



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

ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y DEL MEDIO
DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE XILANASA RECOMBINANTE EN
PICHIA PASTORIS Y DISEÑO DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA ESTIMAR
LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA EN METANOL.

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

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA.

ROMINA ALEJANDRA CORRO TEJEDA

PROFESORA GUÍA:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

SANTIAGO DE CHILE
2021

RESUMEN

La endo-1,4- β -xilanasas es una enzima que cataliza la hidrólisis del xilano, liberando xilosa y xilooligosacáridos (XOS), oligosacáridos compuestos por 2 a 10 monómeros y los estudios sobre su producción han ido en aumento por su carácter prebiótico. Entre los beneficios de su consumo se encuentra el fortalecimiento del sistema inmunológico. La producción suele ser de 2 etapas, un pretratamiento y una hidrólisis enzimática. Por esto es de interés el diseño de un sistema de producción en una etapa, así surge la implementación de un sistema *in situ*. Entre las ventajas de este sistema están la reducción de pasos y disminución de costos.

Sin embargo, las condiciones óptimas de crecimiento difieren de las usadas en la hidrólisis enzimática, por lo que es importante identificar estas condiciones para el sistema *in situ*. Además, es de interés diseñar un modelo matemático para predecir la producción de la enzima a partir de las reacciones metabólicas de *P. pastoris*.

Entonces, la tesis tiene como objetivo principal estudiar el efecto de distintos factores y de los componentes del medio de cultivo sobre la producción de xilanasas recombinante en *Pichia pastoris* y diseñar un modelo matemático que estime la producción de la enzima en metanol.

La metodología general fue estudiar el efecto del pH, temperatura, concentración de metanol y tipo de *buffer* sobre la actividad xilanasas GtXyn10A. Luego, estudiar el crecimiento de *P. pastoris* y la producción de la enzima por parte del mismo, usando condiciones apropiadas para la actividad enzimática. Después, se hace un Análisis de Flujos Metabólicos, con 69 reacciones que participan en la síntesis, usando *solver* de Microsoft Excel. Posteriormente se construye el modelo matemático realizando un Análisis de Balance de Flujos en Cobrapy.

Entre los principales resultados se encontró que usar metanol al 1 %, a pH 6 y a 30°C pueden ser usados para el diseño del sistema *in situ*. También, se propone reemplazar el *buffer* fosfato y el YNB (*Yeast Nitrogen Base*) por *buffer* citrato y casaminoácidos respectivamente ya que fueron identificados como inhibidores fuertes. Se proponen 3 nuevos medios de cultivos de los cuales el MM* cit destacó por triplicar la productividad específica (1,38 [U/g·h]) durante las primeras 24 [h] de cultivo en relación al medio BMMY (0,46 [U/g·h]).

En cuanto al modelo matemático, se logró establecer la reacción de síntesis de xilanasas recombinante, del cual se obtuvo una producción de 6,12 [g MetOH/g Xyl]. Además, el modelo matemático estimó una producción de 144,2 [mg Xyl/L], valor que se asemeja a la producción experimental obtenida (90,4 [mg Xyl/L]). La diferencia se atribuye principalmente a que Cobrapy es un optimizador, pudiendo sobreestimar la producción experimental.

Como proyecciones se tienen: estudiar el efecto que tiene la xilosa sobre la producción de la xilanasas recombinante, implementar el sistema *in situ* usando el medio MM* cit a 30°C y pH 6 y estudiar los rangos de concentración de metanol al que el modelo se ajusta correctamente.

ABSTRACT

The endo-1,4- β -xylanase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of xylan, releasing xylose and xylooligosaccharides (XOS), which are oligosaccharides composed of 2 to 10 monomers, and studies on its production have been increasing due to its prebiotic character. Among the benefits of their consumption is the strengthening of the immune system. The production usually consists of 2 stages, a pretreatment and an enzymatic hydrolysis. For this reason, the design of a one-stage production system is of interest, thus the implementation of an *in situ* system. Among the advantages of this system are the reduction of steps and cost reduction.

Nevertheless, the optimal growth conditions differ from those used in enzymatic hydrolysis, so it is important to identify these conditions for the *P. pastoris* system. In addition, it is of interest to design a mathematical model to predict enzyme production from the metabolic reactions of *P. pastoris*.

Therefore, the main objective of this thesis is to study the effect of different factors and the components of the culture medium on the production of recombinant xylanase in *Pichia pastoris* and to design a mathematical model to estimate the production of the enzyme in methanol.

The general methodology was to study the effect of pH, temperature, methanol concentration and type of *buffer* on GtXyn10A xylanase activity. Then, to study the growth of *P. pastoris* and the production of the enzyme by it, using appropriate conditions for the enzymatic activity. Then, a Metabolic Flux Analysis is done, with 69 reactions involved in the synthesis, using Microsoft Excel's *solver*. Subsequently, the mathematical model is built by performing a Flow Balance Analysis in Cobrapy.

Among the main results, it was found that using methanol at 1%, pH 6 and 30°C can be used for the design of the *in situ* system. Also, it is proposed to replace phosphate and YNB (Yeast Nitrogen Base) by citrate and casamino acids respectively since they were identified as strong inhibitors. Three new culture media were proposed of which MM* cit stood out for tripling the specific productivity (1.38 [U/g·h]) during the first 24 [h] of culture relative to BMMY medium (0.46 [U/g·h]).

As for the mathematical model, it was possible to establish the synthesis reaction of recombinant xylanase, from which a production of 6.12 [g MetOH/g Xyl] was obtained. In addition, the mathematical model estimated a production of 144.2 [mg Xyl/L], a value that is similar to the experimental production obtained (90.4 [mg Xyl/L]). The difference is mainly attributed to the fact that Cobrapy is an optimizer and can overestimate the experimental production.

As projections are: to study the effect that xylose has on the production of recombinant xylanase, to implement the *in situ* system using the MM* cit medium at 30°C and pH 6 and to study the methanol concentration ranges to which the model fits correctly.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
1.1. Marco Teórico	1
1.1.1. Biomasa Lignocelulósica	1
1.1.2. Xilano	2
1.1.3. Endo-1,4- β -xilanasa EC 3.2.1.8	4
1.1.4. Sistemas de producción nativos	8
1.1.5. Sistemas de producción recombinante	9
1.1.6. Sistemas de producción <i>in situ</i>	12
1.1.7. Modelos Matemáticos	13
1.2. Motivación	15
1.3. Objetivos	15
1.3.1. Objetivo General	15
1.3.2. Objetivos Específicos	15
2. Materiales y Metodología	16
2.1. Materiales	16
2.1.1. Reactivos	16
2.1.2. Equipos	17
2.1.3. Herramientas Computacionales	17
2.1.4. Microorganismo	17
2.1.5. Composición Medios de Cultivo	18
2.2. Metodología	19
2.2.1. Ensayo de Actividad	19
2.2.2. Análisis Estadístico	20
2.2.3. Medición de Concentración de Proteínas	22
2.2.4. Cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	22
2.2.5. Medición de Peso Seco	22
2.2.6. Filtración por columnas PD10	23
2.2.7. Análisis de Flujos Metabólicos (MFA)	24
2.2.8. Modelamiento Matemático de <i>Pichia pastoris</i>	25
3. Resultados y Discusión	27
3.1. Evaluación de las condiciones de cultivo de <i>Pichia pastoris</i> sobre la actividad enzimática.	27
3.1.1. Efecto de la concentración de metanol sobre la actividad enzimática	27
3.1.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática	29

3.1.3.	Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	30
3.1.4.	Efecto del <i>buffer</i> sobre la actividad enzimática	31
3.1.5.	Evaluación del efecto de los componentes del medio de inducción sobre la actividad enzimática	33
3.2.	Evaluación del efecto de componentes del medio BMMY sobre el crecimiento de <i>P. pastoris</i> y la producción de xilanasa recombinante.	35
3.2.1.	Efecto de los medios de cultivos sobre el crecimiento de <i>Pichia pastoris</i>	36
3.2.2.	Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de xilanasa	39
3.3.	Construcción de la reacción de producción de xilanasa.	49
3.4.	Resultado del Modelo Matemático de <i>Pichia pastoris</i>	56
4.	Conclusiones	59
	Bibliografía	75
	Anexos	75
A.	Secuencia GtXyn10A	76
A.1.	Secuencia Aminoacídica	76
A.2.	Secuencia Nucleotídica	77
B.	Preparación Materiales y Soluciones	79
B.1.	Preparación Buffers	79
B.2.	Preparación Soluciones Stock	80
B.3.	Preparación Medios de Cultivo	80
B.3.1.	Medio MM	80
B.3.2.	Medio BMGY	81
B.3.3.	Medio BMMY	81
C.	Curvas de Calibración	82
C.1.	Curva de Calibración de DNS	82
C.2.	Curva de Calibración de Bradford	83
D.	Imágenes complementarias	84
D.1.	Cultivo y Crecimiento de <i>Pichia pastoris</i>	84
D.2.	Medición Peso Seco	86
D.3.	Filtración Columnas PD10	88
E.	Aminoácidos Recomendados y Aportados	89
F.	Gráficos complementarios	90
F.1.	Crecimiento de <i>P. pastoris</i>	90
F.2.	Producción de Enzima Recombinante	96
F.3.	Relaciones	103
F.4.	Proporciones	110
G.	Modelo Matemático	117

G.1. Metabolitos	117
G.2. Reacciones	118
G.3. Matriz Estequiométrica	120
G.4. Código	124

Índice de tablas

1.1. Sistemas fúngicos de producción de proteínas nativas y las proteínas que cada uno produce.	8
1.2. Sistemas de producción nativos de xilanasas y condiciones de producción óptimas. Adaptado de [54].	8
1.3. Comparación de los sistemas de producción recombinantes en <i>Escherichia coli</i> (sistema procarionte), <i>Pichia pastoris</i> (sistema eucarionte fúngico) y células CHO (sistema eucarionte animal). Adaptado de [65].	10
2.1. Reactivos y kits usados durante el trabajo en laboratorio.	16
2.2. Equipos de laboratorio utilizados durante el trabajo de tesis.	17
2.3. Herramientas computacionales usadas durante el trabajo de tesis.	17
2.4. Composición del medio YPD líquido [69].	18
2.5. Composición del medio BMGY [69].	18
2.6. Composición del medio BMMY [69].	18
2.7. Factores analizados para el estudio de la actividad enzimática.	19
3.1. Resultados del análisis <i>t-student</i> para el ensayo de actividad hecho con distintas concentraciones de metanol.	28
3.2. Resultados del análisis <i>t-student</i> para el ensayo de actividad hecho con distintos pH's.	30
3.3. Composición de los medios de cultivos propuestos para el cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	35
3.4. Resultados del análisis <i>t-student</i> para el crecimiento de <i>P. pastoris</i> en los 4 medios estudiados.	37
3.5. Tasas de crecimiento de <i>P. pastoris</i> en los distintos medios de cultivos obtenidas durante las primeras 48 horas y su variación con respecto al medio BMMY fos, el cual fue usado de referencia.	38
3.6. Resultados del análisis <i>t-student</i> para el crecimiento de <i>P. pastoris</i> en los 4 medios estudiados eliminando el desplazamiento inicial de las curvas.	38
3.7. Resultados del análisis <i>t-student</i> para los cultivos de producción de enzima recombinante por parte de <i>Pichia pastoris</i>	43
3.8. Resultados del análisis <i>t-student</i> para las mediciones de promedio de actividad enzimática en los medios donde se cultivó <i>P. pastoris</i>	44
3.9. Resultados del análisis <i>t-student</i> para la relación entre actividad enzimática y concentración de proteína de los medios donde se cultivó <i>P. pastoris</i>	46
3.10. Resultados del análisis estadístico de <i>t-student</i> para la producción de enzima por biomasa en los medios donde se cultivó <i>P. pastoris</i>	47

3.11. Tasas de producción de enzima por unidad de biomasa máximas o productividad específica máxima de <i>P. pastoris</i> en los distintos medios de cultivos obtenidas durante las primeras 24 horas y su variación con respecto al medio BMMY fos, el cual es usado de referencia.	47
3.12. Resumen de los resultados obtenidos para los cultivos de <i>P. pastoris</i> y la producción de enzima recombinante. Los valores calculados para los medios BMMY cit, MM* fos y MM* cit fueron hechos usando de referencia los datos obtenidos para el medio BMMY fos.	48
3.13. Resultado parcial de la resolución del <i>solver</i> hecho en el programa Microsoft Excel. Ambos flujos y la diferencia están medidos en [mmol/cell·h].	51
3.14. Caracterización de los usos asignados al metanol a nivel celular y porcentajes máxicos de cada uno.	55
3.15. Condiciones de borde usadas para la construcción del modelo matemático de <i>P. pastoris</i>	58
A.1. Código de escritura de los aminoácidos, adaptado de [131].	77
A.2. Código de escritura de los nucleótidos, adaptado de [131].	78
E.1. Concentraciones de aminoácidos recomendados para las fermentaciones [114] y concentraciones de aminoácidos aportados por el hidrolizado de casaminoácidos [117].	89
F.1. Resultados del análisis <i>t-student</i> para las mediciones de peso seco en los matraces que contenían el medio MM* fos.	91
F.2. Resultados del análisis <i>t-student</i> para las mediciones de peso seco en los matraces que contenían el medio MM* cit.	92
F.3. Resultados del análisis <i>t-student</i> para las mediciones de concentración de proteína en los medios donde se cultivó <i>P. pastoris</i>	101
F.4. Resultados del análisis <i>t-student</i> para las mediciones de concentración de proteína en los matraces que contenían el medio MM* fos.	102
F.5. Resultados del análisis <i>t-student</i> para las mediciones diarias de concentración de proteína en los matraces que contenían el medio MM* fos.	103
F.6. Resultados del análisis <i>t-student</i> para la relación entre concentración de proteína y peso seco de los medios donde se cultivó <i>P. pastoris</i>	114
G.1. Metabolitos usados en el modelo matemático y nomenclatura usada.	117
G.2. Set de reacciones usadas para el modelamiento matemático de <i>P. pastoris</i>	119

Índice de figuras

1.1.	Estructura de la hemicelulosa. La cadena principal del xilano contiene xilasas unidas por enlaces β -1,4. Las enzimas que actúan sobre la cadena y las ramificaciones, se encuentran subrayadas, y las flechas indican el sitio de corte específico de cada una. Nomenclatura: Ac: Acetato; α -4-O-Me-GluUA: 4-O-ácido metilglucurónico; α -araf: α -arabinofurano; pcou./fer.: ácido p-cumárico/ferúlico. Adaptado de [18].	3
1.2.	Estructura general de los xilo-oligosacáridos. X_1 representa al monómero de la cadena, y (X_2) representa a la unión entre 2 monómeros, luego se tiene la estructura general de los xilo-oligosacáridos con $X_{(n+2)}$ donde $n \in \{1, 2, 3, 4, 5\}$. Adaptado de [18].	4
1.3.	Efecto del pH sobre la actividad enzimática de una xilanasa nativa. Ejemplo de una curva de dependencia, donde la actividad máxima encontrada fue a pH 2. A pH entre 1.0 y 5.0 (línea continua) se usó <i>buffer</i> ácido clorhídrico-acetato de sodio Walpole y a pH entre 4.0 y 7.5 (línea discontinua) se usó <i>buffer</i> McIlvaine Na_2HPO_4 -ácido cítrico. Adaptado de [35].	5
1.4.	Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las xilanasas XYNB y XYNB-DS con y sin [emim]OAc. Ejemplo de una curva de dependencia, donde las actividades máximas encontradas fueron entre 80 y 95°C. Nomenclatura: círculo abierto: xilanasa XYNB sin [emim]OAc; cuadrado abierto: xilanasa XYNB + 5% [emim]OAc; círculo relleno: xilanasa XYNB-DS sin [emim]OAc; cuadrado relleno: xilanasa XYNB-DS + 5% [emim]OAc. Adaptado de [36].	6
1.5.	Estructura tridimensional de la enzima GtXyn10A, a) vista lateral y b) vista superior. En rojo se muestran la estructura formada por hélices α , en amarillo las hojas β plegadas y en azul los <i>loops</i> de la molécula. Adaptado de [44] usando las herramientas MMDB y VAST+ [45].	7
1.6.	Mapa del vector de expresión pPIC9K. 5'AOX1: Promotor AOX1; S: Sitio de Clonamiento Multiple (MCS); TT: Señal de poliadenilación y terminación de la transcripción nativa del gen AOX1; HIS4: Gen de tipo salvaje de <i>Pichia</i> que codifica la histidinol deshidrogenasa; Kan: Gen de resistencia a kanamicina de Tn903 que confiere resistencia a Geneticin® en <i>Pichia pastoris</i> y resistencia a kanamicina en <i>E. coli</i> ; 3'AOX1: Secuencias del gen AOX1 que están más allá de las secuencias TT en 3'; pBR322: Origen de replicación de <i>E. coli</i> ; Amp: Gen de resistencia a la ampicilina; SnaB I, EcoR I y Avr II: Sitios de restricción; Bgl II, Sac I, Not I y Sal I: Sitios de restricción únicos [71]. . . .	11

2.1.	A la izquierda prueba <i>t-student</i> con 2 colas, a la derecha prueba <i>t-student</i> con 1 cola, donde α representa el riesgo. La zona azul representa la zona de rechazo de la hipótesis nula (H_0) o aceptación de la hipótesis alternativa (H_1) y la zona no pintada representa la zona de aceptación de la hipótesis nula. Adaptado de [87].	21
2.2.	Columnas PD10 usadas para la filtración de los medios de cultivos. Imagen extraída de [91].	23
3.1.	Efecto de la concentración de metanol en la actividad enzimática de la xilanasa GtXyn10A. Ensayo de actividad realizado a 30°C y pH 6 durante 30 [min]. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.	28
3.2.	Efecto del pH en la actividad enzimática de la xilanasa GtXyn10A. Ensayo de actividad hecho a una temperatura constante de 30°C durante 30 [min]. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.	30
3.3.	Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la xilanasa GtXyn10A. Ensayo de actividad hecho a pH 6 durante 30 [min]. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.	31
3.4.	Efecto del <i>buffer</i> citrato de sodio 50 [mM] y del <i>buffer</i> fosfato de potasio 100 [mM] sobre la actividad enzimática de la xilanasa GtXyn10A a pH 6 y a 30°C. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.	32
3.5.	Efecto de los componentes del medio BMMY sobre la actividad enzimática de la xilanasa recombinante a 30°C y pH 6 luego de 30 [min]. YNB 2Y 1,34%; YNB 4Y 1,34%; biotina $4 \cdot 10^{-5}$ %; peptona 2%; extracto de levadura 1% y metanol 0,5%. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.	34
3.6.	Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre el crecimiento celular en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Curva medio MM* cit estadísticamente distinta a la curva de referencia (medio BMMY fos), curvas de los medio BMMY cit y MM* fos no son estadísticamente distintas a la curva de referencia. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	37
3.7.	Resultado del ensayo de actividad a las 48 [h] para los 4 medios de cultivo, BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit separados por cuadrantes (flechas rojas). El cultivo de cada medio se hizo por triplicado, los cuales se muestran en recuadros morados y rotulados con Matraz 1, Matraz 2 y Matraz 3. Además, a cada matraz se le tomaron muestras por triplicado, representados por T1, T2 y T3, dentro de cada recuadro morado. El recuadro azul contiene el triplicado del blanco, rotulado con B1, B2 y B3.	40

3.8. Resultado del ensayo de actividad a las 48 [h] para los 4 medios de cultivo posterior a la filtración por columnas desaladoras. El cultivo de cada medio se hizo por triplicado, los cuales se muestran en recuadros morados y rotulados con Matraz 1, Matraz 2 y Matraz 3. Además, a cada matraz se le tomaron muestras por triplicado, representados por T1, T2 y T3, dentro de cada recuadro morado. El recuadro azul contiene el triplicado del blanco, rotulado con B1, B2 y B3.	41
3.9. Resultado del ensayo de actividad a las 48 [h] para los 4 medios de cultivo posterior a la filtración por columnas PD10 desaladoras y la dilución de las muestras. El cultivo de cada medio se hizo por triplicado, los cuales se muestran en recuadros morados y rotulados con Matraz 1, Matraz 2 y Matraz 3. Además, a cada matraz se le tomaron muestras por triplicado, representados por T1, T2 y T3, dentro de cada recuadro morado. El recuadro azul contiene el triplicado del blanco, rotulado con B1, B2 y B3.	42
3.10. Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM*cit sobre la producción enzimática en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. El resultado del análisis estadístico indica que las curvas no son estadísticamente distintas con respecto a la curva de referencia (medio BMMY fos). Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	44
3.11. Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de enzima recombinante en cultivos de <i>P. pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Las curvas no son estadísticamente distintas con respecto a la curva de referencia (medio BMMY fos). Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	45
3.12. Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre la producción de enzima por unidad de biomasa en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. El resultado del análisis estadístico indica que las curvas no son estadísticamente distintas con respecto a la curva de referencia (medio BMMY fos). Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	46
3.13. Reacciones y metabolitos identificados del metabolismo de <i>P. pastoris</i> que participan en la síntesis de xilanas recombinante. Flechas continuas representan reacciones de transformación y flechas discontinuas representan reacciones de transporte. Adaptado de [92].	50
3.14. Flujos máxicos encontrados para cada reacción en unidades de [mmol/cell·h] obtenidos a partir del Análisis de Flujos Metabólicos hecho con la herramienta <i>solver</i> , los cálculos se encuentran en el archivo adjunto " <i>Solver.xlsx</i> " [99]. . .	52
C.1. Curva de Calibración de DNS obtenida para la medición de azúcares reductores obtenidos.	82
C.2. Curva de Calibración de Bradford obtenida para la medición de la cantidad de proteína presente en el medio.	83
D.1. Imagen superior del tubo eppendorf con el clon de <i>Pichia pastoris</i> usado para el cultivo.	84

D.2.	Placas con medio YPD sólido, a la izquierda se observa la placa a tiempo 0 [h], donde mediante un raspado del tubo eppendorf mostrado en la Figura D.1 las células son colocadas en la placa. A la derecha se observa la misma placa a las 48 [h], donde se aprecian las colonias ya crecidas (líneas y puntos blancos).	84
D.3.	Tuvo Falcon de 50 ml conteniendo ~25 [ml] de medio YPD líquido con células seleccionadas de una de las colonias de la placa ya crecida. A la izquierda, inóculo a tiempo 0 [h], a la derecha inóculo a tiempo 24 [h]. La pérdida de transparencia o cambio de turbiedad indica que las células crecieron.	85
D.4.	Cultivo en matraz de 2,8 [L] con 650 [ml] de medio BMGY y 1,3 [ml] de inóculo proveniente del medio YPD líquido a tiempo 0 [h].	85
D.5.	Cultivo de <i>Pichia pastoris</i> en los 4 medios estudiados por triplicado a tiempo 0 [h]. Primera columna corresponde al triplicado de los cultivos en medio BMMY fos, segunda columna contiene los triplicados de los cultivos en medio BMMY cit, tercera columna corresponde a los triplicados del cultivo en medio MM* fos y cuarta columna contiene los triplicados de los cultivos en medio MM* cit.	86
D.6.	Vista superior del sistema para medir peso seco a tiempo 0 [h]. Sistema compuesto por un tubo Falcon de 50 [ml], papel filtro y el pellet ya disuelto y vertido en el papel filtro.	86
D.7.	Vista superior del sistema para medir peso seco completada las 24 [h].	87
D.8.	Vista lateral del sistema para medir peso seco compuesto por un tubo Falcon de 50 [ml], papel filtro y el pellet.	87
D.9.	Columnas PD10 usadas para la filtración de los medios de cultivos.	88
F.1.	Efecto de los medios de cultivos individualizados por matraz sobre el crecimiento celular de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Cada curva representa un matraz, donde las mediciones fueron hechas por triplicado. Curvas verdes: matraces con medio BMMY fos, curvas anaranjadas: matraces con medio BMMY cit, curvas azules: matraces con medio MM* fos, curvas amarillas: matraces con medio BMMY cit.	90
F.2.	Efecto de los medios de cultivos sobre el crecimiento celular en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	91
F.3.	Efecto de los medios de cultivos sobre el crecimiento celular de <i>P. pastoris</i> individualizados por matraz y presentadas de a pares de medios de cultivos. a) Peso seco medios BMMY con buffer fosfato (verde) y BMMY con buffer citrato (anaranjado), b) peso seco medios MM* con buffer fosfato (azul) y MM* con buffer citrato (amarillo), c) peso seco medios BMMY con buffer fosfato (verde) y MM* con buffer fosfato (azul) y d) peso seco medios BMMY con buffer citrato (anaranjado) y MM* con buffer citrato (amarillo).	92
F.4.	Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre la producción de biomasa en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Curvas medios BMMY cit y MM* fos estadísticamente distintas a la curva de referencia (medio BMMY fos), curva medio MM* cit no es estadísticamente distinta con respecto a la curva de referencia. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	93

F.5. Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de biomasa en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Cada curva representa un matraz, donde las mediciones fueron hechas por triplicado. Curvas verdes: matraces con medio BMMY fos, curvas anaranjadas: matraces con medio BMMY cit, curvas azules: matraces con medio MM* fos, curvas amarillas: matraces con medio BMMY cit.	94
F.6. Efecto de los medios de cultivos sobre la la producción de biomasa en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	95
F.7. Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de biomasa individualizados por matraz y presentadas de a pares de medios de cultivos. a) Peso seco medios BMMY con buffer fosfato (verde) y BMMY con buffer citrato (anaranjado), b) peso seco medios MM* con buffer fosfato (azul) y MM* con buffer citrato (amarillo), c) peso seco medios BMMY con buffer fosfato (verde) y MM* con buffer fosfato (azul) y d) peso seco medios BMMY con buffer citrato (anaranjado) y MM* con buffer citrato (amarillo).	96
F.8. Efecto de los medios de cultivos sobre la actividad enzimática en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Cada curva representa un matraz, donde las mediciones fueron hechas por triplicado. Curvas verdes: matraces con medio BMMY fos, curvas anaranjadas: matraces con medio BMMY cit, curvas azules: matraces con medio MM* fos, curvas amarillas: matraces con medio BMMY cit.	97
F.9. Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM*cit sobre producción de enzima recombinante individualizadas por matraz en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	98
F.10. Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de enzima recombinante individualizadas por matraz y presentadas de a pares de medios de cultivos. a) Actividad enzimática medios BMMY con buffer fosfato (verde) y BMMY con buffer citrato (anaranjado), b) actividad enzimática medios MM* con buffer fosfato (azul) y MM* con buffer citrato (amarillo), c) actividad enzimática medios BMMY con buffer fosfato (verde) y MM* con buffer fosfato (azul) y d) actividad enzimática medios BMMY con buffer citrato (anaranjado) y MM* con buffer citrato (amarillo).	99
F.11. Efecto de los medios de cultivos sobre la concentración de proteína total promedio en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. El resultado del análisis estadístico indica que las curvas no son estadísticamente distintas con respecto a la curva de referencia (medio BMMY fos). Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	100
F.12. Efecto de los medios de cultivos individualizados por matraz sobre la concentración de proteína total en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Cada curva representa un matraz, donde las mediciones fueron hechas por triplicado. Curvas verdes: matraces con medio BMMY fos, curvas anaranjadas: matraces con medio BMMY cit, curvas azules: matraces con medio MM* fos, curvas amarillas: matraces con medio BMMY cit.	100

F.13. Efecto de los medios de cultivos sobre la concentración de proteína total en cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	102
F.14. Efecto de los medios de cultivos sobre la concentración de proteína total individualizadas por matraz y presentadas de a pares de medios de cultivos. a) Concentración de proteínas medios BMMY con buffer fosfato (verde) y BMMY con buffer citrato (anaranjado), b) concentración de proteínas medios MM* con buffer fosfato (azul) y MM* con buffer citrato (amarillo), c) concentración de proteínas medios BMMY con buffer fosfato (verde) y MM* con buffer fosfato (azul) y d) concentración de proteínas medios BMMY con buffer citrato (anaranjado) y MM* con buffer citrato (amarillo).	103
F.15. Relación entre la actividad enzimática promedio presente en los medios de cultivo y la concentración de proteína promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje derecho.	104
F.16. Relación entre la actividad enzimática presente en los medios de cultivo y la concentración de proteína total individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.	104
F.17. Relación entre la actividad enzimática promedio presente en los medios de cultivo y el peso seco promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje derecho.	105
F.18. Relación entre la actividad enzimática presente en los medios de cultivo y el peso seco individualizados por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.	105
F.19. Relación entre la actividad enzimática promedio presente en los medios de cultivo y la densidad óptica promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho.	106

F.20. Relación entre la actividad enzimática presente en los medios de cultivo y la densidad óptica individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.	106
F.21. Relación entre la concentración promedio de proteína presente en los medios de cultivo y el peso seco promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje derecho.	107
F.22. Relación entre la concentración de proteína total presente en los medios de cultivo y el peso seco individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.	107
F.23. Relación entre la concentración de proteína promedio presente en los medios de cultivo y la densidad óptica promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho.	108
F.24. Relación entre la concentración de proteína total presente en los medios de cultivo y la densidad óptica individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho.	108
F.25. Relación entre el peso seco promedio obtenido de los medios de cultivo y la densidad óptica promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.	109
F.26. Relación entre el peso seco obtenido de los medios de cultivo y la densidad óptica individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.	110
F.27. Efecto de los medios de cultivos sobre la actividad específica en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6 individualizados por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	111

F.28. Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la actividad enzimática y el peso seco en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6 individualizados por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	112
F.29. Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la actividad enzimática y la densidad óptica (DO) promedio en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	112
F.30. Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la actividad enzimática y la densidad óptica (DO) en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6 individualizados por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	113
F.31. Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre la relación entre concentración de proteína total y peso seco cultivos de <i>Pichia pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	113
F.32. Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la concentración de proteína y la densidad óptica (DO) promedio en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	115
F.33. Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la concentración de proteína total y la densidad óptica (DO) en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6 individualizadas por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	115
F.34. Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre el peso seco y la densidad óptica (DO) promedio en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.	116
F.35. Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre el peso seco y la densidad óptica (DO) en cultivos de <i>P.pastoris</i> hechos a 30°C y pH 6 individualizadas por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.	116
G.1. Matriz estequiométrica (<i>S</i>) construida para la resolución del MFA, la primera columna contiene los metabolitos (<i>m</i>) y la primera fila contiene las reacciones (<i>n</i>). Parte 1/3.	121
G.2. Matriz estequiométrica (<i>S</i>) construida para la resolución del MFA, la primera columna contiene los metabolitos (<i>m</i>) y la primera fila contiene las reacciones (<i>n</i>). Parte 2/3.	122
G.3. Matriz estequiométrica (<i>S</i>) construida para la resolución del MFA, la primera columna contiene los metabolitos (<i>m</i>) y la primera fila contiene las reacciones (<i>n</i>). Parte 3/3.	123

Capítulo 1

Introducción

En la actualidad existe un gran interés por la generación de bioproductos, tanto para la industria como para el mercado chileno, y precisamente en los últimos años ha aumentado la producción, distribución y uso de estos insumos de origen biotecnológico [1].

