - Hin: Modificador - Pp: sustrato - P: Producto)
% Parámetros
Vmax= 7.146; KmP= 12.18; KmPp= 0.025; Kr= 0.1;
% Cinética
PIT =
Vmax*(abs(log(Hout/Hin)/log(10))* (log(Hout/Hin)/log(10))*Pp)/((1+(log(Hout/Hin
)/log(10))^2)*(KmP+Pp))-
Kr*P*(log(Hout/Hin)/log(10)+0.5)/((KmP+P)*1.5*0.5^(2.5)+(log(Hout/Hin)/log(10)
+0.5)^(2.5));

%% Construcción del vector de flujos
v1 = [ACEA ACEB ACK ACEK_1 ACEK_2 ACN_1 ACN_2 ACS ADK ATP_MAIN ATP_SYN CYA
CYTBO DOS EDA EDD ENO F6P_E4P_TKT F6P_GAP_TAL FBA FBP FUMA GDH GL6P_HYDROLYSIS
GLT GND GPM GROWTH ICD LPD MAD MDH MQO NDH1 NDH2 PCK PDH PFK PGI PGK PGL PIT
PNT PPC PPS PTA PTS_0 PTS_4 PYK RPE RPI S7P_E4P_TAL S7P_R5P_TKT SDH SK SQR TPI
X5P_GAP_TKT XCH_RMM_ACE XCH_RMM_ACEx XCH_RMM_GLC XCH_RMM_P ZWF MAE_B LDH
XCH_RMM_LACp XCH_RMM_LACx PFL XCH_RMM_FORp XCH_RMM_FORx ALDH ADH XCH_RMM_ETHp
XCH_RMM_ETHx XCH_RMM_SUCp XCH_RMM_SUCx DehR KDGK XCH_RMM_DEHUx XCH_RMM_DEHU
Mt1D XCH_RMM_MANIp XCH_RMM_MANI PDC AdhB EDA_Vibrio k1_PTS1 k2_PTS1 k1_PTS2
k2_PTS2 k1_PTS3 k2_PTS3 ACE_OUT];

for i = 1 : length(v1)
    if imag(v1(i)) ~= 0
        v1(i) = real(v1(i));
    end
end

v = v1';
end

function dydt = dydt(~, y, S, C, G)
% Esta función entrega el cambio de concentración de las distintas especies
del sistema, en [mmol/s].
% ~: generalmente es el tiempo [s]

```

```

% y: es el vector de especies [mmol/L]
% S: vector de flujos de entrada (s_j>0) o salidas (s_j<0) de cada metabolito
% C: matriz estequiométrica
% G: 'vector genético', indica qué enzimas están encendidas y cuáles apagadas
% dydt: vector cuyas filas corresponden al cambio de concentración de las
distintas especies del sistema en [mmol/s].

%% Velocidades enzimáticas

if y(64) < 10^(-10)
    y(64) = 10^(-10);
end
if y(64) > 10^(-4)
    y(64) = 10^(-4);
end
for i = 1 : length(y)
    if y(i) < 0
        y(i) = 0;
    end
end

v = Velocidades2(y); %calcula todas las velocidades
v_fin = v.*G; %deja encendida solo las velocidades que se quieren simular

%% Sistema de EDO's
dydt = C*v_fin + S;

end

function [y_est, v_est] = Integrador_estacionario (y0,S,C,G)
% y0: vector de condiciones iniciales [mmol/L]
% S: vector de flujos de entrada (s_j>0) o salidas (s_j<0) de cada metabolito
% C: matriz estequiométrica
% G: 'vector genético', indica qué enzimas están encendidas y cuáles apagadas
% Función que entrega las concentraciones (y_est) y velocidades enzimáticas
(v_est) en el estacionario

TSPAN = [0 200]; %[s]
options = odeset('NonNegative',1:length(y0));
[t,y] = ode15s(@ (t,y) dydt(t,y,S,C,G),TSPAN,y0,options);

KdADPMg = 1.27771;
KdATPMg = 0.0847634;
KdFDPMg = 5.81;
MG = 1; %mmol/L
y(:,56) = MG.*y(:,51)./(KdADPMg+MG); %mmol/L MgADP
y(:,57) = MG.*y(:,53)./(KdATPMg+MG); %mmol/L MgATP
y(:,58) = MG.*y(:,10)./(KdFDPMg+MG); %mmol/L MgFDP

y_est = y(length(t),:);
v_est = Velocidades2(y_est).*G;

end

```

```

function [v_opt, g_opt] = Optimizador
(C,S,y0,G,Gctes,filetocombinel,filetosave)
% C: matriz estequiométrica
% S: vector de flujos de entrada (s_j>0) o salidas (s_j<0) de cada metabolito
% y0: vector de condiciones iniciales [mmol/L]
% Gctes: vector con ceros en la posición de las enzimas que no pueden ser
modificadas
% Función que entrega el flujo óptimo para cada G

%%
%Para todo G interesante, cambiar g sin cambiar los Gctes
Gi = G;
Gcomb = zeros(93,1);
y_est = zeros(86,1);
v_est = zeros(93,1);
v_eth = 0;
v_growth = 0;
redox = 0;
energy = 0;

%Un solo cambio
fileID = fopen(filetocombinel,'r');
formatSpec = '%d %d';
sizeA = [2 Inf];
A = fscanf(fileID,formatSpec,sizeA);
A = A';
fclose(fileID);
a = 0;
for i = 1 : length(A)
    if Gctes(A(i,1)) ~= 0
        a = a + 1;
        Gi(A(i,1)) = A(i,2);
        Gcomb(:,a) = Gi;
        [y, v] = Integrador_estacionario (y0,S,C,Gi);
        y_est(:,a) = y';
        v_est(:,a) = v;
        v_eth(a) = v(74);
        v_growth(a) = v(28);
        redox(a) = ((y(20)+y(22))/(y(19)+y(21)));
        energy(a) = (y(53)/y(51));
        Gi = G;
    end
end
%ordenando vectores
[eth_orden, ind] = sort(v_eth, 'descend');
g_orden = Gcomb(:,ind);
redox_orden = redox(ind);
energy_orden = energy(ind);
growth_orden = v_growth(ind);

previos_growth = [1.0311E-5 1.4729E-5 1.3636E-5 1.0798E-5 4.086E-6 1.1887E-6
5.9954E-23];
previos_redox = [0.113702347 0.125328145 0.098880038 0.108329032 0.116695738
0.119356309 0.03434003];
previos_energy= [3.679517054 9.016425133 2.4479494 3.716678724 5.811656167
7.007174994 0.235110938];

```

```

%definir los límites
if S(62) == 0.23/100
    if previos_growth(1) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(1),6);
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(1);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(1);
elseif S(9) == 0.23
    if previos_growth(2) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(2),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(2);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(2);
elseif S(9) == 0.177
    if previos_growth(3) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(3),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(3);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(3);
elseif S(9) == 0.142
    if previos_growth(4) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(4),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(4);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(4);
elseif S(9) == 0.088
    if previos_growth(5) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(5),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(5);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(5);
elseif S(9) == 0.053
    if previos_growth(6) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(6),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(6);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(6);
elseif S(83) == 0.23
    if previos_growth(7) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(7),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(7);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(7);
end

```

```

figure
subplot(1,2,1)
scatter3(energy_orden,redox_orden,eth_orden,[],eth_orden,'filled')
colorbar
if S(62) == 0.23/100
    title('Etanol para BAL con glucosa')
elseif S(9) == 0.23
    title('Etanol para BAL con manitol')
elseif S(9) == 0.177
    title('Etanol para BAL con D:M 3:10')
elseif S(9) == 0.142
    title('Etanol para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
elseif S(9) == 0.088
    title('Etanol para BAL con D:M 8:5')
elseif S(9) == 0.053
    title('Etanol para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
elseif S(83) == 0.23
    title('Etanol para BAL con DEHU')
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(1,2,2)
scatter3(energy_orden,redox_orden,eth_orden,[],eth_orden,'filled')
colorbar
view(0,90)
if S(62) == 0.23/100
    title('Etanol para BAL con glucosa')
    axis([0 7.4 0 0.23])
elseif S(9) == 0.23
    title('Etanol para BAL con manitol')
    axis([0 18.1 0 0.26])
elseif S(9) == 0.177
    title('Etanol para BAL con D:M 3:10')
    axis([0 5 0 0.2])
elseif S(9) == 0.142
    title('Etanol para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
    axis([0 7.5 0 0.22])
elseif S(9) == 0.088
    title('Etanol para BAL con D:M 8:5')
    axis([0 12 0 0.24])
elseif S(9) == 0.053
    title('Etanol para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
    axis([0 14.1 0 0.24])
elseif S(83) == 0.23
    title('Etanol para BAL con DEHU')
    axis([0 0.5 0 0.07])
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
hold on
rectangle('Position',[limites_energy(1) limites_redox(1) (limites_energy(2)-
limites_energy(1)) (limites_redox(2)-limites_redox(1))])
hold off

```



```

if limites_growth == 0
    [v_opt, r_max] = max(v_eth(:));
    g_opt = Gcomb(:,r_max);
    redox_orden=redox_orden';
    energy_orden=energy_orden';
    growth_orden=growth_orden';
    eth_orden=eth_orden';
    save(filetosave, 'A','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_eth', 'limites_growth', 'limites_redox',
'limites_energy', 'v_growth', 'redox','energy', 'eth_orden','g_orden','ind',
'redox_orden', 'energy_orden','growth_orden')
    return
end

```

```

energy_plot = 0;
redox_plot = 0;
eth_plot = 0;
growth_plot = 0;
g_plot_i = 0;
g_plot = 0;
d = 0;
for i = 1 : length(limites_growth)
    for j = 1 : length(eth_orden)
        if growth_orden(j) ~= 0
            if growth_orden(j) >= limites_growth(i)
                if redox_orden(j) >= limites_redox(1)
                    %if redox_orden(j) ~= 0
                        if redox_orden(j) <= limites_redox(2)
                            if energy_orden(j) >= limites_energy(1)
                                %if energy_orden(j) ~= 0
                                    if energy_orden(j) <= limites_energy(2)
                                        d = d + 1;
                                        growth_plot(d,i) = growth_orden(j);
                                        energy_plot(d,i) = energy_orden(j);
                                        redox_plot(d,i) = redox_orden(j);
                                        eth_plot(d,i) = eth_orden(j);
                                    end
                                end
                            end
                        end
                    end
                end
            end
        end
    end
end
d = 0;
end

```

```

energy_plot1 = 0; redox_plot1 = 0; eth_plot1 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,1) ~= 0 && redox_plot(j,1) ~= 0 && eth_plot(j,1) ~= 0
        energy_plot1(j) = energy_plot(j,1);
        redox_plot1(j) = redox_plot(j,1);
        eth_plot1(j) = eth_plot(j,1);
        growth_plot1(j) = growth_plot(j,1);
    end
end

```

```

end
energy_plot2 = 0; redox_plot2 = 0; eth_plot2 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,2) ~= 0 && redox_plot(j,2) ~= 0 && eth_plot(j,2) ~= 0
        energy_plot2(j) = energy_plot(j,2);
        redox_plot2(j) = redox_plot(j,2);
        eth_plot2(j) = eth_plot(j,2);
        growth_plot2(j) = growth_plot(j,2);
    end
end
energy_plot3 = 0; redox_plot3 = 0; eth_plot3 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,3) ~= 0 && redox_plot(j,3) ~= 0 && eth_plot(j,3) ~= 0
        energy_plot3(j) = energy_plot(j,3);
        redox_plot3(j) = redox_plot(j,3);
        eth_plot3(j) = eth_plot(j,3);
        growth_plot3(j) = growth_plot(j,3);
    end
end
energy_plot4 = 0; redox_plot4 = 0; eth_plot4 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,4) ~= 0 && redox_plot(j,4) ~= 0 && eth_plot(j,4) ~= 0
        energy_plot4(j) = energy_plot(j,4);
        redox_plot4(j) = redox_plot(j,4);
        eth_plot4(j) = eth_plot(j,4);
        growth_plot4(j) = growth_plot(j,4);
    end
end
energy_plot5 = 0; redox_plot5 = 0; eth_plot5 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,5) ~= 0 && redox_plot(j,5) ~= 0 && eth_plot(j,5) ~= 0
        energy_plot5(j) = energy_plot(j,5);
        redox_plot5(j) = redox_plot(j,5);
        eth_plot5(j) = eth_plot(j,5);
        growth_plot5(j) = growth_plot(j,5);
    end
end
energy_plot6 = 0; redox_plot6 = 0; eth_plot6 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,6) ~= 0 && redox_plot(j,6) ~= 0 && eth_plot(j,6) ~= 0
        energy_plot6(j) = energy_plot(j,6);
        redox_plot6(j) = redox_plot(j,6);
        eth_plot6(j) = eth_plot(j,6);
        growth_plot6(j) = growth_plot(j,6);
    end
end

figure
subplot(3,2,1)
scatter3(energy_plot1,redox_plot1,eth_plot1,[],eth_plot1,'filled')
colorbar
titulol1 = sprintf('a) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(1));
title(titulol1)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,2)

```

```

scatter3(energy_plot2,redox_plot2,eth_plot2,[],eth_plot2,'filled')
colorbar
titulo2 = sprintf('b) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(2));
title(titulo2)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,3)
scatter3(energy_plot3,redox_plot3,eth_plot3,[],eth_plot3,'filled')
colorbar
titulo3 = sprintf('c) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(3));
title(titulo3)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,4)
scatter3(energy_plot4,redox_plot4,eth_plot4,[],eth_plot4,'filled')
colorbar
titulo4 = sprintf('d) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(4));
title(titulo4)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,5)
scatter3(energy_plot5,redox_plot5,eth_plot5,[],eth_plot5,'filled')
colorbar
titulo5 = sprintf('e) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(5));
title(titulo5)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,6)
scatter3(energy_plot6,redox_plot6,eth_plot6,[],eth_plot6,'filled')
colorbar
titulo6 = sprintf('f) Crecimiento > %0.2e (ideal)',limites_growth(6));
title(titulo6)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)

[v_opt, r_max] = max(v_eth(:));
g_opt = Gcomb(:,r_max);
redox_orden=redox_orden';
energy_orden=energy_orden';
growth_orden=growth_orden';
eth_orden=eth_orden';

save(filetosave, 'A','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_eth', 'limites_growth', 'limites_redox',
'limites_energy', 'v_growth', 'redox','energy', 'eth_orden','g_orden','ind',
'redox_orden',
'energy_orden','growth_orden','growth_plot','eth_plot','redox_plot','energy_pl
ot')

end

```

```

%MAIN para resolver el sistema

%% Cargar matriz estequiométrica C
C = sparse(xlsread('Matriz_estequiometrica.xlsx','Hojal','A1:CO86'));

%% Definir entradas
%Definir S para glucosa
S = zeros(86,1);
S(62) = 0.23/100; %entrada de GLCx
%Definir S para manitol puro
S1 = zeros(86,1);
S1(9) = 0.23; %entrada a F6P
S1(19) = -0.23; %uso de NAD en entrada a F6P
S1(20) = 0.23; %producción de NADH en entrada a F6P
%Definir S para manitol:DEHU 0.177:0.053
S2 = zeros(86,1);
S2(9) = 0.177; %entrada a F6P
S2(19) = -0.177; %uso de NAD en entrada a F6P
S2(20) = 0.177; %producción de NADH en entrada a F6P
S2(83) = 0.053; %entrada a KDG
S2(20) = -0.053; %uso de NADH en entrada a KDG
S2(19) = 0.053; %producción de NAD en entrada a KDG
S2(17) = 0.053; %entrada a KDPG
S2(53) = -0.053; %uso de ATP en entrada a KDPG
S2(51) = 0.053; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.142:0.088
S3 = zeros(86,1);
S3(9) = 0.142; %entrada a F6P
S3(19) = -0.142; %uso de NAD en entrada a F6P
S3(20) = 0.142; %producción de NADH en entrada a F6P
S3(83) = 0.088; %entrada a KDG
S3(20) = -0.088; %uso de NADH en entrada a KDG
S3(19) = 0.088; %producción de NAD en entrada a KDG
S3(17) = 0.088; %entrada a KDPG
S3(53) = -0.088; %uso de ATP en entrada a KDPG
S3(51) = 0.088; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.088:0.142
S4 = zeros(86,1);
S4(9) = 0.088; %entrada a F6P
S4(19) = -0.088; %uso de NAD en entrada a F6P
S4(20) = 0.088; %producción de NADH en entrada a F6P
S4(83) = 0.142; %entrada a KDG
S4(20) = -0.142; %uso de NADH en entrada a KDG
S4(19) = 0.142; %producción de NAD en entrada a KDG
S4(17) = 0.142; %entrada a KDPG
S4(53) = -0.142; %uso de ATP en entrada a KDPG
S4(51) = 0.142; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.053:0.177
S5 = zeros(86,1);
S5(9) = 0.053; %entrada a F6P
S5(19) = -0.053; %uso de NAD en entrada a F6P
S5(20) = 0.053; %producción de NADH en entrada a F6P
S5(83) = 0.177; %entrada a KDG
S5(20) = -0.177; %uso de NADH en entrada a KDG
S5(19) = 0.177; %producción de NAD en entrada a KDG
S5(17) = 0.177; %entrada a KDPG
S5(53) = -0.177; %uso de ATP en entrada a KDPG

```

```

S5(51) = 0.177; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para DEHU puro
S6 = zeros(86,1);
S6(83) = 0.23; %entrada a KDG
S6(20) = -0.23; %uso de NADH en entrada a KDG
S6(19) = 0.23; %producción de NAD en entrada a KDG
S6(17) = 0.23; %entrada a KDPG
S6(53) = -0.23; %uso de ATP en entrada a KDPG
S6(51) = 0.23; %producción de ADP en entrada a KDPG

%% Definir G
%Definir G para glucosa
G = ones(93,1);
G(65:70) = 0; %apagar lactato y formiato
G(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

%Definir G para manitol:DEHU
G_MD = ones(93,1);
G_MD(65:70) = 0; %apagar lactato y formiato
G_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
G_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%% Definir Gctes
%Definir Gctes para glucosa
Gctes_GLC = ones(93,1);
%Otros no-cambios
Gctes_GLC(61) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(47) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(48) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(73) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_GLC(74) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_GLC(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_GLC(65:70) = 0; %apagar lactato y formiato
Gctes_GLC(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

%Definir Gctes para manitol:DEHU
Gctes_MD = ones(93,1);
%Otros no-cambios
Gctes_MD(73) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_MD(74) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_MD(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_MD(65:70) = 0; %apagar lactato y formiato
Gctes_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
Gctes_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%% Condiciones iniciales
y0 = zeros(86,1);
y0(1) = 0.154743; %ACCOA, mmol/L
y0(2) = 0.0321498; %ACO, mmol/L
y0(3) = 0.0143909; %ACP, mmol/L
y0(4) = 0.59787; %AKG, mmol/L
y0(5) = 0.0654106; %BPG, mmol/L

```

y0(6) = 0.0895305; %CIT, mmol/L
y0(7) = 0.437094; %DAP, mmol/L
y0(8) = 0.1313; %E4P, mmol/L
y0(9) = 0.261766; %F6P, mmol/L
y0(10) = 0.281808; %FDP, mmol/L
y0(11) = 0.213115; %FUM, mmol/L
y0(12) = 0.86113; %G6P, mmol/L
y0(13) = 0.117183; %GAP, mmol/L
y0(14) = 0.00326165; %GL6P, mmol/L
y0(15) = 0.00881041; %GLX, mmol/L
y0(16) = 0.105782; %ICIT, mmol/L
y0(17) = 0.0868177; %KDPG, mmol/L
y0(18) = 1.03215; %MAL, mmol/L
y0(19) = 1.41154; %NAD, mmol/L
y0(20) = 0.158456; %NADH, mmol/L
y0(21) = 0.167837; %NADP, mmol/L
y0(22) = 0.0891628; %NADPH, mmol/L
y0(23) = 0.12784; %OAA, mmol/L
y0(24) = 0.997038; %PEP, mmol/L
y0(25) = 0.378297; %PGA2, mmol/L
y0(26) = 0.696274; %PGA3, mmol/L
y0(27) = 0.1316; %PGN, mmol/L
y0(28) = 0.236891; %PYR, mmol/L
y0(29) = 0.326117; %Q, mmol/L
y0(30) = 0.673883; %QH2, mmol/L
y0(31) = 0.106842; %R5P, mmol/L
y0(32) = 0.341827; %RU5P, mmol/L
y0(33) = 0.141985; %S7P, mmol/L
y0(34) = 0.216055; %SUC, mmol/L
y0(35) = 0.0410878; %SUCCOA, mmol/L
y0(36) = 0.506018; %X5P, mmol/L
y0(37) = 0.000334013; %ei, mmol/L
y0(38) = 0.00638116; %eiP, mmol/L
y0(39) = 0.0142019; %eiia, mmol/L
y0(40) = 0.480569; %eiiaP, mmol/L
y0(41) = 4.7191E-05; %eiicb, mmol/L
y0(42) = 0.000342621; %eiicbP, mmol/L
y0(43) = 0.000191212; %hpr, mmol/L
y0(44) = 0.00525081; %hprP, mmol/L
y0(45) = 0.000542744; %icd, mmol/L
y0(46) = 0.0514573; %icdP, mmol/L
y0(47) = 0.00278094; %tal, mmol/L
y0(48) = 0.0572191; %talC3, mmol/L
y0(49) = 0.0138308; %tkk, mmol/L
y0(50) = 0.0561692; %tkkC2, mmol/L
y0(51) = 0.598315; %ADP, mmol/L
y0(52) = 0.186253; %AMP, mmol/L
y0(53) = 2.5722; %ATP, mmol/L
y0(54) = 0.923131; %CAMP, mmol/L
y0(55) = 9.76395; %P, mmol/L
y0(56) = 0.262683; %MgADP, mmol/L
y0(57) = 2.37121; %MgATP, mmol/L
y0(58) = 0.0413815; %MgFDP, mmol/L
y0(59) = 0.253914; %FAD, mmol/L
y0(60) = 0.746086; %FADH2, mmol/L
y0(61) = 0.000186708; %ACE, mmol/L
y0(62) = 0.00633337; %GLCx, mmol/L

```

y0(63) = 0.000186687; %ACEx, mmol/L
y0(64) = 5.37448E-05; %Hout, mmol/L
y0(65) = 0.00403337; %GLCp, mmol/L
y0(66) = 9.99943; %Pp, mmol/L
y0(67) = 0.000186697; %ACEp, mmol/L
y0(68) = 0.000186708; %FOR, mmol/L
y0(69) = 0.000186697; %FORp, mmol/L
y0(70) = 0.000186687; %FORx, mmol/L
y0(71) = 0.000186708; %LAC, mmol/L
y0(72) = 0.000186697; %LACp, mmol/L
y0(73) = 0.000186687; %LACx, mmol/L
y0(74) = 0.216055; %SUCp, mmol/L
y0(75) = 0.216055; %SUCx, mmol/L
y0(76) = 0.000186708; %ETH, mmol/L
y0(77) = 0.000186697; %ETHp, mmol/L
y0(78) = 0.000186687; %ETHx, mmol/L
y0(79) = 0.000186708; %AcAld, mmol/L
y0(80) = 0.000186708; %DEHU, mmol/L
y0(81) = 0.000186697; %DEHUp, mmol/L
y0(82) = 0.000186687; %DEHUx, mmol/L
y0(83) = 0.000186708; %KDG, mmol/L
y0(84) = 0.000186708; %MANI, mmol/L
y0(85) = 0.000186697; %MANIp, mmol/L
y0(86) = 0.000186687; %MANIx, mmol/L

```