En Chile se han reportados 70 empresas que comercializan bioproductos, donde el 50 % se dedica a la importación, 34 % a la producción y el 16 % a la producción e importación. Entre estos productos se encuentran los bioproductos alimenticios (macro o micronutrientes), biofertilizantes, biocombustibles, bioestimulantes, biopesticidas, biorremediadores, entre otros [1] [2].

1.1. Marco Teórico

1.1.1. Biomasa Lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es un material renovable de gran abundancia en el mundo y sus principales usos se destinan a la producción de biocombustible, tales como el bioetanol y biogas [3] [4] y otros bioproductos, como celulosa, alcoholes, hidrocarbonos, ácidos orgánicos y bioplásticos [4] [5].

Los materiales lignocelulósicos son obtenidos principalmente de los sectores industriales, forestales y agrícolas, y de estos últimos dos es de donde se obtiene la mayor cantidad de biomasa, debido a la gran disponibilidad y al bajo costo económico de adquisición [6].

La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, la composición exacta depende del origen de la biomasa, pero en general, la celulosa se puede encontrar en un porcentaje entre 30 y 50 %, la hemicelulosa entre un 20 y 40 % y finalmente la lignina, la cual se encuentra entre un 15 y 25 % [7] [8]. En particular, la hemicelulosa está compuesta principalmente por xilano, abarcando entre 65 y 85 %, seguido de componentes arabinosos, cubriendo entre 9 y 11 % [7].

En Chile, las fuentes de biomasa lignocelulósica provienen principalmente de la industria del

trigo seguido de la industria de la avena, abarcando el 38,5 y el 13 % del terreno cultivado respectivamente [9]. El 75 % del trigo cultivado se concentra en las Regiones del Nuble, Bío-Bío y el Maule, y se estima que en la temporada 2020/2021 se siembren 217 mil [ha] de trigo lo cual representa un incremento con respecto a la temporada anterior [10] [11].

De acuerdo a la Corporación Nacional Forestal (CONAF), en el periodo de julio 2013 a junio 2014 se quemaron 243.788 [ha] de rastrojos de origen agrícola y 9578 [ha] de residuos de origen forestal, es decir, el 13 % de la producción de paja de trigo fue quemada, esto con el fin de eliminar grandes volúmenes de paja para facilitar el despeje del área destinada al próximo cultivo [12]. Sumado a lo anterior, a nivel mundial la biomasa lignocelulósica como la madera, el pasto y los residuos agrícolas, aún son usados principalmente para la producción de energía convencional por combustión directa [13]. Sin embargo, la quema trae consigo un impacto negativo en la flora y fauna que habita el sector, además de contribuir a la producción de gases del efecto invernadero y de material particulado de un tamaño inferior a los 10 [μm]. Otro efecto negativo que trae la quema de rastrojos es la erosión [14] y la pérdida de macronutrientes como consecuencia directa de la combustión perdiendo entre el 80 y el 100 % del carbono disponible en las tierras [12]. Finalmente, la quema descontrolada de residuos agrícolas puede provocar incendios forestales, donde sólo en la temporada 2018-2019 se reportaron 80.064 hectáreas que fueron afectadas por 7.219 incendios, de los cuales el 99 % fueron provocados por acción del ser humano [14].

De este modo surge la necesidad por encontrar un nuevo uso para los rastrojos que no lograron ser comercializados, y entre las alternativas propuestas en la actualidad se encuentran re-destinar los residuos a la elaboración de compost y a la alimentación de bovinos [12].

1.1.2. Xilano

El xilano es un polisacárido encontrado en las plantas, y representa el tercer polímero más abundante en La Tierra, seguido de la celulosa y la quitina [15]. El grado de polimerización o DP por sus siglas en inglés (*Degrees of Polymerisation*) indica la cantidad de monómeros que hay unidos, siendo entre 100 y 200 para el xilano nativo, donde la xilosa corresponde a la unidad estructural (monómero) [16]. El xilano además cuenta con ramificaciones unidas directamente a la cadena principal. Dependiendo del origen del xilano, las ramificaciones varían, pero las más comunes se observan en la Figura 1.1, los cuales corresponden a grupos acetilos, ácidos urónicos, arabinosas, entre otros [17].

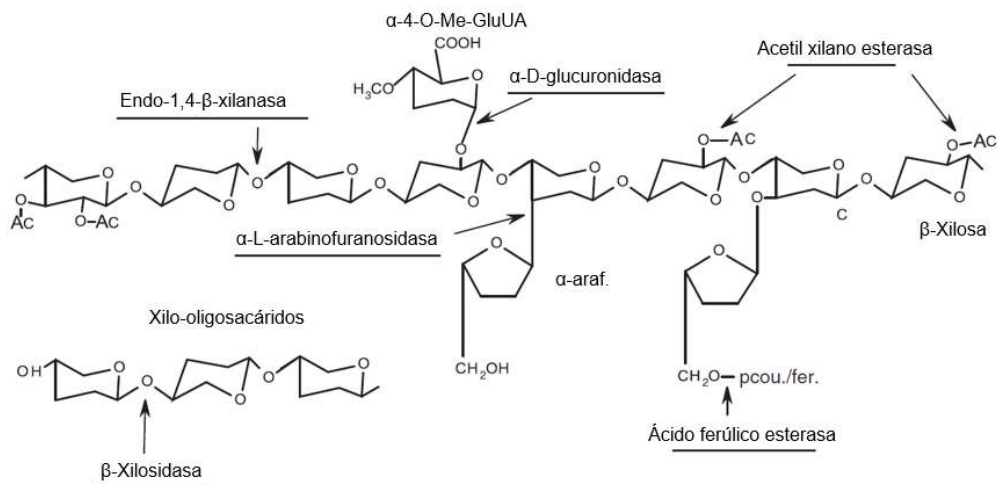


Figura 1.1: Estructura de la hemicelulosa. La cadena principal del xilano contiene xilasas unidas por enlaces β -1,4. Las enzimas que actúan sobre la cadena y las ramificaciones, se encuentran subrayadas, y las flechas indican el sitio de corte específico de cada una. Nomenclatura: Ac: Acetato; α -4-O-Me-GluUA: 4-O-ácido metilglucurónico; α -araf: α -arabinofurano; pcou./fer.: ácido p-cumárico/ferúlico. Adaptado de [18].

Para romper cada tipo de enlace, se requiere de diferentes enzimas con actividad específica para cada tipo de unión. En la Figura 1.1 también se observan algunas de estas que son usadas en la degradación del xilano.

Las enzimas endo-1,4- β -xilanasas y β -xilosidasas tienen como función principal la depolimerización del xilano, la primera de ellas es la encargada de romper los enlaces β -1,4 presentes en la cadena principal y como resultado se obtienen fragmentos oligosacáridos más cortos, mientras que la segunda enzima actúa sólo en los extremos no reducidos de la cadena, por lo que con cada corte, se genera un monómero. Por otro lado, existen otras enzimas que actúan sólo en las ramificaciones, con el fin de poder homogeneizar la cadena, entre ellas se encuentran la α -L-arabinofuranosidasa, α -D-glucuronidasa, acetil xilano esterases, esterases de ácido ferúlico y esterasa p-cumárico [18] [19].

A partir de la degradación del xilano, se obtienen los xilooligosacáridos o XOS, correspondientes a oligosacáridos compuestos por 2 a 10 unidades monoméricas de xilasas, las cuales se unen mediante enlaces tipo β -1,4 [20].

En la Figura 1.2 se observa la estructura lineal y sin ramificaciones de una cadena de xilooligosacáridos con DP entre 1 y 7.

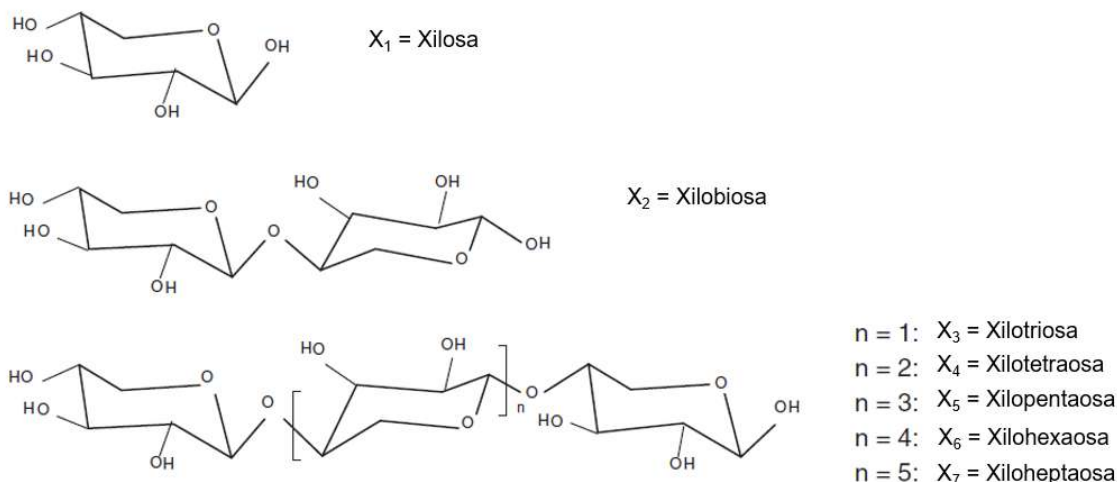


Figura 1.2: Estructura general de los xilo-oligosacáridos. X_1 representa al monómero de la cadena, y (X_2) representa a la unión entre 2 monómeros, luego se tiene la estructura general de los xilo-oligosacáridos con $X_{(n+2)}$ donde $n \in \{1, 2, 3, 4, 5\}$. Adaptado de [18].

Los estudios que involucran producción y purificación de xilooligosacáridos han ido en aumento en los últimos años debido a su carácter prebiótico [21]. Los XOS son clasificados como oligosacáridos no digeribles, es decir, desde que son ingresados al organismo hasta que se alojan en el intestino no son degradados, y son consumidos por algunas de las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal [22]. Además, es de mayor interés alcanzar un DP entre 2 y 6, ya que ese es el rango donde se ha detectado el mayor potencial prebiótico [23].

El beneficio de consumir alimentos prebióticos es que estos estimulan el crecimiento y la proliferación de microorganismos, específicamente de algunas bacterias presentes en la flora intestinal que son favorables para la salud humana, también fortalece el sistema inmunológico, disminuye la incidencia de contraer cáncer de colon, disminuye el número de bacterias patógenas, mejora la función intestinal y la absorción de calcio, tiene actividad antioxidante y anti-inflamatoria, entre otras cualidades [15] [24].

Las técnicas de producción de XOS son variadas, y en ellas el xilano es degradado hasta obtener los oligosacáridos de interés. Estas pueden ser llevadas a cabo en una o dos etapas. Entre las técnicas de una sola etapa se encuentran la hidrólisis ácida [18] y la autohidrólisis [25], mientras que las técnicas de 2 fases se dividen en un pretratamiento, que puede ser hidrólisis ácida [26], hidrólisis básica [27] o autohidrólisis [28] y un tratamiento, el cual suele ser una hidrólisis enzimática [29]. Esta última etapa puede ser llevada a cabo con enzimas auxiliares, y siempre debe ser usada la xilanasa [23].

1.1.3. Endo-1,4- β -xilanasa EC 3.2.1.8

Características y Estructura

La endo-1,4- β -xilanasa, también conocida como xilanasa [30], es una proteína que cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,4- β de la cadena principal de xilano (sustrato), liberando XOS en

las primeras etapas de rompimientos, y generando xilosas o moléculas más pequeñas en las últimas etapas de rompimiento [23].

Las xilanasas y otras enzimas se organizan en familias de glicosil hidrolasa o GH (*Glycosyl Hidrolase*). Las enzimas pertenecientes a la familia GH se caracterizan por hidrolizar enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos, y además, se caracterizan por dos de sus residuos aminoacídicos, donde uno de ellos actúa como ácido o donante de protón(es) y el otro como base o nucleófilo [31].

Existen 176 familias GH, sin embargo, las más representativas de las endoxilanasas corresponden a las familias 10 y 11, la primera de ellas se caracteriza por actuar en cadenas cortas de xilano, produciendo unidades de xilosa y por poseer una estructura tipo barril (α/β)₈ [32], mientras que las enzimas perteneciente a la familia GH11 tienen una estructura β *jelly roll* [33] y tienen preferencia por realizar los cortes en cadenas más largas de xilano, lo cual genera cadenas cortas, evitando así la producción de monómeros [23].

Otra diferencia entre ambas familias, es que las enzimas pertenecientes al grupo GH10 tienen dominios catalíticos de un tamaño de 40 [kDa] aproximadamente, a diferencia de las enzimas de la familia GH11, los cuales poseen un tamaño cercano a los 20 [kDa] [34].

La actividad enzimática depende de distintos factores, entre ellos el pH, la temperatura, la concentración de sustrato y la concentración de enzima. A continuación, en la Figura 1.3, se observa un ejemplo de una curva de dependencia típica que tiene una enzima por el pH, esta tiene forma de campana y se observa que la máxima actividad de la xilanasas encontrada por Fushinobu *et al.* (2021) fue a pH 2.

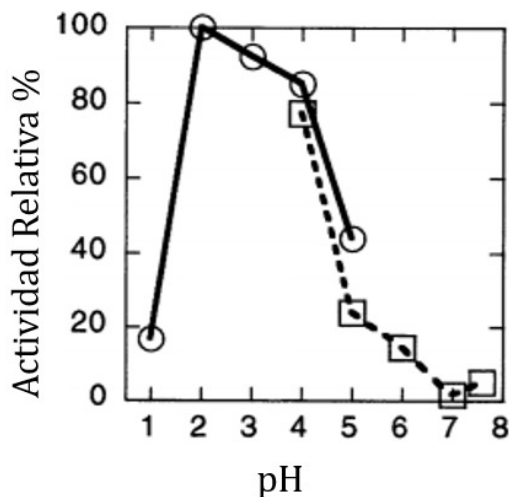


Figura 1.3: Efecto del pH sobre la actividad enzimática de una xilanasas nativa. Ejemplo de una curva de dependencia, donde la actividad máxima encontrada fue a pH 2. A pH entre 1.0 y 5.0 (línea continua) se usó *buffer* ácido clorhídrico-acetato de sodio Walpole y a pH entre 4.0 y 7.5 (línea discontinua) se usó *buffer* McIlvaine Na₂HPO₄-ácido cítrico. Adaptado de [35].

La dependencia de la actividad enzimática que se provoca por la temperatura también se observa en forma de campana. Un ejemplo de esta curva de observación se muestra en la Figura 1.4, donde los máximos obtenidos fueron entre 80 y 95°C dependiendo de la xilanasas.

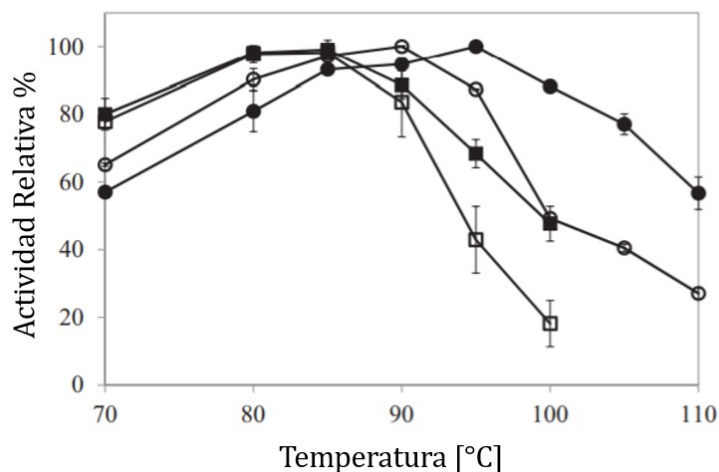


Figura 1.4: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las xilanasas YXNB y YXNB-DS con y sin [emim]OAc. Ejemplo de una curva de dependencia, donde las actividades máximas encontradas fueron entre 80 y 95°C. Nomenclatura: círculo abierto: xilanasas YXNB sin [emim]OAc; cuadrado abierto: xilanasas YXNB + 5% [emim]OAc; círculo relleno: xilanasas YXNB-DS sin [emim]OAc; cuadrado relleno: xilanasas YXNB-DS + 5% [emim]OAc. Adaptado de [36].

En cuanto a la concentración de sustrato, aumentar su concentración provoca un aumento en la velocidad de reacción pero hasta cierto límite. Unidas las enzimas al sustrato, el aumento de sustrato no tendrá efecto en la velocidad de reacción, ya que no habrán enzimas disponibles para degradar el sustrato [37]. Finalmente, aumentar la concentración de enzima aumenta la velocidad de reacción, siempre que haya sustrato disponible al cual adherirse, pero nuevamente existe un límite al cual es beneficioso aumentar la concentración de enzima. Una vez que todo el sustrato esté adherido, la reacción deja de acelerarse, puesto que no hay sustrato disponible al que las enzimas adicionales se puedan unir [37].

En particular, las xilanasas son proteínas muy termoestables, tal es el caso de la xilanasas producida por la bacteria *Bacillus halodurans* TSEV1 que tiene su óptimo a 80°C [38] y también está el caso de la enzima Tlxyn10A producida por *Talaromyces leycettanus*, la cual logra mantener el 75% de la actividad a 90°C [39]. Además, son estables en un gran rango de pH, el cual puede ir desde 3,5 hasta 10,5 dependiendo del origen de la xilanasas [40].

En el presente trabajo se utilizó la enzima GtXyn10A, correspondiente a la xilanasas producida por el hongo *Gloeophyllum trabeum* y que pertenece a la familia GH10. Tiene un peso molecular de 38 kDa y un punto isoelectrico de 4,57 [41]. La cadena aminoacídica consta de 351 aminoácidos, la cual se encuentra en el Anexo A, donde los primeros 18 aminoácidos corresponden al péptido señal, y el resto de la secuencia corresponde a la proproteína [42]. La estructura tridimensional se muestra en la Figura 1.5 donde se puede observar la estructura

tipo barril, formado por 8 hélices α y 8 hojas β .

Específicamente, la enzima GtXyn10A, usada en el presente trabajo, ha mostrado tener su actividad máxima a pH's ácidos, entre 3,4 y 5 [34] [43] y a 50°C [34] al agregar el sustrato a una concentración del 1 %.

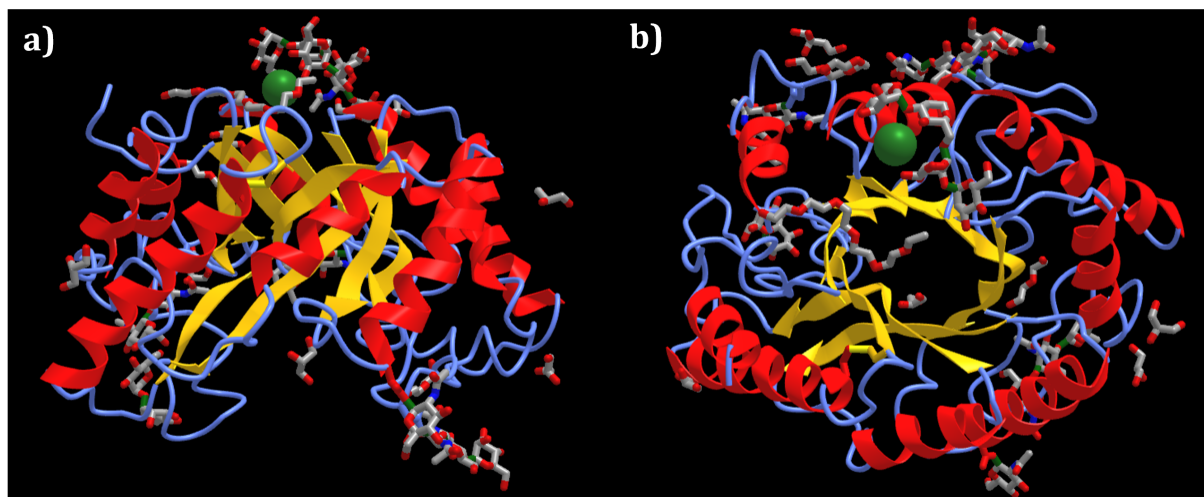


Figura 1.5: Estructura tridimensional de la enzima GtXyn10A, a) vista lateral y b) vista superior. En rojo se muestran la estructura formada por hélices α , en amarillo las hojas β plegadas y en azul los *loops* de la molécula. Adaptado de [44] usando las herramientas MMDB y VAST+ [45].

Aplicaciones

Las aplicaciones industriales que se confieren a la xilanasas han ido en constante aumento desde que se inició su uso en el año 1980, entre las más destacadas se encuentra el blanqueamiento de pulpa en la industria del papel [46], en la industria alimenticia se usa en la hidrólisis enzimática para degradar polisacáridos, también se usa para aumentar el volumen y calidad del pan o derivados (reemplazando el uso de la levadura tradicional) [47] y en la clarificación de jugos de frutas [48]. Además, la xilanasas se usa en el pretratamiento de la comida de rumiantes para facilitar la digestión, junto con otras enzimas glucanasas, pectinasas, etc [47] [49].

En la industria textil, a pesar de que es menos frecuente su uso, comparado con las celulasas y pectinasas, el complejo xilanólítico es usado para la limpieza de textiles y el procesamiento de fibras vegetales como lo son la arpillera y el lino [47], y también, es usado para el ablandamiento de la fibra del arbusto de yute y ramio u ortiga blanca [50]. Finalmente, existe un bajo porcentaje del mercado farmacéutico donde esta enzima es usada con el fin de obtener unidades de azúcares monoméricas [51].

La xilanasas también es añadida en algunos medicamentos que son recetados a personas con dieta suplementaria o con baja tasa de digestión, mejorando así la absorción de nutrientes de los pacientes [52]. Particularmente la xilanasas es de gran importancia para la producción de xilooligosacáridos, los cuales presentan una capacidad prebiótica, que, como se expuso anteriormente, presentan múltiples beneficios para la salud humana [23].

1.1.4. Sistemas de producción nativos

Múltiples organismos han sido estudiados por sus sistemas nativos de producción de proteínas, estos incluyen bacterias, levaduras, hongos, líneas celulares de insectos y plantas [53].

Específicamente, existe un gran interés por los hongos con la capacidad de degradar materiales lignocelulósicos ya que son productores naturales de estas enzimas hidrolíticas [54]. En la Tabla 1.1 se observan algunos sistemas de producción de proteínas junto con las proteínas que producen.

Tabla 1.1: Sistemas fúngicos de producción de proteínas nativas y las proteínas que cada uno produce.

Organismo Productor	Proteína(s)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i> HN-2	Celulasa, β -glucosidasa, celobiohidrolasa, endoglucanasa y xilanasa	[55]
<i>Aspergillus niger</i> N402	Celulasa, β -glucosidasa, celobiohidrolasa, endoglucanasa y xilanasa	[55]
<i>Aspergillus oryzae</i> MTCC 1846	Celulasa, xilanasa, β -glucosidasa y α -amilasa	[56]
<i>Aspergillus tubingensis</i> CBS 643.92	4 tipos de β -glucosidasas	[57]
<i>Aspergillus unguis</i> NII-08123	β -glucosidasa	[58]
<i>Gloeophyllum trabeum</i> ATCC 11539	Endoglucanasa GtCel12A	[59]
<i>Gloeophyllum trabeum</i> CBS 900.73	Xilanasa GtXyn10	[60]
<i>Talaromyces leycettanus</i> JCM12802	Xilanasa TlXyn10A	[39]
<i>Trichoderma reesei</i>	Celobiohidrolasa Cel7A y endoglucanasa Cel5A	[61]
<i>Trichoderma reesei</i> ATCC 56765	Endoglucanasa y β -glucosidasa	[62]

Además, en la Tabla 1.2 se muestran algunos sistemas de producción nativos de xilanasas y sus condiciones de operación óptimas.

Tabla 1.2: Sistemas de producción nativos de xilanasas y condiciones de producción óptimas. Adaptado de [54].

Proteína	Organismo Productor	Familia	Condiciones
Xyl10g	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	GH10	pH 4,0-7,0 a 70°C
XynD	<i>Penicillium funiculosum</i>	GH10	pH 4,0-5,5 a 80°C
XynT	<i>Bacillus alcalophilus</i>	GH10	pH 7,0-9,0 a 50°C
XynA	<i>Schizophyllum commune</i>	GH11	pH 5,0 a 50°C
Xylcg	<i>Chaetomium globosum</i>	GH11	pH 5,5 a 40°C
Thxyn11A	<i>Thermobifida halotolerans</i>	GH11	pH 9,0 a 70°C

El sistema de producción nativo que destaca por su producción de xilanasa corresponde al

del hongo de podredumbre marrón *Gloeophyllum trabeum*, el cual ha sido estudiado debido a su eficiente mecanismo de degradación de sustratos lignocelulósicos [54].

Para *Gloeophyllum trabeum* ATCC 11539, se ha demostrado que tiene un sistema impulsado por hidroquinona para producir especies reactivas del oxígeno extracelulares (ROS), una β -glucosidasa, una xilanasas (GtXyn10A) y dos endoglucanasas (GtCel5A y GtCel12A) las cuales no degradan la celulosa cristalina, sin embargo, las enzimas extracelulares más abundantes en los cultivos de *G. trabeum* son las endoglucanasas y la xilanasas [63].

Cohen, R., Suzuki, M. & Hammel, K. (2020), estudiaron el sistema de producción nativo que posee *G. trabeum* y para un cultivo de 7,5 [ml], a 31°C durante 10 días, obtuvieron una producción de 123 [μ g] de xilanasas Xyn10A y 82 y 4 [μ g] para las endoglucanasas Cel5A y Cel12A respectivamente [63].

Las ventajas del uso de estos sistemas de producción de proteínas es la facilidad y constancia de su producción, debido a que se producen gracias a un promotor constitutivo propio del organismo, sin embargo, al ser sistemas no modificados, las producciones suelen ser bajas y con una gran cantidad de contaminantes, ya sean sales u otras proteínas secretadas por el mismo organismo, esto hace que el sistema requiera de etapas adicionales de purificación [64].

1.1.5. Sistemas de producción recombinante

Una alternativa eficiente a los sistemas de producción nativos son los sistemas de producción de proteínas recombinantes, ya que son sistemas que han reportado elevadas producciones de proteínas recombinantes [64].

Los sistemas de producción pueden ser llevado por distintos microorganismos, tales como bacterias, hongos, levaduras, líneas celulares animales, entre otros, donde la elección del microorganismo depende del uso final de la proteína [65]. A continuación, en la Tabla 1.3, se muestran las diferencias entre los sistemas de producción recombinantes de bacterias, levaduras y células animales.

Tabla 1.3: Comparación de los sistemas de producción recombinantes en *Escherichia coli* (sistema procarionte), *Pichia pastoris* (sistema eucarionte fúngico) y células CHO (sistema eucarionte animal). Adaptado de [65].