```
%% Resolución del problema
```

```
%Un solo cambio
```

```
fileID = fopen('combil.txt','w');
```

```
generate(1,1:93,[],fileID)
```

```
fclose(fileID);
```

```
%Glucosa
```

```
[v_opt_G, g_opt_G] = Optimizador
```

```
(C,S,y0,G,Gctes_GLC,'combil.txt','1ETHglucosa.mat');
```

```
%Manitol puro
```

```
[v_opt_M, g_opt_M] = Optimizador
```

```
(C,S1,y0,G_MD,Gctes_MD,'combil.txt','1ETHmanitol.mat');
```

```
%manitol:DEHU 0.177:0.053
```

```
[v_opt_MD1, g_opt_MD1] = Optimizador
```

```
(C,S2,y0,G_MD,Gctes_MD,'combil.txt','1ETHMD1.mat');
```

```
%manitol:DEHU 0.142:0.088
```

```
[v_opt_MD2, g_opt_MD2] = Optimizador
```

```
(C,S3,y0,G_MD,Gctes_MD,'combil.txt','1ETHMD2.mat');
```

```
%manitol:DEHU 0.088:0.142
```

```
[v_opt_MD3, g_opt_MD3] = Optimizador
```

```
(C,S4,y0,G_MD,Gctes_MD,'combil.txt','1ETHMD3.mat');
```

```
%manitol:DEHU 0.053:0.177
```

```
[v_opt_MD4, g_opt_MD4] = Optimizador
```

```
(C,S5,y0,G_MD,Gctes_MD,'combil.txt','1ETHMD4.mat');
```

```
%DEHU puro
```

```
[v_opt_D, g_opt_D] = Optimizador
```

```
(C,S6,y0,G_MD,Gctes_MD,'combil.txt','1ETHDEHU.mat');
```

9.14.2. Dos mutaciones

9.14.2.1. Gráficos de las simulaciones

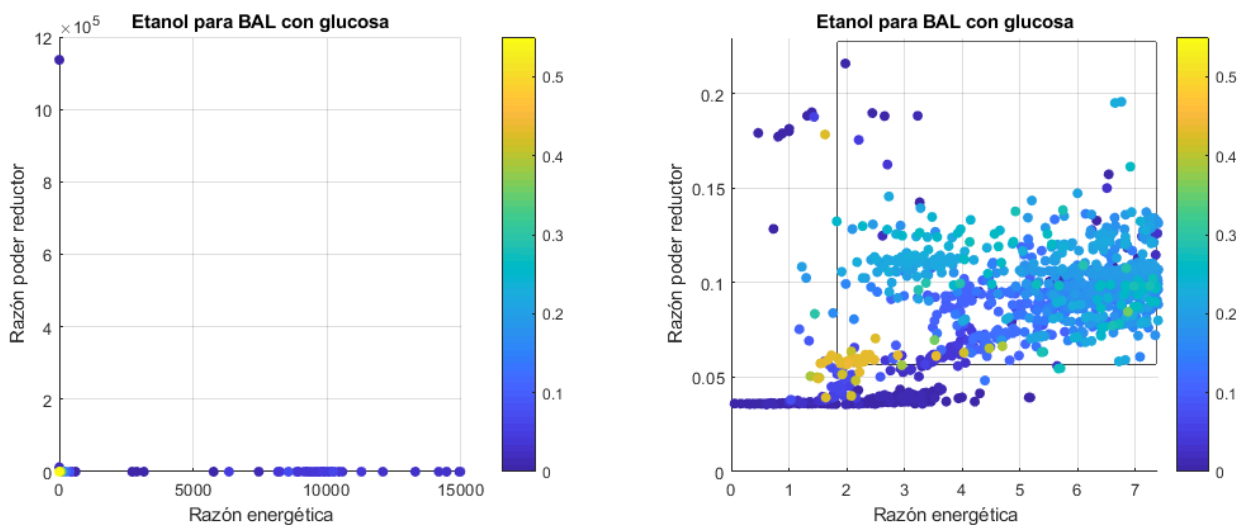


Figura 87. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

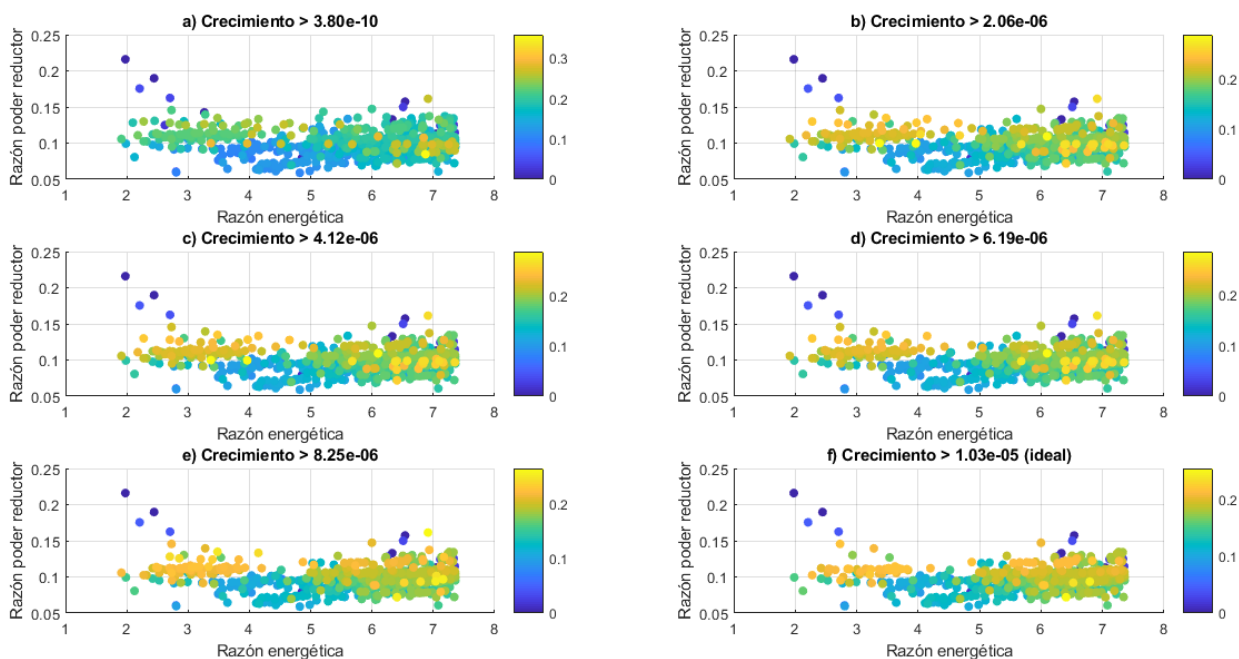


Figura 88. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

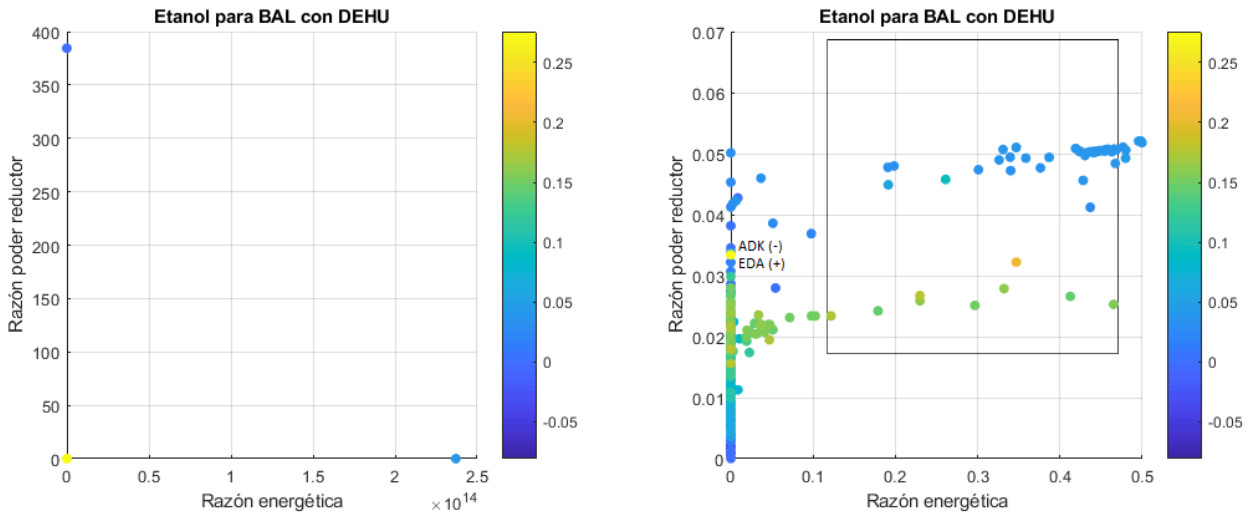


Figura 89. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con DEHU como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

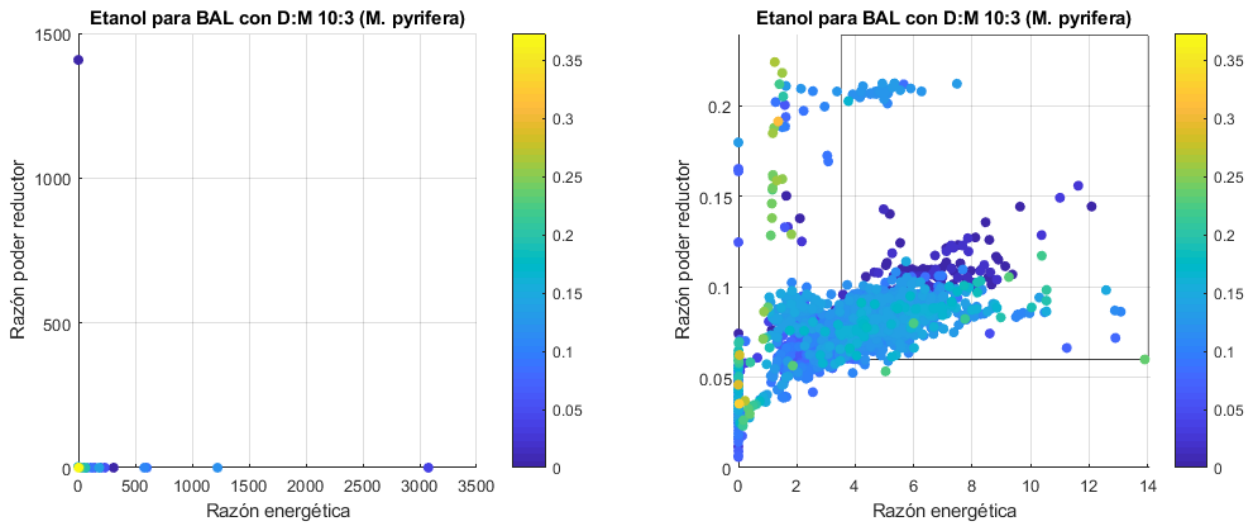


Figura 90. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con M. pyrifera como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

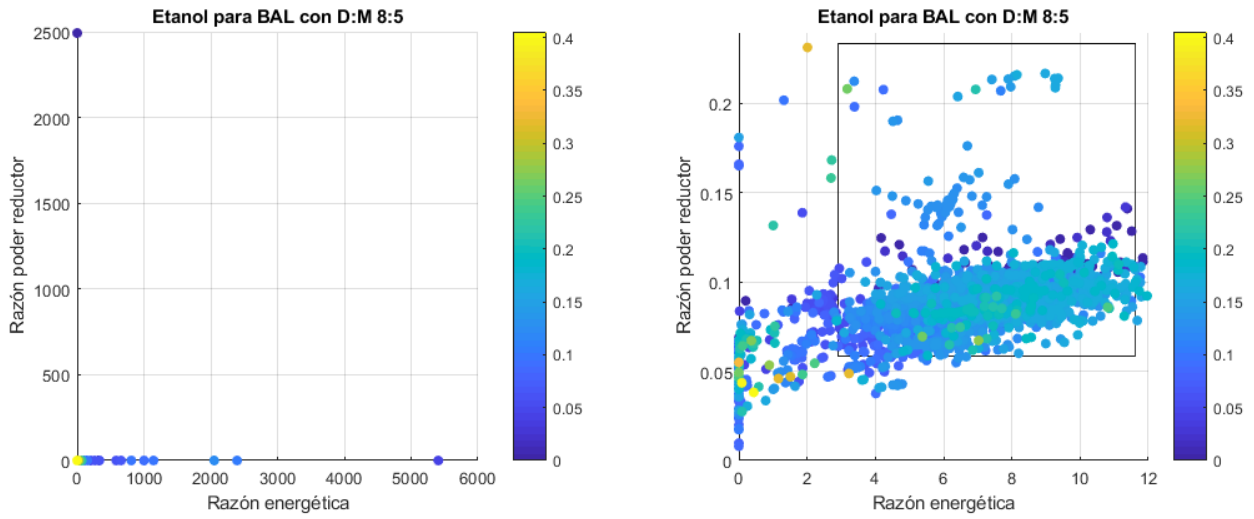


Figura 91. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con DEHU:manitol 8:5 como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

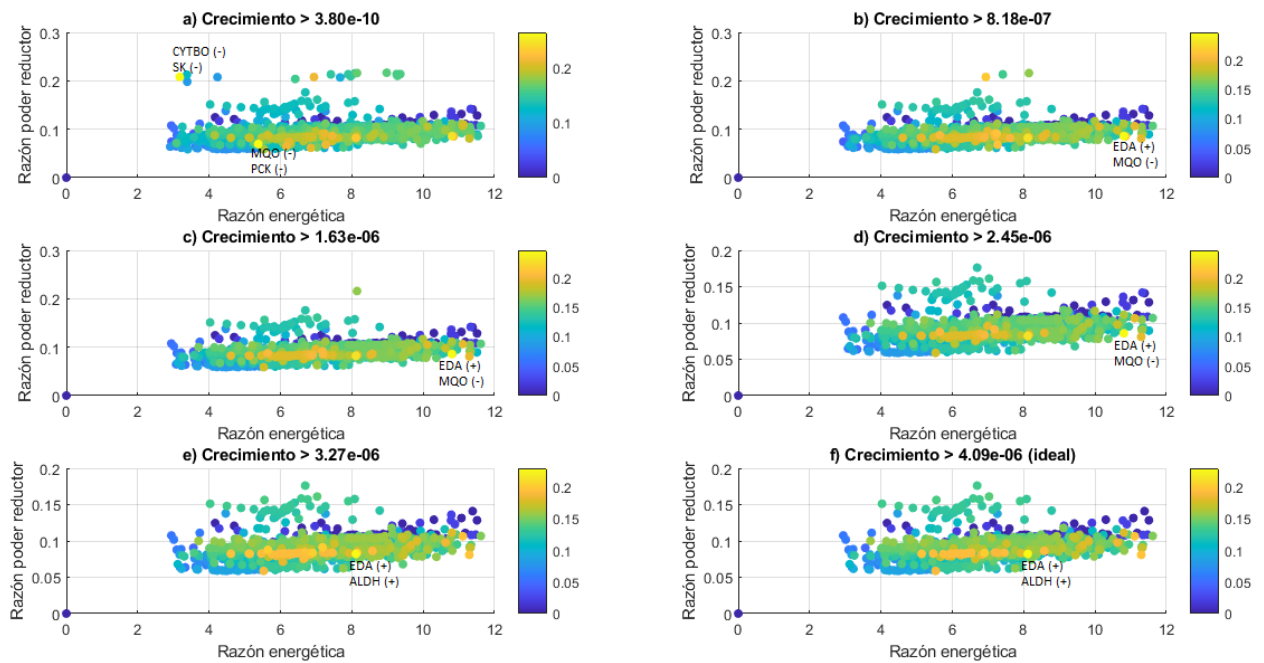


Figura 92. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para DEHU:manitol 8:5, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

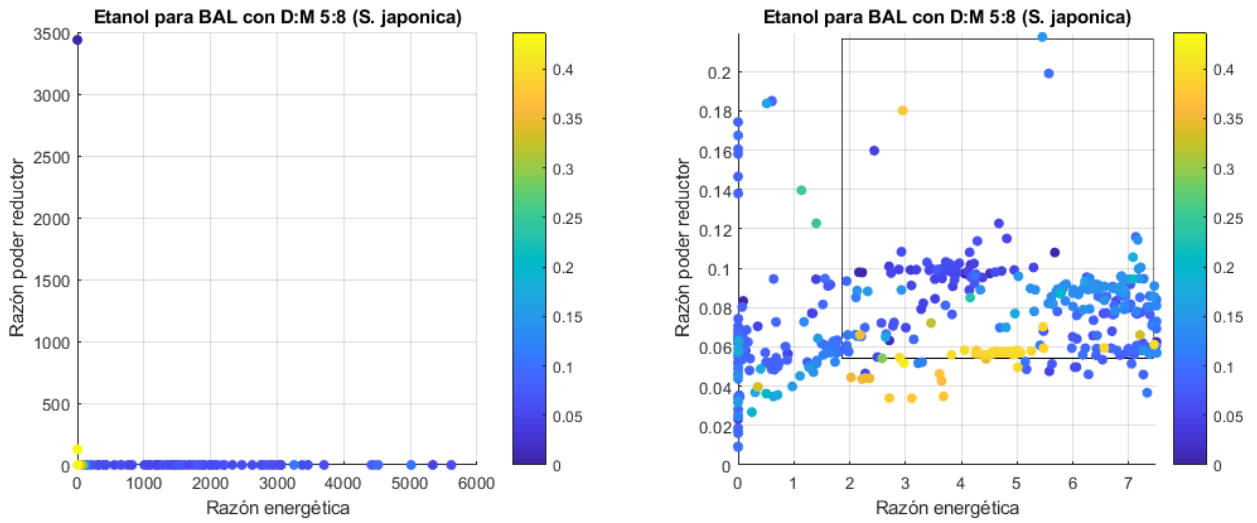


Figura 93. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con *S. japonica* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

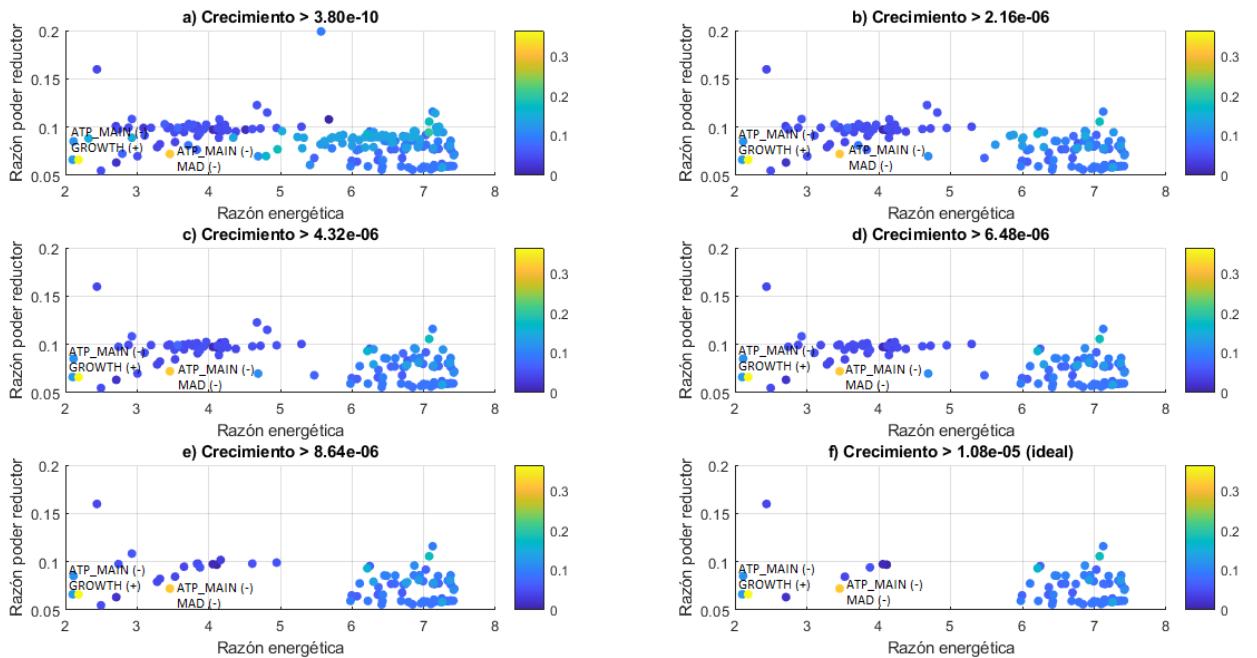


Figura 94. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para *S. japonica*, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

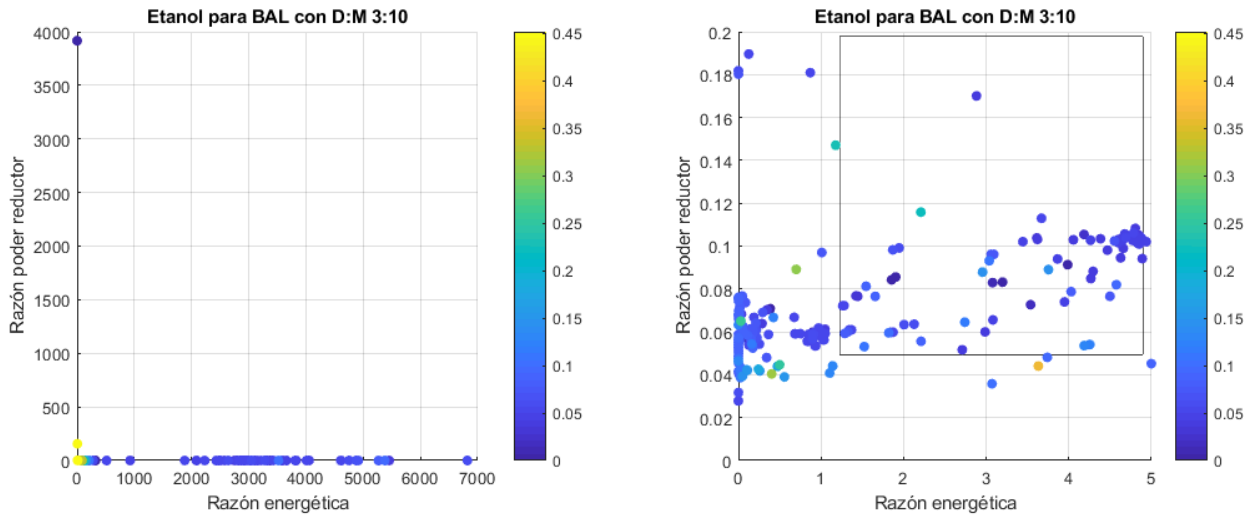


Figura 95. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con DEHU:manitol 3:10 como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

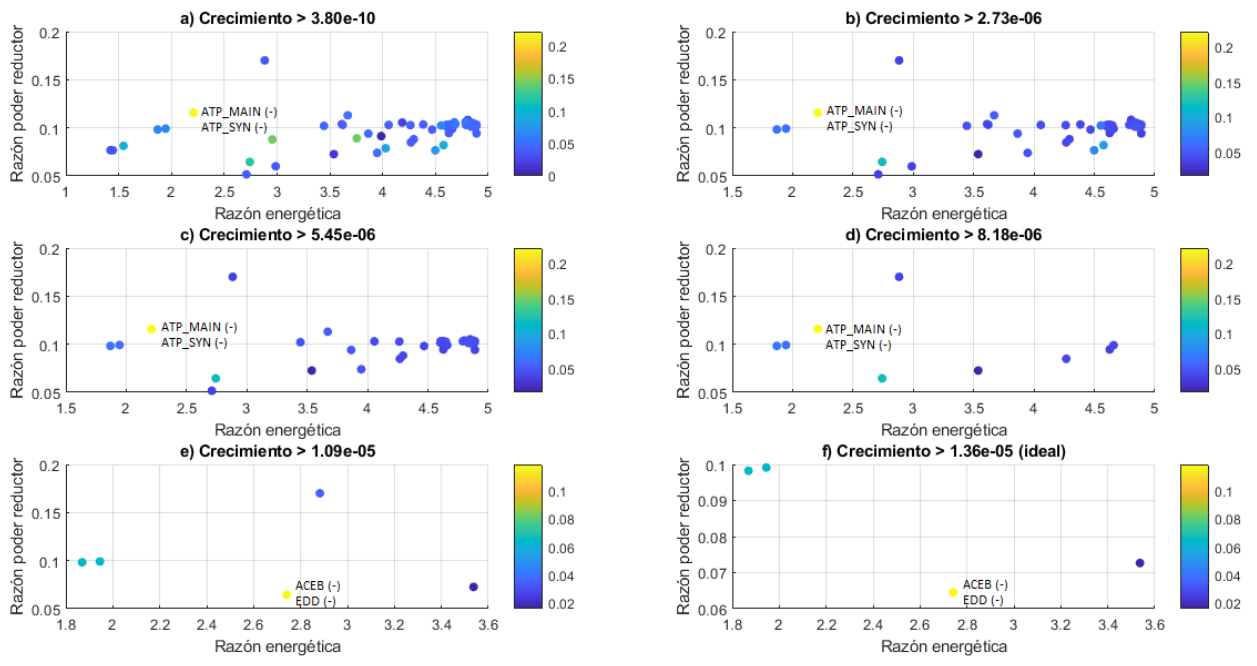


Figura 96. Gráficos de producción de etanol en la zona de factibilidad biológica para DEHU:manitol 3:10, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones.

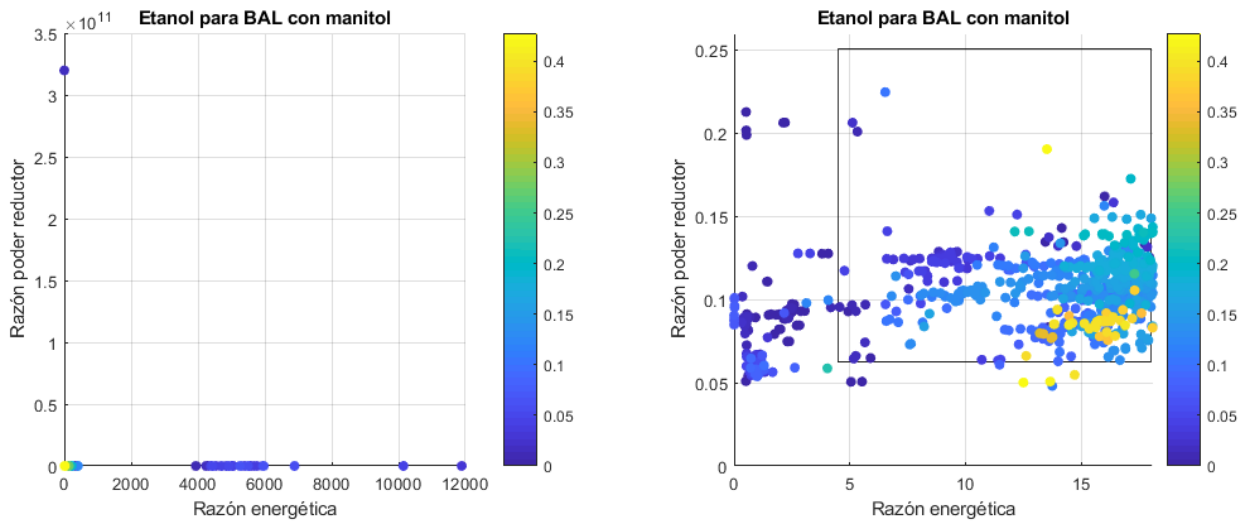


Figura 97. Gráficos que muestran la relación entre producción de etanol (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación de dos mutaciones, realizada con manitol como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

9.14.2.2. Códigos de Matlab

En este caso, hay que cambiar la función Optimizador y el *main*, por lo siguiente:

```
function [v_opt, g_opt] = Optimizador
(C,S,y0,G,Gctes,filetocombine2,filetosave)
% C: matriz estequiométrica
% S: vector de flujos de entrada (s_j>0) o salidas (s_j<0) de cada metabolito
% y0: vector de condiciones iniciales [mmol/L]
% Gctes: vector con ceros en la posición de las enzimas que no pueden ser
modificadas
% Función que entrega el flujo óptimo para cada G

%%
%Para todo G interesante, cambiar g sin cambiar los Gctes
Gi = G;
Gcomb = zeros(93,1);
y_est = zeros(86,1);
v_est = zeros(93,1);
v_eth = 0;
v_growth = 0;
redox = 0;
energy = 0;

%Dos cambios
fileID2 = fopen(filetocombine2,'r');
formatSpec = '%d %d %d %d';
sizeB = [4 Inf];
B = fscanf(fileID2,formatSpec,sizeB);
B = B';
fclose(fileID2);
b = 0;
```

```

for i = 1 : length(B)
    if Gctes(B(i,1)) ~= 0
        if Gctes(B(i,3)) ~= 0
            b = b + 1;
            Gi(B(i,1)) = B(i,2);
            Gi(B(i,3)) = B(i,4);
            Gcomb(:,b) = Gi;
            [y, v] = Integrador_estacionario (y0,S,C,Gi);
            y_est(:,b) = y';
            v_est(:,b) = v;
            v_eth(:,b) = v(74);
            v_growth(:,b) = v(28);
            redox(b) = ((y(20)+y(22))/(y(19)+y(21)));
            energy(b) = (y(53)/y(51));
            Gi = G;
        end
    end
end

[v_opt, r_max] = max(v_eth(:));
g_opt = Gcomb(:,r_max);

save(filetosave, 'B','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_eth', 'v_growth', 'redox','energy')

end

%MAIN para optimizar etanol - 2 cambios

%% Cargar matriz estequiométrica C
C = sparse(xlsread('Matriz_estequiometrica.xlsx','Hojal','A1:C086'));

%% Definir entradas
%Definir S para glucosa
S = zeros(86,1);
S(62) = 0.23/100; %entrada de GLCx
%Definir S para manitol puro
S1 = zeros(86,1);
S1(9) = 0.23; %entrada a F6P
S1(19) = -0.23; %uso de NAD en entrada a F6P
S1(20) = 0.23; %producción de NADH en entrada a F6P
%Definir S para manitol:DEHU 0.177:0.053
S2 = zeros(86,1);
S2(9) = 0.177; %entrada a F6P
S2(19) = -0.177; %uso de NAD en entrada a F6P
S2(20) = 0.177; %producción de NADH en entrada a F6P
S2(83) = 0.053; %entrada a KDG
S2(20) = -0.053; %uso de NADH en entrada a KDG
S2(19) = 0.053; %producción de NAD en entrada a KDG
S2(17) = 0.053; %entrada a KDPG
S2(53) = -0.053; %uso de ATP en entrada a KDPG
S2(51) = 0.053; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.142:0.088
S3 = zeros(86,1);
S3(9) = 0.142; %entrada a F6P

```

```

S3(19) = -0.142; %uso de NAD en entrada a F6P
S3(20) = 0.142; %producción de NADH en entrada a F6P
S3(83) = 0.088; %entrada a KDG
S3(20) = -0.088; %uso de NADH en entrada a KDG
S3(19) = 0.088; %producción de NAD en entrada a KDG
S3(17) = 0.088; %entrada a KDPG
S3(53) = -0.088; %uso de ATP en entrada a KDPG
S3(51) = 0.088; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.088:0.142
S4 = zeros(86,1);
S4(9) = 0.088; %entrada a F6P
S4(19) = -0.088; %uso de NAD en entrada a F6P
S4(20) = 0.088; %producción de NADH en entrada a F6P
S4(83) = 0.142; %entrada a KDG
S4(20) = -0.142; %uso de NADH en entrada a KDG
S4(19) = 0.142; %producción de NAD en entrada a KDG
S4(17) = 0.142; %entrada a KDPG
S4(53) = -0.142; %uso de ATP en entrada a KDPG
S4(51) = 0.142; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.053:0.177
S5 = zeros(86,1);
S5(9) = 0.053; %entrada a F6P
S5(19) = -0.053; %uso de NAD en entrada a F6P
S5(20) = 0.053; %producción de NADH en entrada a F6P
S5(83) = 0.177; %entrada a KDG
S5(20) = -0.177; %uso de NADH en entrada a KDG
S5(19) = 0.177; %producción de NAD en entrada a KDG
S5(17) = 0.177; %entrada a KDPG
S5(53) = -0.177; %uso de ATP en entrada a KDPG
S5(51) = 0.177; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para DEHU puro
S6 = zeros(86,1);
S6(83) = 0.23; %entrada a KDG
S6(20) = -0.23; %uso de NADH en entrada a KDG
S6(19) = 0.23; %producción de NAD en entrada a KDG
S6(17) = 0.23; %entrada a KDPG
S6(53) = -0.23; %uso de ATP en entrada a KDPG
S6(51) = 0.23; %producción de ADP en entrada a KDPG

%% Definir G
%Definir G para glucosa
G = ones(93,1);
G(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
G(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

%Definir G para manitol:DEHU
G_MD = ones(93,1);
G_MD(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
G_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
G_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%% Definir Gctes
%Definir Gctes para glucosa
Gctes_GLC = ones(93,1);
%Otros no-cambios

```

```

Gctes_GLC(61) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(47) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(48) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(73) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_GLC(74) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_GLC(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_GLC(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
Gctes_GLC(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

```

```
%Definir Gctes para manitol:DEHU
```

```
Gctes_MD = ones(93,1);
```

```
%Otros no-cambios
```

```

Gctes_MD(73) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_MD(74) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_MD(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_MD(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
Gctes_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
Gctes_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

```

```
%% Condiciones iniciales
```

```

y0 = zeros(86,1);
y0(1) = 0.154743; %ACCOA, mmol/L
y0(2) = 0.0321498; %ACO, mmol/L
y0(3) = 0.0143909; %ACP, mmol/L
y0(4) = 0.59787; %AKG, mmol/L
y0(5) = 0.0654106; %BPG, mmol/L
y0(6) = 0.0895305; %CIT, mmol/L
y0(7) = 0.437094; %DAP, mmol/L
y0(8) = 0.1313; %E4P, mmol/L
y0(9) = 0.261766; %F6P, mmol/L
y0(10) = 0.281808; %FDP, mmol/L
y0(11) = 0.213115; %FUM, mmol/L
y0(12) = 0.86113; %G6P, mmol/L
y0(13) = 0.117183; %GAP, mmol/L
y0(14) = 0.00326165; %GL6P, mmol/L
y0(15) = 0.00881041; %GLX, mmol/L
y0(16) = 0.105782; %ICIT, mmol/L
y0(17) = 0.0868177; %KDPG, mmol/L
y0(18) = 1.03215; %MAL, mmol/L
y0(19) = 1.41154; %NAD, mmol/L
y0(20) = 0.158456; %NADH, mmol/L
y0(21) = 0.167837; %NADP, mmol/L
y0(22) = 0.0891628; %NADPH, mmol/L
y0(23) = 0.12784; %OAA, mmol/L
y0(24) = 0.997038; %PEP, mmol/L
y0(25) = 0.378297; %PGA2, mmol/L
y0(26) = 0.696274; %PGA3, mmol/L
y0(27) = 0.1316; %PGN, mmol/L
y0(28) = 0.236891; %PYR, mmol/L
y0(29) = 0.326117; %Q, mmol/L
y0(30) = 0.673883; %QH2, mmol/L
y0(31) = 0.106842; %R5P, mmol/L
y0(32) = 0.341827; %RU5P, mmol/L
y0(33) = 0.141985; %S7P, mmol/L
y0(34) = 0.216055; %SUC, mmol/L

```



```

y0(35) = 0.0410878; %SUCCOA, mmol/L
y0(36) = 0.506018; %X5P, mmol/L
y0(37) = 0.000334013; %ei, mmol/L
y0(38) = 0.00638116; %eiP, mmol/L
y0(39) = 0.0142019; %eiia, mmol/L
y0(40) = 0.480569; %eiiaP, mmol/L
y0(41) = 4.7191E-05; %eiicb, mmol/L
y0(42) = 0.000342621; %eiicbP, mmol/L
y0(43) = 0.000191212; %hpr, mmol/L
y0(44) = 0.00525081; %hprP, mmol/L
y0(45) = 0.000542744; %icd, mmol/L
y0(46) = 0.0514573; %icdP, mmol/L
y0(47) = 0.00278094; %tal, mmol/L
y0(48) = 0.0572191; %talC3, mmol/L
y0(49) = 0.0138308; %tkt, mmol/L
y0(50) = 0.0561692; %tktC2, mmol/L
y0(51) = 0.598315; %ADP, mmol/L
y0(52) = 0.186253; %AMP, mmol/L
y0(53) = 2.5722; %ATP, mmol/L
y0(54) = 0.923131; %CAMP, mmol/L
y0(55) = 9.76395; %P, mmol/L
y0(56) = 0.262683; %MgADP, mmol/L
y0(57) = 2.37121; %MgATP, mmol/L
y0(58) = 0.0413815; %MgFDP, mmol/L
y0(59) = 0.253914; %FAD, mmol/L
y0(60) = 0.746086; %FADH2, mmol/L
y0(61) = 0.000186708; %ACE, mmol/L
y0(62) = 0.00633337; %GLCx, mmol/L
y0(63) = 0.000186687; %ACEx, mmol/L
y0(64) = 5.37448E-05; %Hout, mmol/L
y0(65) = 0.00403337; %GLCp, mmol/L
y0(66) = 9.99943; %Pp, mmol/L
y0(67) = 0.000186697; %ACEp, mmol/L
y0(68) = 0.000186708; %FOR, mmol/L
y0(69) = 0.000186697; %FORp, mmol/L
y0(70) = 0.000186687; %FORx, mmol/L
y0(71) = 0.000186708; %LAC, mmol/L
y0(72) = 0.000186697; %LACp, mmol/L
y0(73) = 0.000186687; %LACx, mmol/L
y0(74) = 0.216055; %SUCp, mmol/L
y0(75) = 0.216055; %SUCx, mmol/L
y0(76) = 0.000186708; %ETH, mmol/L
y0(77) = 0.000186697; %ETHp, mmol/L
y0(78) = 0.000186687; %ETHx, mmol/L
y0(79) = 0.000186708; %AcAld, mmol/L
y0(80) = 0.000186708; %DEHU, mmol/L
y0(81) = 0.000186697; %DEHUp, mmol/L
y0(82) = 0.000186687; %DEHUx, mmol/L
y0(83) = 0.000186708; %KDG, mmol/L
y0(84) = 0.000186708; %MANI, mmol/L
y0(85) = 0.000186697; %MANIp, mmol/L
y0(86) = 0.000186687; %MANIx, mmol/L

```

```

%% Resolución del problema
%Dos cambios
fileID2 = fopen('combi2.txt','w');
generate(2,1:93,[],fileID2)

```

```

fclose(fileID2);

%Glucosa
[v_opt_G, g_opt_G] = Optimizador
(C,S,y0,G,Gctes_GLC, 'combi2.txt', 'ETHglucosa.mat');
% %Manitol puro
[v_opt_M, g_opt_M] = Optimizador
(C,S1,y0,G_MD,Gctes_MD, 'combi2.txt', 'ETHmanitol.mat');
% %manitol:DEHU 0.177:0.053
[v_opt_MD1, g_opt_MD1] = Optimizador
(C,S2,y0,G_MD,Gctes_MD, 'combi2.txt', 'ETHMD1.mat');
% %manitol:DEHU 0.142:0.088
[v_opt_MD2, g_opt_MD2] = Optimizador
(C,S3,y0,G_MD,Gctes_MD, 'combi2.txt', 'ETHMD2.mat');
% %manitol:DEHU 0.088:0.142
[v_opt_MD3, g_opt_MD3] = Optimizador
(C,S4,y0,G_MD,Gctes_MD, 'combi2.txt', 'ETHMD3.mat');
% %manitol:DEHU 0.053:0.177
[v_opt_MD4, g_opt_MD4] = Optimizador
(C,S5,y0,G_MD,Gctes_MD, 'combi2.txt', 'ETHMD4.mat');
% %DEHU puro
[v_opt_D, g_opt_D] = Optimizador
(C,S6,y0,G_MD,Gctes_MD, 'combi2.txt', 'ETHDEHU.mat');

```

Además, para generar los gráficos se agregó la función Graficar, a la cual se le ingresan como parámetros los datos guardados en el *main*, para cada simulación, y el nombre del nuevo archivo donde se quieren guardar las demás matrices generadas:

```

function Graficar (file,filetosave)

load(file)

%ordenando vectores
[eth_orden, ind] = sort(v_eth, 'descend');
g_orden = Gcomb(:,ind);
redox_orden = redox(ind);
energy_orden = energy(ind);
growth_orden = v_growth(ind);

previos_growth = [1.0311E-5 1.4729E-5 1.3636E-5 1.0798E-5 4.086E-6 1.1887E-6
5.9954E-23];
previos_redox = [0.113702347 0.125328145 0.098880038 0.108329032 0.116695738
0.119356309 0.03434003];
previos_energy= [3.679517054 9.016425133 2.4479494 3.716678724 5.811656167
7.007174994 0.235110938];

%definir los límites
if S(62) == 0.23/100
    if previos_growth(1) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(1),6);
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(1);

```

```

    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(1);
elseif S(9) == 0.23
    if previos_growth(2) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(2),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(2);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(2);
elseif S(9) == 0.177
    if previos_growth(3) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(3),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(3);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(3);
elseif S(9) == 0.142
    if previos_growth(4) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(4),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(4);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(4);
elseif S(9) == 0.088
    if previos_growth(5) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(5),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(5);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(5);
elseif S(9) == 0.053
    if previos_growth(6) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(6),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(6);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(6);
elseif S(83) == 0.23
    if previos_growth(7) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(7),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(7);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(7);
end

figure
subplot(1,2,1)
scatter3(energy_orden,redox_orden,eth_orden,[],eth_orden,'filled')
colorbar
if S(62) == 0.23/100
    title('Etanol para BAL con glucosa')

```

```

elseif S(9) == 0.23
    title('Etanol para BAL con manitol')
elseif S(9) == 0.177
    title('Etanol para BAL con D:M 3:10')
elseif S(9) == 0.142
    title('Etanol para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
elseif S(9) == 0.088
    title('Etanol para BAL con D:M 8:5')
elseif S(9) == 0.053
    title('Etanol para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
elseif S(83) == 0.23
    title('Etanol para BAL con DEHU')
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(1,2,2)
scatter3(energy_orden,redox_orden,eth_orden,[],eth_orden,'filled')
colorbar
view(0,90)
if S(62) == 0.23/100
    title('Etanol para BAL con glucosa')
    axis([0 7.4 0 0.23])
elseif S(9) == 0.23
    title('Etanol para BAL con manitol')
    axis([0 18.1 0 0.26])
elseif S(9) == 0.177
    title('Etanol para BAL con D:M 3:10')
    axis([0 5 0 0.2])
elseif S(9) == 0.142
    title('Etanol para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
    axis([0 7.5 0 0.22])
elseif S(9) == 0.088
    title('Etanol para BAL con D:M 8:5')
    axis([0 12 0 0.24])
elseif S(9) == 0.053
    title('Etanol para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
    axis([0 14.1 0 0.24])
elseif S(83) == 0.23
    title('Etanol para BAL con DEHU')
    axis([0 0.5 0 0.07])
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
hold on
rectangle('Position',[limites_energy(1) limites_redox(1) (limites_energy(2)-
limites_energy(1)) (limites_redox(2)-limites_redox(1))])
hold off

if limites_growth == 0
    [v_opt, r_max] = max(v_eth(:));
    g_opt = Gcomb(:,r_max);
    redox_orden=redox_orden';
    energy_orden=energy_orden';
    growth_orden=growth_orden';
    eth_orden=eth_orden';

```

```

        save(filetosave, 'B','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
        'v_opt', 'g_opt', 'v_eth', 'limites_growth', 'limites_redox',
        'limites_energy', 'v_growth', 'redox', 'energy', 'eth_orden', 'g_orden', 'ind',
        'redox_orden', 'energy_orden', 'growth_orden')
        return
end

```

```

energy_plot = 0;
redox_plot = 0;
eth_plot = 0;
growth_plot = 0;
g_plot_i = 0;
g_plot = 0;
d = 0;
for i = 1 : length(limites_growth)
    for j = 1 : length(eth_orden)
        if growth_orden(j) ~= 0
            if growth_orden(j) >= limites_growth(i)
                if redox_orden(j) >= limites_redox(1)
                    %if redox_orden(j) ~= 0
                        if redox_orden(j) <= limites_redox(2)
                            if energy_orden(j) >= limites_energy(1)
                                %if energy_orden(j) ~= 0
                                    if energy_orden(j) <= limites_energy(2)
                                        d = d + 1;
                                        growth_plot(d,i) = growth_orden(j);
                                        energy_plot(d,i) = energy_orden(j);
                                        redox_plot(d,i) = redox_orden(j);
                                        eth_plot(d,i) = eth_orden(j);
                                        %g_plot_i(:,d) = g_orden(:,j);
                                    end
                                %end
                            end
                        end
                    end
                end
            end
        end
    end
end
d = 0;
%g_plot(:, :, i) = g_plot_i(:, :);
end

```

```

energy_plot1 = 0; redox_plot1 = 0; eth_plot1 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,1) ~= 0 && redox_plot(j,1) ~= 0 && eth_plot(j,1) ~= 0
        energy_plot1(j) = energy_plot(j,1);
        redox_plot1(j) = redox_plot(j,1);
        eth_plot1(j) = eth_plot(j,1);
        growth_plot1(j) = growth_plot(j,1);
    end
end
energy_plot2 = 0; redox_plot2 = 0; eth_plot2 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,2) ~= 0 && redox_plot(j,2) ~= 0 && eth_plot(j,2) ~= 0
        energy_plot2(j) = energy_plot(j,2);
    end
end

```

```

        redox_plot2(j) = redox_plot(j,2);
        eth_plot2(j) = eth_plot(j,2);
        growth_plot2(j) = growth_plot(j,2);
    end
end
energy_plot3 = 0; redox_plot3 = 0; eth_plot3 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,3) ~= 0 && redox_plot(j,3) ~= 0 && eth_plot(j,3) ~= 0
        energy_plot3(j) = energy_plot(j,3);
        redox_plot3(j) = redox_plot(j,3);
        eth_plot3(j) = eth_plot(j,3);
        growth_plot3(j) = growth_plot(j,3);
    end
end
energy_plot4 = 0; redox_plot4 = 0; eth_plot4 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,4) ~= 0 && redox_plot(j,4) ~= 0 && eth_plot(j,4) ~= 0
        energy_plot4(j) = energy_plot(j,4);
        redox_plot4(j) = redox_plot(j,4);
        eth_plot4(j) = eth_plot(j,4);
        growth_plot4(j) = growth_plot(j,4);
    end
end
energy_plot5 = 0; redox_plot5 = 0; eth_plot5 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,5) ~= 0 && redox_plot(j,5) ~= 0 && eth_plot(j,5) ~= 0
        energy_plot5(j) = energy_plot(j,5);
        redox_plot5(j) = redox_plot(j,5);
        eth_plot5(j) = eth_plot(j,5);
        growth_plot5(j) = growth_plot(j,5);
    end
end
energy_plot6 = 0; redox_plot6 = 0; eth_plot6 = 0;
for j = 1 : length(eth_plot)
    if energy_plot(j,6) ~= 0 && redox_plot(j,6) ~= 0 && eth_plot(j,6) ~= 0
        energy_plot6(j) = energy_plot(j,6);
        redox_plot6(j) = redox_plot(j,6);
        eth_plot6(j) = eth_plot(j,6);
        growth_plot6(j) = growth_plot(j,6);
    end
end

figure
subplot(3,2,1)
scatter3(energy_plot1,redox_plot1,eth_plot1,[],eth_plot1,'filled')
colorbar
titulo1 = sprintf('a) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(1));
title(titulo1)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,2)
scatter3(energy_plot2,redox_plot2,eth_plot2,[],eth_plot2,'filled')
colorbar
titulo2 = sprintf('b) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(2));
title(titulo2)
xlabel('Razón energética')

```

```

ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,3)
scatter3(energy_plot3,redox_plot3,eth_plot3,[],eth_plot3,'filled')
colorbar
titulo3 = sprintf('c) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(3));
title(titulo3)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,4)
scatter3(energy_plot4,redox_plot4,eth_plot4,[],eth_plot4,'filled')
colorbar
titulo4 = sprintf('d) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(4));
title(titulo4)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,5)
scatter3(energy_plot5,redox_plot5,eth_plot5,[],eth_plot5,'filled')
colorbar
titulo5 = sprintf('e) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(5));
title(titulo5)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,6)
scatter3(energy_plot6,redox_plot6,eth_plot6,[],eth_plot6,'filled')
colorbar
titulo6 = sprintf('f) Crecimiento > %0.2e (ideal)',limites_growth(6));
title(titulo6)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)

[v_opt, r_max] = max(v_eth(:));
g_opt = Gcomb(:,r_max);

redox_orden=redox_orden';
energy_orden=energy_orden';
growth_orden=growth_orden';
eth_orden=eth_orden';

save(filetosave, 'eth_orden','g_orden','ind', 'redox_orden',
'energy_orden','growth_orden','growth_plot','eth_plot','redox_plot','energy_pl
ot')

end

```

9.14.3. Tres o más mutaciones

Empleando los mismos programas anteriores, el código del *main* de Matlab utilizado para estas simulaciones es el siguiente:

```

%MAIN

%% Cargar matriz estequiométrica C
C = sparse(xlsread('Matriz_estequiometrica.xlsx','Hoja1','A1:CO86'));

%% Definir entradas
%Definir S para m pyriferá
S = zeros(86,1);
S(9) = 0.053; %entrada a F6P
S(19) = -0.053; %uso de NAD en entrada a F6P
S(20) = 0.053; %producción de NADH en entrada a F6P
S(83) = 0.177; %entrada a KDG
S(20) = -0.177; %uso de NADH en entrada a KDG
S(19) = 0.177; %producción de NAD en entrada a KDG
S(17) = 0.177; %entrada a KDPG
S(53) = -0.177; %uso de ATP en entrada a KDPG
S(51) = 0.177; %producción de ADP en entrada a KDPG

%% Definir los G
%Definir G para manitol:DEHU
G = ones(93,1);
G(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
G(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
G(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
G(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
G(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%G1: EDA + ALDH - CYTBO
G1 = G;
G1(15) = 2;
G1(71) = 2;
G1(13) = 0;

%G2: EDA + ALDH - MQO
G2 = G;
G2(15) = 2;
G2(71) = 2;
G2(33) = 0;

%G3: EDA + ALDH - CYTBO - MQO
G3 = G;
G3(15) = 2;
G3(71) = 2;
G3(13) = 0;
G3(33) = 0;

%% Condiciones iniciales
y0 = zeros(86,1);
y0(1) = 0.154743; %ACCOA, mmol/L
y0(2) = 0.0321498; %ACO, mmol/L
y0(3) = 0.0143909; %ACP, mmol/L
y0(4) = 0.59787; %AKG, mmol/L
y0(5) = 0.0654106; %BPG, mmol/L
y0(6) = 0.0895305; %CIT, mmol/L
y0(7) = 0.437094; %DAP, mmol/L
y0(8) = 0.1313; %E4P, mmol/L

```


y0(9) = 0.261766; %F6P, mmol/L
y0(10) = 0.281808; %FDP, mmol/L
y0(11) = 0.213115; %FUM, mmol/L
y0(12) = 0.86113; %G6P, mmol/L
y0(13) = 0.117183; %GAP, mmol/L
y0(14) = 0.00326165; %GL6P, mmol/L
y0(15) = 0.00881041; %GLX, mmol/L
y0(16) = 0.105782; %ICIT, mmol/L
y0(17) = 0.0868177; %KDPG, mmol/L
y0(18) = 1.03215; %MAL, mmol/L
y0(19) = 1.41154; %NAD, mmol/L
y0(20) = 0.158456; %NADH, mmol/L
y0(21) = 0.167837; %NADP, mmol/L
y0(22) = 0.0891628; %NADPH, mmol/L
y0(23) = 0.12784; %OAA, mmol/L
y0(24) = 0.997038; %PEP, mmol/L
y0(25) = 0.378297; %PGA2, mmol/L
y0(26) = 0.696274; %PGA3, mmol/L
y0(27) = 0.1316; %PGN, mmol/L
y0(28) = 0.236891; %PYR, mmol/L
y0(29) = 0.326117; %Q, mmol/L
y0(30) = 0.673883; %QH2, mmol/L
y0(31) = 0.106842; %R5P, mmol/L
y0(32) = 0.341827; %RU5P, mmol/L
y0(33) = 0.141985; %S7P, mmol/L
y0(34) = 0.216055; %SUC, mmol/L
y0(35) = 0.0410878; %SUCCOA, mmol/L
y0(36) = 0.506018; %X5P, mmol/L
y0(37) = 0.000334013; %ei, mmol/L
y0(38) = 0.00638116; %eiP, mmol/L
y0(39) = 0.0142019; %eiia, mmol/L
y0(40) = 0.480569; %eiiaP, mmol/L
y0(41) = 4.7191E-05; %eiicb, mmol/L
y0(42) = 0.000342621; %eiicbP, mmol/L
y0(43) = 0.000191212; %hpr, mmol/L
y0(44) = 0.00525081; %hprP, mmol/L
y0(45) = 0.000542744; %icd, mmol/L
y0(46) = 0.0514573; %icdP, mmol/L
y0(47) = 0.00278094; %tal, mmol/L
y0(48) = 0.0572191; %talC3, mmol/L
y0(49) = 0.0138308; %tkt, mmol/L
y0(50) = 0.0561692; %tktC2, mmol/L
y0(51) = 0.598315; %ADP, mmol/L
y0(52) = 0.186253; %AMP, mmol/L
y0(53) = 2.5722; %ATP, mmol/L
y0(54) = 0.923131; %CAMP, mmol/L
y0(55) = 9.76395; %P, mmol/L
y0(56) = 0.262683; %MgADP, mmol/L
y0(57) = 2.37121; %MgATP, mmol/L
y0(58) = 0.0413815; %MgFDP, mmol/L
y0(59) = 0.253914; %FAD, mmol/L
y0(60) = 0.746086; %FADH2, mmol/L
y0(61) = 0.000186708; %ACE, mmol/L
y0(62) = 0.00633337; %GLCx, mmol/L
y0(63) = 0.000186687; %ACEx, mmol/L
y0(64) = 5.37448E-05; %Hout, mmol/L
y0(65) = 0.00403337; %GLCp, mmol/L

```

y0(66) = 9.99943; %Pp, mmol/L
y0(67) = 0.000186697; %ACEp, mmol/L
y0(68) = 0.000186708; %FOR, mmol/L
y0(69) = 0.000186697; %FORp, mmol/L
y0(70) = 0.000186687; %FORx, mmol/L
y0(71) = 0.000186708; %LAC, mmol/L
y0(72) = 0.000186697; %LACp, mmol/L
y0(73) = 0.000186687; %LACx, mmol/L
y0(74) = 0.216055; %SUCp, mmol/L
y0(75) = 0.216055; %SUCx, mmol/L
y0(76) = 0.000186708; %ETH, mmol/L
y0(77) = 0.000186697; %ETHp, mmol/L
y0(78) = 0.000186687; %ETHx, mmol/L
y0(79) = 0.000186708; %AcAld, mmol/L
y0(80) = 0.000186708; %DEHU, mmol/L
y0(81) = 0.000186697; %DEHUp, mmol/L
y0(82) = 0.000186687; %DEHUX, mmol/L
y0(83) = 0.000186708; %KDG, mmol/L
y0(84) = 0.000186708; %MANI, mmol/L
y0(85) = 0.000186697; %MANIp, mmol/L
y0(86) = 0.000186687; %MANIx, mmol/L

```

```
%% Resolución del problema
```

```
[y_est1, v_est1] = Integrador_estacionario (y0,S,C,G1);
```

```
[y_est2, v_est2] = Integrador_estacionario (y0,S,C,G2);
```

```
[y_est3, v_est3] = Integrador_estacionario (y0,S,C,G3);
```

```

redox1 = (y_est1(20)+y_est1(22))/(y_est1(19)+y_est1(21));
redox2 = (y_est2(20)+y_est2(22))/(y_est2(19)+y_est2(21));
redox3 = (y_est3(20)+y_est3(22))/(y_est3(19)+y_est3(21));

```

```

energy1 = y_est1(53)/y_est1(51);
energy2 = y_est2(53)/y_est2(51);
energy3 = y_est3(53)/y_est3(51);

```

9.15. Anexo O: Simulaciones de la optimización de la producción de ácido láctico y ácido succínico

Debido a la gran cantidad de datos generados en estas simulaciones, se decidió no incluir las tablas con los distintos valores numéricos obtenidos. No obstante, se presenta a continuación los códigos de Matlab utilizados para las simulaciones, en caso de querer ser reproducidas.

9.15.1. Ácido láctico

9.15.1.1. Una mutación

El código de Matlab es casi el mismo que se utilizó en el caso de etanol para un cambio (Anexo N), modificando la función Optimizador y el *main*, por lo siguiente:

```

function [v_opt, g_opt] = Optimizador
(C,S,y0,G,Gctes,filetocombinel,filetosave)
% C: matriz estequiométrica
% S: vector de flujos de entrada (s_j>0) o salidas (s_j<0) de cada metabolito
% y0: vector de condiciones iniciales [mmol/L]
% Gctes: vector con ceros en la posición de las enzimas que no pueden ser
modificadas
% Función que entrega el flujo óptimo para cada G

%%
%Para todo G interesante, cambiar g sin cambiar los Gctes
Gi = G;
Gcomb = zeros(93,1);
y_est = zeros(86,1);
v_est = zeros(93,1);
v_lac = 0;
v_growth = 0;
redox = 0;
energy = 0;

%Un sólo cambio
fileID = fopen(filetocombinel,'r');
formatSpec = '%d %d';
sizeA = [2 Inf];
A = fscanf(fileID,formatSpec,sizeA);
A = A';
fclose(fileID);
a = 0;
for i = 1 : length(A)
    if Gctes(A(i,1)) ~= 0
        a = a + 1;
        Gi(A(i,1)) = A(i,2);
        Gcomb(:,a) = Gi;
        [y, v] = Integrador_estacionario (y0,S,C,Gi);
        y_est(:,a) = y';
        v_est(:,a) = v;
        v_lac(a) = v(67);
        v_growth(a) = v(28);
        redox(a) = ((y(20)+y(22))/(y(19)+y(21)));
        energy(a) = (y(53)/y(51));
        Gi = G;
    end
end
%ordenando vectores
[lac_orden, ind] = sort(v_lac, 'descend');
g_orden = Gcomb(:,ind);
redox_orden = redox(ind);
energy_orden = energy(ind);
growth_orden = v_growth(ind);

previos_growth = [1.0311E-5 1.4729E-5 1.3636E-5 1.0798E-5 4.086E-6 1.1887E-6
5.9954E-23];
previos_redox = [0.113702347 0.125328145 0.098880038 0.108329032 0.116695738
0.119356309 0.03434003];
previos_energy= [3.679517054 9.016425133 2.4479494 3.716678724 5.811656167
7.007174994 0.235110938];

```

```

%definir los límites
if S(62) == 0.23/100
    if previos_growth(1) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(1),6);
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(1);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(1);
elseif S(9) == 0.23
    if previos_growth(2) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(2),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(2);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(2);
elseif S(9) == 0.177
    if previos_growth(3) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(3),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(3);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(3);
elseif S(9) == 0.142
    if previos_growth(4) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(4),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(4);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(4);
elseif S(9) == 0.088
    if previos_growth(5) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(5),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(5);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(5);
elseif S(9) == 0.053
    if previos_growth(6) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(6),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(6);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(6);
elseif S(83) == 0.23
    if previos_growth(7) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(7),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(7);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(7);
end

```

```

figure
subplot(1,2,1)
scatter3(energy_orden,redox_orden,lac_orden,[],lac_orden,'filled')
colorbar
if S(62) == 0.23/100
    title('Ác. láctico para BAL con glucosa')
elseif S(9) == 0.23
    title('Ác. láctico para BAL con manitol')
elseif S(9) == 0.177
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 3:10')
elseif S(9) == 0.142
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
elseif S(9) == 0.088
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 8:5')
elseif S(9) == 0.053
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
elseif S(83) == 0.23
    title('Ác. láctico para BAL con DEHU')
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(1,2,2)
scatter3(energy_orden,redox_orden,lac_orden,[],lac_orden,'filled')
colorbar
view(0,90)
axis([0 14.1 0 0.24])
if S(62) == 0.23/100
    title('Ác. láctico para BAL con glucosa')
    axis([0 7.4 0 0.23])
elseif S(9) == 0.23
    title('Ác. láctico para BAL con manitol')
    axis([0 18.1 0 0.26])
elseif S(9) == 0.177
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 3:10')
    axis([0 5 0 0.2])
elseif S(9) == 0.142
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
    axis([0 7.5 0 0.22])
elseif S(9) == 0.088
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 8:5')
    axis([0 12 0 0.24])
elseif S(9) == 0.053
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
    axis([0 14.1 0 0.24])
elseif S(83) == 0.23
    title('Ác. láctico para BAL con DEHU')
    axis([0 0.5 0 0.07])
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
hold on
rectangle('Position',[limites_energy(1) limites_redox(1) (limites_energy(2)-
limites_energy(1)) (limites_redox(2)-limites_redox(1))])
hold off

```

```

if limites_growth == 0
    [v_opt, r_max] = max(v_lac(:));
    g_opt = Gcomb(:,r_max);
    redox_orden=redox_orden';
    energy_orden=energy_orden';
    growth_orden=growth_orden';
    lac_orden=lac_orden';
    save(filetosave, 'A','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_lac', 'limites_growth', 'limites_redox',
'limites_energy', 'v_growth', 'redox','energy', 'lac_orden','g_orden','ind',
'redox_orden', 'energy_orden','growth_orden')
    return
end

```

```

energy_plot = 0;
redox_plot = 0;
lac_plot = 0;
growth_plot = 0;
g_plot_i = 0;
g_plot = 0;
d = 0;
for i = 1 : length(limites_growth)
    for j = 1 : length(lac_orden)
        if growth_orden(j) ~= 0
            if growth_orden(j) >= limites_growth(i)
                if redox_orden(j) >= limites_redox(1)
                    %if redox_orden(j) ~= 0
                        if redox_orden(j) <= limites_redox(2)
                            if energy_orden(j) >= limites_energy(1)
                                %if energy_orden(j) ~= 0
                                    if energy_orden(j) <= limites_energy(2)
                                        d = d + 1;
                                        growth_plot(d,i) = growth_orden(j);
                                        energy_plot(d,i) = energy_orden(j);
                                        redox_plot(d,i) = redox_orden(j);
                                        lac_plot(d,i) = lac_orden(j);
                                    end
                                end
                            end
                        end
                    end
                end
            end
        end
    end
end
d = 0;
end

```

```

energy_plot1 = 0; redox_plot1 = 0; lac_plot1 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,1) ~= 0 && redox_plot(j,1) ~= 0 && lac_plot(j,1) ~= 0
        energy_plot1(j) = energy_plot(j,1);
        redox_plot1(j) = redox_plot(j,1);
        lac_plot1(j) = lac_plot(j,1);
        growth_plot1(j) = growth_plot(j,1);
    end
end

```

```

end
energy_plot2 = 0; redox_plot2 = 0; lac_plot2 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,2) ~= 0 && redox_plot(j,2) ~= 0 && lac_plot(j,2) ~= 0
        energy_plot2(j) = energy_plot(j,2);
        redox_plot2(j) = redox_plot(j,2);
        lac_plot2(j) = lac_plot(j,2);
        growth_plot2(j) = growth_plot(j,2);
    end
end
energy_plot3 = 0; redox_plot3 = 0; lac_plot3 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,3) ~= 0 && redox_plot(j,3) ~= 0 && lac_plot(j,3) ~= 0
        energy_plot3(j) = energy_plot(j,3);
        redox_plot3(j) = redox_plot(j,3);
        lac_plot3(j) = lac_plot(j,3);
        growth_plot3(j) = growth_plot(j,3);
    end
end
energy_plot4 = 0; redox_plot4 = 0; lac_plot4 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,4) ~= 0 && redox_plot(j,4) ~= 0 && lac_plot(j,4) ~= 0
        energy_plot4(j) = energy_plot(j,4);
        redox_plot4(j) = redox_plot(j,4);
        lac_plot4(j) = lac_plot(j,4);
        growth_plot4(j) = growth_plot(j,4);
    end
end
energy_plot5 = 0; redox_plot5 = 0; lac_plot5 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,5) ~= 0 && redox_plot(j,5) ~= 0 && lac_plot(j,5) ~= 0
        energy_plot5(j) = energy_plot(j,5);
        redox_plot5(j) = redox_plot(j,5);
        lac_plot5(j) = lac_plot(j,5);
        growth_plot5(j) = growth_plot(j,5);
    end
end
energy_plot6 = 0; redox_plot6 = 0; lac_plot6 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,6) ~= 0 && redox_plot(j,6) ~= 0 && lac_plot(j,6) ~= 0
        energy_plot6(j) = energy_plot(j,6);
        redox_plot6(j) = redox_plot(j,6);
        lac_plot6(j) = lac_plot(j,6);
        growth_plot6(j) = growth_plot(j,6);
    end
end

figure
subplot(3,2,1)
scatter3(energy_plot1,redox_plot1,lac_plot1,[],lac_plot1,'filled')
colorbar
titulol1 = sprintf('a) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(1));
title(titulol1)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,2)

```

```

scatter3(energy_plot2,redox_plot2,lac_plot2,[],lac_plot2,'filled')
colorbar
titulo2 = sprintf('b) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(2));
title(titulo2)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,3)
scatter3(energy_plot3,redox_plot3,lac_plot3,[],lac_plot3,'filled')
colorbar
titulo3 = sprintf('c) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(3));
title(titulo3)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,4)
scatter3(energy_plot4,redox_plot4,lac_plot4,[],lac_plot4,'filled')
colorbar
titulo4 = sprintf('d) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(4));
title(titulo4)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,5)
scatter3(energy_plot5,redox_plot5,lac_plot5,[],lac_plot5,'filled')
colorbar
titulo5 = sprintf('e) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(5));
title(titulo5)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,6)
scatter3(energy_plot6,redox_plot6,lac_plot6,[],lac_plot6,'filled')
colorbar
titulo6 = sprintf('f) Crecimiento > %0.2e (ideal)',limites_growth(6));
title(titulo6)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)

[v_opt, r_max] = max(v_lac(:));

g_opt = Gcomb(:,r_max);

redox_orden=redox_orden';
energy_orden=energy_orden';
growth_orden=growth_orden';
lac_orden=lac_orden';
%
save(filetosave, 'A','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_lac', 'limites_growth', 'limites_redox',
'limites_energy', 'v_growth', 'redox','energy', 'lac_orden','g_orden','ind',
'redox_orden','energy_orden','growth_orden','growth_plot','lac_plot','redox_pl
ot','energy_plot')

end

```



```

%MAIN de un cambio - lactato

%% Cargar matriz estequiométrica C
C = sparse(xlsread('Matriz_estequiometrica.xlsx','Hojal','A1:CO86'));

%% Definir entradas
%Definir S para glucosa
S = zeros(86,1);
S(62) = 0.23/100; %entrada de GLCx
%Definir S para manitol puro
S1 = zeros(86,1);
S1(9) = 0.23; %entrada a F6P
S1(19) = -0.23; %uso de NAD en entrada a F6P
S1(20) = 0.23; %producción de NADH en entrada a F6P
%Definir S para manitol:DEHU 0.177:0.053
S2 = zeros(86,1);
S2(9) = 0.177; %entrada a F6P
S2(19) = -0.177; %uso de NAD en entrada a F6P
S2(20) = 0.177; %producción de NADH en entrada a F6P
S2(83) = 0.053; %entrada a KDG
S2(20) = -0.053; %uso de NADH en entrada a KDG
S2(19) = 0.053; %producción de NAD en entrada a KDG
S2(17) = 0.053; %entrada a KDPG
S2(53) = -0.053; %uso de ATP en entrada a KDPG
S2(51) = 0.053; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.142:0.088
S3 = zeros(86,1);
S3(9) = 0.142; %entrada a F6P
S3(19) = -0.142; %uso de NAD en entrada a F6P
S3(20) = 0.142; %producción de NADH en entrada a F6P
S3(83) = 0.088; %entrada a KDG
S3(20) = -0.088; %uso de NADH en entrada a KDG
S3(19) = 0.088; %producción de NAD en entrada a KDG
S3(17) = 0.088; %entrada a KDPG
S3(53) = -0.088; %uso de ATP en entrada a KDPG
S3(51) = 0.088; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.088:0.142
S4 = zeros(86,1);
S4(9) = 0.088; %entrada a F6P
S4(19) = -0.088; %uso de NAD en entrada a F6P
S4(20) = 0.088; %producción de NADH en entrada a F6P
S4(83) = 0.142; %entrada a KDG
S4(20) = -0.142; %uso de NADH en entrada a KDG
S4(19) = 0.142; %producción de NAD en entrada a KDG
S4(17) = 0.142; %entrada a KDPG
S4(53) = -0.142; %uso de ATP en entrada a KDPG
S4(51) = 0.142; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.053:0.177
S5 = zeros(86,1);
S5(9) = 0.053; %entrada a F6P
S5(19) = -0.053; %uso de NAD en entrada a F6P
S5(20) = 0.053; %producción de NADH en entrada a F6P
S5(83) = 0.177; %entrada a KDG
S5(20) = -0.177; %uso de NADH en entrada a KDG
S5(19) = 0.177; %producción de NAD en entrada a KDG
S5(17) = 0.177; %entrada a KDPG
S5(53) = -0.177; %uso de ATP en entrada a KDPG

```

```

S5(51) = 0.177; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para DEHU puro
S6 = zeros(86,1);
S6(83) = 0.23; %entrada a KDG
S6(20) = -0.23; %uso de NADH en entrada a KDG
S6(19) = 0.23; %producción de NAD en entrada a KDG
S6(17) = 0.23; %entrada a KDPG
S6(53) = -0.23; %uso de ATP en entrada a KDPG
S6(51) = 0.23; %producción de ADP en entrada a KDPG

%% Definir G
%Definir G para glucosa
G = ones(93,1);
G(84:85) = 0; %apagar etanol
G(68:70) = 0; %apagar formato
G(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

%Definir G para manitol:DEHU
G_MD = ones(93,1);
G_MD(84:85) = 0; %apagar etanol
G_MD(68:70) = 0; %apagar formato
G_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
G_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%% Definir Gctes
%Definir Gctes para glucosa
Gctes_GLC = ones(93,1);
Gctes_GLC(61) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(47) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(48) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_GLC(77:83) = 0; %no cambiar sistema de DEHU y de MANI
Gctes_GLC(84:85) = 0; %no cambiar etanol
Gctes_GLC(68:70) = 0; %no cambiar formato