Característica	<i>E. coli</i>	<i>P. pastoris</i>	Células CHO
Tiempo de duplicación	30 min	60-120 min	24 h
Costo del medio de cultivo	Bajo	Bajo	Alto
Complejidad del medio de cultivo	Mínimo	Mínimo	Complejo
Nivel de expresión	Alto	Bajo a Alto	Bajo a Moderado
Expresión extracelular	Secretado en periplasma	Secretado al medio	Secretado al medio
Plegamiento de proteína	No realiza	Puede que no realice	Sí realiza
Fosforilación y acetilación	No realiza	Sí realiza	Sí realiza
Glicosilación	No realiza	Sí realiza	Sí realiza

En particular, el uso de levaduras es de especial interés para los sistemas de producción de proteínas recombinantes debido a 5 razones, la primera de ellas es la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales, la cual es una cualidad propia de los organismos eucariontes, también tienen la capacidad de secretar proteínas al medio extracelular, tienen la capacidad de crecer hasta lograr densidades celulares muy altas, además hay una amplia disponibilidad de cepas de levaduras para la expresión de proteínas recombinantes, y finalmente, existe una menor o nula producción de toxinas celulares en comparación con una cepa bacteriana, las cuales tienen asociadas una producción de endotoxinas [66].

Para esta investigación en específico, es de interés conocer las formas de producción de xilanas mediante este tipo de sistemas por la alta capacidad de producción. Entre ellos destacan los sistemas compuestos por los hongos *Aspergillus* y *Trichoderma*, ya que son los principales productores a nivel industrial [67], y también destaca *Pichia pastoris*, que es considerada como una de las herramientas más populares y estándar para la producción de proteína recombinante en biología molecular [65].

P. pastoris es una levadura metilotrófica, es decir es capaz de usar metanol como única fuente de carbono y es mediante el mismo metanol que se induce la expresión del gen que codifica para la proteína recombinante [68]. *P. pastoris* ha demostrado crecer de manera óptima entre 28 y 30°C en cultivos líquidos y a pH 6 en los medios BMGY y BMMY [69]. Cultivar sobre los 32°C es perjudicial para las células ya que afecta negativamente la producción de proteína recombinante, e incluso, se podría llegar a la muerte celular [69].

La expresión de cualquier gen foráneo en *P. pastoris* comprende tres pasos principales: primero, se debe insertar el gen de interés en un vector de expresión; segundo se debe

introducir el vector de expresión en el hospedador *P. pastoris*; y tercero, se examinan cepas potenciales para la expresión del gen foráneo [68].

Se ha reportado el uso de distintos promotores para la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*, entre ellos pAOX1, pAOX2 y pGAP [70]. La diferencia entre ellos es el tipo de promotor, pGAP es el único promotor constitutivo, mientras que pAOX1 y pAOX2 son promotores inducibles con metanol. La ventaja del sistema constitutivo es que es independiente de la cantidad de metanol disponible, sin embargo, el promotor pAOX1 es el más usado para la producción de proteínas recombinantes debido a que tiene una mayor expresión, además, este promotor es de gran interés ya que permite tener una producción controlada de xilanasa [70].

A continuación, en la Figura 1.6 se observa el mapa del vector de expresión de *Pichia pastoris*, el cual contiene la zona de inducción por metanol denotada por 5'AOX1.

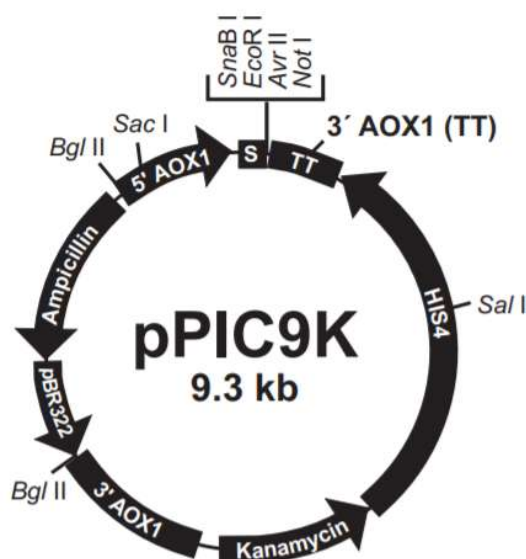


Figura 1.6: Mapa del vector de expresión pPIC9K. 5'AOX1: Promotor AOX1; S: Sitio de Clonamiento Múltiple (MCS); TT: Señal de poliadenilación y terminación de la transcripción nativa del gen AOX1; HIS4: Gen de tipo salvaje de *Pichia* que codifica la histidinol deshidrogenasa; Kan: Gen de resistencia a kanamicina de Tn903 que confiere resistencia a Geneticin® en *Pichia pastoris* y resistencia a kanamicina en *E. coli*; 3'AOX1: Secuencias del gen AOX1 que están más allá de las secuencias TT en 3'; pBR322: Origen de replicación de *E. coli*; Amp: Gen de resistencia a la ampicilina; SnaB I, EcoR I y Avr II: Sitios de restricción; Bgl II, Sac I, Not I y Sal I: Sitios de restricción únicos [71].

Las ventajas de los sistemas de producción de levaduras se detallan en la Tabla 1.3, y específicamente el sistema otorgado por *Pichia pastoris* se caracteriza por la capacidad de generar modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación con enlaces de O y N y formación de enlaces disulfuro, no produce proteínas terapéuticas hiperglicosiladas y no contiene manosas unidas a α -1,3 terminales potencialmente inmunogénicas, en comparación

con el sistema formado con *S. cerevisiae* [65], también sobresale su gran capacidad por secretar proteínas [64], y además, su uso es sencillo como el de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* [65] [69].

Las desventajas de este sistema, es que en la etapa de transformación, a diferencia del sistema bacteriano, las células competentes requieren grandes cantidades (μg) del plásmido. El número de transformantes de *E. coli* (10^8 - 10^{11}) es mayor que el de transformantes de *P. pastoris* (10^3 - 10^4) por μg de ADN. Además, los niveles altos de metanol, sobre el 5 %, tienen un efecto tóxico sobre las células [65].

1.1.6. Sistemas de producción *in situ*

Una alternativa para producir xilooligosacáridos es mediante una fermentación microbiana *in situ*, donde la hidrólisis enzimática se lleva a cabo de manera simultánea a la producción de la enzima por parte de un cultivo en suspensión de un organismo productor de endo-1,4- β -xilanasas, tales como los hongos filamentosos *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma* [23] [72]. Incluso, usar sistemas eucariontes como *Pichia pastoris* podrían permitir una reducción en la producción simultánea de enzimas no deseadas como xilosidasas y celobiasas [23].

La puesta en marcha de un sistema *in situ* donde se lleve a cabo la fermentación de la biomasa lignocelulósica por microorganismos para producir XOS tiene un gran potencial, debido a la simplificación del proceso [22]. Además, es una estrategia muy prometedora ya que podría reducir el costo de producción de los compuestos de interés dado que no se requeriría de comprar enzimas y porque podría reducir el número de pasos involucrados en todo el proceso tradicional de producción, y puede potencialmente beneficiar al rendimiento de producción global [22].

Otras ventajas del proceso de fermentación *in situ* es que permite producir una mezcla con altas cantidades de XOS y bajo contenido de xilosa, ya que los microorganismos tienen preferencia por consumir azúcares fácilmente disponibles. Por lo tanto, este enfoque también tiene el potencial de reducir el costo de la purificación de XOS [22].

Se han realizado fermentaciones *in situ* para la co-producción de xilanasas y XOS a partir de residuos agroindustriales usando *Bacillus subtilis* [73], *Aspergillus brasiliensis* [74] y *Scytalidium thermophilum* [75], sin embargo, se obtuvieron bajos rendimientos, evidenciando que se requieren de condiciones específicas para un sistema *in situ*, las cuales son distintas a las condiciones de optimización de la producción de XOS [22].

A pesar de que *P. pastoris* es un organismo altamente estudiado por su gran capacidad de producir proteínas recombinantes [65], no existen estudios actuales donde se reporte su uso como huésped para la secreción de xilanasas recombinantes [23].

1.1.7. Modelos Matemáticos

Análisis de Flujos Metabólicos

El Análisis de Flujos Metabólicos o *Metabolic Flux Analysis* (MFA) es una técnica analítica importante utilizada para cuantificar los flujos metabólicos intracelulares. En la ingeniería metabólica de sistemas, esta herramienta es de gran importancia ya que sirve para comprender la fisiología celular en condiciones particulares y/o predecir su capacidad metabólica después de perturbaciones genéticas o ambientales [76].

El Análisis de Flujos Metabólicos busca resolver el sistema mostrado en la Ecuaciones 1.1, 1.2 y 1.3 [77]:

$$\text{Min } SSR = \sum \frac{(r - r_m)^2}{\sigma_r^2} \quad (1.1)$$

$$\text{s.t. } R \times v = r \quad (1.2)$$

$$S \times v = 0 \quad (1.3)$$

En la Ecuación 1.1, los flujos se estiman minimizando la suma de los residuos al cuadrado (SSR) entre las tasas medidas (r_m) y las tasas predichas por el modelo (r), sujeto a la restricción estequiométrica, donde los residuos se ponderan mediante errores de medición al cuadrado (σ_r^2). Luego, en las ecuaciones 1.2 y 1.3, S es la matriz estequiométrica, v es el vector de flujos metabólicos, r son las tasas metabólicas externas medidas, tales como la tasa de crecimiento, la absorción de sustrato y las tasas de acumulación de producto [77] [78].

Un MFA es un procedimiento de optimización, el cual puede ser basado en ^{13}C o en restricciones, estas últimas pueden ser estequiometrías de reacción y/o balances de masa, donde el supuesto principal es el estado pseudo-estacionario [76].

Ambos se usan con el mismo objetivo, cuantificar flujos internos a partir de una red metabólica previamente definida [79], pero la diferencia es que el MFA basado en ^{13}C utiliza isótopos de Carbono 13 y analiza patrones de acumulación de ^{13}C en los metabolitos mediante una Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM), siendo una de las aplicaciones la cuantificación de los flujos metabólicos de células cancerígenas [78].

Por otro lado, el MFA basado en restricciones proporciona información sobre cómo se equilibra el metabolismo, es decir, cómo los organismos convierten los sustratos en productos de interés o biomasa [79]. La ventaja de los modelos estequiométricos o basados en restricciones, es que pueden realizar las predicciones *in silico* de las rutas metabólicas, y dependiendo del objetivo del trabajo, estas rutas podrían ser rendimientos máximos, vías óptimas, requerimientos de sustrato o predicción de modificaciones genéticas óptimas usando diferentes algoritmos [80].

Los MFA se crearon inicialmente para comprender los fenotipos de células productoras, sin embargo, otros campos muy importantes en el que un MFA puede contribuir es el sector médico, para la ingeniería de tejidos o para estudiar el efecto de drogas o químicos en las

células y por ejemplo, determinar los niveles tóxicos [80]. También puede ser usado para la optimización de procesos de cultivos celulares usados para la producción de proteínas recombinantes que requieren glicosilaciones postraduccionales específicas [80].

La principal ventaja de MFA es que es sencilla de aplicar, y por lo tanto, accesible para muchos investigadores, ya que solo requiere álgebra lineal simple y se basa en mediciones sólidas de metabolitos extracelulares [77].

Análisis de Balance de Flujo

Un Análisis de Balance de Flujo o *Flux Balance Analysis* (FBA) es un método ampliamente utilizado para analizar redes metabólicas [81]. Sirve para cuantificar la distribución del flujo intracelular de una red metabólica mediante la optimización de una función objetivo planteado en un Problema de Programación Lineal (PPL) [80]. Una de las funciones objetivos más usadas es la de producción de biomasa, la cual busca ser maximizada [82].

En el FBA se busca resolver el sistema mostrado en la Ecuaciones 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7, correspondiente a un problema de programación lineal [83]:

$$\underset{v,p}{Max} \sum_{i \in I^{obj}} p_i \quad (1.4)$$

$$\sum_{j \in J} S_{i,j} \cdot v_j = p_i, \forall i \in I \quad (1.5)$$

$$p_i = 0, \forall i \notin I^{obj} \quad (1.6)$$

$$\alpha_j \leq v_j \leq \beta_j, \forall j \in J \quad (1.7)$$

En la Ecuación 1.4 se observa la función objetivo a maximizar, donde I son todos los metabolitos, I^{obj} es el metabolito objetivo sobre el cual se harán las iteraciones, p_i es el vector de tasas de acumulación de metabolitos el cual se limita a cero para todos los metabolitos además del metabolito cuyo rendimiento se maximiza, y también para las Ecuaciones 1.5, 1.6 y 1.7, J son todas las reacciones, $S_{i,j}$ es la matriz estequiométrica y v_j es el vector de flujos distinto a cero [83].

La mayoría de las herramientas para la simulación FBA's requieren descargas de software, los paquetes de software más populares para la simulación requieren conocimientos de programación informática. COBRA Toolbox y COBRApy requieren conocimientos de los lenguajes de programación MATLAB y Python, respectivamente [81].

El enfoque principal del análisis de balance de flujo (FBA), y varios enfoques relacionados con la reconstrucción y análisis basados en restricciones (COBRA), es analizar las consecuencias de estas restricciones estequiométricas según las capacidades de cada sistema biológico [80].

Una de las aplicaciones más tempranas y exitosas del FBA fue calcular los rendimientos teóricos máximos de productos metabólicos para un modelo de red y sustrato dado resolviendo

el problema de programación lineal, pero también puede ser utilizado para calcular los rendimientos máximos de biomasa, en este caso, es importante incluir también la reacción de formación de biomasa asociado al microorganismo estudiado [78].

1.2. Motivación

Debido a que los cultivos donde se implementan sistemas *in situ* se han planteado como sistemas potencialmente rápidos y de menor costo [22], se tiene un gran interés en desarrollar un sistema de producción de XOS en una sola etapa mediante el uso este sistema. En él se plantea cultivar *Pichia pastoris*, con la capacidad de producir la xilanasa, junto con paja de trigo o algún material lignocelulósico que esté disponible en Chile y sea de fácil acceso, de este modo al realizar la inducción, *P. pastoris* secreta la enzima mientras simultáneamente se lleva a cabo la hidrólisis enzimática, para obtener como producto final xilo-oligosacáridos con un bajo DP.

Así es como se propone estudiar el efecto que provocan distintos factores de cultivo, tales como temperatura, pH, concentración de metanol, tipo de *buffer* y estudiar el efecto que tienen los componentes del medio de cultivo sobre la producción de xilanasa recombinante y el crecimiento de *Pichia pastoris*. Además, para predecir la producción de xilanasa se plantea construir un modelo matemático que relacione el consumo de metanol (fuente de carbono) con la producción de xilanasa recombinante.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Estudiar el efecto del pH, temperatura, concentración de inductor, tipo de *buffer* y los componentes del medio de cultivo sobre la producción de xilanasa recombinante en *Pichia pastoris* y diseñar un modelo matemático que estime la producción de la enzima en metanol.

1.3.2. Objetivos Específicos

- 1.- Identificar las condiciones de cultivo que son más relevantes en la producción de la proteína recombinante a partir de *P. pastoris*, estas son concentración de metanol, temperatura, pH y tipo de *buffer*.
- 2.- Evaluar el efecto de los componentes del medio de cultivo BMMY sobre la actividad de xilanasa recombinante GtXyn10A.
- 3.- Establecer la reacción estequiométrica relacionada con la producción de xilanasa en *Pichia pastoris*.
- 4.- Construir un modelo matemático del metabolismo de *Pichia pastoris* para la producción de la proteína recombinante endoxilanasa, a partir de metanol como fuente de carbono.

Capítulo 2

Materiales y Metodología

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos

En la Tabla 2.1 se listan los reactivos y kits usados para llevar a cabo los experimentos.

Tabla 2.1: Reactivos y kits usados durante el trabajo en laboratorio.

Reactivo/Kit	Fabricante
Peptona (Bacto™ Peptone)	BD Difco
Extracto de Levadura (Bacto™ Yeast Extract)	BD Difco
YNB, Yeast Nitrogen Base	BD Difco
YNB, Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids and Ammonium Sulfate	BD Difco
Biotina	Sigma Aldrich (Merck)
K ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Dextrosa	Merck
Metanol	Merck
Glicerol	Merck
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
Albúmina de Suero Bovino (BSA)	Sigma Aldrich (Merck)
DNS	PanReac AppliChem, Merck
Xilano (Beechwood)	Megazyme
PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare

El laboratorio dispone de dos YNB's, ambos sin aminoácidos pero uno con sulfato de amonio y el otro sin sulfato de amonio. Por esto es que se decide realizar los experimentos con ambos compuestos. Para poder diferenciar a los YNB's, al YNB sin sulfato de amonio se le denomina 'YNB 2Y' y al YNB con sulfato de amonio se le denomina 'YNB 4Y'.

2.1.2. Equipos

Los equipos usados para llevar a cabo los experimentos se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Equipos de laboratorio utilizados durante el trabajo de tesis.

Equipo	Fabricante	Modelo
Microcentrífuga	Eppendorf	Centrifuge 5804 R
Centrífuga	Heal Force	Neofuge 15R
Incubadora con agitación	Shel Lab	SI6R
Termociclador	Hangzhou Jingle Scientific Instruments Co.	Gradient PCR thermal cycler K960
Campana de Flujo Laminar	Steamline Laboratory Products	SHC-4AX
Espectrofotómetro (Lector de placas)	1 Biochrom Ltd.	Biochrom Asys UVM 340 Scanning Microplate Reader
Espectrofotómetro (Lector de cubetas)	2 Biochrom Ltd.	Biochrom Libra S50 UV/Vis Spectrophotometer
Calentador de Bloques	Labline Instruments	Multi-Blok Heater Model 2000
Estufa	Gallenkamp	Hot Box Oven - Size 2

2.1.3. Herramientas Computacionales

Los programas usados y sus funciones principales se encuentran listados en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Herramientas computacionales usadas durante el trabajo de tesis.

Programa	Función
DigiRead 1.8	Registro de las lecturas de absorbancia.
Microsoft Excel 2014	Construcción de gráficos, cálculo de valores estadísticos, construcción de la matriz del MFA, uso de la herramienta <i>solver</i> .
Python 3.8.3	Extensión <i>cobrapy</i> para la construcción del FBA.
yEd Graph Editor 15.0.2	Diseño gráfico de las rutas metabólicas.
MMDB and VAST+	Diseño de estructura tridimensional de proteínas.
LaTeX	Creación del documento principal.

2.1.4. Microorganismo

Los experimentos se realizan con la cepa KM71 del hongo *Pichia pastoris*, el cual contiene inserto el gen *GtXyn10A*, secuencia que codifica para la síntesis de xilanas recombinante. El microorganismo se encuentra disponible en el Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB).

2.1.5. Composición Medios de Cultivo

A continuación se detalla la composición de cada medio de cultivo usado durante el trabajo de tesis.

- Medio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*): La composición del medio YPD* se muestra en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Composición del medio YPD líquido [69].

Componente	Concentración
Peptona	2 %
Dextrosa (Glucosa)	2 %
Extracto de Levadura	1 %

*Para cultivar en placas, agregar 20 g de agar bacto en 1 litro de medio de cultivo.

- Medio BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*): La composición del medio BMGY se muestra en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Composición del medio BMGY [69].

Componente	Concentración
Peptona	2 %
YNB	1,34 %
Extracto de Levadura	1 %
Glicerol	1 %
Fosfato de Potasio pH 6,0	100 mM
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$ %

- Medio BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*): La composición del medio BMMY se muestra en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6: Composición del medio BMMY [69].

Componente	Concentración
Peptona	2 %
YNB	1,34 %
Extracto de Levadura	1 %
Metanol	0,5 %
Fosfato de Potasio pH 6,0	100 mM
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$ %

Para ver en detalle la preparación de cada medio de cultivo, junto con los *buffers* y soluciones *stock* ver el Anexo B.

2.2. Metodología

2.2.1. Ensayo de Actividad

Como se nombró anteriormente, *Pichia pastoris* se cultiva a 30°C y a pH 6 en el medio BMMY el cual contiene *buffer* fosfato de potasio 100 [mM] y se induce con metanol al 0,5 % [69]. Por otro lado, la enzima GtXyn10A ha demostrado tener su actividad máxima a 50°C [34] y pH 5 [43] y su expresión podría ser aumentada con concentraciones mayores de metanol. Además, se encuentra que la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* también puede ser llevada a cabo en *buffer* citrato de sodio [84], es por esto, que con el fin de proponer los factores de diseño de un sistema *in situ*, se plantea estudiar cómo se ve afectada la actividad enzimática bajo distintos factores. Los factores estudiados se muestran en la Tabla 2.7 junto con las condiciones usadas.

Tabla 2.7: Factores analizados para el estudio de la actividad enzimática.

N°	Factor	Condiciones
1	Concentración de Metanol	0,5 %, 1 % y 2 %
2	pH	5, 6 y 7
3	Temperatura	30°C y 50°C
4	<i>Buffer</i>	Fosfato de potasio y Citrato de sodio
5	Componentes del medio BMMY	Peptona, extracto de levadura, YNB y biotina.

Los ensayos de actividad, a modo general, se realizan en placas de 96 pocillos donde se usan volúmenes de 200 [μ L], el 10 % corresponde a volumen de enzima mientras que el 90 % a volumen de sustrato (xilano 1 %), este último volumen varía si se agregan otros componentes a la reacción. El *buffer* usado es acetato de sodio 50 [mM] a pH 5, los ensayos se realizan a 30°C durante 30 [min], además, cada ensayo es hecho por triplicado incluyendo un blanco o control negativo.

Los volúmenes específicos para el estudio de cada factor son los siguientes:

- **Factor 1:** 100 [μ L] de xilano 1 %, 80 [μ L] de metanol y 20 [μ L] de enzima disuelta en *buffer* acetato de sodio 50 mM a pH 5. Cada ensayo se hizo con las concentraciones de metanol nombradas en la Tabla 2.7.
- **Factor 2:** 100 [μ L] de xilano, 40 [μ L] de *buffer*, 40 [μ L] de agua y 20 [μ L] de enzima disuelta en *buffer* acetato de sodio 50 mM a pH 5. El *buffer* varía según el pH estudiado, para los pH's 5 y 6 se usa *buffer* citrato de sodio y para el ensayo a pH 7 se usa *buffer* MOPS.
- **Factor 3:** Para el estudio del efecto de la temperatura se usan las mismas proporciones para ambos ensayos, estos son 100 [μ L] de xilano, 40 [μ L] de agua, 40 [μ L] de *buffer* y 20 [μ L] de enzima.
- **Factor 4:** 100 [μ L] de xilano, 40 [μ L] de *buffer*, 40 [μ L] de agua y 20 [μ L] de enzima. Los *buffers* usados son los nombrados en la Tabla 2.7.
- **Factor 5:** Los volúmenes usados para este ensayo son 100 [μ L] de xilano, 80 [μ L] del componente a estudiar y 20 [μ L] de enzima. Los componentes se agregan manteniendo

las concentraciones con las que son agregadas al medio BMMY.

Finalmente, la actividad enzimática, definida como la cantidad de enzima que puede catalizar la transformación de 1 μmol de sustrato a producto durante 1 minuto bajo condiciones estándar, y su unidad de medida es el [U] ('Unidades') o [U/ml] si se quiere normalizar por unidad de volumen [85], se mide con el método del DNS (ácido 3,5-Dinitrosalicílico), usando una proporción 1:1 entre volumen de reacción y volumen de DNS, luego la microplaca es calentada a 99°C durante 5 min, para finalmente, llevarla al espectrofotómetro y medir absorbancia a 550 [nm]. El valor de absorbancia es transformado a concentración de azúcares reductores [mg/ml] usando la ecuación obtenida de la curva de calibración de DNS y luego, con la Ecuación 2.1, el valor es transformado a actividad enzimática por unidad de volumen [U/ml]. La curva se encuentra en el Anexo C.1 y la ecuación se muestra a continuación:

$$Act = \frac{[Xil] \cdot FD \cdot 1000}{PM_{xilosa} \cdot t_{rxn}} \quad (2.1)$$

Donde Act es actividad enzimática en [U/ml], $[Xil]$ es concentración de xilosa en [mg/ml], FD es el factor de dilución [-], PM_{xilosa} es peso molecular de la xilosa, la cual es 150,33 [mg/mmol] [86] y t_{rxn} es el tiempo de reacción en [min]. Además la ecuación está multiplicada por 1000, con el fin de ajustar correctamente las unidades.

2.2.2. Análisis Estadístico

Los ensayos de actividad se realizan variando el pH, la temperatura, el *buffer* y los componentes del medio BMMY, y para cuantificar el efecto de estos cambios sobre la actividad enzimática, se hace un análisis estadístico implementando un test de hipótesis. En él se plantean dos hipótesis, la primera de ellas es la hipótesis nula (H_0) o de no efecto, la cual indica que no hay diferencias entre los datos analizados, y la segunda es la hipótesis alternativa (H_1), la cual indica cierto grado de diferencia entre los datos. Debido a que se desea conocer la diferencia o similitud entre los datos experimentales obtenidos para una población normal con 3 datos, se realiza el análisis *t-student*. Dependiendo de la finalidad del análisis, se selecciona el criterio adecuado para determinar el mejor resultado.

Existen 2 subtipos de análisis, el primero de ellos es la prueba con dos colas, el cual indica **qué tan distintos** son los 2 *set* de datos. El segundo análisis corresponde a la prueba con una cola, el cual identifica si **un set de datos es mejor o peor** que el *set* de datos de referencia. La diferencia gráfica se puede ver en la Figura 2.1.

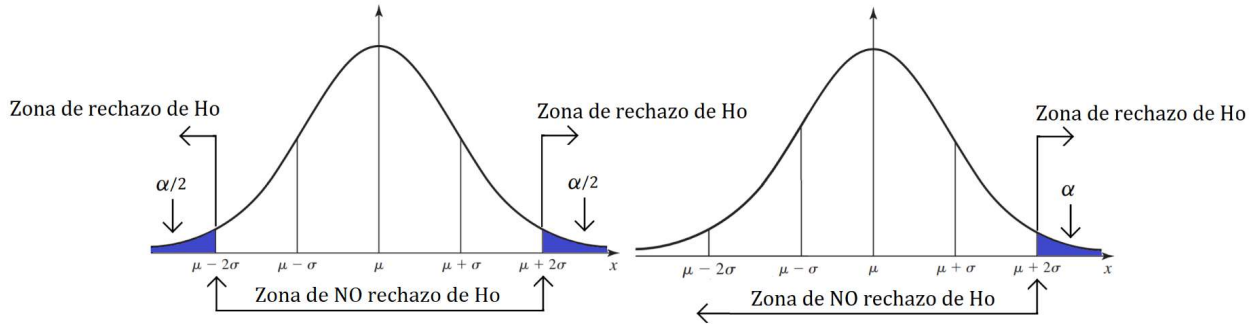


Figura 2.1: A la izquierda prueba *t-student* con 2 colas, a la derecha prueba *t-student* con 1 cola, donde α representa el riesgo. La zona azul representa la zona de rechazo de la hipótesis nula (H_0) o aceptación de la hipótesis alternativa (H_1) y la zona no pintada representa la zona de aceptación de la hipótesis nula. Adaptado de [87].

Al trabajar ya sea con una o dos colas, se usa un intervalo de confianza del 95 %, o equivalente a tener un riesgo (α) del 5 %, esto quiere decir que el valor crítico o *p-value* es igual a 0,05. Este valor es elegido ya que es uno de los riesgos más usados y aceptados, y también ha demostrado arrojar resultados confiables. [87]

Para determinar si hay o no diferencias significativas entre los *set* de datos se usan los criterios que se muestran a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Criterio 1 : } p > 0,05 & \begin{cases} 95 \% \text{ Probabilidad de que los datos tengan una diferencia aleatoria.} \\ 5 \% \text{ Probabilidad de que los datos tengan una diferencia significativa.} \end{cases} \\ \text{Criterio 2 : } p < 0,05 & \begin{cases} 95 \% \text{ Probabilidad de que los datos tengan una diferencia significativa.} \\ 5 \% \text{ Probabilidad de que los datos tengan una diferencia aleatoria.} \end{cases} \end{aligned}$$

Tener una **diferencia aleatoria** significa que los errores asociados corresponden principalmente a errores aleatorios o a ruido ambiente, el cual suele ser inevitable e irrepetible [88], por ende, la hipótesis nula es aceptada. Esto implica que los datos son suficientemente similares y se puede trabajar con todos ellos [89].

Por otro lado, tener una **diferencia significativa**, implica que hay un error sistemático asociado al resultado, es decir, se tienen errores asociados al diseño del trabajo, al calibrado de los instrumentos o al momento de tomar las muestras [88]. Para corregirlo se deben analizar y suprimir algunos datos con el objetivo de salir de la zona de riesgo y poder aceptar la hipótesis nula. En caso de que no se logre esto último, se dice que los datos sí poseen una diferencia significativa, por lo que se debe repetir la toma de muestra, o bien, descartar el *set* de datos comparados.

Para ilustrar el uso de los criterios nombrados anteriormente se realiza el siguiente ejemplo: si el valor del *p-value* es 0,6, se entra en el criterio 1, donde $p > 0,05$. Esto quiere decir que hay un 60 % de probabilidad de que los datos presenten una diferencia aleatoria, es decir no tengan una diferencia significativa, y un 40 % de probabilidad de que los datos sí presenten una diferencia significativa y como el intervalo de confianza elegido es del 95 %, se concluye

que los datos no son estadísticamente distintos. Esto se refleja en la Figura 2.1 donde los datos analizados caen en la zona blanca, donde la hipótesis nula es aceptada.