%Definir Gctes para manitol:DEHU
Gctes_MD = ones(93,1);
Gctes_MD(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
Gctes_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(84:85) = 0; %no cambiar etanol
Gctes_MD(68:70) = 0; %no cambiar formato

%% Condiciones iniciales
y0 = zeros(86,1);
y0(1) = 0.154743; %ACCOA, mmol/L
y0(2) = 0.0321498; %ACO, mmol/L
y0(3) = 0.0143909; %ACP, mmol/L
y0(4) = 0.59787; %AKG, mmol/L
y0(5) = 0.0654106; %BPG, mmol/L
y0(6) = 0.0895305; %CIT, mmol/L
y0(7) = 0.437094; %DAP, mmol/L

```

y0(8) = 0.1313; %E4P, mmol/L
y0(9) = 0.261766; %F6P, mmol/L
y0(10) = 0.281808; %FDP, mmol/L
y0(11) = 0.213115; %FUM, mmol/L
y0(12) = 0.86113; %G6P, mmol/L
y0(13) = 0.117183; %GAP, mmol/L
y0(14) = 0.00326165; %GL6P, mmol/L
y0(15) = 0.00881041; %GLX, mmol/L
y0(16) = 0.105782; %ICIT, mmol/L
y0(17) = 0.0868177; %KDPG, mmol/L
y0(18) = 1.03215; %MAL, mmol/L
y0(19) = 1.41154; %NAD, mmol/L
y0(20) = 0.158456; %NADH, mmol/L
y0(21) = 0.167837; %NADP, mmol/L
y0(22) = 0.0891628; %NADPH, mmol/L
y0(23) = 0.12784; %OAA, mmol/L
y0(24) = 0.997038; %PEP, mmol/L
y0(25) = 0.378297; %PGA2, mmol/L
y0(26) = 0.696274; %PGA3, mmol/L
y0(27) = 0.1316; %PGN, mmol/L
y0(28) = 0.236891; %PYR, mmol/L
y0(29) = 0.326117; %Q, mmol/L
y0(30) = 0.673883; %QH2, mmol/L
y0(31) = 0.106842; %R5P, mmol/L
y0(32) = 0.341827; %RU5P, mmol/L
y0(33) = 0.141985; %S7P, mmol/L
y0(34) = 0.216055; %SUC, mmol/L
y0(35) = 0.0410878; %SUCCOA, mmol/L
y0(36) = 0.506018; %X5P, mmol/L
y0(37) = 0.000334013; %ei, mmol/L
y0(38) = 0.00638116; %eiP, mmol/L
y0(39) = 0.0142019; %eiia, mmol/L
y0(40) = 0.480569; %eiiaP, mmol/L
y0(41) = 4.7191E-05; %eiicb, mmol/L
y0(42) = 0.000342621; %eiicbP, mmol/L
y0(43) = 0.000191212; %hpr, mmol/L
y0(44) = 0.00525081; %hprP, mmol/L
y0(45) = 0.000542744; %icd, mmol/L
y0(46) = 0.0514573; %icdP, mmol/L
y0(47) = 0.00278094; %tal, mmol/L
y0(48) = 0.0572191; %talC3, mmol/L
y0(49) = 0.0138308; %tkt, mmol/L
y0(50) = 0.0561692; %tktC2, mmol/L
y0(51) = 0.598315; %ADP, mmol/L
y0(52) = 0.186253; %AMP, mmol/L
y0(53) = 2.5722; %ATP, mmol/L
y0(54) = 0.923131; %CAMP, mmol/L
y0(55) = 9.76395; %P, mmol/L
y0(56) = 0.262683; %MgADP, mmol/L
y0(57) = 2.37121; %MgATP, mmol/L
y0(58) = 0.0413815; %MgFDP, mmol/L
y0(59) = 0.253914; %FAD, mmol/L
y0(60) = 0.746086; %FADH2, mmol/L
y0(61) = 0.000186708; %ACE, mmol/L
y0(62) = 0.00633337; %GLCx, mmol/L
y0(63) = 0.000186687; %ACEx, mmol/L
y0(64) = 5.37448E-05; %Hout, mmol/L

```

y0(65) = 0.00403337; %GLCp, mmol/L
y0(66) = 9.99943; %Pp, mmol/L
y0(67) = 0.000186697; %ACEp, mmol/L
y0(68) = 0.000186708; %FOR, mmol/L
y0(69) = 0.000186697; %FORp, mmol/L
y0(70) = 0.000186687; %FORx, mmol/L
y0(71) = 0.000186708; %LAC, mmol/L
y0(72) = 0.000186697; %LACp, mmol/L
y0(73) = 0.000186687; %LACx, mmol/L
y0(74) = 0.216055; %SUCp, mmol/L
y0(75) = 0.216055; %SUCx, mmol/L
y0(76) = 0.000186708; %ETH, mmol/L
y0(77) = 0.000186697; %ETHp, mmol/L
y0(78) = 0.000186687; %ETHx, mmol/L
y0(79) = 0.000186708; %AcAld, mmol/L
y0(80) = 0.000186708; %DEHU, mmol/L
y0(81) = 0.000186697; %DEHUp, mmol/L
y0(82) = 0.000186687; %DEHUx, mmol/L
y0(83) = 0.000186708; %KDG, mmol/L
y0(84) = 0.000186708; %MANI, mmol/L
y0(85) = 0.000186697; %MANIp, mmol/L
y0(86) = 0.000186687; %MANIx, mmol/L

```

```

%% Resolución del problema

```

```

%Un sólo cambio

```

```

fileID = fopen('combil.txt','w');

```

```

generate(1,1:93,[],fileID)

```

```

fclose(fileID);

```

```

%Glucosa

```

```

[v_opt_G, g_opt_G] = Optimizador

```

```

(C,S,y0,G,Gctes_GLC,'combil.txt','LAC1glucosa.mat');

```

```

% %manitol:DEHU 0.053:0.177

```

```

[v_opt_MD4, g_opt_MD4] = Optimizador

```

```

(C,S5,y0,G_MD,Gctes_MD,'combil.txt','LAC1MD4.mat');

```

9.15.1.2. Dos mutaciones

En este caso, hay que cambiar la función Optimizador y el *main*, por lo siguiente:

```

function [v_opt, g_opt] = Optimizador

```

```

(C,S,y0,G,Gctes,filetocombine2,filetosave)

```

```

% C: matriz estequiométrica

```

```

% S: vector de flujos de entrada (s_j>0) o salidas (s_j<0) de cada metabolito

```

```

% y0: vector de condiciones iniciales [mmol/L]

```

```

% Gctes: vector con ceros en la posición de las enzimas que no pueden ser
modificadas

```

```

% Función que entrega el flujo óptimo para cada G

```

```

%%

```

```

%Para todo G interesante, cambiar g sin cambiar los Gctes

```

```

Gi = G;

```

```

Gcomb = zeros(93,1);

```

```

y_est = zeros(86,1);

```

```

v_est = zeros(93,1);

```

```

v_lac = 0;
v_growth = 0;
redox = 0;
energy = 0;

% %Dos cambios
fileID2 = fopen(filetocombine2,'r');
formatSpec = '%d %d %d %d';
sizeB = [4 Inf];
B = fscanff(fileID2,formatSpec,sizeB);
B = B';
fclose(fileID2);
b = 0;
for i = 1 : length(B)
    if Gctes(B(i,1)) ~= 0
        if Gctes(B(i,3)) ~= 0
            b = b + 1;
            Gi(B(i,1)) = B(i,2);
            Gi(B(i,3)) = B(i,4);
            Gcomb(:,b) = Gi;
            [y, v] = Integrador_estacionario (y0,S,C,Gi);
            y_est(:,b) = y';
            v_est(:,b) = v;
            v_lac(:,b) = v(67);
            v_growth(b) = v(28);
            redox(b) = ((y(20)+y(22))/(y(19)+y(21)));
            energy(b) = (y(53)/y(51));
            Gi = G;
        end
    end
end

[v_opt, r_max] = max(v_lac(:));
g_opt = Gcomb(:,r_max);

save(filetosave, 'B','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_lac', 'v_growth', 'redox','energy')

end

%MAIN para lactato - 2 cambios

%% Cargar matriz estequiométrica C
C = sparse(xlsread('Matriz_estequiometrica.xlsx','Hoja1','A1:C086'));

%% Definir entradas
%Definir S para glucosa
S = zeros(86,1);
S(62) = 0.23/100; %entrada de GLCx
%Definir S para manitol puro
S1 = zeros(86,1);
S1(9) = 0.23; %entrada a F6P
S1(19) = -0.23; %uso de NAD en entrada a F6P
S1(20) = 0.23; %producción de NADH en entrada a F6P

```

```

%Definir S para manitol:DEHU 0.177:0.053
S2 = zeros(86,1);
S2(9) = 0.177; %entrada a F6P
S2(19) = -0.177; %uso de NAD en entrada a F6P
S2(20) = 0.177; %producción de NADH en entrada a F6P
S2(83) = 0.053; %entrada a KDG
S2(20) = -0.053; %uso de NADH en entrada a KDG
S2(19) = 0.053; %producción de NAD en entrada a KDG
S2(17) = 0.053; %entrada a KDPG
S2(53) = -0.053; %uso de ATP en entrada a KDPG
S2(51) = 0.053; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.142:0.088
S3 = zeros(86,1);
S3(9) = 0.142; %entrada a F6P
S3(19) = -0.142; %uso de NAD en entrada a F6P
S3(20) = 0.142; %producción de NADH en entrada a F6P
S3(83) = 0.088; %entrada a KDG
S3(20) = -0.088; %uso de NADH en entrada a KDG
S3(19) = 0.088; %producción de NAD en entrada a KDG
S3(17) = 0.088; %entrada a KDPG
S3(53) = -0.088; %uso de ATP en entrada a KDPG
S3(51) = 0.088; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.088:0.142
S4 = zeros(86,1);
S4(9) = 0.088; %entrada a F6P
S4(19) = -0.088; %uso de NAD en entrada a F6P
S4(20) = 0.088; %producción de NADH en entrada a F6P
S4(83) = 0.142; %entrada a KDG
S4(20) = -0.142; %uso de NADH en entrada a KDG
S4(19) = 0.142; %producción de NAD en entrada a KDG
S4(17) = 0.142; %entrada a KDPG
S4(53) = -0.142; %uso de ATP en entrada a KDPG
S4(51) = 0.142; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.053:0.177
S5 = zeros(86,1);
S5(9) = 0.053; %entrada a F6P
S5(19) = -0.053; %uso de NAD en entrada a F6P
S5(20) = 0.053; %producción de NADH en entrada a F6P
S5(83) = 0.177; %entrada a KDG
S5(20) = -0.177; %uso de NADH en entrada a KDG
S5(19) = 0.177; %producción de NAD en entrada a KDG
S5(17) = 0.177; %entrada a KDPG
S5(53) = -0.177; %uso de ATP en entrada a KDPG
S5(51) = 0.177; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para DEHU puro
S6 = zeros(86,1);
S6(83) = 0.23; %entrada a KDG
S6(20) = -0.23; %uso de NADH en entrada a KDG
S6(19) = 0.23; %producción de NAD en entrada a KDG
S6(17) = 0.23; %entrada a KDPG
S6(53) = -0.23; %uso de ATP en entrada a KDPG
S6(51) = 0.23; %producción de ADP en entrada a KDPG

%% Definir G
%Definir G para glucosa
G = ones(93,1);
G(84:85) = 0; %apagar etanol

```

```

G(68:70) = 0; %apagar formato
G(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

%Definir G para manitol:DEHU
G_MD = ones(93,1);
G_MD(84:85) = 0; %apagar etanol
G_MD(68:70) = 0; %apagar formato
G_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
G_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%% Definir Gctes
%Definir Gctes para glucosa
Gctes_GLC = ones(93,1);
Gctes_GLC(61) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(47) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(48) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_GLC(77:83) = 0; %no cambiar sistema de DEHU y de MANI
Gctes_GLC(84:85) = 0; %no cambiar etanol
Gctes_GLC(68:70) = 0; %no cambiar formato

%Definir Gctes para manitol:DEHU
Gctes_MD = ones(93,1);
Gctes_MD(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
Gctes_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(84:85) = 0; %no cambiar etanol
Gctes_MD(68:70) = 0; %no cambiar formato

%% Condiciones iniciales
y0 = zeros(86,1);
y0(1) = 0.154743; %ACCOA, mmol/L
y0(2) = 0.0321498; %ACO, mmol/L
y0(3) = 0.0143909; %ACP, mmol/L
y0(4) = 0.59787; %AKG, mmol/L
y0(5) = 0.0654106; %BPG, mmol/L
y0(6) = 0.0895305; %CIT, mmol/L
y0(7) = 0.437094; %DAP, mmol/L
y0(8) = 0.1313; %E4P, mmol/L
y0(9) = 0.261766; %F6P, mmol/L
y0(10) = 0.281808; %FDP, mmol/L
y0(11) = 0.213115; %FUM, mmol/L
y0(12) = 0.86113; %G6P, mmol/L
y0(13) = 0.117183; %GAP, mmol/L
y0(14) = 0.00326165; %GL6P, mmol/L
y0(15) = 0.00881041; %GLX, mmol/L
y0(16) = 0.105782; %ICIT, mmol/L
y0(17) = 0.0868177; %KDPG, mmol/L
y0(18) = 1.03215; %MAL, mmol/L
y0(19) = 1.41154; %NAD, mmol/L
y0(20) = 0.158456; %NADH, mmol/L
y0(21) = 0.167837; %NADP, mmol/L

```

y0(22) = 0.0891628; %NADPH, mmol/L
y0(23) = 0.12784; %OAA, mmol/L
y0(24) = 0.997038; %PEP, mmol/L
y0(25) = 0.378297; %PGA2, mmol/L
y0(26) = 0.696274; %PGA3, mmol/L
y0(27) = 0.1316; %PGN, mmol/L
y0(28) = 0.236891; %PYR, mmol/L
y0(29) = 0.326117; %Q, mmol/L
y0(30) = 0.673883; %QH2, mmol/L
y0(31) = 0.106842; %R5P, mmol/L
y0(32) = 0.341827; %RU5P, mmol/L
y0(33) = 0.141985; %S7P, mmol/L
y0(34) = 0.216055; %SUC, mmol/L
y0(35) = 0.0410878; %SUCCOA, mmol/L
y0(36) = 0.506018; %X5P, mmol/L
y0(37) = 0.000334013; %ei, mmol/L
y0(38) = 0.00638116; %eiP, mmol/L
y0(39) = 0.0142019; %eiia, mmol/L
y0(40) = 0.480569; %eiiaP, mmol/L
y0(41) = 4.7191E-05; %eiicb, mmol/L
y0(42) = 0.000342621; %eiicbP, mmol/L
y0(43) = 0.000191212; %hpr, mmol/L
y0(44) = 0.00525081; %hprP, mmol/L
y0(45) = 0.000542744; %icd, mmol/L
y0(46) = 0.0514573; %icdP, mmol/L
y0(47) = 0.00278094; %tal, mmol/L
y0(48) = 0.0572191; %talC3, mmol/L
y0(49) = 0.0138308; %tkt, mmol/L
y0(50) = 0.0561692; %tktC2, mmol/L
y0(51) = 0.598315; %ADP, mmol/L
y0(52) = 0.186253; %AMP, mmol/L
y0(53) = 2.5722; %ATP, mmol/L
y0(54) = 0.923131; %CAMP, mmol/L
y0(55) = 9.76395; %P, mmol/L
y0(56) = 0.262683; %MgADP, mmol/L
y0(57) = 2.37121; %MgATP, mmol/L
y0(58) = 0.0413815; %MgFDP, mmol/L
y0(59) = 0.253914; %FAD, mmol/L
y0(60) = 0.746086; %FADH2, mmol/L
y0(61) = 0.000186708; %ACE, mmol/L
y0(62) = 0.00633337; %GLCx, mmol/L
y0(63) = 0.000186687; %ACEx, mmol/L
y0(64) = 5.37448E-05; %Hout, mmol/L
y0(65) = 0.00403337; %GLCp, mmol/L
y0(66) = 9.99943; %Pp, mmol/L
y0(67) = 0.000186697; %ACEp, mmol/L
y0(68) = 0.000186708; %FOR, mmol/L
y0(69) = 0.000186697; %FORp, mmol/L
y0(70) = 0.000186687; %FORx, mmol/L
y0(71) = 0.000186708; %LAC, mmol/L
y0(72) = 0.000186697; %LACp, mmol/L
y0(73) = 0.000186687; %LACx, mmol/L
y0(74) = 0.216055; %SUCp, mmol/L
y0(75) = 0.216055; %SUCx, mmol/L
y0(76) = 0.000186708; %ETH, mmol/L
y0(77) = 0.000186697; %ETHp, mmol/L
y0(78) = 0.000186687; %ETHx, mmol/L


```

y0(79) = 0.000186708; %AcAld, mmol/L
y0(80) = 0.000186708; %DEHU, mmol/L
y0(81) = 0.000186697; %DEHUp, mmol/L
y0(82) = 0.000186687; %DEHUx, mmol/L
y0(83) = 0.000186708; %KDG, mmol/L
y0(84) = 0.000186708; %MANI, mmol/L
y0(85) = 0.000186697; %MANIp, mmol/L
y0(86) = 0.000186687; %MANIx, mmol/L

```

```
%% Resolución del problema
```

```
%Dos cambios
```

```

fileID2 = fopen('combi2.txt','w');
generate(2,1:93,[],fileID2)
fclose(fileID2);

```

```
%Glucosa
```

```

[v_opt_G, g_opt_G] = Optimizador
(C,S,y0,G,Gctes_GLC,'combi2.txt','LACglucosa.mat');

```

```
%Macrocystis
```

```

[v_opt_MD4, g_opt_MD4] = Optimizador
(C,S5,y0,G_MD,Gctes_MD,'combi2.txt','LACMD4.mat');

```

Además, para generar los gráficos se agregó la función Graficar, a la cual se le ingresan como parámetros los datos guardados en el *main*, para cada simulación, y el nombre del nuevo archivo donde se quieren guardar las demás matrices generadas:

```
function Graficar (file,filetosave)
```

```
load(file)
```

```
%ordenando vectores
```

```

[lac_orden, ind] = sort(v_lac,'descend');
g_orden = Gcomb(:,ind);
redox_orden = redox(ind);
energy_orden = energy(ind);
growth_orden = v_growth(ind);

```

```

previos_growth = [1.0311E-5 1.4729E-5 1.3636E-5 1.0798E-5 4.086E-6 1.1887E-6
5.9954E-23];

```

```

previos_redox = [0.113702347 0.125328145 0.098880038 0.108329032 0.116695738
0.119356309 0.03434003];

```

```

previos_energy= [3.679517054 9.016425133 2.4479494 3.716678724 5.811656167
7.007174994 0.235110938];

```

```
%definir los límites
```

```

if S(62) == 0.23/100
    if previos_growth(1) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(1),6);
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(1);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(1);
elseif S(9) == 0.23
    if previos_growth(2) >= 3.8e-10

```

```

        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(2),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(2);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(2);
elseif S(9) == 0.177
    if previos_growth(3) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(3),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(3);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(3);
elseif S(9) == 0.142
    if previos_growth(4) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(4),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(4);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(4);
elseif S(9) == 0.088
    if previos_growth(5) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(5),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(5);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(5);
elseif S(9) == 0.053
    if previos_growth(6) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(6),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(6);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(6);
elseif S(83) == 0.23
    if previos_growth(7) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(7),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(7);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(7);
end

figure
subplot(1,2,1)
scatter3(energy_orden,redox_orden,lac_orden,[],lac_orden,'filled')
colorbar
if S(62) == 0.23/100
    title('Ác. láctico para BAL con glucosa')
elseif S(9) == 0.23
    title('Ác. láctico para BAL con manitol')
elseif S(9) == 0.177

```

```

        title('Ác. láctico para BAL con D:M 3:10')
elseif S(9) == 0.142
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
elseif S(9) == 0.088
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 8:5')
elseif S(9) == 0.053
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifera)')
elseif S(83) == 0.23
    title('Ác. láctico para BAL con DEHU')
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(1,2,2)
scatter3(energy_orden,redox_orden,lac_orden,[],lac_orden,'filled')
colorbar
view(0,90)
axis([0 14.1 0 0.24])
if S(62) == 0.23/100
    title('Ác. láctico para BAL con glucosa')
    axis([0 7.4 0 0.23])
elseif S(9) == 0.23
    title('Ác. láctico para BAL con manitol')
    axis([0 18.1 0 0.26])
elseif S(9) == 0.177
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 3:10')
    axis([0 5 0 0.2])
elseif S(9) == 0.142
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
    axis([0 7.5 0 0.22])
elseif S(9) == 0.088
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 8:5')
    axis([0 12 0 0.24])
elseif S(9) == 0.053
    title('Ác. láctico para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifera)')
    axis([0 14.1 0 0.24])
elseif S(83) == 0.23
    title('Ác. láctico para BAL con DEHU')
    axis([0 0.5 0 0.07])
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
hold on
rectangle('Position',[limites_energy(1) limites_redox(1) (limites_energy(2)-
limites_energy(1)) (limites_redox(2)-limites_redox(1))])
hold off

if limites_growth == 0
    [v_opt, r_max] = max(v_lac(:));
    g_opt = Gcomb(:,r_max);
    redox_orden=redox_orden';
    energy_orden=energy_orden';
    growth_orden=growth_orden';
    lac_orden=lac_orden';
    save(filetosave, 'B','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_lac', 'limites_growth', 'limites_redox',

```

```

'limites_energy', 'v_growth', 'redox','energy', 'lac_orden','g_orden','ind',
'redox_orden', 'energy_orden','growth_orden')
    return
end

energy_plot = 0;
redox_plot = 0;
lac_plot = 0;
growth_plot = 0;
g_plot_i = 0;
g_plot = 0;
d = 0;
for i = 1 : length(limites_growth)
    for j = 1 : length(lac_orden)
        if growth_orden(j) ~= 0
            if growth_orden(j) >= limites_growth(i)
                if redox_orden(j) >= limites_redox(1)
                    %if redox_orden(j) ~= 0
                    if redox_orden(j) <= limites_redox(2)
                        if energy_orden(j) >= limites_energy(1)
                            %if energy_orden(j) ~= 0
                            if energy_orden(j) <= limites_energy(2)
                                d = d + 1;
                                growth_plot(d,i) = growth_orden(j);
                                energy_plot(d,i) = energy_orden(j);
                                redox_plot(d,i) = redox_orden(j);
                                lac_plot(d,i) = lac_orden(j);
                                %g_plot_i(:,d) = g_orden(:,j);
                            end
                        end
                    end
                end
            end
        end
    end
end
d = 0;
%g_plot(:, :, i) = g_plot_i(:, :);
end

```

```

energy_plot1 = 0; redox_plot1 = 0; lac_plot1 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,1) ~= 0 && redox_plot(j,1) ~= 0 && lac_plot(j,1) ~= 0
        energy_plot1(j) = energy_plot(j,1);
        redox_plot1(j) = redox_plot(j,1);
        lac_plot1(j) = lac_plot(j,1);
        growth_plot1(j) = growth_plot(j,1);
    end
end
energy_plot2 = 0; redox_plot2 = 0; lac_plot2 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,2) ~= 0 && redox_plot(j,2) ~= 0 && lac_plot(j,2) ~= 0
        energy_plot2(j) = energy_plot(j,2);
    end
end

```

```

        redox_plot2(j) = redox_plot(j,2);
        lac_plot2(j) = lac_plot(j,2);
        growth_plot2(j) = growth_plot(j,2);
    end
end
energy_plot3 = 0; redox_plot3 = 0; lac_plot3 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,3) ~= 0 && redox_plot(j,3) ~= 0 && lac_plot(j,3) ~= 0
        energy_plot3(j) = energy_plot(j,3);
        redox_plot3(j) = redox_plot(j,3);
        lac_plot3(j) = lac_plot(j,3);
        growth_plot3(j) = growth_plot(j,3);
    end
end
energy_plot4 = 0; redox_plot4 = 0; lac_plot4 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,4) ~= 0 && redox_plot(j,4) ~= 0 && lac_plot(j,4) ~= 0
        energy_plot4(j) = energy_plot(j,4);
        redox_plot4(j) = redox_plot(j,4);
        lac_plot4(j) = lac_plot(j,4);
        growth_plot4(j) = growth_plot(j,4);
    end
end
energy_plot5 = 0; redox_plot5 = 0; lac_plot5 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,5) ~= 0 && redox_plot(j,5) ~= 0 && lac_plot(j,5) ~= 0
        energy_plot5(j) = energy_plot(j,5);
        redox_plot5(j) = redox_plot(j,5);
        lac_plot5(j) = lac_plot(j,5);
        growth_plot5(j) = growth_plot(j,5);
    end
end
energy_plot6 = 0; redox_plot6 = 0; lac_plot6 = 0;
for j = 1 : length(lac_plot)
    if energy_plot(j,6) ~= 0 && redox_plot(j,6) ~= 0 && lac_plot(j,6) ~= 0
        energy_plot6(j) = energy_plot(j,6);
        redox_plot6(j) = redox_plot(j,6);
        lac_plot6(j) = lac_plot(j,6);
        growth_plot6(j) = growth_plot(j,6);
    end
end

figure
subplot(3,2,1)
scatter3(energy_plot1,redox_plot1,lac_plot1,[],lac_plot1,'filled')
colorbar
titulo1 = sprintf('a) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(1));
title(titulo1)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,2)
scatter3(energy_plot2,redox_plot2,lac_plot2,[],lac_plot2,'filled')
colorbar
titulo2 = sprintf('b) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(2));
title(titulo2)
xlabel('Razón energética')

```

```

ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,3)
scatter3(energy_plot3,redox_plot3,lac_plot3,[],lac_plot3,'filled')
colorbar
titulo3 = sprintf('c) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(3));
title(titulo3)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,4)
scatter3(energy_plot4,redox_plot4,lac_plot4,[],lac_plot4,'filled')
colorbar
titulo4 = sprintf('d) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(4));
title(titulo4)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,5)
scatter3(energy_plot5,redox_plot5,lac_plot5,[],lac_plot5,'filled')
colorbar
titulo5 = sprintf('e) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(5));
title(titulo5)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,6)
scatter3(energy_plot6,redox_plot6,lac_plot6,[],lac_plot6,'filled')
colorbar
titulo6 = sprintf('f) Crecimiento > %0.2e (ideal)',limites_growth(6));
title(titulo6)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)

[v_opt, r_max] = max(v_lac(:));

g_opt = Gcomb(:,r_max);

redox_orden=redox_orden';
energy_orden=energy_orden';
growth_orden=growth_orden';
lac_orden=lac_orden';

save(filetosave, 'lac_orden','g_orden','ind', 'redox_orden',
'energy_orden','growth_orden','growth_plot','lac_plot','redox_plot','energy_pl
ot')

end

```

9.15.2. Ácido succínico

9.15.2.1. Una mutación

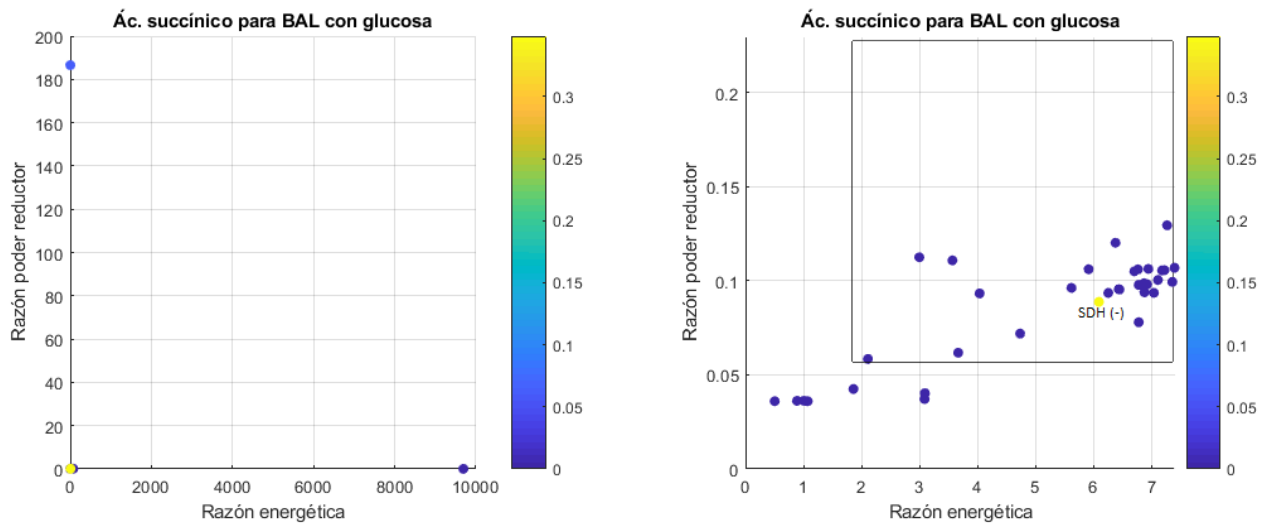


Figura 98. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido succínico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

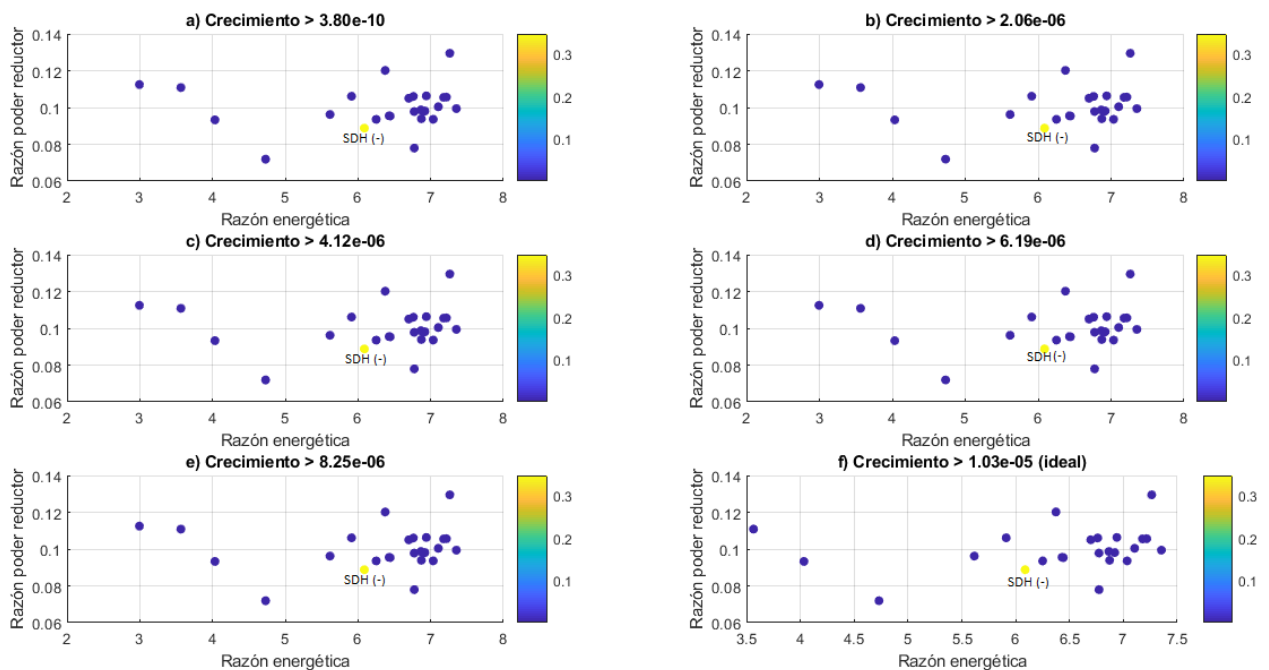


Figura 99. Gráficos de producción de ácido succínico en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento.

El código de Matlab es casi el mismo que se utilizó en el caso de etanol para un cambio (Anexo N), modificando la función Optimizador y el *main*, por lo siguiente:

```

function [v_opt, g_opt] = Optimizador
(C,S,y0,G,Gctes,filetocombinel,filetosave)
% C: matriz estequiométrica
% S: vector de flujos de entrada (s_j>0) o salidas (s_j<0) de cada metabolito
% y0: vector de condiciones iniciales [mmol/L]
% Gctes: vector con ceros en la posición de las enzimas que no pueden ser
modificadas
% Función que entrega el flujo óptimo para cada G

%%
%Para todo G interesante, cambiar g sin cambiar los Gctes
Gi = G;
Gcomb = zeros(93,1);
y_est = zeros(86,1);
v_est = zeros(93,1);
v_suc = 0;
v_growth = 0;
redox = 0;
energy = 0;

%Un sólo cambio
fileID = fopen(filetocombinel,'r');
formatSpec = '%d %d';
sizeA = [2 Inf];
A = fscanf(fileID,formatSpec,sizeA);
A = A';
fclose(fileID);
a = 0;
for i = 1 : length(A)
    if Gctes(A(i,1)) ~= 0
        a = a + 1;
        Gi(A(i,1)) = A(i,2);
        Gcomb(:,a) = Gi;
        [y, v] = Integrador_estacionario (y0,S,C,Gi);
        y_est(:,a) = y';
        v_est(:,a) = v;
        v_suc(a) = v(76);
        v_growth(a) = v(28);
        redox(a) = ((y(20)+y(22))/(y(19)+y(21)));
        energy(a) = (y(53)/y(51));
        Gi = G;
    end
end
%ordenando vectores
[suc_orden, ind] = sort(v_suc, 'descend');
g_orden = Gcomb(:,ind);
redox_orden = redox(ind);
energy_orden = energy(ind);
growth_orden = v_growth(ind);

previos_growth = [1.0311E-5 1.4729E-5 1.3636E-5 1.0798E-5 4.086E-6 1.1887E-6
5.9954E-23];
previos_redox = [0.113702347 0.125328145 0.098880038 0.108329032 0.116695738
0.119356309 0.03434003];
previos_energy= [3.679517054 9.016425133 2.4479494 3.716678724 5.811656167
7.007174994 0.235110938];

```



```

%definir los límites
if S(62) == 0.23/100
    if previos_growth(1) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(1),6);
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(1);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(1);
elseif S(9) == 0.23
    if previos_growth(2) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(2),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(2);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(2);
elseif S(9) == 0.177
    if previos_growth(3) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(3),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(3);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(3);
elseif S(9) == 0.142
    if previos_growth(4) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(4),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(4);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(4);
elseif S(9) == 0.088
    if previos_growth(5) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(5),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(5);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(5);
elseif S(9) == 0.053
    if previos_growth(6) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(6),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(6);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(6);
elseif S(83) == 0.23
    if previos_growth(7) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(7),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(7);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(7);
end

```

```

figure
subplot(1,2,1)
scatter3(energy_orden,redox_orden,suc_orden,[],suc_orden,'filled')
colorbar
if S(62) == 0.23/100
    title('Ác. succínico para BAL con glucosa')
elseif S(9) == 0.23
    title('Ác. succínico para BAL con manitol')
elseif S(9) == 0.177
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 3:10')
elseif S(9) == 0.142
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
elseif S(9) == 0.088
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 8:5')
elseif S(9) == 0.053
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
elseif S(83) == 0.23
    title('Ác. succínico para BAL con DEHU')
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(1,2,2)
scatter3(energy_orden,redox_orden,suc_orden,[],suc_orden,'filled')
colorbar
view(0,90)
if S(62) == 0.23/100
    title('Ác. succínico para BAL con glucosa')
    axis([0 7.4 0 0.23])
elseif S(9) == 0.23
    title('Ác. succínico para BAL con manitol')
    axis([0 18.1 0 0.26])
elseif S(9) == 0.177
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 3:10')
    axis([0 5 0 0.2])
elseif S(9) == 0.142
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
    axis([0 7.5 0 0.22])
elseif S(9) == 0.088
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 8:5')
    axis([0 12 0 0.24])
elseif S(9) == 0.053
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
    axis([0 14.1 0 0.24])
elseif S(83) == 0.23
    title('Ác. succínico para BAL con DEHU')
    axis([0 0.5 0 0.07])
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
hold on
rectangle('Position',[limites_energy(1) limites_redox(1) (limites_energy(2)-
limites_energy(1)) (limites_redox(2)-limites_redox(1))])
hold off

```

```

if limites_growth == 0
    [v_opt, r_max] = max(v_suc(:));
    g_opt = Gcomb(:,r_max);
    redox_orden=redox_orden';
    energy_orden=energy_orden';
    growth_orden=growth_orden';
    suc_orden=suc_orden';
    save(filetosave, 'A','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_suc', 'limites_growth', 'limites_redox',
'limites_energy', 'v_growth', 'redox','energy', 'suc_orden','g_orden','ind',
'redox_orden', 'energy_orden','growth_orden')
    return
end

```

```

energy_plot = 0;
redox_plot = 0;
suc_plot = 0;
growth_plot = 0;
g_plot_i = 0;
g_plot = 0;
d = 0;
for i = 1 : length(limites_growth)
    for j = 1 : length(suc_orden)
        if growth_orden(j) ~= 0
            if growth_orden(j) >= limites_growth(i)
                if redox_orden(j) >= limites_redox(1)
                    if redox_orden(j) <= limites_redox(2)
                        if energy_orden(j) >= limites_energy(1)
                            if energy_orden(j) <= limites_energy(2)
                                d = d + 1;
                                growth_plot(d,i) = growth_orden(j);
                                energy_plot(d,i) = energy_orden(j);
                                redox_plot(d,i) = redox_orden(j);
                                suc_plot(d,i) = suc_orden(j);
                            end
                        end
                    end
                end
            end
        end
    end
end
d = 0;
end

```

```

energy_plot1 = 0; redox_plot1 = 0; suc_plot1 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,1) ~= 0 && redox_plot(j,1) ~= 0 && suc_plot(j,1) ~= 0
        energy_plot1(j) = energy_plot(j,1);
        redox_plot1(j) = redox_plot(j,1);
        suc_plot1(j) = suc_plot(j,1);
        growth_plot1(j) = growth_plot(j,1);
    end
end

```

```

energy_plot2 = 0; redox_plot2 = 0; suc_plot2 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,2) ~= 0 && redox_plot(j,2) ~= 0 && suc_plot(j,2) ~= 0
        energy_plot2(j) = energy_plot(j,2);
        redox_plot2(j) = redox_plot(j,2);
        suc_plot2(j) = suc_plot(j,2);
        growth_plot2(j) = growth_plot(j,2);
    end
end
energy_plot3 = 0; redox_plot3 = 0; suc_plot3 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,3) ~= 0 && redox_plot(j,3) ~= 0 && suc_plot(j,3) ~= 0
        energy_plot3(j) = energy_plot(j,3);
        redox_plot3(j) = redox_plot(j,3);
        suc_plot3(j) = suc_plot(j,3);
        growth_plot3(j) = growth_plot(j,3);
    end
end
energy_plot4 = 0; redox_plot4 = 0; suc_plot4 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,4) ~= 0 && redox_plot(j,4) ~= 0 && suc_plot(j,4) ~= 0
        energy_plot4(j) = energy_plot(j,4);
        redox_plot4(j) = redox_plot(j,4);
        suc_plot4(j) = suc_plot(j,4);
        growth_plot4(j) = growth_plot(j,4);
    end
end
energy_plot5 = 0; redox_plot5 = 0; suc_plot5 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,5) ~= 0 && redox_plot(j,5) ~= 0 && suc_plot(j,5) ~= 0
        energy_plot5(j) = energy_plot(j,5);
        redox_plot5(j) = redox_plot(j,5);
        suc_plot5(j) = suc_plot(j,5);
        growth_plot5(j) = growth_plot(j,5);
    end
end
energy_plot6 = 0; redox_plot6 = 0; suc_plot6 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,6) ~= 0 && redox_plot(j,6) ~= 0 && suc_plot(j,6) ~= 0
        energy_plot6(j) = energy_plot(j,6);
        redox_plot6(j) = redox_plot(j,6);
        suc_plot6(j) = suc_plot(j,6);
        growth_plot6(j) = growth_plot(j,6);
    end
end

figure
subplot(3,2,1)
scatter3(energy_plot1,redox_plot1,suc_plot1,[],suc_plot1,'filled')
colorbar
titulol1 = sprintf('a) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(1));
title(titulol1)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,2)
scatter3(energy_plot2,redox_plot2,suc_plot2,[],suc_plot2,'filled')

```

```

colorbar
titulo2 = sprintf('b) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(2));
title(titulo2)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,3)
scatter3(energy_plot3,redox_plot3,suc_plot3,[],suc_plot3,'filled')
colorbar
titulo3 = sprintf('c) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(3));
title(titulo3)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,4)
scatter3(energy_plot4,redox_plot4,suc_plot4,[],suc_plot4,'filled')
colorbar
titulo4 = sprintf('d) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(4));
title(titulo4)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,5)
scatter3(energy_plot5,redox_plot5,suc_plot5,[],suc_plot5,'filled')
colorbar
titulo5 = sprintf('e) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(5));
title(titulo5)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,6)
scatter3(energy_plot6,redox_plot6,suc_plot6,[],suc_plot6,'filled')
colorbar
titulo6 = sprintf('f) Crecimiento > %0.2e (ideal)',limites_growth(6));
title(titulo6)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)

[v_opt, r_max] = max(v_suc(:));

g_opt = Gcomb(:,r_max);

redox_orden=redox_orden';
energy_orden=energy_orden';
growth_orden=growth_orden';
suc_orden=suc_orden';

save(filetosave, 'A','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_suc', 'limites_growth', 'limites_redox',
'limites_energy', 'v_growth', 'redox','energy', 'suc_orden','g_orden','ind',
'redox_orden','energy_orden','growth_orden','growth_plot','suc_plot','redox_pl
ot','energy_plot')

```

```

%MAIN un cambio - succinato

%% Cargar matriz estequiométrica C
C = sparse(xlsread('Matriz_estequiometrica.xlsx','Hoja1','A1:CO86'));

%% Definir entradas
%Definir S para glucosa
S = zeros(86,1);
S(62) = 0.23/100; %entrada de GLCx
%Definir S para manitol puro
S1 = zeros(86,1);
S1(9) = 0.23; %entrada a F6P
S1(19) = -0.23; %uso de NAD en entrada a F6P
S1(20) = 0.23; %producción de NADH en entrada a F6P
%Definir S para manitol:DEHU 0.177:0.053
S2 = zeros(86,1);
S2(9) = 0.177; %entrada a F6P
S2(19) = -0.177; %uso de NAD en entrada a F6P
S2(20) = 0.177; %producción de NADH en entrada a F6P
S2(83) = 0.053; %entrada a KDG
S2(20) = -0.053; %uso de NADH en entrada a KDG
S2(19) = 0.053; %producción de NAD en entrada a KDG
S2(17) = 0.053; %entrada a KDPG
S2(53) = -0.053; %uso de ATP en entrada a KDPG
S2(51) = 0.053; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.142:0.088
S3 = zeros(86,1);
S3(9) = 0.142; %entrada a F6P
S3(19) = -0.142; %uso de NAD en entrada a F6P
S3(20) = 0.142; %producción de NADH en entrada a F6P
S3(83) = 0.088; %entrada a KDG
S3(20) = -0.088; %uso de NADH en entrada a KDG
S3(19) = 0.088; %producción de NAD en entrada a KDG
S3(17) = 0.088; %entrada a KDPG
S3(53) = -0.088; %uso de ATP en entrada a KDPG
S3(51) = 0.088; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.088:0.142
S4 = zeros(86,1);
S4(9) = 0.088; %entrada a F6P
S4(19) = -0.088; %uso de NAD en entrada a F6P
S4(20) = 0.088; %producción de NADH en entrada a F6P
S4(83) = 0.142; %entrada a KDG
S4(20) = -0.142; %uso de NADH en entrada a KDG
S4(19) = 0.142; %producción de NAD en entrada a KDG
S4(17) = 0.142; %entrada a KDPG
S4(53) = -0.142; %uso de ATP en entrada a KDPG
S4(51) = 0.142; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.053:0.177
S5 = zeros(86,1);
S5(9) = 0.053; %entrada a F6P
S5(19) = -0.053; %uso de NAD en entrada a F6P
S5(20) = 0.053; %producción de NADH en entrada a F6P
S5(83) = 0.177; %entrada a KDG
S5(20) = -0.177; %uso de NADH en entrada a KDG
S5(19) = 0.177; %producción de NAD en entrada a KDG
S5(17) = 0.177; %entrada a KDPG
S5(53) = -0.177; %uso de ATP en entrada a KDPG

```

```

S5(51) = 0.177; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para DEHU puro
S6 = zeros(86,1);
S6(83) = 0.23; %entrada a KDG
S6(20) = -0.23; %uso de NADH en entrada a KDG
S6(19) = 0.23; %producción de NAD en entrada a KDG
S6(17) = 0.23; %entrada a KDPG
S6(53) = -0.23; %uso de ATP en entrada a KDPG
S6(51) = 0.23; %producción de ADP en entrada a KDPG

%% Definir G
%Definir G para glucosa
G = ones(93,1);
G(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
G(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

%Definir G para manitol:DEHU
G_MD = ones(93,1);
G_MD(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
G_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
G_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%% Definir Gctes
%Definir Gctes para glucosa
Gctes_GLC = ones(93,1);
Gctes_GLC(61) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(47) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(48) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(73) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_GLC(74) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_GLC(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_GLC(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
Gctes_GLC(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