2.2.3. Medición de Concentración de Proteínas

Para saber la concentración de proteína producida en los cultivos de *Pichia pastoris* se realizan ensayos de proteína de Bradford, en el que, en una placa de 96 pocillos, se añaden 200 [μL] de reactivo de Bradford y 10 [μL] de la solución que contiene la proteína, en este caso se añaden directamente 10 [μL] de medio de cultivo. Cada ensayo es realizado por triplicado y con un control negativo, el cual contiene 200 [μL] de reactivo de Bradford y 10 [μL] de agua milli Q. La placa es llevada al espectrofotómetro para medir absorbancia a 595 [nm]. Los valores son transformados a unidades de concentración [mg/ml] usando la curva de calibración correspondiente que se adjunta en el Anexo C.2.

2.2.4. Cultivo de *Pichia pastoris*

Las células de *Pichia pastoris* se encuentran almacenadas en tubos eppendorf a -80°C en los laboratorios del CeBiB, es por esto que no se pueden realizar directamente los cultivos y es necesaria la integración de etapas previas. De este modo se identifican 4 etapas, estas son: Crecimiento en Placas, Generación del Inóculo, Inoculación y Crecimiento Celular, e Inducción. A continuación se describe cada etapa.

- **Crecimiento en Placas:** Bajo campana se abre el tubo eppendorf que contiene las células de *Pichia pastoris*, se raspa levemente la superficie de las células y se llevan a una placa con YPD sólido. Luego se espera a que crezcan las colonias de *P. pastoris* incubadas a 30°C . Esta etapa suele tardar entre 24 y 48 horas.
- **Generación del Inóculo:** Crecidas las colonias, se selecciona la mejor, es decir la más simétrica y alejada de otras colonias. Esta es sumergida y diluída en un tubo Falcon con 10 [ml] de medio YPD líquido. El tubo se deja bajo agitación (200 rpm) a 30°C , ligeramente inclinado y con la tapa semi abierta para permitir la aireación. Se esperan 24 horas para que las células se adapten y crezcan, de este modo se obtiene el inóculo.
- **Inoculación y Crecimiento:** Con el inóculo listo, se traspasan 2 [ml] de inóculo por cada litro de medio de cultivo BMGY en un matraz adecuado al volumen usado, a 30°C y 200 rpm. Se esperan 24 horas, tiempo en el que las células crecen y se multiplican.
- **Inducción:** Finalmente, las células obtenidas del paso anterior son concentradas y colocadas en un matraz con medio BMMY, el cual al contener metanol lleva a cabo la inducción de la producción de xilanas GtXyn10A. El cultivo se realiza durante 3 días a 30°C y 200 rpm.

Para ver más detalles o imágenes de las etapas descritas anteriormente, ver Anexo D.1.

2.2.5. Medición de Peso Seco

Las mediciones son hechas en papeles filtro y tubos Falcon de 50 [ml], estos son ingresados a una estufa a 60°C *overnight* con el fin de eliminar la humedad de cada elemento. Luego de 24 horas se mide la masa del papel filtro y el tubo Falcon (m_i). A continuación, las muestras

extraídas diariamente de los cultivos se centrifugan a 10.000 [rpm] (12.200 g) durante 5 minutos, los *pellets* obtenidos, una vez separados de los sobrenadantes, se diluyen con agua destilada y se vierten en los papeles filtros, los cuales fueron afirmados en los tubos Falcon. Para ver el sistema completo ver Figuras del Anexo D.2. Esto se coloca nuevamente en la estufa a 60°C *overnight* y luego de 24 horas se mide el peso del sistema completo, es decir del papel filtro junto al tubo Falcon y al pellet seco (m_f). Finalmente, el peso seco (m_{PS}) se calcula restando la masa del papel filtro y del tubo Falcon según la Ecuación 2.2.

$$m_{PS} = m_f - m_i \quad (2.2)$$

2.2.6. Filtración por columnas PD10

Las columnas PD10 contienen la resina Sephadex G-25 que permite descartar sales y otros contaminantes [90]. Existen 2 protocolos, el primero de ellos por centrifugación y el segundo por gravedad, la ventaja del primero es que es más rápido y tiene un rendimiento del 90 % pero la columna debe ser desechada luego de un uso. Por otro lado, el método por gravedad es un proceso más lento, sin embargo las columnas pueden ser reusadas múltiples veces y tiene un rendimiento del 98 % [90].

El protocolo usado es por gravedad, por lo que las filtraciones se realizaron manualmente. A continuación en la Figura D.9 se muestran las columnas descritas anteriormente.



Figura 2.2: Columnas PD10 usadas para la filtración de los medios de cultivos. Imagen extraída de [91].

Como se observa en la Figura 2.2, las columnas se encuentran abiertas por la parte superior, mientras que por la parte inferior tienen un tapón el cual es sacado o colocado dependiendo de la etapa en la que se encuentre la filtración.

Primero, por la parte superior se ingresan 2,5 ml de *buffer* acetato de sodio 50 [mM] y se espera a que pase completamente el líquido por la columna, esto se repite 4 veces con el fin de limpiar la resina.

A continuación los medios de cultivos son colocados por la parte superior, dejando la parte inferior sin tapón, de este modo la proteína queda atrapada en la resina y los contaminantes son descartados.

Luego, en la parte inferior se coloca el recipiente que va a contener la solución filtrada, en este caso se usa un tubo Falcon de 15 [ml], se añaden 3,5 [ml] de *buffer* acetato de sodio 50 [mM] y se espera a que toda la solución salga de la columna. De este modo se obtiene el medio de cultivo filtrado y diluido en *buffer* acetato. Cada vez que se termine de usar la columna o se quiera usar para una nueva filtración, se debe realizar la etapa de limpieza.

Se usa *buffer* acetato ya que ese es el *buffer* en donde se realizan los ensayos de actividad, de este modo la solución puede ser usada directamente.

2.2.7. Análisis de Flujos Metabólicos (MFA)

Para establecer la reacción que representa la producción de xilanasa recombinante se deben identificar las reacciones metabólicas que participan en la síntesis de la enzima en *Pichia pastoris*. Una fracción de las reacciones fueron extraídas del documento publicado por Unrean (2013), quien estudió la producción de dos proteínas recombinantes en *P. pastoris*, la hormona del crecimiento humano o hGH (*human Growth Hormone*) y la proteína de fluorescencia verde o GFP (*Green Fluorescent Protein*) [92]. La otra fracción de las reacciones se extrajeron de la plataforma Kegg [93]. Las reacciones extraídas del documento de Unrean (2013) se usan de base para la construcción de la ruta metabólica, la cual es completada usando las reacciones encontradas en Kegg, obteniendo un total de 69 reacciones y 67 metabolitos.

Una vez construida la ruta metabólica e identificadas las reacciones participantes en la síntesis de xilanasa recombinante, se procede a construir la matriz estequiométrica usada en un MFA. Para ello se eligen las reacciones relacionadas con el consumo de metanol y oxígeno, y se identifican los metabolitos usados en el citoplasma, en la mitocondria o en el medio extracelular.

El objetivo de la construcción de la matriz es resolver el sistema lineal $S \times v = r$, donde S es la matriz de coeficientes estequiométricos de dimensiones $m \times n$, con m número de metabolitos (filas) y n número de reacciones (columnas), v es el vector de flujos intracelulares y r es el vector de flujos netos. Se le asigna el valor de 0 a r , a las filas que contienen metabolitos intermedios ya que se asume que el sistema se encuentra en estado estacionario, por lo que no hay acumulación estos metabolitos, mientras que a los metabolitos externos, el valor de r se calcula en base a supuestos, o bien, se obtienen a partir de datos experimentales [94]. De este modo se tienen 3 situaciones para un sistema de ecuaciones linealmente independientes (L.I.):

- a) $m > n$, el sistema está sobredeterminado, puede haber una solución o puede no existir.
- b) $m = n$, el sistema está determinado, existe un única solución.

c) $m < n$, el sistema está subdeterminado, no hay solución única.

Para resolver el sistema $S \times v = r$, es necesario situarse en el segundo caso, justamente para contar con una solución única. Para esto, del total de 69 reacciones, se utilizan 53 reacciones y 53 metabolitos. El número de reacciones disminuye debido a que pares o tríos de reacciones fueron unidas en una única reacción, por lo tanto ninguna reacción es descartada, y luego, se verifica que no hayan quedado reacciones linealmente dependientes (L.D).

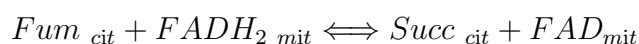
Finalmente, resolviendo el sistema de ecuaciones se determina la reacción faltante que caracteriza la síntesis de xilanas.

Para verificar que la reacción encontrada esté correcta, se usa la herramienta *solver* de Microsoft Excel, donde se realiza el trabajo inverso, el cual usa la reacción de síntesis de xilanas y encuentra el vector de flujos r con el fin de comprobar que los flujos obtenidos experimentalmente se ajustan correctamente al *set* de reacciones, en caso de que no se ajuste, la reacción es corregida según el resultado del *solver* y del error encontrado.

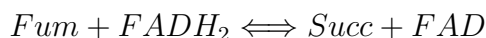
2.2.8. Modelamiento Matemático de *Pichia pastoris*

Construcción del Modelo Matemático

Para la construcción del modelo matemático se procede a realizar un Análisis de Balance de Flujo o FBA (*Flux Balance Analysis*), para ello se usa el programa optimizador de libre uso Cobrapy [95], donde se ingresa el *set* de reacciones identificadas que son partícipes del proceso estudiado, sin embargo, a diferencia del MFA, no se hace distinción entre organelos, citoplasma y el medio extracelular, por lo que los metabolitos son unidos en un sólo término. De este modo, si se tiene la siguiente reacción:



en el FBA se ve lo siguiente:



Por esta misma razón no son agregadas las reacciones de transporte.

Luego, se define una función objetivo, la cual representa la reacción que Cobrapy va a optimizar, por lo que existe la probabilidad de que el programa automáticamente suprima reacciones que identifique como *innecesarias* por el mismo hecho de que optimiza las rutas. Para evitar o amortiguar esta eliminación de reacciones que puedan ser importantes en el metabolismo del microorganismo, se debe realizar una curación del modelo.

Curación del Modelo Matemático

Construido el modelo matemático se procede con la curación de este mismo, el cual consta de 6 etapas fundamentales [96], estas son:

- 1) Identificación de *Dead-Ends*.
- 2) Identificación de reacciones huérfanas.

- 3) Identificación de *Gaps*.
- 4) Revisión de reversibilidad de las reacciones.
- 5) Balance de masa y balance de carga.
- 6) Revisión y/o corrección de la anotación de relación *Gene-Protein-Reaction* (GPR).

En la primera etapa se buscan aquellas reacciones cuyos metabolitos no tienen un final determinado, es decir no son usadas en otras reacciones ni son exportadas al medio extracelular por lo que su acumulación dentro de la célula es constante. Para corregir estos *Dead-Ends* las reacciones son conectadas a otras, o bien, si la reacción no es fundamental es eliminada.

Las reacciones huérfanas corresponden a aquellas reacciones que no están conectadas o relacionadas con la red de reacciones encontrada. Para corregirlo se deben conectar las reacciones al circuito, así se da continuidad al sistema. En caso de no poder integrar las reacciones se debe eliminar con la condición de que no sea fundamental en el metabolismo estudiado.

En la tercera etapa, se buscan los *Gaps*, es decir, aquellas reacciones que no tienen asociado un gen. Para corregirlo se debe evaluar si es conveniente eliminar toda la ruta metabólica asociada a esa reacción. En caso de que la ruta sea importante y no sea posible eliminarla, se puede continuar con el proceso pero teniendo en consideración esta ausencia.

En la cuarta etapa se estudia si las reacciones son reversibles o irreversibles. Esto se puede hacer realizando una búsqueda bibliográfica en plataformas conocidas como Brenda [97] o NCBI [98].

El balance de masa y balance de carga se hace para cada reacción, esto con el fin de cumplir con los balances de masa correspondiente. Este trabajo es llevado a cabo manualmente y usando la base de datos de Kegg se encuentran las reacciones balanceadas [93].

Luego, la relación *Gene-Protein-Reaction* hace referencia a que cada gen esté asociado a su proteína respectiva, la cual a su vez esté asociada a la reacción correcta. Es posible que exista más de un gen asociado a una proteína, como también es posible que varias proteínas estén asociadas a una reacción. Todo esto debe ser verificado y corregido. Para verificarlo se pueden usar las plataformas nombradas anteriormente y para corregirlo se debe crear una función *for* en el código del modelo, donde se asocien los genes, proteínas y reacciones correspondientes.

Finalmente se ajustan las condiciones de borde según los flujos calculados y/u obtenidos experimentalmente.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Evaluación de las condiciones de cultivo de *Pichia pastoris* sobre la actividad enzimática.

Tal como indica Amorim *et al.* (2019) las condiciones de operación de un sistema *in situ* son distintas a las de un sistema de producción de XOS [22], por lo que para conocer estas condiciones y para cumplir con el primer objetivo de este trabajo, se estudió cómo se ve afectada la producción de la enzima al ser usada bajo las condiciones de cultivo de *Pichia pastoris*. Los factores estudiados son la concentración de metanol, pH, temperatura y el *buffer*.

A continuación se muestran los resultados del estudio hecho sobre cada factor.

3.1.1. Efecto de la concentración de metanol sobre la actividad enzimática

Pichia pastoris KM71 es una levadura disponible en el laboratorio del CeBiB, la cual tiene inserta el plasmidio con el gen recombinante de GtXyn10A, y mediante el metanol es que la expresión de este gen es inducido.

Para realizar la inducción, el metanol debe estar en una concentración del 0,5 % ya que así lo indica la receta del medio BMMY [69], y con el fin de saber cómo se ve afectada la enzima al estar en presencia de metanol a concentraciones mayores, se estudió el efecto que tiene el metanol al ser añadido en distintas concentraciones.

El ensayo de actividad se realizó con concentraciones de metanol de 0,5 %, 1 % y 2 %, y además se realizó un ensayo sin metanol usado como control negativo. El resultado se encuentra en la Figura 3.1. (los datos experimentales se adjuntan en el documento "*Datos_Experimentales.xlsx*" presente en el *link* la referencia [99]).

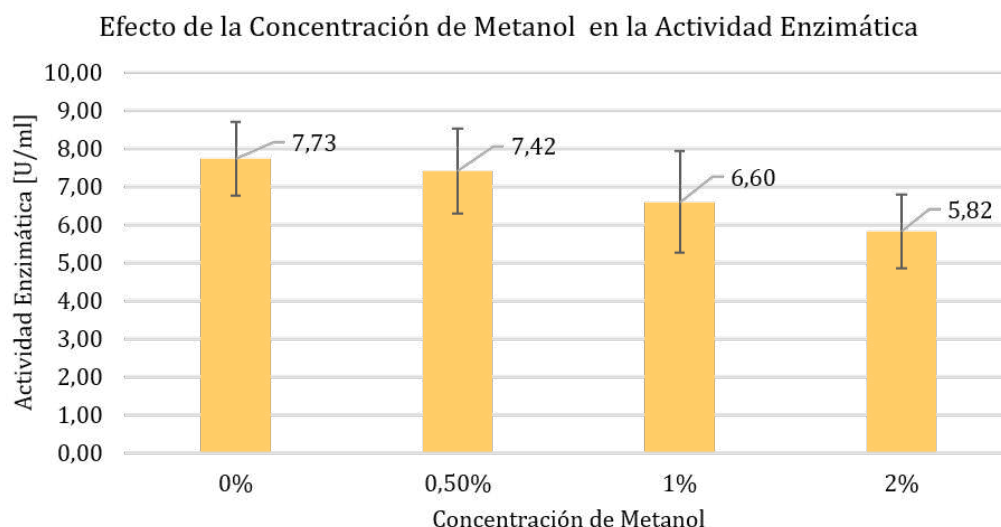


Figura 3.1: Efecto de la concentración de metanol en la actividad enzimática de la xilanasas GtXyn10A. Ensayo de actividad realizado a 30°C y pH 6 durante 30 [min]. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.

Como se ve en la Figura 3.1, la actividad disminuyó a medida que aumentó la concentración de metanol, de este modo, para una concentración de metanol del 0,5 %, la actividad disminuyó un 4 %, mientras que al usar concentraciones de 1 % y 2 %, la actividad se redujo en un 15 y 25 % respectivamente con respecto al ensayo sin metanol. Para saber qué tan significativa es la disminución de la actividad, se realizó un análisis estadístico *t-student* con un intervalo de confianza del 95 %. Del análisis se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Resultados del análisis *t-student* para el ensayo de actividad hecho con distintas concentraciones de metanol.

Valores Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
Metanol al 0 % y 0,5 %	0,482	No significativo
Metanol al 0 % y 1 %	0,114	No significativo
Metanol al 0 % y 2 %	0,004	Significativo

De la Tabla 3.1 se desprende que al usar concentraciones de 0,5 y 1 % no hay una disminución significativa de la actividad debido a que el *p-value* es mayor a 0,05. Sin embargo, al usar una concentración del 2 %, el *p-value* es menor a 0,05, con esto se concluye que el efecto del metanol sobre la actividad enzimática es estadísticamente significativa y se puede afirmar con una seguridad del 99,6 %.

Esta reducción de actividad enzimática por parte del metanol también fue observado en la proteína fusión EG-M-Xyn, que presenta dos actividades celulolíticas (endoglucanasa y xilanasas) [100]. Las enzimas lograron tener actividades relativas del 73,5 % y 86,5 % respectivamente al estar en contacto con metanol al 5 % [100].

Adicionalmente, se encontró que el aumento abrupto en la concentración de metanol (5 %) en el medio de cultivo produjo que el crecimiento de *Pichia pastoris* se detuviera completamente [101]. También, se reportó que el metanol desde una concentración del 2 % empieza a actuar como inhibidor del crecimiento celular [102]. Por el contrario, otros estudios indican que agregar metanol en bajas concentraciones (inferiores a 0,25 %), conduce a un crecimiento y una producción deficientes [103].

Sumado a lo anterior, Lee *et al.* (2017) estudió el mecanismo de inducción del promotor AOX1 y encontró que este, además de ser inducido por metanol, es fuertemente inhibido por otras fuentes de carbono, como glucosa y glicerol [102]. Debido a esto, y a que uno de los productos de la acción de las xilanasas son las xilosas, es importante estudiar cómo la concentración de este azúcar afecta al promotor AOX1 y se debe investigar si la producción de enzima se ve afectada.

Considerando los resultados encontrados y proyectando el resultado anterior con un cultivo de *P. pastoris* para un sistema *in situ*, se determina que la inducción debe ser hecha con metanol al 1 % ya que de este modo se aumenta el grado de inducción sin afectar la actividad de la enzima y sin afectar el crecimiento de *Pichia pastoris*.

3.1.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Las xilanasas fúngicas presentan su actividad máxima a pH ácidos cercanos a 5, aunque dependiendo de otras condiciones como la temperatura, esta puede variar entre pH 4 y 6 [104]. Por otro lado, la cepa KM71 de *Pichia pastoris* se cultiva en el medio BMGY a pH 6 por lo que es importante saber cómo se ve afectada la actividad de la enzima frente a esta variación de pH [69].

El ensayo de actividad se llevó a cabo a pH 5, 6 y 7. Para ello se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 3.2. (Los datos experimentales se adjuntan en el documento "*Datos_Experimentales.xlsx*" presente en el *link* la referencia [99]).

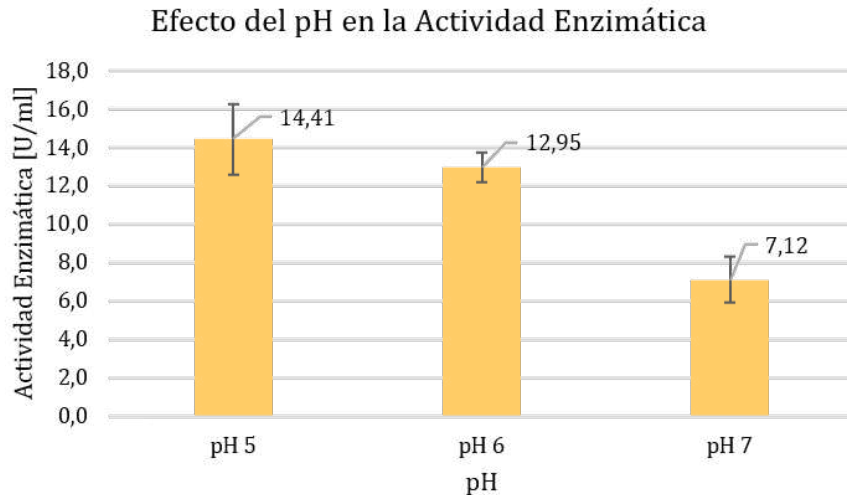


Figura 3.2: Efecto del pH en la actividad enzimática de la xilanasa GtXyn10A. Ensayo de actividad hecho a una temperatura constante de 30°C durante 30 [min]. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.

Como se observa en la Figura 3.2, la actividad disminuyó un 10% al pasar de pH 5 a pH 6. Esta reducción no es despreciable, pero aún así la enzima presenta una alta actividad. Luego, al comparar los pH 5 y 7, se ve una disminución del 51 %, es decir la enzima es sensible a este cambio de pH, ya que reduce su actividad a la mitad. Para confirmar el análisis hecho, se hizo un análisis estadístico, donde se tomó como referencia el pH 5. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Resultados del análisis *t-student* para el ensayo de actividad hecho con distintos pH's.

Valores Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
pH 5 y 6	0,304	No significativo
pH 5 y 7	0,003	Significativo

Con esto se determina que la enzima puede ser usada a pH 6 sin tener un efecto perjudicial sobre su actividad (*p-value* > 0,05), pero es de suma importancia no sobrepasar este valor de pH, ya que la disminución de la actividad es estadísticamente significativa a pH 7 (*p-value* < 0,05).

El efecto observado en la Figura 3.2 se relaciona con la dependencia que tienen todas las enzimas con el pH. Los resultados obtenidos en la Figura 3.2, corresponden a la sección derecha de la campana, siendo el pH 5 un valor cercano al máximo según los antecedentes [43].

3.1.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La temperatura a la que se cultiva *Pichia pastoris* depende de la cepa con la que se trabaje, pero en general, el crecimiento se da entre 28 y 30°C [69]. Por otro lado, las xilanasas suelen

tener actividad máxima a altas temperaturas, cercanas a los 60°C para xilanasas de origen bacteriano y 70°C para xilanasas de origen fúngico [104].

Es de gran interés saber cómo actúa la xilanasas a 30°C, ya que esa sería la temperatura a la que operaría un eventual sistema *in situ* con *P. pastoris*. Sumado a lo anterior, se tiene como antecedente que la enzima GtXyn10A presenta una gran termoestabilidad a 50°C [105], además de reportarse la actividad máxima a esa temperatura [34], por esta razón las temperaturas usadas para realizar el ensayo de actividad fueron 30 y 50°C. Los resultados se observan en la Figura 3.3. (Los datos experimentales se adjuntan en el documento "*Datos_Experimentales.xlsx*" presente en el *link* de la referencia [99]).

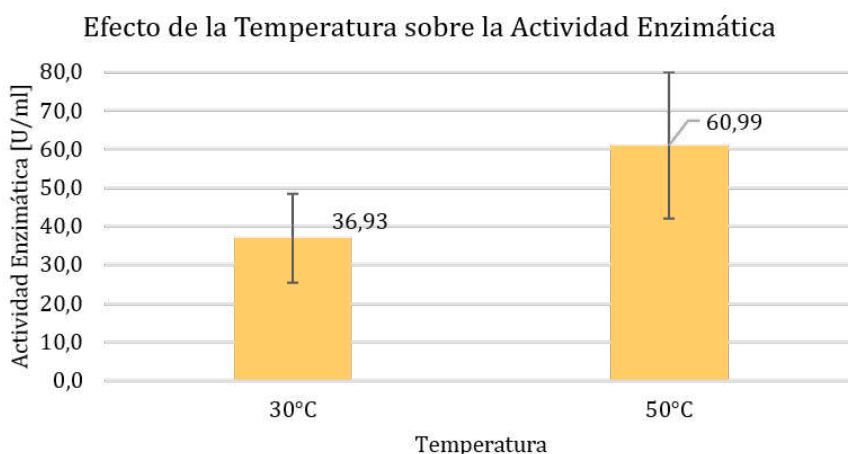


Figura 3.3: Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la xilanasas GtXyn10A. Ensayo de actividad hecho a pH 6 durante 30 [min]. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.

Al tomar como referencia los 50°C, se aprecia que a 30°C hay una disminución del 39,4% de la actividad enzimática, y para saber la significancia del cambio se procedió a realizar un análisis estadístico, del cual se obtuvo un *p-value* igual a 0,009, y al ser menor que 0,05, se determinó que la disminución es significativa.

A pesar de que el valor se aleja del máximo, se determina que el sistema puede ser operado de igual modo a 30°C a costa de esta disminución de la actividad enzimática. Con este resultado el sistema *in situ* sigue siendo una alternativa viable para producir XOS.

Por otro lado, al igual que en la sección anterior, se puede encontrar el efecto de la dependencia de la actividad, esta vez con respecto a la temperatura. Sin embargo, los resultados obtenidos en la Figura 3.3 se acercan a la parte izquierda de la campana, donde 50°C corresponde a la temperatura donde la xilanasas estudiada tiene su actividad máxima.

3.1.4. Efecto del *buffer* sobre la actividad enzimática

Debido a que los medios BMMY y BMGY utilizan fosfato de potasio 100 [mM] como *buffer*, y estos son los medios tradicionales donde se cultiva e induce *P. pastoris* respectivamente, es

de interés realizar el ensayo de actividad con este *buffer*, a diferencia de los ensayos anteriores que fueron hechos con *buffer* citrato de sodio 50 [mM] [69].

En la Figura 3.4 se muestran los resultados del ensayo de actividad.

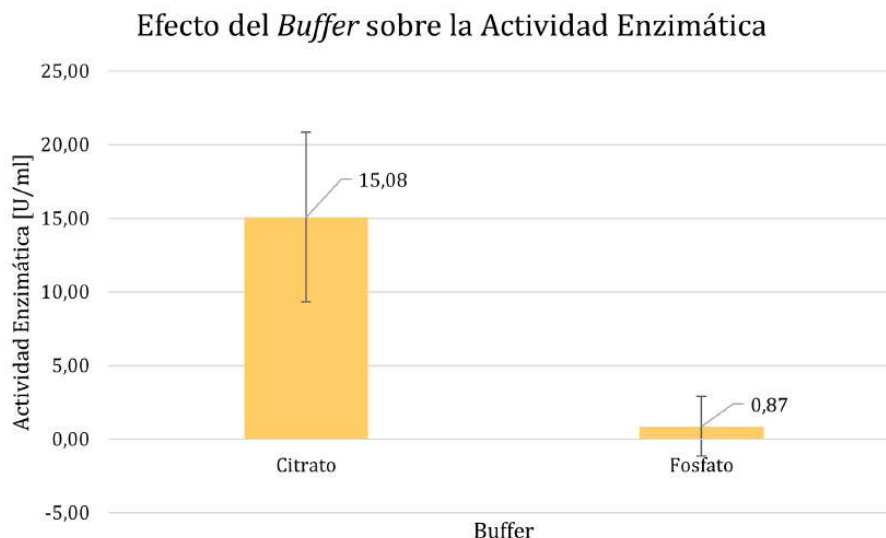


Figura 3.4: Efecto del *buffer* citrato de sodio 50 [mM] y del *buffer* fosfato de potasio 100 [mM] sobre la actividad enzimática de la xilanasa GtXyn10A a pH 6 y a 30°C. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.

De la Figura 3.4 se encontró que la enzima al estar en contacto con el *buffer* fosfato de potasio, disminuyó de manera importante su actividad. Un resultado similar fue obtenido por el equipo de Pérez-Ávalos *et al.* (2008), quienes encontraron que la xilanasa disminuía un 60 % su actividad al estar en contacto con el *buffer* fosfato 50 [mM] (8,7 [g/L]) [106].

También existen reportes que indican que el potasio no afecta la actividad enzimática, o bien lo hace de forma muy leve, se encontró que para las xilanasas Xln-1, XynBS27 y XynAS9, producidas por los hongos *Aspergillus niger* [107], *Streptomyces sp.* S27 [108] y *Streptomyces sp.* S9 [109] respectivamente, la actividad residual fue mayor al 88 % para los 3 casos usando potasio a una concentración de 10 [mM], y para Xln-1, la actividad residual fue de un 90,3 % al usar potasio 20 [mM] [107]. Por otro lado, se reportó que el potasio 50 [mM] sirve como estabilizante de la xilanasa producida por el hongo *Aspergillus ochraceus* frente a cambios de temperatura [110] y a concentraciones entre 5 y 10 [mM] se reportan leves aumentos de la actividad enzimática al ser producida por *Aspergillus terreus* [111], *Rhizomucor miehei* [112] y *Thermomyces lanuginosus* [113].

Al no existir antecedentes sobre el comportamiento de la xilanasa producida por *Pichia pastoris* al estar en contacto con potasio, no es posible determinar con exactitud si este compuesto aumenta o disminuye la actividad enzimática, sin embargo, las disminuciones de actividad son menores en comparación con las reportadas por el fosfato, por lo que es a este compuesto a quien se le atribuye el efecto inhibitorio encontrado en la enzima.

Este resultado indica que el sistema *in situ* no es viable si se induce *P. pastoris* en el medio BMMY, y para resolverlo se debe reemplazar el *buffer*. Dado que se ha experimentado anteriormente con el *buffer* citrato de sodio 50 [mM], demostrando tener un buen comportamiento con la enzima ya que no afecta su actividad, y a que además, se ha reportado su uso para la expresión de otras proteínas recombinantes [84], se propone al *buffer* citrato de sodio como reemplazo del *buffer* fosfato de potasio.

3.1.5. Evaluación del efecto de los componentes del medio de inducción sobre la actividad enzimática

Inicialmente, se había propuesto desarrollar un sistema de producción *in situ* de xilanasa recombinante en el medio BMMY, ya que es el medio donde se induce la expresión del gen de la xilanasa en *P. pastoris*, pero debido al resultado anterior el *buffer* debe ser reemplazado y para asegurar que no haya algún otro elemento que pueda afectar la actividad enzimática se estudia el efecto que tiene cada uno de los componentes del medio BMMY sobre la actividad enzimática. Estos compuestos son peptona, extracto de levadura, YNB sin sulfato de amonio y sin aminoácidos (YNB 2Y), YNB con sulfato de amonio y sin aminoácidos (YNB 4Y), biotina y metanol.

Cada ensayo se realizó con enzima, xilano y solo uno de los compuestos recién nombrados, de este modo se puede encontrar el efecto de cada componente de manera individualizada y sin intervención de los otros componentes del medio.

El resultado de los ensayos de actividad se muestran en la Figura 3.5 donde las concentraciones usadas de cada compuesto son las mismas con las que se añaden al medio BMMY.

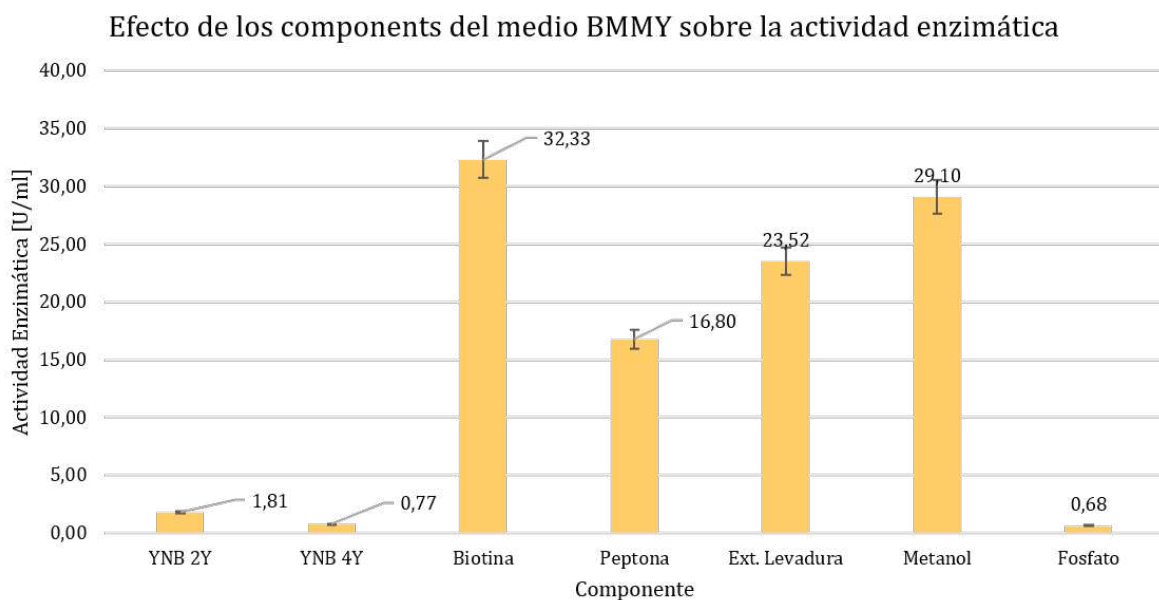


Figura 3.5: Efecto de los componentes del medio BMMY sobre la actividad enzimática de la xilanasas recombinante a 30°C y pH 6 luego de 30 [min]. YNB 2Y 1,34%; YNB 4Y 1,34%; biotina $4 \cdot 10^{-5}$ %; peptona 2%; extracto de levadura 1% y metanol 0,5%. Las barras corresponden a las desviaciones estándar, considerando que cada ensayo se hizo por triplicado.

Tal como se observa en la Figura 3.5 hay una importante disminución de la actividad de la enzima al estar en contacto con el YNB, independiente de si este tenga sulfato de amonio (YNB 4Y) o no (YNB 2Y). Con el fin de determinar qué es lo que afecta a la enzima exactamente, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la composición de ambos YNB's, y se encontró que los dos contienen fosfato de potasio 1 [g/L] [114] [115], componente que de resultados anteriores indica tener un efecto negativo en la actividad de la enzima, por lo que el uso de este componente es descartado y debe ser reemplazado.

De la Figura 3.5 se observa que se realizó el ensayo nuevamente con fosfato de potasio 100 [mM], del cual se obtuvo el mismo resultado presentado en la sección anterior pero ahora con una desviación estándar menor.

Al realizar el cambio de unidades respectivo se determinó que la concentración de fosfato de potasio en el medio BMMY es de 17,4 [g/L], por lo que se deduce que el fosfato de potasio afecta negativamente a la actividad enzimática al ser usado dentro del rango entre 1 y 17,4 [g/L].

También, se encontró que existe una disminución de la actividad enzimática al estar en contacto con peptona, sin embargo, la disminución no impide que el sistema *in situ* pueda ser llevado a cabo, por lo que se propone mantener su uso por ahora y enfocar la atención en el resultado obtenido para el YNB.

La propuesta para sustituir el YNB es el hidrolizado de casaminoácidos, ya que posee concentración de nitrógeno similar al del YNB y también contiene los aminoácidos que se

recomiendan agregar en cultivos de levaduras [114]. Además, la adición de casaminoácidos al 1% en cultivos de *Pichia pastoris* para la producción de proteínas recombinantes ha demostrado estabilizar a las proteínas secretadas ya que inhibe a las proteasas extracelulares [116], y finalmente, el cuarto factor decisivo para elegir el hidrolizado de casaminoácidos es que no contiene fosfato de potasio [117]. Para ver los aminoácidos recomendados y los aportados por los casaminoácidos ver Tabla E.1 del Anexo E.

Con los resultados de los efectos de distintos factores y componentes sobre la actividad enzimática, se proponen las siguientes condiciones de operación para un posible sistema *in situ*: operar a 30°C, pH 6 e inducir con metanol al 1%. Por otro lado se proponen los siguientes cambios al medio BMMY, uso de *buffer* citrato en reemplazo del *buffer* fosfato y uso de casaminoácidos en reemplazo del YNB. En la Tabla 3.3, se muestran los medios de cultivos propuestos para realizar los cultivos de *Pichia pastoris*, estos son medios BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit.

Tabla 3.3: Composición de los medios de cultivos propuestos para el cultivo de *Pichia pastoris*.

Componentes	Composición Medios de Cultivo			
	BMMY fos	BMMY cit	MM* fos	MM* cit
Extracto de Levadura	1 %	1 %	1 %	1 %
Peptona	2 %	2 %	2 %	2 %
<i>Buffer</i> Fosfato	100 [mM]	-	100 [mM]	-
<i>Buffer</i> Citrato	-	50 [mM]	-	50 [mM]
YNB	1,34 %	1,34 %	-	-
Casaminoácidos	-	-	1 %	1 %
Biotina	$4 \cdot 10^{-5}$ %	$4 \cdot 10^{-5}$ %	$4 \cdot 10^{-5}$ %	$4 \cdot 10^{-5}$ %
Metanol	1 %	1 %	1 %	1 %

De la Tabla 3.3 se debe aclarar que el medio BMMY fos (o BMMY) corresponde al medio tradicional de cultivo de *Pichia pastoris* mostrado también en la Tabla 2.6, el cual no presenta ningún cambio, el medio BMMY cit corresponde al medio BMMY con el cambio de *buffer* (*buffer* fosfato es reemplazado por *buffer* citrato). El medio MM* fos corresponde al medio BMMY pero con casaminoácidos en lugar de YNB, y finalmente, el medio MM* cit, corresponde al medio BMMY con ambos cambios realizados, es decir, contiene *buffer* citrato y casaminoácidos en reemplazo del *buffer* fosfato e YNB. Por otro lado las concentraciones del extracto de levadura, peptona y biotina no fueron modificadas.

3.2. Evaluación del efecto de componentes del medio BMMY sobre el crecimiento de *P. pastoris* y la producción de xilanas recombinante.

Para cumplir con el segundo objetivo planteado, se realizaron cultivos de *P. pastoris* en los 3 medios propuestos en la sección anterior, además de cultivar en el medio original para usarlo como referencia.

La realización del cultivo se explica en la sección 2.2.4 de la Metodología, sin embargo, se destaca que cada cultivo fue hecho por triplicado en matraces de 125 [ml], en los cuales se ingresó un volumen de 10 [ml] de medio de cultivo, los matraces se cultivaron a 30°C y con una agitación de 200 [rpm]. A cada cultivo se le midió diariamente actividad enzimática, concentración de proteína, densidad óptica y peso seco. Específicamente, para saber cómo se ve afectada la producción de xilanas, se hizo un seguimiento a la actividad enzimática y para saber cómo se ve afectado el crecimiento de *P. pastoris* se hace un seguimiento al peso seco, y también se realizaron pruebas estadísticas de *t-student* para cuantificar los cambios.

Sumado a lo anterior, se tiene como antecedente que el tiempo óptimo de producción enzimática en el medio BMMY para *P. pastoris* es de 48 horas [65], sin embargo, al desconocer el comportamiento que *Pichia pastoris* tiene frente a los nuevos medios propuestos, se decide cultivar durante 72 [h]. Las mediciones fueron hechas cada 24 horas siendo el tiempo 0 [h] el momento de la inducción.

3.2.1. Efecto de los medios de cultivos sobre el crecimiento de *Pichia pastoris*

Como se nombró anteriormente, el crecimiento de *P. pastoris* y las variaciones entre los distintos medios se cuantificó según el peso seco obtenido.

Las mediciones de peso seco promedio se plasman en la Figura 3.6. De ella se aprecian comportamientos similares entre las 4 curvas. Además, se observa que los máximos se obtuvieron a las 48 horas para los medios BMMY fos, BMMY cit y MM*cit, y a las 24 horas para el medio MM* fos.

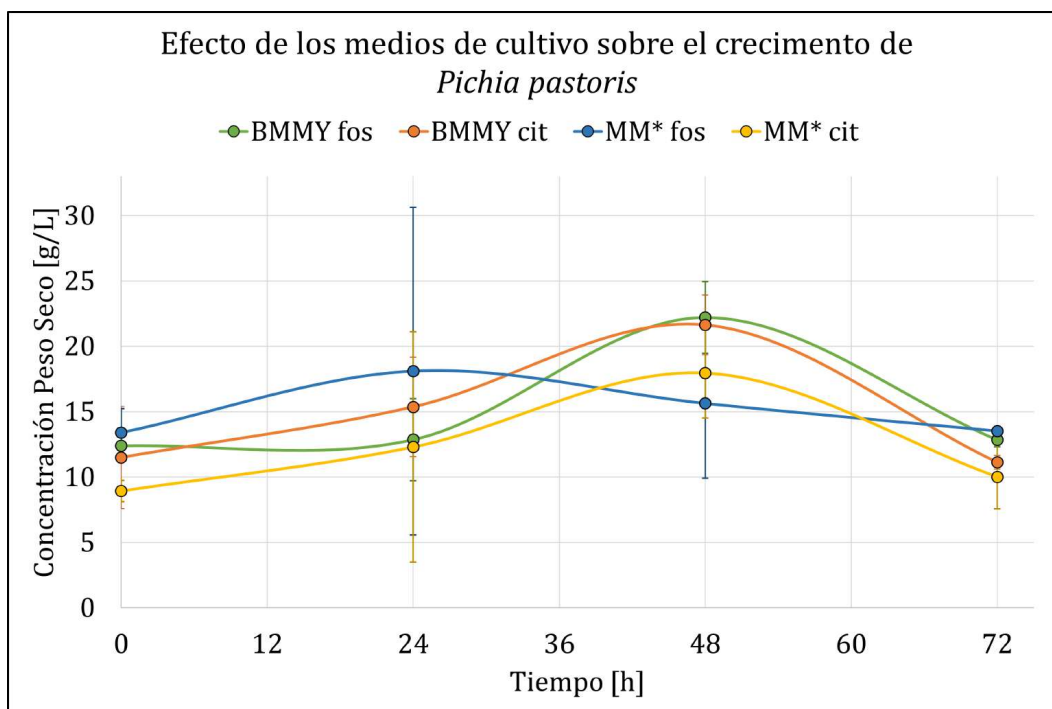


Figura 3.6: Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre el crecimiento celular en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Curva medio MM* cit estadísticamente distinta a la curva de referencia (medio BMMY fos), curvas de los medio BMMY cit y MM* fos no son estadísticamente distintas a la curva de referencia. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

En la Figura 3.6 también se destaca que luego de las 48 horas, hubo una disminución del crecimiento de *P. pastoris*, lo cual podría indicar que las células se están rompiendo o lisando debido a la muerte celular. Este decaimiento a partir de las 48 horas es un indicador de que el cultivo, independiente del medio, debe tener una duración máxima de 2 días.

También se observa que el crecimiento máximo obtenido fue en el cultivo hecho con el medio BMMY fos, el cual demuestra ser el mejor cuando se prioriza el crecimiento celular. Aún así se hizo un análisis estadístico (ver Tabla 3.4) del cual se encontró que no hay diferencias significativas entre los medios BMMY cit y MM* fos con respecto al de referencia, pero sí se obtuvo una diferencia significativa ($p\text{-value} < 0,05$) para el medio MM* cit, esto indica que el medio recién nombrado tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *P. pastoris*.

Tabla 3.4: Resultados del análisis *t-student* para el crecimiento de *P. pastoris* en los 4 medios estudiados.

Medios Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
BMMY fos y BMMY cit	0,432	No significativo
BMMY fos y MM* fos	0,487	No significativo
BMMY fos y MM* cit	0,020	Significativo

Esta disminución del crecimiento podría ser justificada ya que la biomasa inicial en los medios BMMY fos y MM* cit fue distinta, con una diferencia del 28,0%, es decir que a tiempo 0 [h] se ingresaron 3,5 [g/L] menos de células en el medio MM* cit con respecto al medio BMMY fos. Esta diferencia desapareció a las 24 horas, ya que el crecimiento de *P. pastoris* del medio MM* cit casi logró igualar al del medio BMMY fos, es más, las pendientes de los 3 medios propuestos durante las primeras 24 horas fueron similares, a diferencia del medio BMMY fos el cual tiene una pendiente cercana a 0. Luego, a las 48 [h], la diferencia entre los medios BMMY fos y MM* cit volvió a aumentar, teniendo una diferencia de 4,2 [g/L], diferencia cercana a la inicial. Esto último podría indicar que las curvas no son tan distintas, y la diferencia significativa encontrada se deba a un desplazamiento de la curva completa.

Se calcularon las pendientes de los 4 medios entre las 0 y 48 horas, de este modo se obtienen las tasas de crecimientos de *P. pastoris* en [g/L·h], las cuales se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Tasas de crecimiento de *P. pastoris* en los distintos medios de cultivos obtenidas durante las primeras 48 horas y su variación con respecto al medio BMMY fos, el cual fue usado de referencia.

Medios de cultivo	Tasa de crecimiento [g/L·h]	Variación
BMMY fos	0,204	Referencia
BMMY cit	0,211	+3,4 %
MM* fos	0,047	-77,2 %
MM* cit	0,188	-7,8 %

Tal como se ve en la Tabla 3.5, las pendientes de los medios BMMY fos, BMMY cit y MM* cit son muy similares, entonces, para saber la verdadera diferencia estadística que poseen las curvas se hace un reordenamiento de datos y se impone que todas las curvas empiecen en el mismo punto, esto provoca que se eliminen los desplazamientos, mas no la forma de las curvas. Así, los nuevos *p-values* son los mostrados en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Resultados del análisis *t-student* para el crecimiento de *P. pastoris* en los 4 medios estudiados eliminando el desplazamiento inicial de las curvas.

Medios Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
BMMY fos y BMMY cit	0,244	No significativo
BMMY fos y MM* fos	0,367	No significativo
BMMY fos y MM* cit	0,222	No significativo

Con los nuevos valores críticos encontrados, se determina que no hay diferencias significativas entre las curvas, y específicamente, se determina que la diferencia significativa original encontrada para las curvas de los medios BMMY fos y MM* cit (0,02) había sido producto del desplazamiento de la curva.

En la Tabla 3.6 también se ven las variaciones de las tasas de crecimiento con respecto al medio tradicional, de las cuales resalta por su impacto negativo la obtenida para el medio

MM* fos. De esto se establece que el uso del medio antes nombrado debe ser evitado si el objetivo del cultivo es obtener altas concentraciones de biomasa.

Por otro lado, aún se desconoce cómo se ve afectada la producción de enzima, por lo que aun no es posible definir o descartar algún medio para el sistema *in situ*.

Como se mencionó anteriormente, los cultivos fueron hechos por triplicado, para ver las mediciones individualizadas por matraz ver Figuras del Anexo F.1.

3.2.2. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de xilanasa

El primer resultado sobre producción de enzima se observa en la Figura 3.7, de la cual se determina que sólo el medio MM* cit hubo producción de enzima, esto se atribuyó a que el medio BMMY fos contiene fosfato e YNB, el medio MM* fos contiene fosfato, y el medio BMMY cit contiene YNB, componentes que de resultados anteriores demostraron tener un efecto inhibitorio en la enzima. Esto deja en evidencia que el uso de estos 3 medios no debería ser usado en el sistema *in situ*, ya que, al no registrar actividad, tampoco se podría llevar a cabo la hidrólisis enzimática.

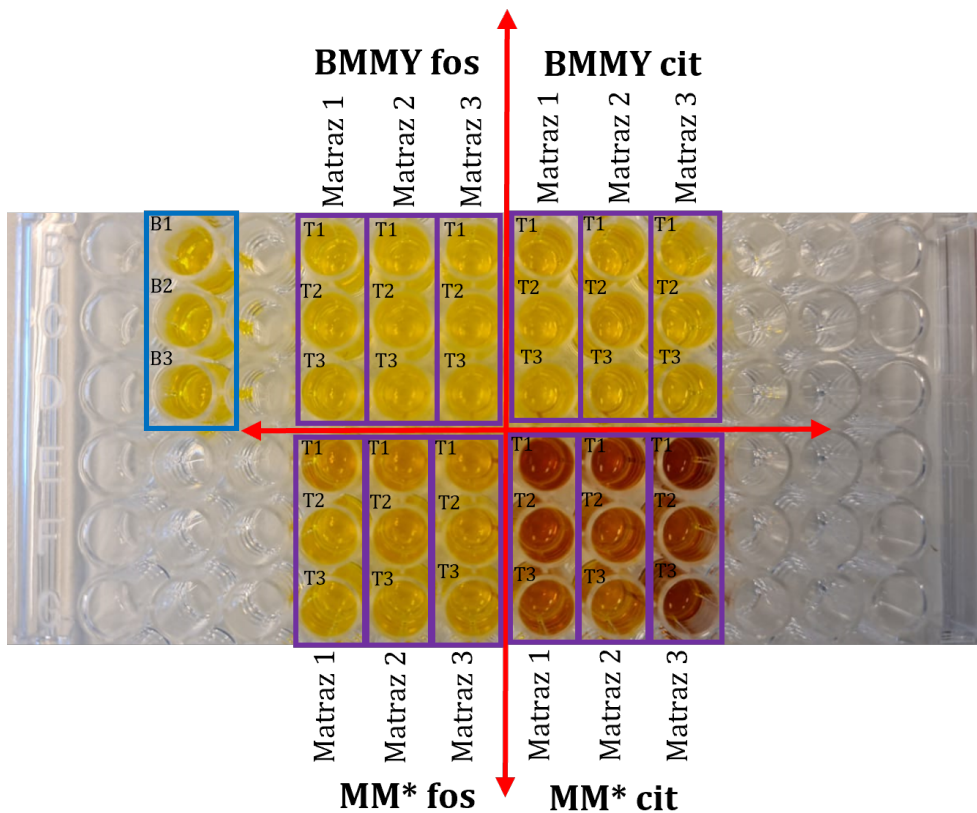


Figura 3.7: Resultado del ensayo de actividad a las 48 [h] para los 4 medios de cultivo, BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit separados por cuadrantes (flechas rojas). El cultivo de cada medio se hizo por triplicado, los cuales se muestran en recuadros morados y rotulados con Matraz 1, Matraz 2 y Matraz 3. Además, a cada matraz se le tomaron muestras por triplicado, representados por T1, T2 y T3, dentro de cada recuadro morado. El recuadro azul contiene el triplicado del blanco, rotulado con B1, B2 y B3.

Para comparar de igual modo los resultados obtenidos para cada medio se realiza una filtración de los medios de cultivos con columnas PD10, las cuales extraen las sales propias de los medios junto con otros contaminantes que podrían quedar en solución. En la Figura 3.8 se observa el ensayo de actividad hecho posterior a la eliminación de los componentes del medio recién nombrados.

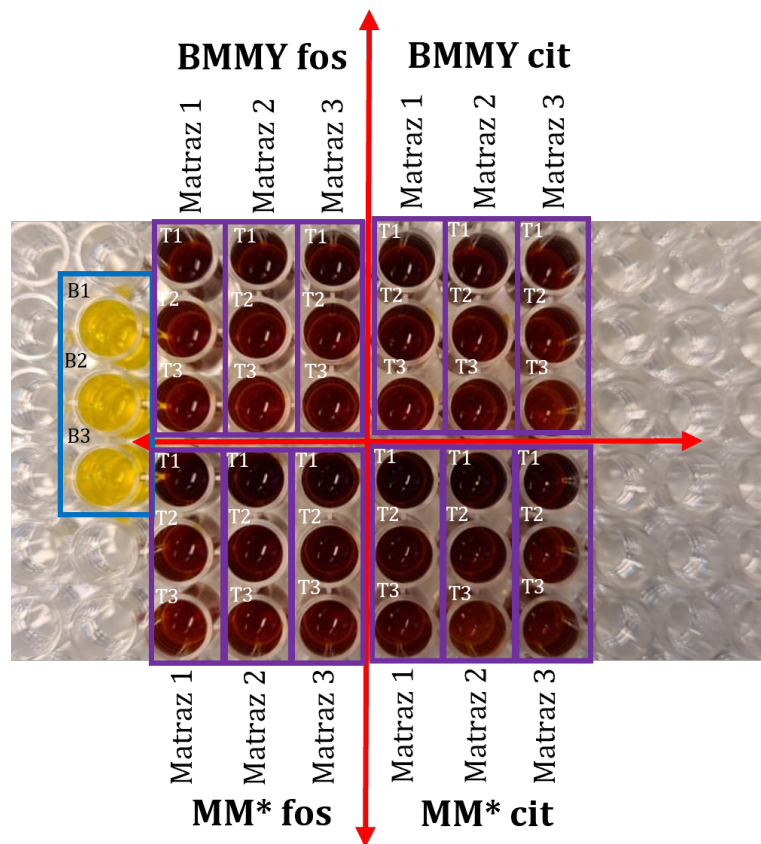


Figura 3.8: Resultado del ensayo de actividad a las 48 [h] para los 4 medios de cultivo posterior a la filtración por columnas desaladoras. El cultivo de cada medio se hizo por triplicado, los cuales se muestran en recuadros morados y rotulados con Matraz 1, Matraz 2 y Matraz 3. Además, a cada matraz se le tomaron muestras por triplicado, representados por T1, T2 y T3, dentro de cada recuadro morado. El recuadro azul contiene el triplicado del blanco, rotulado con B1, B2 y B3.

Tal como se observa en la Figura 3.8, las actividades aumentaron considerablemente al punto de salirse del rango de medición del espectrofotómetro (absorbancia mayor a 1), por lo que deben ser diluídas, así, se entra en el rango correcto y la conversión usando la curva de calibración construida puede ser hecha. El resultado de la dilución se muestra en la Figura 3.9.

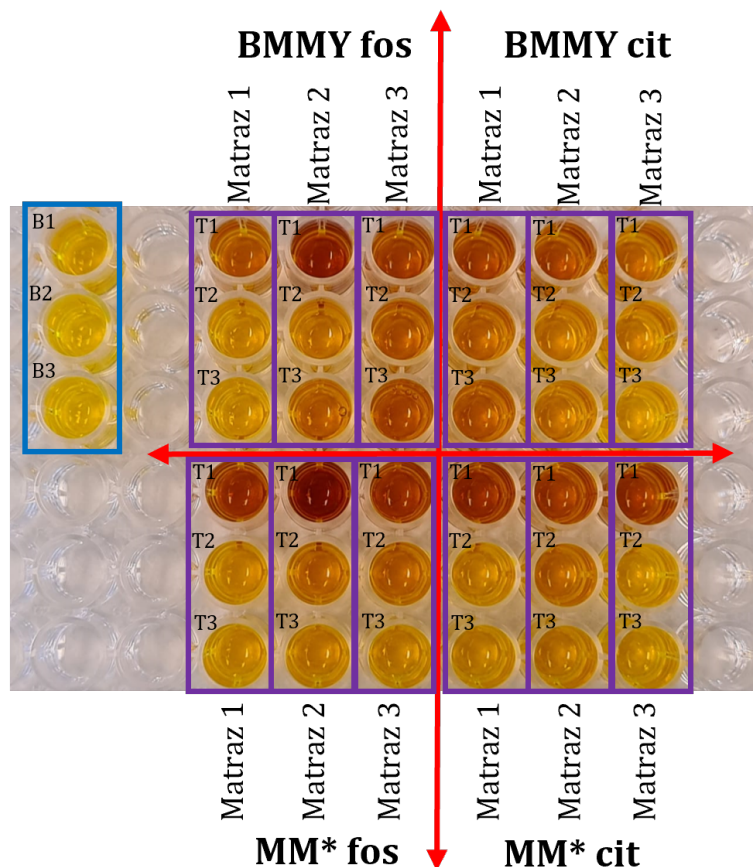


Figura 3.9: Resultado del ensayo de actividad a las 48 [h] para los 4 medios de cultivo posterior a la filtración por columnas PD10 desaladoras y la dilución de las muestras. El cultivo de cada medio se hizo por triplicado, los cuales se muestran en recuadros morados y rotulados con Matraz 1, Matraz 2 y Matraz 3. Además, a cada matraz se le tomaron muestras por triplicado, representados por T1, T2 y T3, dentro de cada recuadro morado. El recuadro azul contiene el triplicado del blanco, rotulado con B1, B2 y B3.

De la Figura 3.9 se desprende que la enzima efectivamente presentó inhibición por fosfato y/o por YNB, ya que en este punto se puede apreciar el cambio de color, indicando la presencia de enzima.

Se destaca que en la Figura 3.9 el color obtenido para el medio MM* cit es más claro que el obtenido en la Figura 3.7, y esto se debe a las diluciones que se realizaron durante el proceso y no a una disminución de la actividad enzimática. Por otro lado, las Figuras 3.7, 3.8 y 3.9 corresponden a los resultados obtenidos sólo a las 48 horas de cultivo, pero las filtraciones se realizaron para todas las muestras, desde las 0 [h] hasta las 72 [h].

También, al observar la Figura 3.9 se destaca una coloración distinta entre triplicados de un mismo matraz, específicamente todos los T1 de cada triplicado presentan un oscurecimiento mayor con respecto a los T2 y T3. Para saber si los datos obtenidos para los T1 son confiables y representativos del medio de cultivo, se realizó un análisis estadístico entre matraces de

cada medio de cultivo, donde se obtuvieron los *p-values* mostrados en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Resultados del análisis *t-student* para los cultivos de producción de enzima recombinante por parte de *Pichia pastoris*.

Medio de Cultivo	Matraces Comparados	<i>p-value</i>
BMMY fos	Matraz 1 y 2	0,067
	Matraz 1 y 3	0,131
	Matraz 2 y 3	0,253
BMMY cit	Matraz 1 y 2	0,530
	Matraz 1 y 3	0,375
	Matraz 2 y 3	0,477
MM* fos	Matraz 1 y 2	0,280
	Matraz 1 y 3	0,395
	Matraz 2 y 3	0,580
MM* cit	Matraz 1 y 2	0,170
	Matraz 1 y 3	0,544
	Matraz 2 y 3	0,479

En la Tabla 3.7 se observa que todos los *p-values* encontrados son mayores a 0,05, por lo tanto las diferencias entre triplicados no son estadísticamente significativas, y las diferencias de color se atribuyen a errores aleatorios durante el cultivo. Por ultimo se distingue que los errores aleatorios se relacionan con una baja precisión en los datos y no en la validez de ellos, y una forma de corregir esta precisión es aumentando la cantidad de muestras o aumentar la precisión de la toma de mediciones [118].

Los resultados de las mediciones producción de enzima durante 72 [h] se muestran a continuación, en la Figura 3.10.

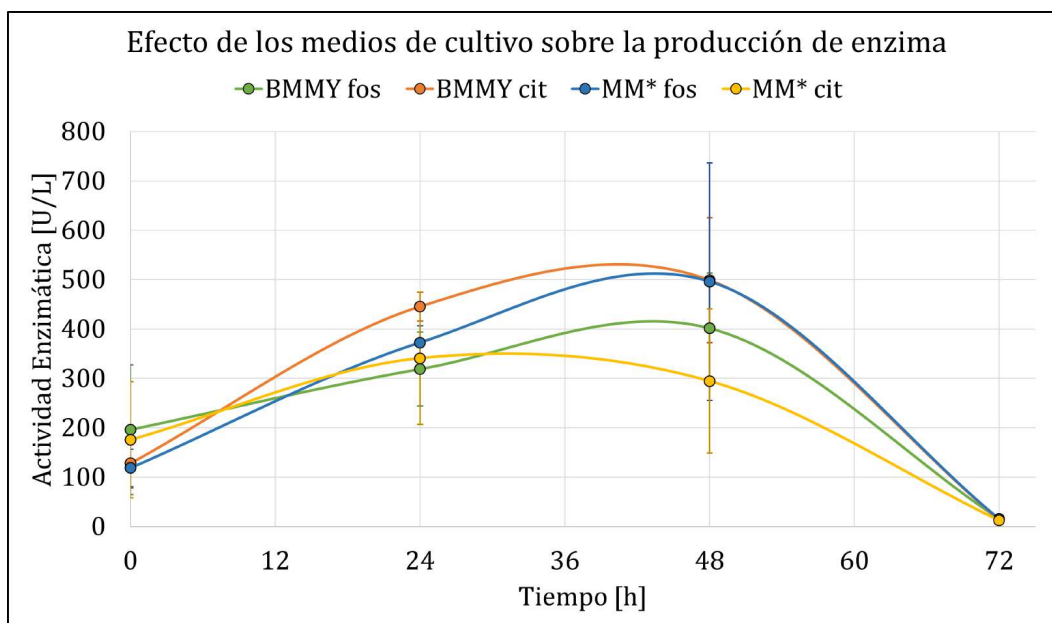


Figura 3.10: Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre la producción enzimática en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. El resultado del análisis estadístico indica que las curvas no son estadísticamente distintas con respecto a la curva de referencia (medio BMMY fos). Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

En la Figura 3.10 se observan comportamientos similares de producción de enzima para los 4 medios de cultivo. Los máximos obtenidos fueron de 484,5 [U/L] y 480,6 [U/L] para los medios BMMY cit y MM* fos respectivamente. Además, se observa que cada medio obtiene su máximo a las 48 [h], a excepción del medio MM* cit, que lo obtiene a las 24 [h]. Finalmente, se destaca que a partir de las 48 [h] la actividad empieza a decrecer, esto indica, nuevamente, que para los 4 medios de cultivo, el tiempo máximo de cultivo debe ser de 48 [h].

También, se hizo un análisis estadístico para conocer si existe algún medio que pueda ser clasificado como *mejor* o *peor* que el medio original BMMY para la producción enzimática. Para esto se encontraron los resultados mostrados en la Tabla 3.8, de la cual se determina que ningún medio puede ser definido como mejor o peor, ya que todos los *p-value* obtenidos fueron mayores a 0,05.

Tabla 3.8: Resultados del análisis *t-student* para las mediciones de promedio de actividad enzimático en los medios donde se cultivó *P. pastoris*.

Medios Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
BMMY fos y BMMY cit	0,123	No significativo
BMMY fos y MM* fos	0,317	No significativo
BMMY fos y MM* cit	0,221	No significativo

El resultado anterior es un primer acercamiento para poder afirmar que la producción de

enzima no se ve afectada al realizar los cultivos de *P. pastoris* en los distintos medios de cultivos propuestos.

Para ver los gráficos de las mediciones individualizadas, ver Figuras del Anexo F.2.

A continuación se muestran los gráficos obtenidos para la relación entre actividad enzimática y concentración de proteína. Se destaca que la relación actividad enzimática/concentración de proteína también es conocida como actividad específica [119], por lo que se usará este nombre. El resultado se observa en la Figura 3.11.

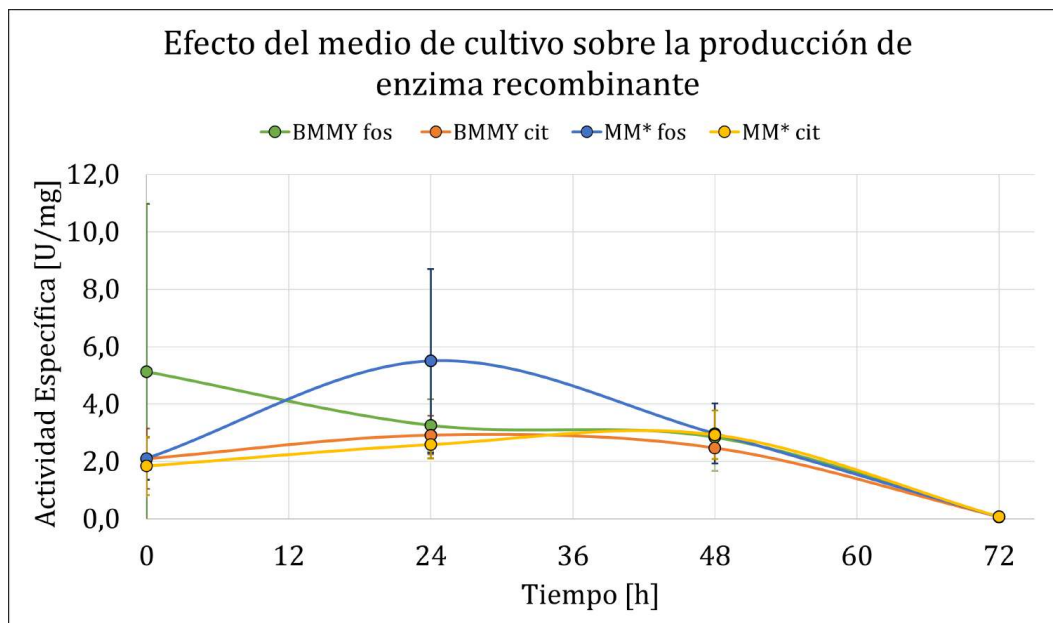


Figura 3.11: Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de enzima recombinante en cultivos de *P. pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Las curvas no son estadísticamente distintas con respecto a la curva de referencia (medio BMMY fos). Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

En la Figura 3.11 se observa un comportamiento muy similar entre todos los medios, exceptuando el dato encontrado para el medio MM* fos a las 24 horas. Luego, recordando que actividad específica [U/mg] es actividad enzimática [U/ml]/concentración de proteína [mg/ml] [119], el resultado podría ser producto ya sea de una alta actividad o una baja concentración de proteína, en caso de estar en el primer escenario, el MM* fos podría ser candidato a ser usado en el sistema *in situ*, en caso de estar en el segundo escenario, donde hay poca proteína, el medio no se recomendaría.

A partir de la Figura 3.10 se encontró que la actividad no sobresale a las 24 [h] para el medio MM* fos, por lo que el primer escenario es descartado. Luego, por otra parte se encontró que a las 24 horas el medio MM* fos es el medio de cultivo donde menos producción de proteína hubo (ver Figura F.11 del Anexo F.2), por lo tanto la máxima actividad específica encontrada a las 24 horas se debe a la baja producción de proteína, de este modo, no se recomienda usar el medio MM* fos.

Para determinar con seguridad si hay o no algún medio mejor, se procede a realizar un análisis estadístico de *t-student*. Los resultados se muestran en la Tabla 3.9, donde se comprueba que ningún medio puede ser clasificado como *mejor* debido a que todos los *p-values* son mayores a 0,05.

Tabla 3.9: Resultados del análisis *t-student* para la relación entre actividad enzimática y concentración de proteína de los medios donde se cultivó *P. pastoris*.

Medios Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
BMMY fos y BMMY cit	0,143	No significativo
BMMY fos y MM* fos	0,421	No significativo
BMMY fos y MM* cit	0,153	No significativo

Finalmente, se analizó la producción de enzima por unidad de biomasa y para ello se estudió la variación de la producción sobre el crecimiento celular a través del tiempo. Esto se refleja en la Figura 3.12.

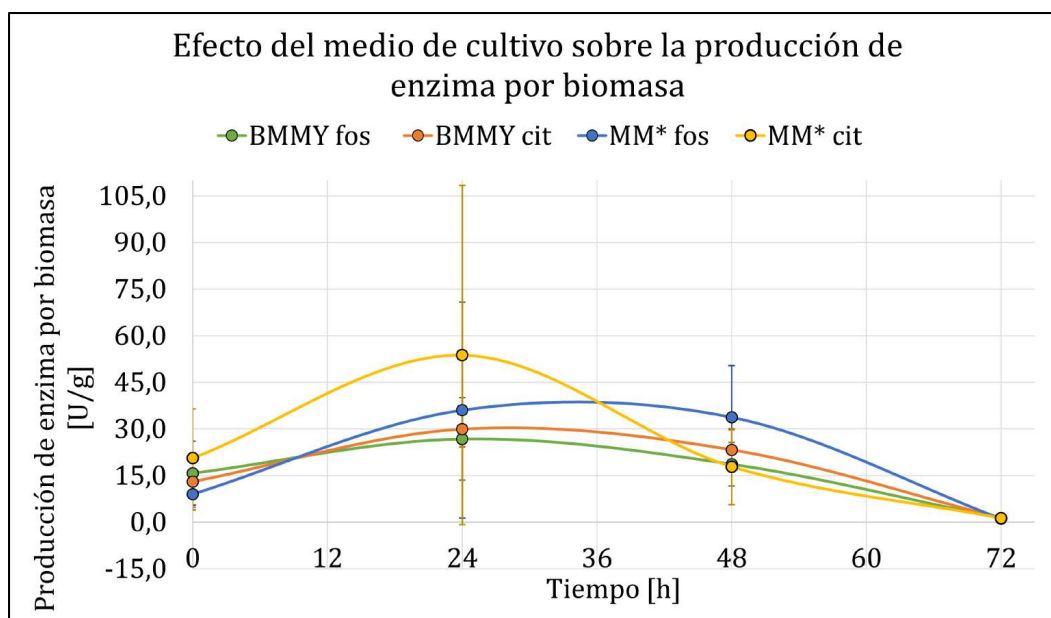


Figura 3.12: Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre la producción de enzima por unidad de biomasa en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. El resultado del análisis estadístico indica que las curvas no son estadísticamente distintas con respecto a la curva de referencia (medio BMMY fos). Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

Como se observa en la Figura 3.12, desde las 24 horas, todas las curvas superan a la curva de referencia (medio BMMY fos) y la producción máxima para los 4 medios se obtiene a las 24 horas. Se encontró que la diferencia que hay entre las 24 y 48 horas para los medios BMMY fos, BMMY cit y MM* fos es muy baja (menor a 8 [U/g]), por lo que se podría asumir que la producción entre las 24 y 48 horas es constante para esos medios (pendiente cercana a 0).

Adicionalmente, se encontró que el medio MM* cit presenta el mayor máximo entre los 4 medios cultivados, alcanzando una producción de 53,8 [U/g], seguida del medio MM* fos con 36,1 [U/g]. El *peak* para el medio MM* cit indica que hay una mayor producción de enzima por células crecidas durante las primeras 24 [h], posteriormente esta producción disminuye, al punto de igualar a la producción obtenida para el medio tradicional.

Al realizar un análisis estadístico, ver Tabla 3.10, se observa que ningún medio es estadísticamente *mejor* que el original con respecto a la producción de enzima por biomasa.

Tabla 3.10: Resultados del análisis estadístico de *t-student* para la producción de enzima por biomasa en los medios donde se cultivó *P. pastoris*.

Medios Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
BMMY fos y BMMY cit	0,299	No significativo
BMMY fos y MM* fos	0,177	No significativo
BMMY fos y MM* cit	0,197	No significativo

Luego, realizando una búsqueda bibliográfica, se encontró que en cultivos de *Aspergillus nidulans*, los casaminoácidos inducen específicamente la producción de xilanas al ser usados en una concentración entre 0,1 y 1 %, y al usarlos en una concentración de 0,5 % el efecto sobre la producción fue la más positiva [120]. Entonces, es posible que usando casaminoácidos al 0,5 % la producción aumente más de lo que se encontró al usar casaminoácidos al 1 %.

Además, de igual modo que se hizo con el crecimiento de *P. pastoris*, se calculó la pendiente de las primeras 24 horas, la cual representa la tasa de producción de enzima por unidad de biomasa. Se calculan las pendientes entre las 0 y las 24 horas y no 48 [h] ya que los máximos obtenidos fueron luego de 1 día, de este modo las pendientes mostradas en la Tabla 3.11 representan las tasas de producción de enzima por unidad de biomasa máximas en cada medio, o productividades específicas máximas ([U/g·h]).

Tabla 3.11: Tasas de producción de enzima por unidad de biomasa máximas o productividad específica máxima de *P. pastoris* en los distintos medios de cultivos obtenidas durante las primeras 24 horas y su variación con respecto al medio BMMY fos, el cual es usado de referencia.

Medios de cultivo	Productividad Específica [U/g·h]	Variación
BMMY fos	0,46	Referencia
BMMY cit	0,70	+53,2 %
MM* fos	1,13	+144,9 %
MM* cit	1,38	+200,8 %

De la Tabla 3.11 se observa que la productividad específica aumenta para los 3 medios de cultivos, y particularmente, la tasa se triplicó al cultivar en el medio MM* cit, demostrando tener gran potencial para el sistema *in situ*.

Cabe destacar que el medio BMMY fos es un medio optimizado para la producción de proteínas recombinantes y no para crecimiento celular [69], por lo que el medio MM* cit demostró tener un mejor resultado que el medio tradicional.

Posteriormente, ordenando los resultados encontrados, se construyó la Tabla 3.12 con el fin de comparar los 4 medios de cultivos.

Tabla 3.12: Resumen de los resultados obtenidos para los cultivos de *P. pastoris* y la producción de enzima recombinante. Los valores calculados para los medios BMMY cit, MM* fos y MM* cit fueron hechos usando de referencia los datos obtenidos para el medio BMMY fos.

Medio de Cultivo	Característica Estudiada			
	Tasa de Crecimiento [g/L·h]	Producción de Enzima [U/L]	Actividad Específica [U/mg]	Productividad Específica [U/g·h]
BMMY cit	+3,4 %	+25,4 %	-13,1 %	+53,2 %
MM* fos	-77,2 %	+24,4 %	+4,5 %	+144,9 %
MM* cit	-7,8 %	-27,0 %	+3,1 %	+200,8 %

Analizando la Tabla 3.12, los datos obtenidos para el medio MM* cit indican que, a pesar de que hubo una disminución de la tasa de crecimiento del 7,8 %, la productividad específica, fue el doble, por lo que realizando el *trade-off* correspondiente, se determina que es el medio con más potencial para ser llevado a cabo en un sistema *in situ*, ya que la disminución de la tasa de crecimiento es casi despreciable, y a la vez, la productividad específica es la mayor obtenida para los 4 medios estudiados.

Así mismo, de la Tabla 3.12 y considerando todos los resultados obtenidos y calculados, se determina que cultivar en los medios BMMY cit y MM* fos representa un cambio positivo en cuanto a la tasa de producción de enzima, ya que en ambos medios se percibió un aumento del 53 y 145 % respectivamente, sin embargo, en el medio MM* fos, la tasa de crecimiento disminuyó considerablemente, reduciéndose casi a una cuarta parte del crecimiento obtenido para el medio original.

Finalmente, considerando todos los resultados obtenidos en esta sección, se define que, para un sistema *in situ*, donde lo que se desea priorizar es la producción de xilanasa para poder realizar y aumentar la hidrólisis enzimática, el medio MM* cit es el recomendado para su diseño, ya que a pesar de que el crecimiento celular disminuye, la productividad específica es mucho mayor, llegando a triplicar a la productividad específica obtenida por el medio tradicional durante las primeras 24 horas.

3.3. Construcción de la reacción de producción de xilanasa.

Con el fin de ejecutar el tercer objetivo de este trabajo, se construye un modelo matemático de *Pichia pastoris* para el cual se debe encontrar la ruta de producción de xilanasa. Para ello se deben definir las reacciones involucradas en este proceso, además de identificar la reacción específica de síntesis de la proteína recombinante, la cual es desconocida.

Para lograr encontrar la reacción principal se procedió a realizar un Análisis de Flujos Metabólicos (MFA) en Microsoft Excel, el cual resuelve el sistema lineal $S \times v = r$, donde S es la matriz con los coeficientes estequiométricos de cada reacción, v es el vector de flujos internos y r es el vector de flujos neto.

Se lograron identificar un total de 69 reacciones con 67 metabolitos mostrados en los Anexos G.1 y G.2 respectivamente. De los metabolitos se identificaron 3 sustratos, estos son metanol, oxígeno y una fuente de nitrógeno; 1 producto principal, xilanasa; y 2 productos secundarios, estos son CO_2 y biomasa. Además, se hizo la diferenciación entre los metabolitos internos, los presentes en el citoplasma y los contenidos en la mitocondria.

Las principales rutas que están presentes en el metabolismo de producción de xilanasa son el ciclo de Krebs, la glicólisis, la ruta de la pentosa fosfato y el metabolismo del metanol. Otras rutas que aportaron a la construcción de la ruta pero que fueron de menor uso son el metabolismo del piruvato, el metabolismo de la purina, el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato y la fosforilación oxidativa. Para ver la ruta a la que pertenece cada reacción, ver el documento Excel adjunto "*MFA.xlsx*", presente en la referencia [99].

Para poder resolver el sistema $S \times v = r$, este debe contener igual cantidad de reacciones que de metabolitos, esto es el equivalente a tener la misma cantidad de ecuaciones que de incógnitas, y además, estas deben ser linealmente independientes entre sí, de lo contrario el sistema quedaría subestimado y no habría una solución única. De este modo se usaron 53 reacciones con 53 metabolitos, número encontrado a partir de la unión de 2 o 3 reacciones en una única reacción.

La reducción de reacciones no fue directa ya cada reacción puede aportar uno o más metabolitos, o incluso puede no aportar, por lo que a medida que se iban uniendo reacciones, la cantidad de metabolitos también variaba. Por esta razón, no se podían eliminar 2 reacciones y se llegó a un total de 53.

La matriz del MFA está anexada en la planilla Excel "*MFA.xlsx*", presente en el *link* la referencia [99], y además se puede contemplar en el Anexo G.3. En la Figura 3.13 se muestra el esquema del metabolismo de *P. pastoris* con las reacciones usadas para el diseño del modelo matemático.

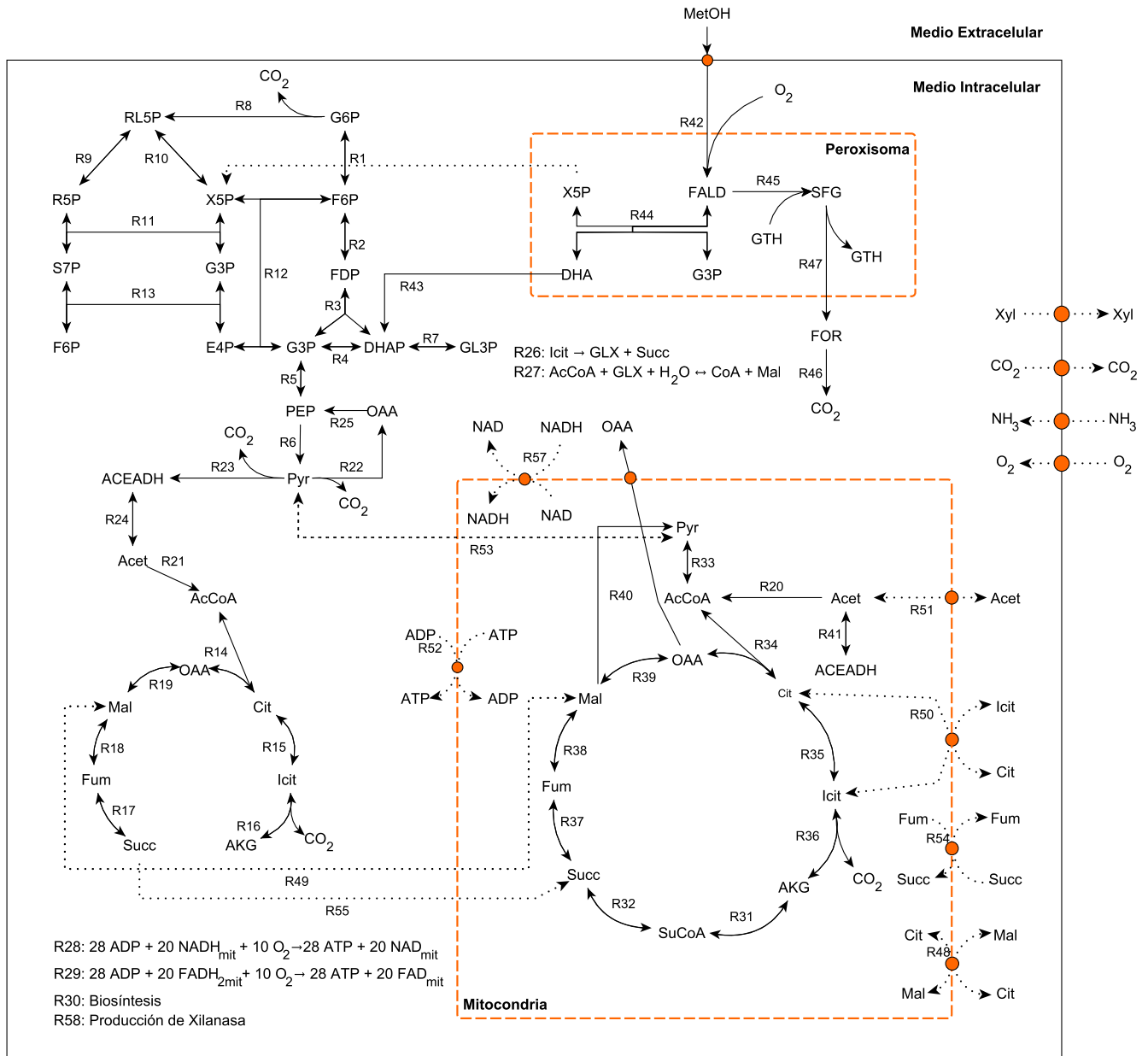
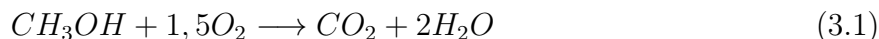


Figura 3.13: Reacciones y metabolitos identificados del metabolismo de *P. pastoris* que participan en la síntesis de xilanasas recombinante. Flechas continuas representan reacciones de transformación y flechas discontinuas representan reacciones de transporte. Adaptado de [92].

Para el cálculo de r , se hizo el supuesto de que el sistema se encuentra en estado estacionario, es decir no hay acumulación de metabolitos internos, de este modo el flujo es 0. Por otro lado, para los metabolitos externos de biomasa y metanol los flujos fueron calculados a partir de los datos experimentales obtenidos del cultivo hecho en la sección anterior. Luego los flujos de oxígeno y dióxido de carbono se calcularon a partir de la metodología hecha por Jahic *et al.* (2002), quien calculó, mediante una serie de ecuaciones, la tasa de consumo total de oxígeno que *P. pastoris* tiene mientras se encuentra en la fase de inducción con metanol y se asumió

que el flujo de dióxido de carbono es $2/3$ de la demanda de oxígeno ya que así lo indica la estequiometría de la reacción de respiración celular mostrada en la Ecuación 3.1 [121].



Finalmente, para el flujo de la fuente de nitrógeno se encontró por bibliografía que el nitrógeno está presente en el medio de cultivo en una concentración entre 9 y 12 % [122], se seleccionó el promedio, luego la concentración se convirtió a flujo usando un tiempo de 48 [h] y se asumió que el consumo fue del 100 %.

Para saber si la reacción se ajustó bien, se realizó una simulación de los flujos de cada metabolito usando la herramienta *solver* del programa Microsoft Excel. En él se buscaba encontrar r resolviendo el sistema lineal $S \cdot v = r$, para ello se impusieron ciertas restricciones, entre las principales se encuentran las irreversibilidades de las reacciones y que el flujo simulado era similar al flujo arrojado por el *solver*.

A continuación, en la Tabla 3.13 se encuentran algunos de los resultados obtenidos del *solver*, en cual incluye el flujo calculado teóricamente (Flujo Calculado), el flujo arrojado por el programa (Flujo Simulado) y la diferencia, que corresponde a la resta en valor absoluto de ambos flujos. La lista completa con los 53 flujos se encuentra en el archivo Excel adjunto "*Solver.xlsx*" presente en el *link* la referencia [99].

Tabla 3.13: Resultado parcial de la resolución del *solver* hecho en el programa Microsoft Excel. Ambos flujos y la diferencia están medidos en [mmol/cell·h].

Metabolito	Flujo Simulado	Flujo Calculado	Diferencia
FDP	0,00	0,00	$3,4 \cdot 10^{-14}$
DHAP	0,00	0,00	$3,4 \cdot 10^{-14}$
CO ₂	7,03	7,03	$0,0 \cdot 10^{+00}$
O ₂	-10,55	-10,55	$1,4 \cdot 10^{-14}$
MetOH	-0,037	-0,037	$1,0 \cdot 10^{-16}$
NH ₃	-0,00009	-17,74	$1,8 \cdot 10^1$
BM	1,56	1,56	$2,0 \cdot 10^{-15}$
Xyl	$5,07 \cdot 10^{-6}$	$5,07 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^{-16}$

En la Tabla 3.13 se observan los flujos de FDP y DHAP, los cuales son los flujos de los metabolitos internos que mayor diferencia presentaron con respecto al flujo calculado, sin embargo, estos valores son del orden de -14, lo cual se puede despreciar ya que la diferencia tiende a cero.

En la misma Tabla se observan los flujos de los metabolitos externos, donde las diferencias nuevamente son despreciables (del orden de -14 o menor), a excepción del flujo de nitrógeno, donde el flujo obtenido es casi 10^5 veces menor. Esto se puede explicar ya que al hacer el cálculo teórico de este flujo, se asumió que se consumía la totalidad del nitrógeno, pero con esto queda demostrado que no es así, ya que la resolución del programa indica que se consume sólo el $5,1 \cdot 10^{-4}$ % del nitrógeno ingresado al medio de cultivo.

Luego de ajustar el flujo de nitrógeno, el resultado completo arrojado por el *solver* se muestra en la Figura 3.14, donde cada reacción (Rn) fue reemplazado por el flujo encontrado. Como resultado se encontró que todo el metanol que ingresó a las células se dirige a la ruta de la glicólisis, esto se ve ya que la ruta alternativa contenida en el peroxisoma presenta flujos nulos. Además, al finalizar la glicólisis, gran parte del flujo se dirige a la mitocondria, específicamente al ciclo de Krebs, produciendo los metabolitos mitocondriales necesarios para la síntesis de xilanasa, entre ellos NADH, NADPH y acetil CoA.

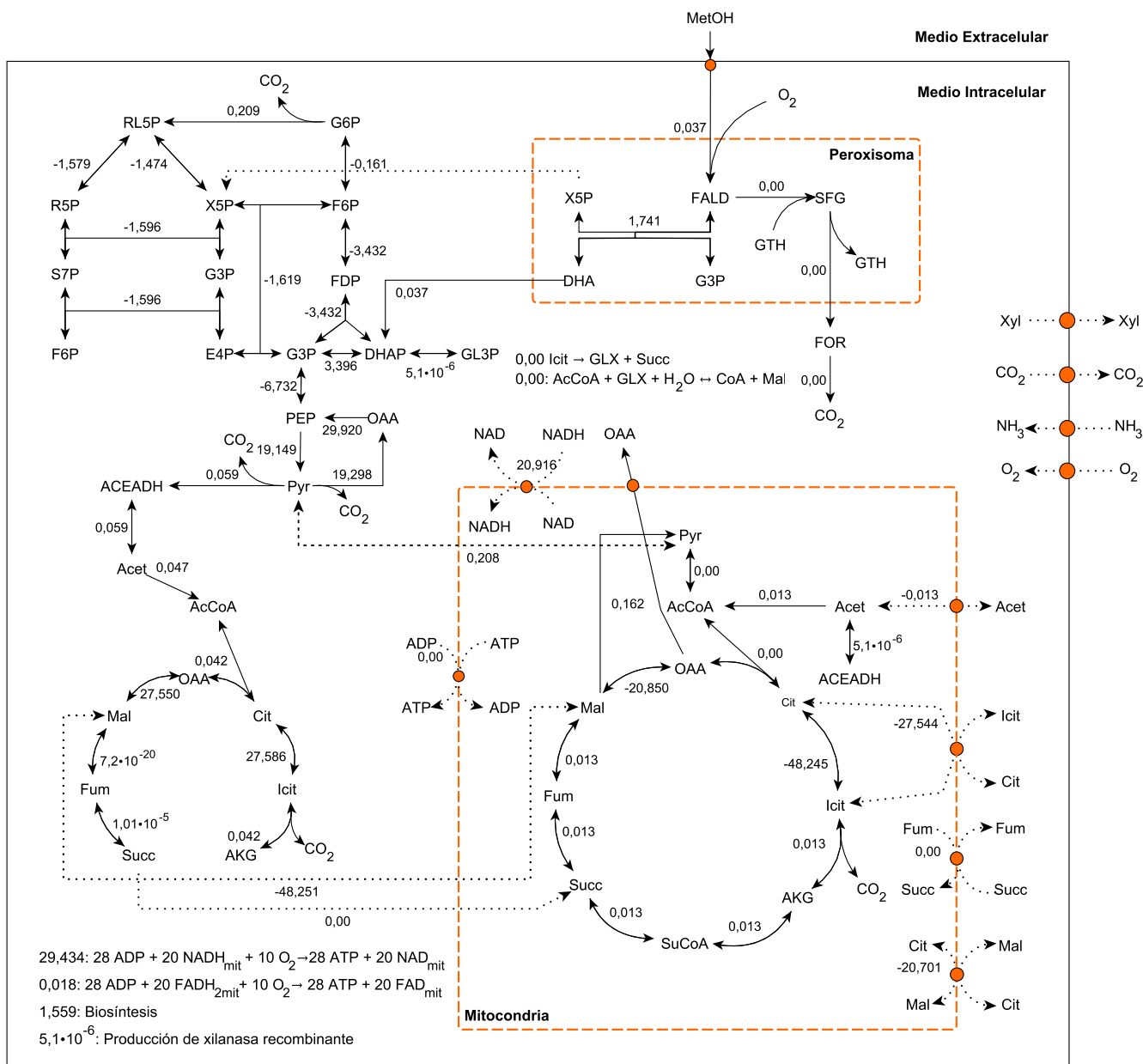
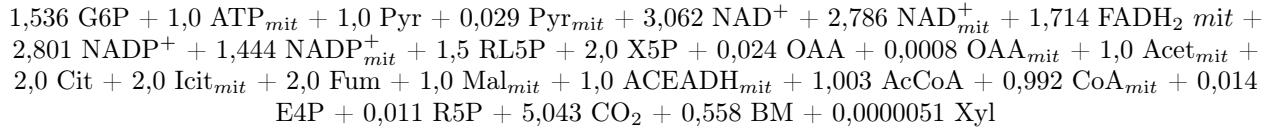
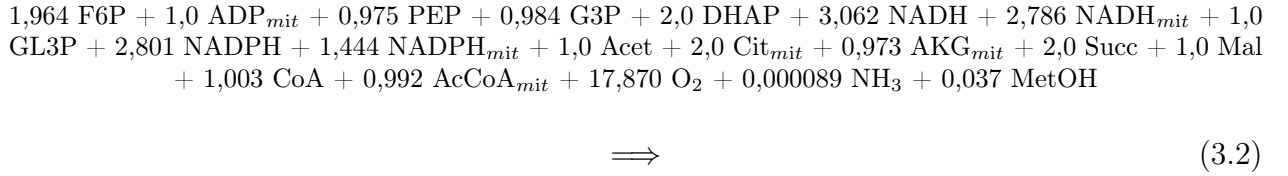


Figura 3.14: Flujos máxicos encontrados para cada reacción en unidades de [mmol/cell.h] obtenidos a partir del Análisis de Flujos Metabólicos hecho con la herramienta *solver*, los cálculos se encuentran en el archivo adjunto "Solver.xlsx" [99].

De este modo, el sistema al estar definido posibilita el cálculo para encontrar la reacción de producción de proteína recombinante de manera directa. El resultado del MFA se muestra a continuación en la Ecuación 3.2:



Para calcular la producción (P_{xyl}) por unidad de enzima teórica se realizó el siguiente cálculo, donde los valores numéricos fueron extraídos de la Ecuación 3.2:

$$P_{Xyl} = \frac{0,037 \text{ [mol MetOH]}}{0,00000506 \text{ [mol Xyl]}} = 7.255 \left[\frac{\text{mol MetOH}}{\text{mol Xyl}} \right]$$

Luego, se hizo el cambio de unidades respectivo, donde 32 [g/mol] corresponde al peso molecular del metanol [123] y 37.931,6 [g/mol] corresponde al peso molecular de la xilanasa, el cual fue calculado a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína [124]. Entonces se obtuvo lo siguiente:

$$P_{Xyl} = 7.255 \left[\frac{\text{mol MetOH}}{\text{mol Xyl}} \right] \cdot \frac{32 \text{ [g/mol]}}{37.931,6 \text{ [g/mol]}} = 6,12 \left[\frac{\text{g MetOH}}{\text{g Xyl}} \right]$$

De esto se desprende que cada 6,12 gramos de metanol se produce un gramo de xilanasa aproximadamente. El valor recién encontrado para el consumo de metanol destinado a la producción de xilanasa fue calculado considerando los datos de concentración de proteína máximos encontrados, entonces el valor de 6,12 [g MetOH/g Xyl] a la vez corresponde al mínimo de consumo, es decir, que la cantidad mínima que consumirá *Pichia pastoris* para poder producir 1 [g] de xilanasa es de 6,12 [g] de metanol, por lo que es posible que este valor esté subestimado.

A continuación se muestra el cálculo hecho para saber el porcentaje de metanol consumido que se destina a la síntesis de proteína recombinante (C_{xyl}), para ellos se usa el dato experimental de la producción de xilanasa por litro de cultivo (90,4 [mg Xyl/L]) y el antecedente sobre la concentración de metanol ingresado, el cual es 8,08 [g/L], luego:

$$C_{xyl} = 6,12 \left[\frac{\text{g MetOH}}{\text{g Xyl}} \right] \cdot \frac{1 \text{ [g Xyl]}}{1.000 \text{ [mg Xyl]}} \cdot \frac{90,4 \text{ [mg Xyl/L]}}{8,08 \text{ [g MetOH/L]}} \cdot 100 = 6,83 \%$$

Para comprobar que los valores encontrados se ajustan a las condiciones usadas y resultados obtenidos, se realizó el siguiente cálculo considerando una concentración del 1 % de metanol

y que su densidad es de 0,792 [g/ml] [125]:

$$C_{met} = \frac{1 [ml \text{ MetOH}]}{99 [ml \text{ H}_2\text{O}]} \cdot 0,792 \left[\frac{g \text{ MetOH}}{ml \text{ MetOH}} \right] = 0,08 [g \text{ MetOH}]$$

De este metanol, el 6,83% se destina a síntesis de xilanasa, entonces la cantidad de metanol presente es:

$$\text{Metanol} = 0,08 [g \text{ MetOH}] \cdot 0,0683 = 0,0054 [g \text{ MetOH}]$$

Y usando el valor encontrado anteriormente de 6,12 [g MetOH/g Xyl] se calcula la xilanasa producida:

$$\text{Xilanasa} = \frac{0,0054 [g \text{ MetOH}]}{6,12 \left[\frac{g \text{ MetOH}}{g \text{ Xyl}} \right]} = 0,00088 [g \text{ Xyl}]$$

Ahora, recordando que los cultivos tenían un volumen de 10 [ml], la xilanasa producida por litro de cultivo es de:

$$\text{Prod}_{xyl} = \frac{0,00088 [g \text{ Xyl}]}{10 [ml]} \cdot \frac{1000 [ml]}{1 [L]} = 0,0889 \left[\frac{g \text{ Xyl}}{L} \right] = 88,9 \left[\frac{mg \text{ Xyl}}{L} \right]$$

Luego, el dato experimental obtenido fue de 90,4 [mg Xyl /L], por lo que se obtuvo un error del 1,7%. Con esto se determina que la reacción encontrada, junto con los valores de producción calculados son confiables y bastante cercanos a los valores experimentales, y también, que el porcentaje de metanol consumido por *P. pastoris* destinado a la producción de xilanasa recombinante corresponde al 6,83%.

El otro 93,16% se reparte en una fracción destinada a la producción de biomasa y otra fracción destinada al mantenimiento celular y otras funciones.

Para determinar el porcentaje de cada una se procede con un cálculo similar, primero se calculó la producción de biomasa por gramo de metanol (P_{BM}) y luego se calculó C_{BM} , correspondiente al metanol consumido que se destina al crecimiento celular. Los valores molares son extraídos directamente de las ecuaciones de producción de xilanasa y síntesis de biomasa, esta última se encuentra en el Anexo G.2, rotulada como R33.

$$P_{BM} = \left(\frac{3 \cdot 10^{-8} [mol \text{ MetOH}]}{1 [mol \text{ BM}]} + \frac{0,0368 [mol \text{ MetOH}]}{0,558 [mol \text{ BM}]} \right) \cdot \frac{32 [g/mol]}{131 [g/mol]} = 0,0161 \left[\frac{g \text{ MetOH}}{g \text{ BM}} \right]$$

$$C_{BM} = 0,0161 \left[\frac{g \text{ MetOH}}{g \text{ BM}} \right] \cdot \frac{9,8 [g \text{ BM/L}]}{8,08 [g \text{ MetOH/L}]} \cdot 100$$

$$C_{BM} = 1,95\%$$

Para verificar que la producción de biomasa encontrada sea verídica, se realizó un cálculo similar al hecho para la xilanasa, este se muestra a continuación:

$$\text{Metanol} = 0,08 [g \text{ MetOH}] \cdot 0,0195 = 0,00156 [g \text{ MetOH}]$$

$$\text{Biomasa} = \frac{0,00156 [g \text{ MetOH}]}{0,0161 \left[\frac{g \text{ MetOH}}{g \text{ BM}} \right]} = 0,0968 [g \text{ BM}]$$

Y recordando que los cultivos tenían un volumen de 10 [ml], la biomasa producida por litro de cultivo es de:

$$Prod_{BM} = \frac{0,0968 [g \text{ BM}]}{10 [ml]} \cdot \frac{1000 [ml]}{1 [L]} = 9,68 \left[\frac{g \text{ BM}}{L} \right]$$

Y usando el dato experimental de que la producción de biomasa fue de 9,8 [g/L], se tiene un error del 1,22%. Con esto se determina que la reacción encontrada es confiable para su uso.

Posteriormente, para calcular el porcentaje de metanol destinado al mantenimiento celular junto con otras funciones asociadas al microorganismo, se hace una resta directa del 100%. El resumen de las fracciones se muestra en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14: Caracterización de los usos asignados al metanol a nivel celular y porcentajes máxicos de cada uno.

Metanol	Destino
88,21 %	Mantenimiento celular y otras funciones
6,83 %	Producción xilanasa recombinante
1,95 %	Producción biomasa

Al tomar la fracción másica encontrada para el mantenimiento C_{man} y transformarla en un coeficiente de mantenimiento m_s , recordando que el cultivo fue hecho durante 72 [h] (3 días), da como resultado lo siguiente:

$$C_{man} = 88,21 \% = \frac{88,21}{100} \left[\frac{g \text{ MetOH}}{g \text{ BM}} \right]$$

$$m_s = \frac{\frac{88,21}{100} \left[\frac{g \text{ MetOH}}{g \text{ BM}} \right]}{72 [h]}$$

$$m_s = 0,0122 [g/g \cdot h]$$

El valor de m_s encontrado concuerda con el rango de m_s encontrado por Zhang *et al.* (2000, 2003), quien encontró que el m_s varía entre 0,007 y 0,013 [g/g·h] para la producción de otras proteínas recombinantes a partir de *Pichia pastoris* al inducir con metanol al 1% [126] [127]. Además, Khatri & Hoffmann (2006) tomaron el supuesto de que m_s es 0,01 [g/g·h] al estudiar la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* y lograron obtener resultados concordantes y validados por la literatura [128].

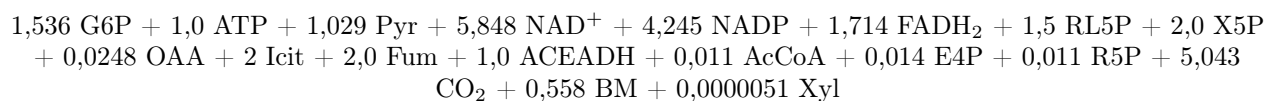
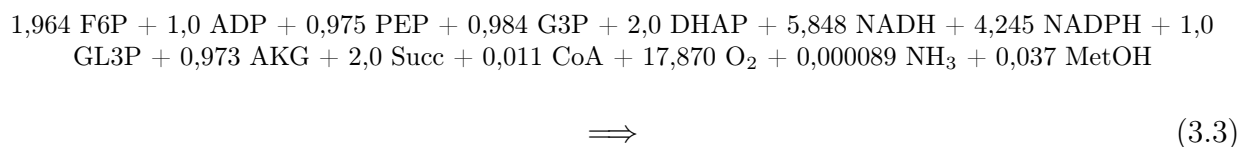
El gran porcentaje destinado al mantenimiento celular se puede explicar, nuevamente, ya que *Pichia pastoris* es un organismo metilotrófico y usa su única fuente de carbono para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que tiene. Adicionalmente, se destaca que el coeficiente de mantenimiento encontrado para *P. pastoris* abarca tanto metabolismo como producción de otras proteínas internas necesarias, es por esto que el valor encontrado se acerca al límite superior reportado para los valores de m_s y puede que el valor disminuya si se filtran las otras funciones abarcadas en el cálculo del m_s .

Luego, dentro del porcentaje calculado para el mantenimiento celular se abarcan otros destinos más específicos que no se incluyen en la ecuación encontrada para la producción de xilanasa, tales como producción de otras proteínas nativas [64] y/o a funciones propias de *Pichia pastoris*, tales como N-glicosilaciones u otras modificaciones post traduccionales [129], por lo tanto, el 88,2% no es exclusivo del mantenimiento.

Finalmente, el bajo porcentaje destinado a la producción de biomasa se debe a que el medio BMMY es un medio usado para la síntesis de proteínas recombinantes, a diferencia del medio BMGY, el cual se usa para el crecimiento celular, por lo que el valor encontrado está dentro de los parámetros esperados [69].

3.4. Resultado del Modelo Matemático de *Pichia pastoris*.

Para cumplir con el cuarto objetivo y luego de haber encontrado la reacción de producción de xilanasa recombinante, se procedió a reordenarla ya que a diferencia del MFA, en el FBA no hay diferenciación entre organelos o sitios al interior de la célula, de este modo, los compuestos citoplasmáticos y mitocondriales son unidos en un solo término. Así, la reacción que se ingresó al modelo fue la mostrada en la Ecuación 3.3:



Con la reacción adaptada se procedió a construir el modelo matemático que describe esta producción usando el programa Cobrapy. El modelo se encuentra en el Anexo G.4, y además, se encuentra adjunto en el archivo python "*Modelo_Matematico.py*" presente en el *link* la referencia [99].

El modelo se construyó a partir de las 67 reacciones identificadas inicialmente y que se encuentran en el Anexo G.2. Luego, se realizó la curación del modelo, esto involucra los siguientes pasos:

- 1) Identificación de *dead-ends*.
- 2) Búsqueda de reacciones huérfanas.
- 3) Revisión de reversibilidades.
- 4) Balance de masa y de carga de las reacciones.

De la identificación de *dead-ends* se encontró solo un metabolito que podría haberse estado acumulado constantemente, este es el GL3P, sin embargo, del MFA se encuentra que su producción es $5,1 \cdot 10^{-6}$, este valor es despreciable considerando que los otros flujos son del

orden de 10^1 , y sumado a esto, la reacción involucrada es reversible, por lo tanto se deduce que no se deberían generar problemas futuros relacionados a este metabolito, ya que la reversibilidad de la reacción implica que puede haber producción o consumo dependiendo de hacia donde se encuentre desplazado el equilibrio de la reacción, por lo tanto su producción no es permanente.

Al realizar la búsqueda de reacciones huérfanas, correspondientes a las reacciones que no están conectadas a la red principal, se encontraron dos de estas reacciones, estas son R26 y R27 (Ver Figura 3.13). Pero nuevamente, gracias al resultado del *solver*, se encuentra que los flujos de ambas reacciones son 0 (Ver Figura 3.14), por lo que las reacciones fueron eliminadas automáticamente por el programa. Esto representa una ventaja por parte del programa Python ya que al ser un optimizador, por defecto busca las rutas óptimas para la producción solicitada, sin embargo, no es beneficioso contar con este tipo de reacciones dentro del modelo, ya que ralentizan el proceso de búsqueda de rutas del programa.

Luego, las reversibilidades fueron revisadas y no fue necesario corregir ninguna, ya que para la resolución del *solver* estas ya habían sido definidas.

Finalmente, al realizar el balance de masa y cargas se encontró que la mayoría estaban desbalanceadas e incluso les faltaban componentes a las reacciones, tales como protones, ácidos fosfóricos o moléculas de agua, por lo que la cantidad de metabolitos aumentó para poder cumplir con el balance. De este modo se usan 57 metabolitos, los cuales se encuentran listados en el Anexo G.1. Esta etapa no es necesaria en la resolución del MFA ni del *solver*, por lo que la revisión se hizo manualmente a cada reacción y se corroboró que los balances se hayan hecho correctamente con la ayuda de la plataforma *online* Kegg.

Luego de este proceso, se determina que el modelo es funcional a pesar de las ineficiencias que existieron en un inicio. Pero independiente de la afirmación anterior, todos los errores e ineficiencias detectadas en el código fueron corregidas.

Por otro lado se destaca que las etapas de identificación de *Gaps* y la revisión y corrección de la anotación sobre la relación *Gene-Protein-Reaction* (GPR) fueron omitidas, ya que esos pasos se realizan para modelos a escala genómica y el modelo construido corresponde a un modelo estequiométrico.

Una vez que el modelo ha sido curado, se definieron las condiciones de borde para ajustar correctamente el modelo. Estas se muestran en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15: Condiciones de borde usadas para la construcción del modelo matemático de *P. pastoris*.

Componente	Límite Inferior	Límite Superior
Metanol	-0,537	$3 \cdot 10^{-7}$
O ₂	-18,83	18,83
NH ₃	-0,00009	0,00009
CO ₂	-12,55	12,55
Xyl	-0,0000051	0,0000051
BM	-1,56	1,56

Las condiciones de borde se eligieron de acuerdo a los flujos calculados para cada metabolito externo, de este modo los límites son \pm el flujo, a excepción del metanol, el cual tiene un límite superior cercano a 0. Esto se hace con el fin de dejar la producción de xilanasa dependiente del metanol. El límite no se puede definir directamente como 0 ya que el programa arroja un error, por esto se selecciona el exponente más bajo al que Python es sensible dentro de los rangos que se están estudiando.

Como resultado, se obtuvo una producción de xilanasa recombinante de 144,17 [mg] por cada litro de cultivo, equivalente a un flujo de $8,1 \cdot 10^{-6}$ [mmol/cell·h]. Este valor se aproxima al calculado previamente ($5,1 \cdot 10^{-6}$ [mmol/cell·h]), por lo que se determina que fue posible ajustar las condiciones correctamente.

Se destaca que el valor encontrado teóricamente (144,17 [mg/L]) dista del valor encontrado experimentalmente (90,4 [mg/L]), con un error relativo del 59,5 %, y a pesar de que el error no es despreciable, se encuentra que el orden del resultado obtenido por el modelo es del mismo orden que el del resultado experimental. La diferencia entre los valores encontrados y calculados se explica por 3 razones principales. La primera de ellas es que Python es un optimizador, y la función objetivo seleccionada es la de producción de xilanasa recombinante, por lo tanto Python optimiza las rutas con tal de maximizar el flujo de xilanasa, por eso el flujo calculado por el programa supera al encontrado experimentalmente. La segunda razón es que Python no diferencia entre el metanol destinado a crecimiento o mantenimiento celular, del metanol destinado a la síntesis de proteína recombinante o biosíntesis, ya que para estas últimas dos existen reacciones asociadas, no así para el mantenimiento, por lo que los porcentajes encontrados en la Tabla 3.14 puede que cambien, maximizando la fracción destinada a la producción de xilanasa. La tercera razón identificada es que Python tampoco es capaz de reconocer inhibiciones o la sobrecarga metabólica que podrían estar percibiendo las células, ya que el inductor (metanol) al agregarlo en cantidades superiores a la recomendada comienza a intoxicar al microorganismo, pero si se eleva indiscriminadamente el límite superior del metanol en el modelo matemático, la producción de xilanasa aumenta junto con la biosíntesis y este aumento es real sólo para los flujos de metanol que no son perjudiciales para las células, es decir, flujos iguales o menores a 40 [g/L], ya que flujos superiores a este, la muerte celular es inminente [130].

Capítulo 4

Conclusiones

Con respecto al primer objetivo, se lograron identificar las condiciones de cultivo más relevantes en la producción de la enzima recombinante. Se encontró que el metanol puede ser usado para inducir con una concentración del 1 % sin afectar significativamente la actividad enzimática, y sin afectar el crecimiento de *P. pastoris*. Sin embargo, el mecanismo de inducción del promotor AOX1 presente en *P. pastoris* se inhibe ante la presencia de azúcares, por lo que se propone estudiar cómo se ve afectada la producción de enzima al estar en contacto con distintas concentraciones de xilosa.

También se encontró que el pH es la condición de cultivo a la que la enzima es más sensible, ya que a pH 6, hay un desempeño regular por parte de la enzima, pero una pequeña variación hacia el pH neutro (7), provoca una disminución significativa de la actividad enzimática, reduciéndose un 51 %. Esto podría provocar que el rendimiento del sistema *in situ* no sea el óptimo o incluso no se lleve a cabo la hidrólisis enzimática. Adicionalmente se encontró que la enzima a una temperatura de 30°C disminuyó su actividad en un 39 % con respecto a la temperatura usada de referencia (50°C), sin embargo, este cambio no es impedimento para la puesta en marcha de un sistema *in situ*.

También se detectó que el fosfato es un gran inhibidor de la enzima por lo que su uso como *buffer* es descartado, al igual que el uso de YNB, ya que el compuesto contiene fosfato de potasio. Así es como se propusieron nuevos medios de cultivo, donde el YNB es reemplazado por casaminoácidos y el *buffer* fosfato por *buffer* citrato, donde se propusieron 3 medios, BMMY cit, MM* fos y MM* cit.

Luego, referente al segundo objetivo, en el medio BMMY cit *Pichia pastoris* creció de forma similar al medio BMMY, y aumentó la tasa de producción en un 53 %. Por otro lado, en el medio MM* fos la tasa de crecimiento fue un 77 % menor que en el medio original, por lo que su uso fue descartado para un sistema *in situ*.

Finalmente, en el medio MM* cit, la enzima tuvo una tasa de crecimiento [g/L·h] similar a la obtenida para el medio BMMY, pero además, tuvo una productividad específica [U/g·h] un 200 % mayor con respecto al medio original, por lo que se propuso su uso para el diseño

del sistema *in situ*, ya que mejoraría la hidrólisis enzimática considerando que el impacto sobre el crecimiento de *P. pastoris* fue bajo y tuvo un leve aumento en la actividad específica [U/mg].

Luego, con respecto al cumplimiento del tercer objetivo, se lograron identificar 69 reacciones involucradas en la producción de la proteína recombinante de interés. En la construcción de la matriz esteoquímica del MFA se usaron 53 reacciones y 53 metabolitos, de este modo se plantea un problema de programación lineal con igual cantidad de ecuaciones que de incógnitas, obteniendo un sistema determinado, permitiendo la caracterización deseada.

Para comprobar que la reacción encontrada estuviera correcta, mediante la función *solver* de Excel se hizo la simulación de los flujos de los metabolitos, los cuales se ajustaron correctamente a excepción del flujo del nitrógeno, el cual fue corregido exitosamente. El error encontrado se debió al supuesto en el que el 100 % del nitrógeno del medio de cultivo era consumido, sin embargo, queda demostrado que sólo una fracción del nitrógeno es consumido por *Pichia pastoris*. De la reacción encontrada se desprende que para producir un gramo de xilanasa se necesitan 6,12 gramos de metanol.

A partir de la ecuación encontrada y usando también la reacción de biosíntesis se determina que las células destinan el 88,2% del metanol a la mantención celular, metabolismo propio de la célula y otras funciones que realizan los organismos eucariontes, luego, el 6,8% del metanol lo destina a la producción de xilanasa recombinante y sólo el 2% a la síntesis celular, concluyendo que el elevado porcentaje destinado a la mantención celular se debe al hecho de que *Pichia* es un organismo metilotrófico, y usa metanol para realizar todas sus funciones metabólicas. Sin embargo, el 88,2% encontrado puede que, además de destinar metanol al mantenimiento celular, se abarquen otras funciones propias de *Pichia pastoris*, tales como producción de otras proteínas o modificaciones post traduccionales. Por otro lado a partir del bajo porcentaje destinado a la síntesis celular, se concluye que *P. pastoris* enfoca su energía en mantenerse y en producir proteínas, mas no en duplicarse, resultado concordante con el objetivo del medio BMMY, el cual es optimizar la producción de proteínas recombinantes, sin necesariamente optimizar el crecimiento celular.

En cuanto al cuarto objetivo, al momento de diseñar el modelo matemático de *Pichia pastoris*, se usaron las 69 reacciones identificadas inicialmente y se incluye la reacción de producción de xilanasa recombinante encontrada anteriormente. Se logra realizar la curación del modelo y ajustar las condiciones de borde. Así, la producción arrojada por el modelo es de 144,2 [mg/L], que a pesar de tener un error relativo del 59,5%, el valor encontrado está dentro del orden de producción obtenida experimentalmente, por lo que se determina que el modelo logró predecir la producción experimental. Aún así el valor encontrado supera los valores experimentales, esto se atribuye principalmente a la maximización que realiza el programa, pudiendo sobre-estimar la producción real, y al hecho de que el modelo no considera el estrés metabólico que pudieran estar teniendo las células o a la intoxicación por metanol que pudiera ocurrir.

Ya que se encontró que el promotor AOX1 presente en *P. pastoris* se inhibe ante la presencia de azúcares, se propone estudiar el efecto de la xilosa sobre el promotor AOX1 a distintas concentraciones para determinar si afecta o no la expresión del gen de producción de xilanasa,

y si es así, establecer el límite en el que la xilosa puede estar presente sin afectar la producción de la enzima recombinante. También se propone implementar el sistema de producción *in situ* de producción de xilanasa recombinante en el medio MM* cit a 30°C, pH 6 e inducir con metanol al 1%. Finalmente, se propone estudiar los rangos de concentración de metanol al que el modelo se ajusta y sería válido implementarlo.

Bibliografía

- [1] MARTÍNEZ, M., ORTEGA, R. & VALDÉS, S. (2017). Bioproductos en Chile: Un nuevo e interesante mercado. [En línea] <<https://bit.ly/2Z17fji>> [Consulta: 23 de junio de 2021].
- [2] AGROINTEC. (2018). Bioproductos Agro. [En línea] <<https://bit.ly/3BWTpwW>> [Consulta: 23 de junio de 2021].
- [3] ZABED, H., SAHU, J., BOYCE, A. & FARUQ, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 66, 751-774, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>.
- [4] LIU, Y., NIE, Y., LU, X., ZHANG, X., HE, H., PAN, F., ZHOU, L., LIU, X., JI, X. & ZHANG, S. (2019). Cascade utilization of lignocellulosic biomass to high-value products. Green Chemistry, 21(13), 3499-3535, <http://dx.doi.org/10.1039/C9GC00473D>.
- [5] BHATIA, S., JAGTAP, S., BEDEKAR, A., BHATIA, R., PATEL, A., PANT D., BANU, J., RAO, C., KIM, Y. & YANG, Y. (2020). Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. Bioresource Technology, 300, 122724, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>.
- [6] CAI, J., HE, Y., YU, X., BANKS, S., YANG, Y., ZHANG, X., YU, Y., LIU, R. & BRIDGWATER, A. (2017). Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 76, 309-322, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>.
- [7] OTIENO, D. & AHRING, B. (2012). The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). Carbohydrate Research, 360, 84-92, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.017>.
- [8] HOLTZAPPLE, M. (2003). Hemicelluloses. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, (Second Edition). 3060-3071, <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00589-7>.

- [9] INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS. (2019). Estudio de intenciones de siembra de cultivos anuales año agrícola 2019/2020. Informe de Resultados Nacionales, [Documento en línea] <[https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/11/Intenciones Siembra2019_20.pdf](https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/11/Intenciones_Siembra2019_20.pdf)> [Consulta: 15 de Octubre de 2021].
- [10] OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. (2021). Cereales. [Documento en línea] <<https://www.odepa.gob.cl/rubros/cereales>> [Consulta: 17 de junio de 2021].
- [11] OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. (2021). Informe Semanal Temporada de Trigo 2020-2021. [Documento en línea] <<https://bit.ly/2Z1uDhg>> [Consulta: 17 de junio de 2021].
- [12] RIVAS, C. & JIMÉNEZ, J. (2017). Valorización energética de los residuos agrícolas en el sector productiva de la IX región de Chile. Universidad de Concepción, [Documento en línea] <<https://bit.ly/2YXWuyk>> [Consulta: 15 de Octubre de 2021].
- [13] DE BHOWMICK, G., SARMAH, A. & SEN, R. (2018). Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. Bioresource Technology, 247, 1144-1154, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.163>.
- [14] MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE. (2020). Resumen del estado del medio ambiente para la ciudadanía. pag. 15, [Documento En línea] <<https://sinia.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2021/01/Resumen-Ejecutivo-IEMA2020.pdf>> [Consulta: 17 de octubre de 2021].
- [15] FAIK, A. (2013). “Plant cell wall structure-pretreatment” the critical relationship in biomass conversion to fermentable sugars. Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production, In: Gu T. (eds). SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Netherlands, Dordrecht. 1-30, https://doi.org/10.1007/978-94-007-6052-3_1.
- [16] ZHANG, W., JOHNSON, A., BARONE, J. & RENNECKAR, S. (2016). Reducing the heterogeneity of xylan through processing. Carbohydrate Polymers, 150, 250-258, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.013>.
- [17] BIAN, J., PENG, F., PENG, X.-P., PENG, P., XU, F. & SUN, R.-C. (2013). Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. Bioresource Technology, 127, 236-241, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.112>.
- [18] CARVALHO, A., NETO, P., DA SILVA, D. & PASTORE, G. (2013). Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. Food Research International, 51(1), 75-85, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>.
- [19] COOPER, B. (2013). Enzimas xilanólicas bacterianas y sus aplicaciones in-

dustriales. Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 16(1): 19-22., <<https://n9.cl/6o7z>>.

- [20] AACHARY, A. & PRAPULLA, S. (2010). Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: Microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10(1), 2–16., <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x>.
- [21] AMORIM, C., SILVÉRIO, S. & RODRIGUES, L. (2019). One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma* species. Food Chemistry, 270, 86–94, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.080>.
- [22] AMORIM, C., SILVÉRIO, S., PRATHER, K. & RODRIGUES, L. (2019). From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. Biotechnology Advances, Volume 37, Issue 7, 107397, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>.
- [23] SANTIBÁÑEZ, L., HENRÍQUEZ, C., CORRO-TEJEDA, R., BERNAL, S., ARMIJO, B. & SALAZAR, O. (2021). Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. Carbohydrate Polymers, 251, 117118, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117118>.
- [24] BURUIANA, C.-T., GÓMEZ, B., VIZIREANU, C. & GARROTE, G. (2017). Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. LWT, 77, 449–459., <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.083>.
- [25] QING, Q., LI, H., KUMAR, R. & WYMAN, C. (2013). Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment. Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals, 391–415., <https://doi.org/10.1002/9780470975831.ch19>.
- [26] BRAGATTO, J., SEGATO, F. & SQUINA, F. (2013). Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*. Industrial Crops and Products, 51, 123–129., <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.062>.
- [27] DRISS, D., HADDAR, A., GHORBEL, R. & CHAABOUNI, S. (2014). Production of Xylooligosaccharides by immobilized His-tagged recombinant xylanase from *Penicillium occitanis* on Nickel-Chelate Eupergit C. Applied Biochemistry and Biotechnology, 173(6), 1405–1418., <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0932-0>.
- [28] SINGH, R., NADAR, C., MUIR, J. & ARORA, A. (2019). Green and clean process to obtain low degree of polymerisation xylooligosaccharides from almond shell. Journal of Cleaner Production, 241, 118237., <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118237>.

- [29] CHAPLA, D., PANDIT, P. & SHAH, A. (2012). Production of xylooligosaccharides from corn cob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. Bioresource Technology, 115, 215–221., <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.083>.
- [30] KEGG. (2021). ENZYME: 3.2.1.8. [En línea] <<https://www.kegg.jp/entry/3.2.1.8>> [Consulta: 19 de agosto de 2021].
- [31] CAZY. (2021). Glycoside Hydrolase family classification. [En línea] <<https://bit.ly/3pkAhWx>> [Consulta: 19 de agosto de 2021].
- [32] CAZY. (2021). Glycoside Hydrolase Family 10. [En línea] <<https://bit.ly/3BTZGtz>> [Consulta: 19 de agosto de 2021].
- [33] CAZY. (2021). Glycoside Hydrolase Family 11. [En línea] <<https://bit.ly/3lSs8Gm>> [Consulta: 19 de agosto de 2021].
- [34] SYDENHAM, R., ZHENG, Y., RIEMENS, A., TSANG, A., POWLOWSKI, J. & STORMS, R. (2014). Cloning and enzymatic characterization of four thermostable fungal endo-1,4- β -xylanases. Applied Microbiology and Biotechnology, 98, 3613–3628, <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5244-8>.
- [35] FUSHINOBU, S., ITO, K., KONNO, M., WAKAGI, T. & MATSUZAWA, H. (1998). Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. Protein Engineering, Design and Selection, 11(12), 1121–1128, <https://doi.org/10.1093/protein/11.12.1121>.
- [36] LI, H., KANKAANPÄÄ, A., XIONG, H., HUMMEL, M., SIXTA, H., OJAMO, H. & TURUNEN, O. (2013). Thermostabilization of extremophilic *Dictyoglomus thermophilum* GH11 xylanase by an N-terminal disulfide bridge and the effect of ionic liquid [emim]OAc on the enzymatic performance. Protein Engineering, Design and Selection, 53(6-7), 414-419, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.09.004>.
- [37] KHAN ACADEMY. (2018). Enzymes review. [Documento En línea] <<https://bit.ly/3CftFvV>> [Consulta: 25 de octubre de 2021].
- [38] KUMAR, V. & SATYANARAYANA, T. (2013). Biochemical and thermodynamic characteristics of thermo-alkali-stable xylanase from a novel polyextremophilic *Bacillus halodurans* TSEV1. International Journal of Biological Macromolecules, 17(5), 797–808, <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0565-1>.
- [39] WANG, X., HUANG, H., XIE, X., MA, R., BAI, Y., ZHENG, F., YOU, S., ZHANG, B., XIE, H., YAO, B. & LUO, H. (2016). Improvement of the catalytic performance of a hyperthermostable GH10 xylanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802. Bioresource Technology, 222, 277-284, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.003>.
- [40] CHEN, Z., ZAKY, A., LIU, Y., CHEN, Y., LIU, L., LI, S. & JIA,

- Y. (2013). Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs. Protein Expression and Purification, 154, 91-97, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.10.006>.
- [41] EXPASY. (2021). Compute pI/Mw. [En línea] <https://web.expasy.org/compute_pi/> [Consulta: 20 de agosto de 2021].
- [42] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. (2021). Endo-1,4- β -xylanase precursor [*Gloeophyllum trabeum*]. [En línea] <<https://bit.ly/2WbDVWc>> [Consulta: 19 de agosto de 2021].
- [43] RYTIOJA, J., HILDÉN, K., YUZON, J., HATAKKA, A., DE VRIES, R. & MÄKELÄ, M. (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78, 614-649, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>.
- [44] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. (2021). 4XX6: Crystal Structure Of A Glycosylated Endo- β -1,4-xylanase (glycoside Hydro-lase Family 10/gh10). Enzyme From *Gloeophyllum Trabeum*. [En línea] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4XX6>> [Consulta: 23 de octubre de 2021].
- [45] MADEJ, T., LANCZYCKI, C., ZHANG, D., THIESSEN, P., GEER, R., MARCHLER-BAUER, A. & BRYANT, S. (2014). MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. Nucleic Acids Research, 42(Database issue), D297–D303, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1208>.
- [46] KHAMBHATY, Y. AKSHAYA, R., SUGANYA, C., SREERAM, K. & RAO, J. (2018). A logical and sustainable approach towards bamboo pulp bleaching using xylanase from *Aspergillus nidulans*. International Journal of Biological Macromolecules, 118, 452-459, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.100>.
- [47] BAJPAI, P. (2014). Industrial Applications of Xylanases. Xylanolytic Enzymes, 69–104, doi:10.1016/b978-0-12-801020-4.00008-1.
- [48] ADIGUZEL, G., FAIZ, O., SISECIOGLU, M., SARI, B., BALTACI, O., AKBULUT, S., GENÇ, B. & ADIGUZEL, A. (2019). A novel endo- β -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. International Journal of Biological Macromolecules, 129, 571-578, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.054>.
- [49] VALDES, K., SALEM, A., LOPEZ, S., ALONSO, M., RIVERO, N., ELGHANDOUR, M., DOMINGUEZ, I., RONQUILLO, M. & KHOLIF, A. (2015). Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. The Journal of Agricultural Science, 153(4), 732-742, <https://doi.org/10.1017/S0021859614000975>.

- [50] COLLINS, T., GERDAY, C. & FELLER, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews, 29, 3–23, <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>.
- [51] AHMED, A., BABALOLA, O. & MCKAY, T. (2018). Cellulase- and xylanase-producing bacterial isolates with the ability to saccharify wheat straw and their potential use in the production of pharmaceuticals and chemicals from lignocellulosic materials. Waste Biomass Valor, 9, 765–775, <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9849-5>.
- [52] BAJAJ, P. & MAHAJAN, R. (2019). Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology, 103, 8711–8724, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10146-0>.
- [53] GEEM, K., SONG, Y., HWANG, I., BAE, H.-J. & LEE, D. (2021). Production of *Gloeophyllum trabeum* endoglucanase Cel12A in *Nicotiana benthamiana* for cellulose degradation. Frontiers in Plant Science, 12, 696199, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.696199>.
- [54] KIM, H., LEE, K., KIM, K., LEE, D.-S., NGUYEN, Q. & BAE, H.-J. (2014). Efficient function and characterization of GH10 xylanase (Xyl10g) from *Gloeophyllum trabeum* in lignocellulose degradation. Journal of Biotechnology, 172, 38–45, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.12.013>.
- [55] OBEROI, H., RAWAT, R. & CHADHA, B. (2014). Response surface optimization for enhanced production of cellulases with improved functional characteristics by newly isolated *Aspergillus niger* HN-2. Antonie van Leeuwenhoek, 105, 119–134, <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0060-9>.
- [56] CHANDEL, A., SINGH, O., RAO, L., CHANDRASEKHAR, G. & NARASU, M. (2011). Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum*, a weedy material, into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498. Bioresource Technology, 102, 1709–1714, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.016>.
- [57] DECKER, C., VISSER, J. & SCHREIER, P. (2011). β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. Applied Microbiology and Biotechnology, 55, 157–163, <https://doi.org/10.1007/s002530000462>.
- [58] RAJASREE, K., MATHEW, G., PANDEY, A. & SUKUMARAN, R. (2013). Highly glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus unguis*: NII 08123 for enhanced hydrolysis of biomass. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 40, 967–975, <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1291-5>.
- [59] OH, C., PARK, C., LEE, Y., SONG, Y. & BAE, H.-J. (2019). Characterization of acidic endoglucanase Cel12A from *Gloeophyllum trabeum* and its synergistic effects on hydrogen peroxide–acetic acid (HPAC)-pretreated lignocellulose. Journal of Wood Science,

65, 24, <https://doi.org/10.1186/s10086-019-1803-7>.

- [60] WANG, X., LUO, H., YU, W., MA, R., YOU, S., LIU, W., HOU, L., ZHENG, F., XIE, X. & YAO, B. (2016). A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. Bioresource Technology, 199, 516-523, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.028>.
- [61] WAHLSTRÖM, R., RAHIKAINEN, J., KRUUS, K. & SUURNÄKKI, A. (2014). Cellulose hydrolysis and binding with *Trichoderma reesei* Cel5A and Cel7A and their core domains in ionic liquid solutions. Microbiology, 111, 726-733, <https://doi.org/10.1002/bit.25144>.
- [62] PETERSON, R. & NEVALAINEN, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. Microbiology, 158(1), 58–68, <https://doi.org/10.1099/mic.0.054031-0>.
- [63] COHEN, R., SUZUKI, M. & HAMMEL, K. (2020). Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. Applied and Environmental Microbiology, 71(5), 2412–2417, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2412-2417.2005>.
- [64] ZAHRL, R., PEÑA, D., MATTANOVICH, M. & GASSER, B. (2017). Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. FEMS Yeast Research, 17, 7, <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox068>.
- [65] KARBALAEI, M., REZAEI, S. & FARSIANI, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. Journal of Cellular Physiology, 235, 5867–5881., <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>.
- [66] OBENG, E., ADAM, S., BUDIMAN, C., ONGKUDON, C., MAAS, R. & JOSE, J. (2017). Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. Bioresources and Bioprocessing, 4, 16, <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0146-8>.
- [67] PARK, Y., KANG, S., LEE, J., HONG, S. & KIM, S. (2002). Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. Applied Microbiology and Biotechnology, 58, 761–766, <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0965-0>.
- [68] MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M., MCNEIL, B. & HARVEY, L. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast, 22: 249–270, <https://doi.org/10.1002/yea.1208>.
- [69] INVITROGEN. (2010). *Pichia* Expression Kit. User Guide. For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, Catalog Number K171001. [Documento en línea] <<https://bit.ly/3haK90c>> [Consulta: 1 de julio de 2021].
- [70] POTVIN, G., AHMAD, A. & ZHANG, Z. (2012). Bioprocess en-

gineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. Biochemical Engineering Journal, 64, 91–105, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.017>.

- [71] INVITROGEN. (2010). pPIC9K. A *Pichia* Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression. Catalog no. V175–20. [Documento en línea] <<https://bit.ly/3zbb2YK>> [Consulta: 22 de agosto de 2021].
- [72] AMORIM, C., SILVÉRIO, S., SILVA, S., COELHO, E., COIMBRA, M., PRATHER, K., & RODRIGUES, L. (2018). Single-step production of arabino-xylooligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers' spent grain. Carbohydrate Polymers, 199, 546–554, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.017>.
- [73] REDDY, S. & KRISHNAN, C. (2015). Production of xylooligosaccharides in SSF by *Bacillus subtilis* KCX006 producing β -xylosidase-free endo-xylanase and multiple xylan debranching enzymes. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 46, 49-55, <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.970694>.
- [74] DA SILVA, B., ROSSI, D. & AYUB, M. (2017). Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. World Journal of Microbiology and Biotechnology volume, 33, 58, <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2226-5>.
- [75] KOCABAS, D. & OZBEN, N. (2014). Co-production of xylanase and xylooligosaccharides from lignocellulosic agricultural wastes. RSC Advances, 4(50), 26129, <https://doi.org/10.1039/C4RA02508C>.
- [76] LEE, S., PARK, J. & KIM, T. (2011). Chapter four - Application of Metabolic Flux Analysis in Metabolic Engineering. Methods in Enzymology, 498, 67-93, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00004-8>.
- [77] ANTONIEWICZ, M. (2015). Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 42, 317–325, <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1585-x>.
- [78] ANTONIEWICZ, M. (2018). A guide to ^{13}C metabolic flux analysis for the cancer biologist. Experimental & Molecular Medicine, 50, 1–13, <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0060-y>.
- [79] VERAS, H., CAMPOS, C., NASCIMENTO, I., ABDELNUR, P., ALMEIDA, J. & PARACHIN, N. (2018). Metabolic flux analysis for metabolome data validation of naturally xylose-fermenting yeasts. BMC Biotechnology, 19, 58, <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0548-0>.
- [80] NIKLAS, J. & HEINZLE, E. (2011). Metabolic Flux Analysis in Systems Biology of Mammalian Cells. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 127, 109-32,

https://doi.org/10.1007/10_2011_99.

- [81] ROWE, E., PALSSON, B. & KING, Z. (2018). Escher-FBA: a web application for interactive flux balance analysis. BMC Systems Biology, 12, 84, <https://doi.org/10.1186/s12918-018-0607-5>.
- [82] BOGAERTS, P., GZIRI, K. & RICHELLE, A. (2017). From MFA to FBA: Defining linear constraints accounting for overflow metabolism in a macroscopic FBA-based dynamical model of cell cultures in bioreactor. Journal of Process Control, 60, 34-47, <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2017.06.018>.
- [83] COMER, A., LONG, M., REED, J. & PFLEGER, B. (2017). Flux balance analysis indicates that methane is the lowest cost feedstock for microbial cell factories. Metabolic Engineering Communications, 5, 26-33, <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2017.07.002>.
- [84] OUEPHANIT, C., BOONVITTHYA, N., BOZONNET, S. & CHULALAKSANANUKUL, W. (2019). High-level heterologous expression of endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* in *Pichia pastoris* X-33 directed through codon optimization and optimized expression. Molecules, 24, 3515, <https://doi.org/10.3390/molecules24193515>.
- [85] CORNISH-BOWDEN, A. (2012). Fundamentals of Enzyme Kinetics. Wiley-Blackwell, Fourth Edition, page 34.
- [86] PUBCHEM. (2020). Compound summary D-xylose. [En línea] <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Xylose>> [Consulta: 30 de julio de 2020].
- [87] DEGROOT, M. & SCHERVISH, M. (2012). Probability and Statistics. Pearson Education, Inc., Fourth Edition, page 321.
- [88] GLEN, S. (2021). Systematic Error / Random Error: Definition and Examples. Statistics How To, [En línea] <<https://bit.ly/37S1B4n>> [Consulta: 18 de agosto de 2021].
- [89] GÓMEZ-BIEDMA, S., VIVÓ, M. & SORIA, E. (2001). Pruebas de significación en bioestadística. Revista de Diagnóstico Biológico, 50(4), 207-218, [En línea] <<https://bit.ly/2W4Xe3t>> [Consulta: 18 de agosto de 2021].
- [90] CYTIVA. (2021). PD-10 desalting columns packed with Sephadex G-25 resin. [En línea] <<https://bit.ly/3qFxJk9>> [Consulta: 1 de julio de 2021].
- [91] FISHER SCIENTIFIC. (2021). Cytiva columns desechables PD-10: PK de 50 columnas vacías. [En línea] <<https://bit.ly/3m8ycLD>> [Consulta: 18 de agosto de 2021].
- [92] UNREAN, P. (2013). Pathway analysis of *Pichia pastoris* to elucidate methanol metabolism and its regulation for production of recombinant proteins. Biotechnology Progress,

30(1), 28–37, <https://doi.org/10.1002/btpr.1855>.

- [93] KEGG. (2021). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [En línea] <<https://www.kegg.jp/>> [Consulta: 30 de junio de 2021].
- [94] VARMA, A. & PALSSON, B. (1994). Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 60, No. 10. p 3724-3731., <https://doi.org/10.1128/AEM.60.10.3724-3731.1994>.
- [95] COBRAPY. (2020). Cobrapy. [En línea] <<https://opencobra.github.io/cobrapy/>> [Consulta: 30 de julio de 2020].
- [96] HENRY, C., DEJONGH, M., BEST, A., FRYBARGER, P., LINSAY, B. & STEVENS, R. (2010). High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. Nature Biotechnology, 28, 977–982, <https://doi.org/10.1038/nbt.1672>.
- [97] BRENDA. (2021). The comprehensive enzyme information system. [En línea] <<https://www.brenda-enzymes.org/>> [Consulta: 30 de junio de 2021].
- [98] NCBI. (2021). The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. [En línea] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> [Consulta: 30 de junio de 2021].
- [99] CORRO-TEJEDA, R. (2021). Documentos Adjuntos Tesis. [En línea] <<https://bit.ly/3hkBnvG>> [Consulta: 1 de julio de 2021].
- [100] CHEN, C., GAO, G., KAO, A. & TSAI, Z. (2018). Bi-functional fusion enzyme EG-M-Xyn displaying endoglucanase and xylanase activities and its utility in improving lignocellulose degradation. International Journal of Biological Macromolecules, 111, 722–729, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.080>.
- [101] COUDERC, R. & BARATTI, J. (1980). Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. Agricultural and Biological Chemistry, 44(10), 2279-2289, <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10864320>.
- [102] LEE, J., CHEN, H., LIU, A., ALBA, B. & LIM, A. (2017). Auto-induction of *Pichia pastoris* AOX1 promoter for membrane protein expression. Protein Expression and Purification, 137, 7-12, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.006>.
- [103] LEE, N. (2018). Statistical Optimization of Medium and Fermentation Conditions of Recombinant *Pichia pastoris* for the Production of Xylanase. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 23(1), 55–63, <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0262-5>.

- [104] CHEN, Q., LI, M. & WANG, X. (2016). Enzymology properties of two different xylanases and their impacts on growth performance and intestinal microflora of weaned piglets. Animal Nutrition Journal, 2(1), 18–23., <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.02.003>.
- [105] SANHUEZA, C., CARVAJAL, G., SOTO-AGUILAR, J., LIENQUEO, M. E. & SALAZAR, O. (2018). The effect of a lytic polysaccharide monoxygenase and a xylanase from *Gloeophyllum trabeum* on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues using a commercial cellulase. Enzyme and Microbial Technology, 113, 75–82, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.11.007>.
- [106] PÉREZ-AVALOS, O., SÁNCHEZ-HERRERA, L., SALGADO, L. & PONCE-NOYOLA, T. (2008). A bifunctional endoglucanase/endoxylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. Current Microbiology, 57, 39–44, <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9149-1>.
- [107] DOBREV, G., ZHEKOVA, B., DELCHEVA, G., KOLEVA, L., TZIPORKOV, N. & PISH-TIYSKI, I. (2009). Purification and characterization of endoxylanase Xln-1 from *Aspergillus niger* B03. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25, 2095, <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0112-5>.
- [108] LI, N., SHI, P., YANG, P., WANG, Y., LUO, H., BAI, Y., ZHOU, Z. & YAO, B. (2009). Cloning, Expression, and Characterization of a New *Streptomyces* sp. S27 Xylanase for Which Xylobiose is the Main Hydrolysis Product. Applied Biochemistry and Biotechnology, 159, 521–531, <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8411-0>.
- [109] LI, N., MENG, K., WANG, Y., SHI, P., LUO, H., BAI, Y., YANG, P. & YAO, B. (2008). Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9. Applied Microbiology and Biotechnology, 80, 231, <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1533-z>.
- [110] BISWAS, S., JANA, S., MISHRA, A. & NANDA, G. (1990). Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. Biotechnology and Bioengineering, 35(3), 244–51, <https://doi.org/10.1002/bit.260350305>.
- [111] SHARMA, S., SHARMA, V., NARGOTRA, P. & BAJAJ, B. (2018). Process desired functional attributes of an endoxylanase of GH10 family from a new strain of *Aspergillus terreus* S9. International journal of biological macromolecules, 115, 663–671, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.096>.
- [112] FAWZI, E. (2018). Highly Thermostable Xylanase Purified from *Rhizomucor Miehei* NRRL 3169. Acta Biologica Hungarica, 85–94 (2011), <https://doi.org/10.1556/ABiol.61.2011.1.9>.
- [113] TRICHES, M., CARVALHO, C. & PEREIRA, N. (2002). Production and

properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. Brazilian Journal of Microbiology, 115, 663-671, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000400011>.

- [114] SIGMA. Product information. Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate. [En línea] <<https://bit.ly/3oV6UHK>> [Consulta: 26 de mayo de 2021].
- [115] SIGMA. Product information. Yeast nitrogen base without amino acids. [En línea] <<https://bit.ly/3oRH7k1>> [Consulta: 26 de mayo de 2021].
- [116] CLARE, J., ROMANOS, M., RAYMENT, F., ROWEDDER, J., SMITH, M., PAYNE, M., SREEKRISHNA K. & HENWOOD, C. (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. Gene, 105(2), 205-212, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90152-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90152-2).
- [117] MERCK. (2010). Microbiology Manual. 12th Edition. pages 541-542. [Documento en línea] <<https://bit.ly/3ylzkhn>> [Consulta: 26 de agosto de 2021].
- [118] MOLINA, M. & OCHOA, C. (2016). Errores en epidemiología. Errores sistemáticos. Factores de confusión y modificación del efecto. Fundamentos de medicina basada en la evidencia, [Documento En línea] <<https://bit.ly/3zstrQT>> [Consulta: 30 de agosto de 2021].
- [119] FÖLDESI, B. (2019). Guide to Enzyme Unit Definitions and Assay Design. [En línea] <<https://www.biomol.com/resources/biomol-blog/guide-to-enzyme-unit-definitions-and-assay-design>> [Consulta: 23 de junio de 2021].
- [120] FERNÁNDEZ-ESPINAR, M., RAMÓN, D., PIÑAGA, F. & VALLÉS, S. (1991). Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiology Letters, 91(2), 91-96, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05190.x>.
- [121] JAHIC, M., ROTTICCI-MULDER, J., MARTINELLE, M. HULT, K. & ENFORS, S. (2002). Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. Bioprocess and Biosystems Engineering, 24, 385-393, <https://doi.org/10.1007/s00449-001-0274-5>.
- [122] SIGMA-ALDRICH. Product specification. Product name: Yeast Extract. [En línea] <<https://bit.ly/3pXwGMp>> [Consulta: 12 de junio de 2021].
- [123] MERCK. (2021). Methanol for spectroscopy Uvasol®. CAS 67-56-1, chemical formula CH₃OH, molar mass 32.04 g/mol. [En línea] <<https://bit.ly/3w3kJWz>> [Consulta: 29 de junio de 2021].
- [124] EXPASY. (2021). Compute pI/Mw. [En línea] <<https://bit.ly/2UQdqVw>> [Consulta: 29 de junio de 2021].
- [125] QUÍMICA UNIVERSAL LTDA. (2020). FICHA TECNICA. [Documento En línea]

<<https://bit.ly/3vMaQy3>> [Consulta: 25 de octubre de 2021].

- [126] ZHANG, W., BEVINS, M., PLANTZ, B., SMITH, L. & MEAGHER, M. (2000). Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and bioengineering*, 70(1), 1–8, [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70:1<1::aid-bit1>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70:1<1::aid-bit1>3.0.co;2-y).
- [127] ZHANG, W., HYWOOD POTTER, K., PLANTZ, B., SCHLEGEL, V., SMITH, L. & MEAGHER, M. (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 30(4), 210–215, <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0035-3>.
- [128] KHATRI, N. & HOFFMANN, F. (2006). Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology & Bioengineering*, 93, 871–879, <https://doi.org/10.1002/bit.20773>.
- [129] IRANI, Z., KERKHOVEN, E., SHOJAOSADATI, S. & NIELSEN J. (2015). Genome-scale metabolic model of *Pichia pastoris* with native and humanized glycosylation of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 961–969, <https://doi.org/10.1002/bit.25863>.
- [130] WAKAYAMA, K., YAMAGUCHI, S., TAKEUCHI, A., MIZUMURA, T., OZAWA, S., TOMIZUKA, N., HAYAKAWA, T. & NAKAGAWA, T. (2016). Regulation of intracellular formaldehyde toxicity during methanol metabolism of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(5), 545–549, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.03.022>.
- [131] COGHILL, A. & GARSON, L. (2006). The ACS Style Guide: Effective Communication of Scientific Information. Third Edition. *Journal of Chemical Education*, 83(11), 1603, DOI: 10.1021/ed083p1603.1.
- [132] DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA. (2018). Propiedades del agua. [En línea] <<https://bit.ly/3Dmcee>> [Consulta: 27 de agosto de 2021].
- [133] MILLER, S., BOTTEMA, C., STATHIS, P., TOKÉS, L. & FELDMAN, D. (1986). Unexpected Presence of Estrogens in Culture Medium Supplements: Subsequent Metabolism by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Endocrinology*, 119(3), 1362–1369, <https://doi.org/10.1210/endo-119-3-1362>.
- [134] THERMO FISHER SCIENTIFIC. (2021). Bacto™ Yeast Extract. [En línea] <<https://bit.ly/3dcJ1H1>> [Consulta: 26 de junio de 2021].
- [135] MERCK. (2021). OmniPur® Casamino Acids - CAS 65072-00-6 - Calbiochem. [En línea] <<https://bit.ly/3A2l3Z6>> [Consulta: 26 de junio de 2021].

Anexos

Anexo A

Secuencia GtXyn10A

A.1. Secuencia Aminoacídica

A continuación se muestra la secuencia amoniacídica de la proteína GtXyn10A, donde se res-
ta la nomenclatura mostrada en la Tabla A.1.

MISKFTFVLLALLPLVQCAPPTPAASSALPTGTSTVALNTAAKAAGKLYMGTATDNG
ELTDTAYTTILDNNANFGQITPANAMKWENTEPEQGTWTWTNADQIANLAKTNGQ
LLRGHNCVWYNQLPSWVTSGSWTNATLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPF
NDDGTYRSDVFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNAKLYINEYNIEYTGSKATAMLNLVES
LKAEGVPIDGVGLQSHFIVGEVPTSLQSIMEQFTALGVEVAITELDIRMTLPETAALLE
QQKTDYDTVISACRAVSGCVGVTVWDFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPA
YDGIVAGWQ

Tabla A.1: Código de escritura