%Definir Gctes para manitol:DEHU
Gctes_MD = ones(93,1);
Gctes_MD(73) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_MD(74) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_MD(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_MD(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
Gctes_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
Gctes_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%% Condiciones iniciales
y0 = zeros(86,1);
y0(1) = 0.154743; %ACCOA, mmol/L
y0(2) = 0.0321498; %ACO, mmol/L
y0(3) = 0.0143909; %ACP, mmol/L
y0(4) = 0.59787; %AKG, mmol/L
y0(5) = 0.0654106; %BPG, mmol/L
y0(6) = 0.0895305; %CIT, mmol/L
y0(7) = 0.437094; %DAP, mmol/L

```

y0(8) = 0.1313; %E4P, mmol/L
y0(9) = 0.261766; %F6P, mmol/L
y0(10) = 0.281808; %FDP, mmol/L
y0(11) = 0.213115; %FUM, mmol/L
y0(12) = 0.86113; %G6P, mmol/L
y0(13) = 0.117183; %GAP, mmol/L
y0(14) = 0.00326165; %GL6P, mmol/L
y0(15) = 0.00881041; %GLX, mmol/L
y0(16) = 0.105782; %ICIT, mmol/L
y0(17) = 0.0868177; %KDPG, mmol/L
y0(18) = 1.03215; %MAL, mmol/L
y0(19) = 1.41154; %NAD, mmol/L
y0(20) = 0.158456; %NADH, mmol/L
y0(21) = 0.167837; %NADP, mmol/L
y0(22) = 0.0891628; %NADPH, mmol/L
y0(23) = 0.12784; %OAA, mmol/L
y0(24) = 0.997038; %PEP, mmol/L
y0(25) = 0.378297; %PGA2, mmol/L
y0(26) = 0.696274; %PGA3, mmol/L
y0(27) = 0.1316; %PGN, mmol/L
y0(28) = 0.236891; %PYR, mmol/L
y0(29) = 0.326117; %Q, mmol/L
y0(30) = 0.673883; %QH2, mmol/L
y0(31) = 0.106842; %R5P, mmol/L
y0(32) = 0.341827; %RU5P, mmol/L
y0(33) = 0.141985; %S7P, mmol/L
y0(34) = 0.216055; %SUC, mmol/L
y0(35) = 0.0410878; %SUCCOA, mmol/L
y0(36) = 0.506018; %X5P, mmol/L
y0(37) = 0.000334013; %ei, mmol/L
y0(38) = 0.00638116; %eiP, mmol/L
y0(39) = 0.0142019; %eiia, mmol/L
y0(40) = 0.480569; %eiiaP, mmol/L
y0(41) = 4.7191E-05; %eiicb, mmol/L
y0(42) = 0.000342621; %eiicbP, mmol/L
y0(43) = 0.000191212; %hpr, mmol/L
y0(44) = 0.00525081; %hprP, mmol/L
y0(45) = 0.000542744; %icd, mmol/L
y0(46) = 0.0514573; %icdP, mmol/L
y0(47) = 0.00278094; %tal, mmol/L
y0(48) = 0.0572191; %talC3, mmol/L
y0(49) = 0.0138308; %tkk, mmol/L
y0(50) = 0.0561692; %tkkC2, mmol/L
y0(51) = 0.598315; %ADP, mmol/L
y0(52) = 0.186253; %AMP, mmol/L
y0(53) = 2.5722; %ATP, mmol/L
y0(54) = 0.923131; %CAMP, mmol/L
y0(55) = 9.76395; %P, mmol/L
y0(56) = 0.262683; %MgADP, mmol/L
y0(57) = 2.37121; %MgATP, mmol/L
y0(58) = 0.0413815; %MgFDP, mmol/L
y0(59) = 0.253914; %FAD, mmol/L
y0(60) = 0.746086; %FADH2, mmol/L
y0(61) = 0.000186708; %ACE, mmol/L
y0(62) = 0.00633337; %GLCx, mmol/L
y0(63) = 0.000186687; %ACEx, mmol/L
y0(64) = 5.37448E-05; %Hout, mmol/L


```

y0(65) = 0.00403337; %GLCp, mmol/L
y0(66) = 9.99943; %Pp, mmol/L
y0(67) = 0.000186697; %ACEp, mmol/L
y0(68) = 0.000186708; %FOR, mmol/L
y0(69) = 0.000186697; %FORp, mmol/L
y0(70) = 0.000186687; %FORx, mmol/L
y0(71) = 0.000186708; %LAC, mmol/L
y0(72) = 0.000186697; %LACp, mmol/L
y0(73) = 0.000186687; %LACx, mmol/L
y0(74) = 0.216055; %SUCp, mmol/L
y0(75) = 0.216055; %SUCx, mmol/L
y0(76) = 0.000186708; %ETH, mmol/L
y0(77) = 0.000186697; %ETHp, mmol/L
y0(78) = 0.000186687; %ETHx, mmol/L
y0(79) = 0.000186708; %AcAld, mmol/L
y0(80) = 0.000186708; %DEHU, mmol/L
y0(81) = 0.000186697; %DEHUp, mmol/L
y0(82) = 0.000186687; %DEHUx, mmol/L
y0(83) = 0.000186708; %KDG, mmol/L
y0(84) = 0.000186708; %MANI, mmol/L
y0(85) = 0.000186697; %MANIp, mmol/L
y0(86) = 0.000186687; %MANIx, mmol/L

```

```

%% Resolución del problema

```

```

%Un sólo cambio

```

```

fileID = fopen('combil.txt','w');

```

```

generate(1,1:93,[],fileID)

```

```

fclose(fileID);

```

```

%Glucosa

```

```

[v_opt_G, g_opt_G] = Optimizador

```

```

(C,S,y0,G,Gctes_GLC,'combil.txt','SUC1glucosa.mat');

```

```

%manitol:DEHU 0.053:0.177

```

```

[v_opt_MD4, g_opt_MD4] = Optimizador

```

```

(C,S5,y0,G_MD,Gctes_MD,'combil.txt','SUC1MD4.mat');

```

9.15.2.2. Dos mutaciones

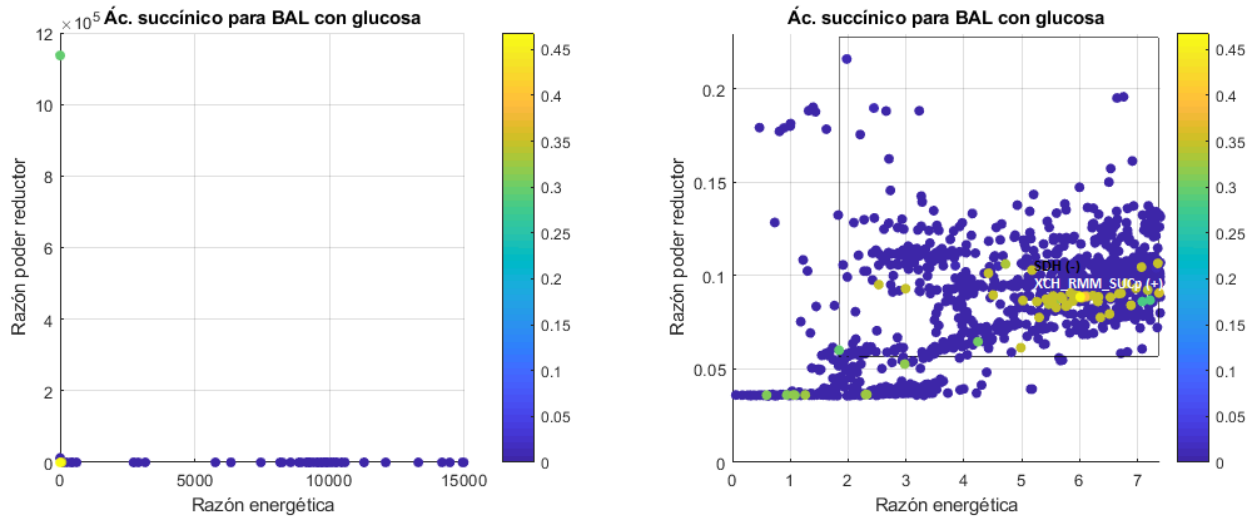


Figura 100. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido succínico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con glucosa como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

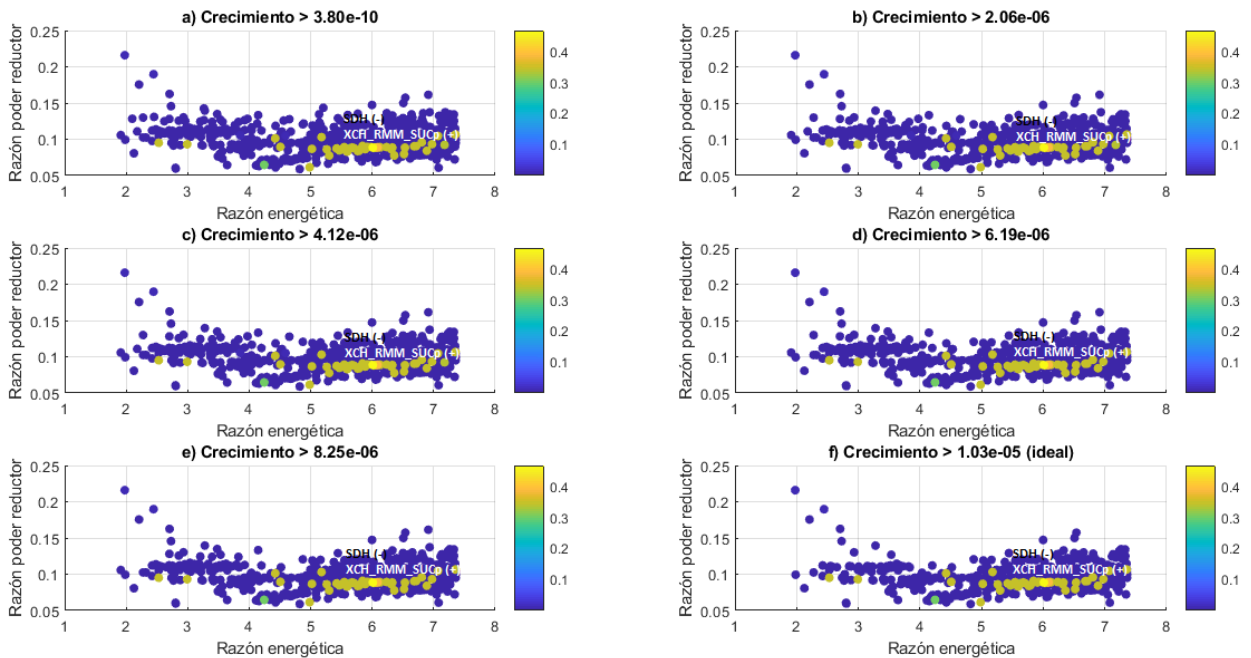


Figura 101. Gráficos de producción de ácido succínico en la zona de factibilidad biológica para glucosa, para cada restricción en el crecimiento en las simulaciones con dos mutaciones

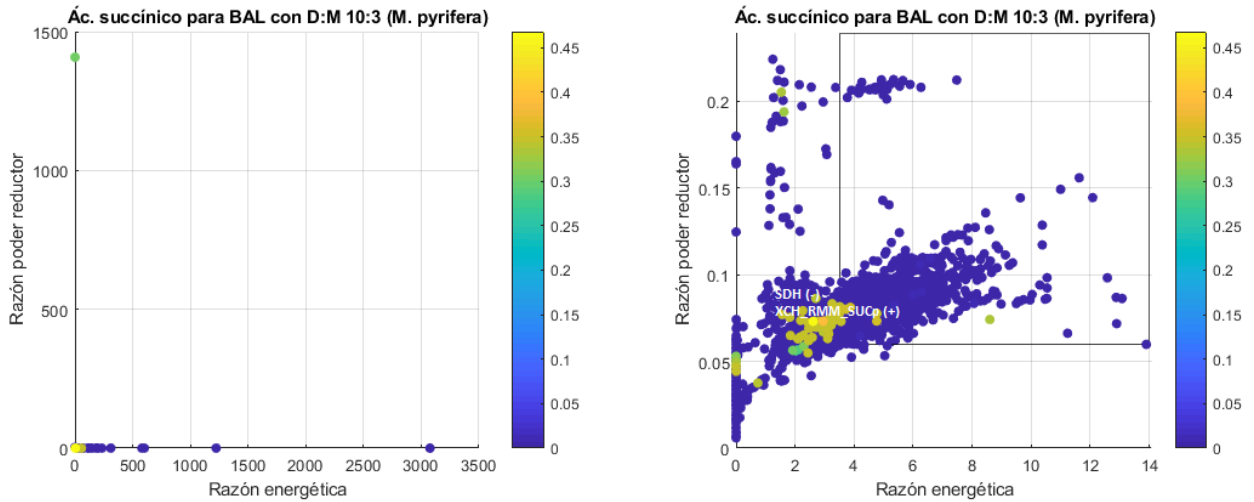


Figura 102. Gráficos que muestran la relación entre producción de ácido succínico (en escala de colores), razón de poder reductor y razón energética para cada simulación realizada con *M. pirifera* como sustrato. A la izquierda, el gráfico de todas las simulaciones; a la derecha, el gráfico con las simulaciones cercanas a la zona factible graficada con un rectángulo.

En cuanto al código de Matlab, en este caso hay que cambiar la función Optimizador y el *main*, por lo siguiente:

```
function [v_opt, g_opt] = Optimizador
(C,S,y0,G,Gctes,filetocombine2,filetosave)
% C: matriz estequiométrica
% S: vector de flujos de entrada (s_j>0) o salidas (s_j<0) de cada metabolito
% y0: vector de condiciones iniciales [mmol/L]
% Gctes: vector con ceros en la posición de las enzimas que no pueden ser
modificadas
% Función que entrega el flujo óptimo para cada G

%%
%Para todo G interesante, cambiar g sin cambiar los Gctes
Gi = G;
Gcomb = zeros(93,1);
y_est = zeros(86,1);
v_est = zeros(93,1);
v_suc = 0;
v_growth = 0;
redox = 0;
energy = 0;

% %Dos cambios
fileID2 = fopen(filetocombine2,'r');
formatSpec = '%d %d %d %d';
sizeB = [4 Inf];
B = fscanf(fileID2,formatSpec,sizeB);
B = B';
fclose(fileID2);
b = 0;
```

```

for i = 1 : length(B)
    if Gctes(B(i,1)) ~= 0
        if Gctes(B(i,3)) ~= 0
            b = b + 1;
            Gi(B(i,1)) = B(i,2);
            Gi(B(i,3)) = B(i,4);
            Gcomb(:,b) = Gi;
            [y, v] = Integrador_estacionario (y0,S,C,Gi);
            y_est(:,b) = y';
            v_est(:,b) = v;
            v_suc(:,b) = v(67);
            v_growth(b) = v(28);
            redox(b) = ((y(20)+y(22))/(y(19)+y(21)));
            energy(b) = (y(53)/y(51));
            Gi = G;
        end
    end
end

[v_opt, r_max] = max(v_suc(:));
g_opt = Gcomb(:,r_max);

save(filetosave, 'B','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_suc', 'v_growth', 'redox','energy')

end

%MAIN para succinato - 2 cambios

%% Cargar matriz estequiométrica C
C = sparse(xlsread('Matriz_estequiometrica.xlsx','Hojal','A1:CO86'));

%% Definir entradas
%Definir S para glucosa
S = zeros(86,1);
S(62) = 0.23/100; %entrada de GLCx
%Definir S para manitol puro
S1 = zeros(86,1);
S1(9) = 0.23; %entrada a F6P
S1(19) = -0.23; %uso de NAD en entrada a F6P
S1(20) = 0.23; %producción de NADH en entrada a F6P
%Definir S para manitol:DEHU 0.177:0.053
S2 = zeros(86,1);
S2(9) = 0.177; %entrada a F6P
S2(19) = -0.177; %uso de NAD en entrada a F6P
S2(20) = 0.177; %producción de NADH en entrada a F6P
S2(83) = 0.053; %entrada a KDG
S2(20) = -0.053; %uso de NADH en entrada a KDG
S2(19) = 0.053; %producción de NAD en entrada a KDG
S2(17) = 0.053; %entrada a KDPG
S2(53) = -0.053; %uso de ATP en entrada a KDPG
S2(51) = 0.053; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.142:0.088
S3 = zeros(86,1);
S3(9) = 0.142; %entrada a F6P

```

```

S3(19) = -0.142; %uso de NAD en entrada a F6P
S3(20) = 0.142; %producción de NADH en entrada a F6P
S3(83) = 0.088; %entrada a KDG
S3(20) = -0.088; %uso de NADH en entrada a KDG
S3(19) = 0.088; %producción de NAD en entrada a KDG
S3(17) = 0.088; %entrada a KDPG
S3(53) = -0.088; %uso de ATP en entrada a KDPG
S3(51) = 0.088; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.088:0.142
S4 = zeros(86,1);
S4(9) = 0.088; %entrada a F6P
S4(19) = -0.088; %uso de NAD en entrada a F6P
S4(20) = 0.088; %producción de NADH en entrada a F6P
S4(83) = 0.142; %entrada a KDG
S4(20) = -0.142; %uso de NADH en entrada a KDG
S4(19) = 0.142; %producción de NAD en entrada a KDG
S4(17) = 0.142; %entrada a KDPG
S4(53) = -0.142; %uso de ATP en entrada a KDPG
S4(51) = 0.142; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para manitol:DEHU 0.053:0.177
S5 = zeros(86,1);
S5(9) = 0.053; %entrada a F6P
S5(19) = -0.053; %uso de NAD en entrada a F6P
S5(20) = 0.053; %producción de NADH en entrada a F6P
S5(83) = 0.177; %entrada a KDG
S5(20) = -0.177; %uso de NADH en entrada a KDG
S5(19) = 0.177; %producción de NAD en entrada a KDG
S5(17) = 0.177; %entrada a KDPG
S5(53) = -0.177; %uso de ATP en entrada a KDPG
S5(51) = 0.177; %producción de ADP en entrada a KDPG
%Definir S para DEHU puro
S6 = zeros(86,1);
S6(83) = 0.23; %entrada a KDG
S6(20) = -0.23; %uso de NADH en entrada a KDG
S6(19) = 0.23; %producción de NAD en entrada a KDG
S6(17) = 0.23; %entrada a KDPG
S6(53) = -0.23; %uso de ATP en entrada a KDPG
S6(51) = 0.23; %producción de ADP en entrada a KDPG

%% Definir G
%Definir G para glucosa
G = ones(93,1);
G(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
G(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

%Definir G para manitol:DEHU
G_MD = ones(93,1);
G_MD(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
G_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
G_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
G_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%% Definir Gctes
%Definir Gctes para glucosa
Gctes_GLC = ones(93,1);
Gctes_GLC(61) = 0; %no cambiar la entrada de GLC

```

```

Gctes_GLC(47) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(48) = 0; %no cambiar la entrada de GLC
Gctes_GLC(73) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_GLC(74) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_GLC(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_GLC(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
Gctes_GLC(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

```

```
%Definir Gctes para manitol:DEHU
```

```

Gctes_MD = ones(93,1);
Gctes_MD(73) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_MD(74) = 0; %no cambiar salida de etanol
Gctes_MD(93) = 0; %no cambiar degradación ACE
Gctes_MD(65:70) = 0; %apagar lactato y formato
Gctes_MD(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI
Gctes_MD(61) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(47) = 0; %apagar la entrada de GLC
Gctes_MD(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

```

```
%% Condiciones iniciales
```

```

y0 = zeros(86,1);
y0(1) = 0.154743; %ACCOA, mmol/L
y0(2) = 0.0321498; %ACO, mmol/L
y0(3) = 0.0143909; %ACP, mmol/L
y0(4) = 0.59787; %AKG, mmol/L
y0(5) = 0.0654106; %BPG, mmol/L
y0(6) = 0.0895305; %CIT, mmol/L
y0(7) = 0.437094; %DAP, mmol/L
y0(8) = 0.1313; %E4P, mmol/L
y0(9) = 0.261766; %F6P, mmol/L
y0(10) = 0.281808; %FDP, mmol/L
y0(11) = 0.213115; %FUM, mmol/L
y0(12) = 0.86113; %G6P, mmol/L
y0(13) = 0.117183; %GAP, mmol/L
y0(14) = 0.00326165; %GL6P, mmol/L
y0(15) = 0.00881041; %GLX, mmol/L
y0(16) = 0.105782; %ICIT, mmol/L
y0(17) = 0.0868177; %KDPG, mmol/L
y0(18) = 1.03215; %MAL, mmol/L
y0(19) = 1.41154; %NAD, mmol/L
y0(20) = 0.158456; %NADH, mmol/L
y0(21) = 0.167837; %NADP, mmol/L
y0(22) = 0.0891628; %NADPH, mmol/L
y0(23) = 0.12784; %OAA, mmol/L
y0(24) = 0.997038; %PEP, mmol/L
y0(25) = 0.378297; %PGA2, mmol/L
y0(26) = 0.696274; %PGA3, mmol/L
y0(27) = 0.1316; %PGN, mmol/L
y0(28) = 0.236891; %PYR, mmol/L
y0(29) = 0.326117; %Q, mmol/L
y0(30) = 0.673883; %QH2, mmol/L
y0(31) = 0.106842; %R5P, mmol/L
y0(32) = 0.341827; %RU5P, mmol/L
y0(33) = 0.141985; %S7P, mmol/L
y0(34) = 0.216055; %SUC, mmol/L
y0(35) = 0.0410878; %SUCCOA, mmol/L
y0(36) = 0.506018; %X5P, mmol/L

```

```

y0(37) = 0.000334013; %ei, mmol/L
y0(38) = 0.00638116; %eiP, mmol/L
y0(39) = 0.0142019; %eiia, mmol/L
y0(40) = 0.480569; %eiiaP, mmol/L
y0(41) = 4.7191E-05; %eiicb, mmol/L
y0(42) = 0.000342621; %eiicbP, mmol/L
y0(43) = 0.000191212; %hpr, mmol/L
y0(44) = 0.00525081; %hprP, mmol/L
y0(45) = 0.000542744; %icd, mmol/L
y0(46) = 0.0514573; %icdP, mmol/L
y0(47) = 0.00278094; %tal, mmol/L
y0(48) = 0.0572191; %talC3, mmol/L
y0(49) = 0.0138308; %tkt, mmol/L
y0(50) = 0.0561692; %tktC2, mmol/L
y0(51) = 0.598315; %ADP, mmol/L
y0(52) = 0.186253; %AMP, mmol/L
y0(53) = 2.5722; %ATP, mmol/L
y0(54) = 0.923131; %CAMP, mmol/L
y0(55) = 9.76395; %P, mmol/L
y0(56) = 0.262683; %MgADP, mmol/L
y0(57) = 2.37121; %MgATP, mmol/L
y0(58) = 0.0413815; %MgFDP, mmol/L
y0(59) = 0.253914; %FAD, mmol/L
y0(60) = 0.746086; %FADH2, mmol/L
y0(61) = 0.000186708; %ACE, mmol/L
y0(62) = 0.00633337; %GLCx, mmol/L
y0(63) = 0.000186687; %ACEx, mmol/L
y0(64) = 5.37448E-05; %Hout, mmol/L
y0(65) = 0.00403337; %GLCp, mmol/L
y0(66) = 9.99943; %Pp, mmol/L
y0(67) = 0.000186697; %ACEp, mmol/L
y0(68) = 0.000186708; %FOR, mmol/L
y0(69) = 0.000186697; %FORp, mmol/L
y0(70) = 0.000186687; %FORx, mmol/L
y0(71) = 0.000186708; %LAC, mmol/L
y0(72) = 0.000186697; %LACp, mmol/L
y0(73) = 0.000186687; %LACx, mmol/L
y0(74) = 0.216055; %SUCp, mmol/L
y0(75) = 0.216055; %SUCx, mmol/L
y0(76) = 0.000186708; %ETH, mmol/L
y0(77) = 0.000186697; %ETHp, mmol/L
y0(78) = 0.000186687; %ETHx, mmol/L
y0(79) = 0.000186708; %AcAld, mmol/L
y0(80) = 0.000186708; %DEHU, mmol/L
y0(81) = 0.000186697; %DEHUp, mmol/L
y0(82) = 0.000186687; %DEHUx, mmol/L
y0(83) = 0.000186708; %KDG, mmol/L
y0(84) = 0.000186708; %MANI, mmol/L
y0(85) = 0.000186697; %MANIp, mmol/L
y0(86) = 0.000186687; %MANIx, mmol/L

```

```

%% Resolución del problema
% %Dos cambios
fileID2 = fopen('combi2.txt','w');
generate(2,1:93,[],fileID2)
fclose(fileID2);

```

```

%Glucosa
[v_opt_G, g_opt_G] = Optimizador
(C,S,y0,G,Gctes_GLC, 'combi2.txt', 'SUCglucosa.mat');
%Macrocystis
[v_opt_MD4, g_opt_MD4] = Optimizador
(C,S5,y0,G_MD,Gctes_MD, 'combi2.txt', 'SUCMD4.mat');

```

Además, para generar los gráficos se agregó la función Graficar, a la cual se le ingresan como parámetros los datos guardados en el *main*, para cada simulación, y el nombre del nuevo archivo donde se quieren guardar las demás matrices generadas:

```

function Graficar (file,filetosave)

load(file)

%ordenando vectores
[suc_orden, ind] = sort(v_suc, 'descend');
g_orden = Gcomb(:,ind);
redox_orden = redox(ind);
energy_orden = energy(ind);
growth_orden = v_growth(ind);

previos_growth = [1.0311E-5 1.4729E-5 1.3636E-5 1.0798E-5 4.086E-6 1.1887E-6
5.9954E-23];
previos_redox = [0.113702347 0.125328145 0.098880038 0.108329032 0.116695738
0.119356309 0.03434003];
previos_energy= [3.679517054 9.016425133 2.4479494 3.716678724 5.811656167
7.007174994 0.235110938];

%definir los límites
if S(62) == 0.23/100
    if previos_growth(1) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(1),6);
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(1);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(1);
elseif S(9) == 0.23
    if previos_growth(2) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(2),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(2);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(2);
elseif S(9) == 0.177
    if previos_growth(3) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(3),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(3);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(3);
elseif S(9) == 0.142
    if previos_growth(4) >= 3.8e-10

```



```

        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(4),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(4);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(4);
elseif S(9) == 0.088
    if previos_growth(5) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(5),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(5);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(5);
elseif S(9) == 0.053
    if previos_growth(6) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(6),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(6);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(6);
elseif S(83) == 0.23
    if previos_growth(7) >= 3.8e-10
        limites_growth = linspace(3.8e-10,previos_growth(7),6);
    else
        limites_growth = 0;
    end
    limites_redox = [0.5 2]*previos_redox(7);
    limites_energy= [0.5 2]*previos_energy(7);
end

figure
subplot(1,2,1)
scatter3(energy_orden,redox_orden,suc_orden,[],suc_orden,'filled')
colorbar
if S(62) == 0.23/100
    title('Ác. succínico para BAL con glucosa')
elseif S(9) == 0.23
    title('Ác. succínico para BAL con manitol')
elseif S(9) == 0.177
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 3:10')
elseif S(9) == 0.142
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
elseif S(9) == 0.088
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 8:5')
elseif S(9) == 0.053
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 10:3 (M. pyrifer)')
elseif S(83) == 0.23
    title('Ác. succínico para BAL con DEHU')
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(1,2,2)
scatter3(energy_orden,redox_orden,suc_orden,[],suc_orden,'filled')
colorbar

```

```

view(0,90)
if S(62) == 0.23/100
    title('Ác. succínico para BAL con glucosa')
    axis([0 7.4 0 0.23])
elseif S(9) == 0.23
    title('Ác. succínico para BAL con manitol')
    axis([0 18.1 0 0.26])
elseif S(9) == 0.177
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 3:10')
    axis([0 5 0 0.2])
elseif S(9) == 0.142
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 5:8 (S. japonica)')
    axis([0 7.5 0 0.22])
elseif S(9) == 0.088
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 8:5')
    axis([0 12 0 0.24])
elseif S(9) == 0.053
    title('Ác. succínico para BAL con D:M 10:3 (M. pyriferá)')
    axis([0 14.1 0 0.24])
elseif S(83) == 0.23
    title('Ác. succínico para BAL con DEHU')
    axis([0 0.5 0 0.07])
end
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
hold on
rectangle('Position',[limites_energy(1) limites_redox(1) (limites_energy(2)-
limites_energy(1)) (limites_redox(2)-limites_redox(1))])
hold off

if limites_growth == 0
    [v_opt, r_max] = max(v_suc(:));
    g_opt = Gcomb(:,r_max);
    redox_orden=redox_orden';
    energy_orden=energy_orden';
    growth_orden=growth_orden';
    suc_orden=suc_orden';
    save(filetosave, 'B','Gcomb', 'v_est', 'y_est', 'C', 'S', 'Gctes', 'y0',
'v_opt', 'g_opt', 'v_suc', 'limites_growth', 'limites_redox',
'limites_energy', 'v_growth', 'redox','energy', 'suc_orden','g_orden','ind',
'redox_orden', 'energy_orden','growth_orden')
    return
end

energy_plot = 0;
redox_plot = 0;
suc_plot = 0;
growth_plot = 0;
g_plot_i = 0;
g_plot = 0;
d = 0;
for i = 1 : length(limites_growth)
    for j = 1 : length(suc_orden)
        if growth_orden(j) ~= 0

```

```

        if growth_orden(j) >= limites_growth(i)
            if redox_orden(j) >= limites_redox(1)
                %if redox_orden(j) ~= 0
                    if redox_orden(j) <= limites_redox(2)
                        if energy_orden(j) >= limites_energy(1)
                            %if energy_orden(j) ~= 0
                                if energy_orden(j) <= limites_energy(2)
                                    d = d + 1;
                                    growth_plot(d,i) = growth_orden(j);
                                    energy_plot(d,i) = energy_orden(j);
                                    redox_plot(d,i) = redox_orden(j);
                                    suc_plot(d,i) = suc_orden(j);
                                end
                            end
                        end
                    end
                end
            end
        end
    end
end
d = 0;
end

```

```

energy_plot1 = 0; redox_plot1 = 0; suc_plot1 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,1) ~= 0 && redox_plot(j,1) ~= 0 && suc_plot(j,1) ~= 0
        energy_plot1(j) = energy_plot(j,1);
        redox_plot1(j) = redox_plot(j,1);
        suc_plot1(j) = suc_plot(j,1);
        growth_plot1(j) = growth_plot(j,1);
    end
end
energy_plot2 = 0; redox_plot2 = 0; suc_plot2 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,2) ~= 0 && redox_plot(j,2) ~= 0 && suc_plot(j,2) ~= 0
        energy_plot2(j) = energy_plot(j,2);
        redox_plot2(j) = redox_plot(j,2);
        suc_plot2(j) = suc_plot(j,2);
        growth_plot2(j) = growth_plot(j,2);
    end
end
energy_plot3 = 0; redox_plot3 = 0; suc_plot3 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,3) ~= 0 && redox_plot(j,3) ~= 0 && suc_plot(j,3) ~= 0
        energy_plot3(j) = energy_plot(j,3);
        redox_plot3(j) = redox_plot(j,3);
        suc_plot3(j) = suc_plot(j,3);
        growth_plot3(j) = growth_plot(j,3);
    end
end
energy_plot4 = 0; redox_plot4 = 0; suc_plot4 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,4) ~= 0 && redox_plot(j,4) ~= 0 && suc_plot(j,4) ~= 0
        energy_plot4(j) = energy_plot(j,4);
    end
end

```

```

        redox_plot4(j) = redox_plot(j,4);
        suc_plot4(j) = suc_plot(j,4);
        growth_plot4(j) = growth_plot(j,4);
    end
end
energy_plot5 = 0; redox_plot5 = 0; suc_plot5 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,5) ~= 0 && redox_plot(j,5) ~= 0 && suc_plot(j,5) ~= 0
        energy_plot5(j) = energy_plot(j,5);
        redox_plot5(j) = redox_plot(j,5);
        suc_plot5(j) = suc_plot(j,5);
        growth_plot5(j) = growth_plot(j,5);
    end
end
energy_plot6 = 0; redox_plot6 = 0; suc_plot6 = 0;
for j = 1 : length(suc_plot)
    if energy_plot(j,6) ~= 0 && redox_plot(j,6) ~= 0 && suc_plot(j,6) ~= 0
        energy_plot6(j) = energy_plot(j,6);
        redox_plot6(j) = redox_plot(j,6);
        suc_plot6(j) = suc_plot(j,6);
        growth_plot6(j) = growth_plot(j,6);
    end
end

figure
subplot(3,2,1)
scatter3(energy_plot1,redox_plot1,suc_plot1,[],suc_plot1,'filled')
colorbar
titulo1 = sprintf('a) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(1));
title(titulo1)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,2)
scatter3(energy_plot2,redox_plot2,suc_plot2,[],suc_plot2,'filled')
colorbar
titulo2 = sprintf('b) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(2));
title(titulo2)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,3)
scatter3(energy_plot3,redox_plot3,suc_plot3,[],suc_plot3,'filled')
colorbar
titulo3 = sprintf('c) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(3));
title(titulo3)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,4)
scatter3(energy_plot4,redox_plot4,suc_plot4,[],suc_plot4,'filled')
colorbar
titulo4 = sprintf('d) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(4));
title(titulo4)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)

```

```

subplot(3,2,5)
scatter3(energy_plot5,redox_plot5,suc_plot5,[],suc_plot5,'filled')
colorbar
titulo5 = sprintf('e) Crecimiento > %0.2e',limites_growth(5));
title(titulo5)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)
subplot(3,2,6)
scatter3(energy_plot6,redox_plot6,suc_plot6,[],suc_plot6,'filled')
colorbar
titulo6 = sprintf('f) Crecimiento > %0.2e (ideal)',limites_growth(6));
title(titulo6)
xlabel('Razón energética')
ylabel('Razón poder reductor')
view(0,90)

[v_opt, r_max] = max(v_suc(:));
g_opt = Gcomb(:,r_max);

redox_orden=redox_orden';
energy_orden=energy_orden';
growth_orden=growth_orden';
suc_orden=suc_orden';

save(filetosave, 'suc_orden','g_orden','ind', 'redox_orden',
'energy_orden','growth_orden','growth_plot','suc_plot','redox_plot','energy_pl
ot')

end

```

9.15.2.3. Tres o más mutaciones

Empleando los mismos programas anteriores para ácido succínico, el código del *main* de Matlab utilizado para estas simulaciones es el siguiente:

```

%MAIN

%% Cargar matriz estequiométrica C
C = sparse(xlsread('Matriz_estequiometrica.xlsx','Hojal','A1:C086'));

%% Definir entradas
%Definir S para m pyrifera
S = zeros(86,1);
S(9) = 0.053; %entrada a F6P
S(19) = -0.053; %uso de NAD en entrada a F6P
S(20) = 0.053; %producción de NADH en entrada a F6P
S(83) = 0.177; %entrada a KDG
S(20) = -0.177; %uso de NADH en entrada a KDG
S(19) = 0.177; %producción de NAD en entrada a KDG
S(17) = 0.177; %entrada a KDPG
S(53) = -0.177; %uso de ATP en entrada a KDPG

```

S(51) = 0.177; %producción de ADP en entrada a KDPG

%% Definir los G

%Definir G para manitol:DEHU

G = ones(93,1);

G(65:70) = 0; %apagar lactato y formato

G(77:83) = 0; %apagar sistema de DEHU y de MANI

G(61) = 0; %apagar la entrada de GLC

G(47) = 0; %apagar la entrada de GLC

G(48) = 0; %apagar la entrada de GLC

%G1: -SDH + XCH_RMM_SUCp - ALDH

G1 = G;

G1(54) = 0;

G1(75) = 2;

G1(71) = 0;

%G2: -SDH + XCH_RMM_SUCp + EDA

G2 = G;

G2(54) = 0;

G2(75) = 2;

G2(15) = 2;

%G3: -SDH + XCH_RMM_SUCp - ALDH + EDA

G3 = G;

G3(54) = 0;

G3(75) = 2;

G3(71) = 0;

G3(15) = 2;

%G4: -SDH + XCH_RMM_SUCp - ALDH + EDA + XCH_RMM_SUCx

G4 = G;

G4(54) = 0;

G4(75) = 2;

G4(71) = 0;

G4(15) = 2;

G4(76) = 2;

%% Condiciones iniciales

y0 = zeros(86,1);

y0(1) = 0.154743; %ACCOA, mmol/L

y0(2) = 0.0321498; %ACO, mmol/L

y0(3) = 0.0143909; %ACP, mmol/L

y0(4) = 0.59787; %AKG, mmol/L

y0(5) = 0.0654106; %BPG, mmol/L

y0(6) = 0.0895305; %CIT, mmol/L

y0(7) = 0.437094; %DAP, mmol/L

y0(8) = 0.1313; %E4P, mmol/L

y0(9) = 0.261766; %F6P, mmol/L

y0(10) = 0.281808; %FDP, mmol/L

y0(11) = 0.213115; %FUM, mmol/L

y0(12) = 0.86113; %G6P, mmol/L

y0(13) = 0.117183; %GAP, mmol/L

y0(14) = 0.00326165; %GL6P, mmol/L

y0(15) = 0.00881041; %GLX, mmol/L

y0(16) = 0.105782; %ICIT, mmol/L

y0(17) = 0.0868177; %KDPG, mmol/L
y0(18) = 1.03215; %MAL, mmol/L
y0(19) = 1.41154; %NAD, mmol/L
y0(20) = 0.158456; %NADH, mmol/L
y0(21) = 0.167837; %NADP, mmol/L
y0(22) = 0.0891628; %NADPH, mmol/L
y0(23) = 0.12784; %OAA, mmol/L
y0(24) = 0.997038; %PEP, mmol/L
y0(25) = 0.378297; %PGA2, mmol/L
y0(26) = 0.696274; %PGA3, mmol/L
y0(27) = 0.1316; %PGN, mmol/L
y0(28) = 0.236891; %PYR, mmol/L
y0(29) = 0.326117; %Q, mmol/L
y0(30) = 0.673883; %QH2, mmol/L
y0(31) = 0.106842; %R5P, mmol/L
y0(32) = 0.341827; %RU5P, mmol/L
y0(33) = 0.141985; %S7P, mmol/L
y0(34) = 0.216055; %SUC, mmol/L
y0(35) = 0.0410878; %SUCCOA, mmol/L
y0(36) = 0.506018; %X5P, mmol/L
y0(37) = 0.000334013; %ei, mmol/L
y0(38) = 0.00638116; %eiP, mmol/L
y0(39) = 0.0142019; %eiia, mmol/L
y0(40) = 0.480569; %eiiaP, mmol/L
y0(41) = 4.7191E-05; %eiicb, mmol/L
y0(42) = 0.000342621; %eiicbP, mmol/L
y0(43) = 0.000191212; %hpr, mmol/L
y0(44) = 0.00525081; %hprP, mmol/L
y0(45) = 0.000542744; %icd, mmol/L
y0(46) = 0.0514573; %icdP, mmol/L
y0(47) = 0.00278094; %tal, mmol/L
y0(48) = 0.0572191; %talC3, mmol/L
y0(49) = 0.0138308; %tkt, mmol/L
y0(50) = 0.0561692; %tktC2, mmol/L
y0(51) = 0.598315; %ADP, mmol/L
y0(52) = 0.186253; %AMP, mmol/L
y0(53) = 2.5722; %ATP, mmol/L
y0(54) = 0.923131; %CAMP, mmol/L
y0(55) = 9.76395; %P, mmol/L
y0(56) = 0.262683; %MgADP, mmol/L
y0(57) = 2.37121; %MgATP, mmol/L
y0(58) = 0.0413815; %MgFDP, mmol/L
y0(59) = 0.253914; %FAD, mmol/L
y0(60) = 0.746086; %FADH2, mmol/L
y0(61) = 0.000186708; %ACE, mmol/L
y0(62) = 0.00633337; %GLCx, mmol/L
y0(63) = 0.000186687; %ACEx, mmol/L
y0(64) = 5.37448E-05; %Hout, mmol/L
y0(65) = 0.00403337; %GLCp, mmol/L
y0(66) = 9.99943; %Pp, mmol/L
y0(67) = 0.000186697; %ACEp, mmol/L
y0(68) = 0.000186708; %FOR, mmol/L
y0(69) = 0.000186697; %FORp, mmol/L
y0(70) = 0.000186687; %FORx, mmol/L
y0(71) = 0.000186708; %LAC, mmol/L
y0(72) = 0.000186697; %LACp, mmol/L
y0(73) = 0.000186687; %LACx, mmol/L

```

y0(74) = 0.216055; %SUCp, mmol/L
y0(75) = 0.216055; %SUCx, mmol/L
y0(76) = 0.000186708; %ETH, mmol/L
y0(77) = 0.000186697; %ETHp, mmol/L
y0(78) = 0.000186687; %ETHx, mmol/L
y0(79) = 0.000186708; %AcAld, mmol/L
y0(80) = 0.000186708; %DEHU, mmol/L
y0(81) = 0.000186697; %DEHUp, mmol/L
y0(82) = 0.000186687; %DEHUx, mmol/L
y0(83) = 0.000186708; %KDG, mmol/L
y0(84) = 0.000186708; %MANI, mmol/L
y0(85) = 0.000186697; %MANIp, mmol/L
y0(86) = 0.000186687; %MANIx, mmol/L

```

```
%% Resolución del problema
```

```

[y_est1, v_est1] = Integrador_estacionario (y0,S,C,G1);
[y_est2, v_est2] = Integrador_estacionario (y0,S,C,G2);
[y_est3, v_est3] = Integrador_estacionario (y0,S,C,G3);
[y_est4, v_est4] = Integrador_estacionario (y0,S,C,G4);

redox1 = (y_est1(20)+y_est1(22))/(y_est1(19)+y_est1(21));
redox2 = (y_est2(20)+y_est2(22))/(y_est2(19)+y_est2(21));
redox3 = (y_est3(20)+y_est3(22))/(y_est3(19)+y_est3(21));
redox4 = (y_est4(20)+y_est4(22))/(y_est4(19)+y_est4(21));

energy1 = y_est1(53)/y_est1(51);
energy2 = y_est2(53)/y_est2(51);
energy3 = y_est3(53)/y_est3(51);
energy4 = y_est4(53)/y_est4(51);

```

9.16. Nomenclatura

AC: metabolismo de acetato

AcAld: acetaldehido

ACCOA: acetilCoA

ACE: acetato

ACEA: isocitrato liasa

ACEB: malato sintasa

ACEK_1: kinasa de ICD

ACEK_2: kinasa 2 de ICD

ACEp: acetato periplasmático

ACEx: acetato extracelular

ACK: acetato kinasa

ACN_1: aconitasa 1

ACN_2: aconitasa 2

ACO: cis-aconitato
ACP: acetil-fosfato
ACS: acetato sintasa
ADH: alcohol deshidrogenasa
AdhB: alcohol deshidrogenasa B
ADK: Adenilato kinasa
ADP: adenosin-difosfato
AKG: alfa-cetoglutarato
ALDH: alcetaldehido deshidrogenasa
AMP: adenosin-monofosfato
AR: reacciones anapleróticas
ASP: ácido aspártico
ATP: adenosin-trifosfato
ATP_MAIN: ATP para mantenimiento
ATP_SYN: ATP sintetasa
BPG: bifosfoglicerato
cAMP: AMP cíclico
CIT: citrato
COA: CoA
CYA: Adenilato ciclasa
CYS: cisteína
CYTBO: citocromo B oxidasa
DHAP: dihidroxiacetona fosfato
DehR: DEHU reductasa
DEHU: ácido urónico 4-deoxi-L-eritro-5-hexoseulosa
DEHU_FEED: alimentación de DEHU
DEHUp: DEHU periplasmático
DEHUx: DEHU extracelular
DOS: cAMP fosfodiesterasa
EDA: KDG-6-fosfato aldolasa
EDD: gluconato-6-fosfato deshidratasa
EDP: Ruta de Entner-Doudoroff

ei, eiia, eiiaP, eiicb, eiicbP, eiP, hpr, hprP: metabolitos de la cadena de fosforilación de glucosa

EMT: glicólisis y gluconeogénesis

ENO: enolasa

ETH: etanol

ETHp: etanol periplasmático

ETHx: etanol extracelular

E4P: eritrisa-4-fosfato

FAD: dinucleótido de flavina y adenina

FADH2: FAD reducido

FBA: aldolasa

FBP: fructose-bifosfatasa

FDP: fructose-bifosfato

FOR: formiato

FORp: formiato periplasmático

FORx: formiato extracelular

FP: Rutas fermentativas

FUM: fumarato

FUMA: fumarato deshidrogenasa

F6P: fructosa-6-fosfato

F6P_E4P_TKT: transcetolasa de F6P a E4P

F6P_GAP_TAL: transaldolasa de F6P a GAP

GAP: gliceraldehido-3-fosfato

GDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GLC_FEED: alimentación de glucosa

GLCp: glucosa periplasmática

GLCx: glucosa extracelular

GLT: citrato sintasa

GLX: glioxilato

GL6P: 6-fosfato-gluconolactona

GL6P_HYDROLYSIS: hidrólisis espontánea de 6-fosfato-gluconolactona

GND: 6-fosfogluconato deshidrogenasa

GPM: fosfoglicerato mutasa

GROWTH: crecimiento
GS: ruta de glioxilato
G6P: glucosa-6-fosfato
HCO₃: carbonato
Hin: protones en intracelular
Hout: protones en extracelular
ICD: isocitrato deshidrogenasa
icd: isocitrato deshidrogenasa (como molécula)
icdP: isocitrato deshidrogenasa fosforilada
ICIT: isocitrato
KDG: 2-ceto-3-deoxi-gluconato
KDGK: KDG kinasa
KDPG: 2-ceto-3-deoxi-fosfogluconato
LAC: lactato
LACp: lactato periplasmático
LACx: lactato extracelular
LDH: lactato deshidrogenasa
LPD: alfa-cetoglutarato deshidrogenasa
MAD: enzima málica
MAE_B: enzima málica B
MAL: malato
MANI: manitol
MANI_FEED: alimentación de manitol
MANIp: manitol periplasmático
MANIx: manitol extracelular
MDH: malato deshidrogenasa
MG: magnesio
MgADP: complejo ADP-magnesio
MgATP: complejo ATP-magnesio
MgFDP: complejo FDP-magnesio
MN: manganeso
MQO: malato-quinona oxidoreductasa
MtlD: manitol-1-fosfato-5-dehidrogenasa

NAD: dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina reducida
NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NDH1: NADH dehidrogenasa I
NDH2: NADH dehidrogenasa II
NC&T: conversión de nucleótidos y transhidrogenasas
OAA: oxaloacetato
OP: fosforilación oxidativa
O2: oxígeno molecular
P: fosfato
Pp: fosfato periplasma
Px: fosfato extracelular
PCK: fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PDC: piruvato decarboxilasa
PDH: piruvato deshidrogenasa
PEP: fosfoenolpiruvato
PFK: fosfofructokinasa
PFL: piruvato formiato-liasa
PGA2: 2 fosfoglicerato
PGA3: 3 fosfoglicerato
PGI: fosfoglucoisomerasa
PGK: fosfoglicerato kinasa
PGL: 6-fosfoglucolactonasa
PGN: 6-fosfogluconato (6PG)
PIT: transportador de fosfato
PNT: transhidrogenasas
PPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa
PPS: fosfoenolpiruvato sintasa
PPP: Ruta de las pentosas fosfato
PTA: fosfotransacetilasa
PTS: sistema de glucosa fosfotransferasa
PTS_0: hexokinasa

PTS_4: hexokinasa
PYK: piruvato kinasa
PYR: piruvato
Q: quinona
QH2: quinona reducida
RPE: ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa
RPI: ribosa-5-fosfato isomerasa
RU5P: ribulosa-5-fosfato
R5P: ribosa-5-fosfato
SDH: succinato deshidrogenasa
SK: succinilCoA sintetasa
SQR: complejo succinato deshidrogenasa
SUC: succinato
SUCCOA: succinilCoA
SUCp: succinato periplasmático
SUCx: succinato extracelular
S7P: sedoheptulosa-7-fosfato
S7P_E4P_TAL: transaldolasa de S7P a E4P
S7P_R5P_TKT: transacetolasa de S7P a R5P
tal: transaldolasa
talC3: transaldolasa con unidad C3
TCA: ciclo del ácido tricarboxílico
tkt: transacetolasa
tktC2: transacetolasa con unidad C2
TPI: triosa fosfato isomerasa
Vcell: volumen celular
Vperi: volumen periplasmático
Vxcell: volumen extracelular
XCH: reacciones de intercambio entre compartimientos
X5P: xilosa-5-fosfato
X5P_GAP_TKT: transacetolasa de X5P a GAP
ZWF: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa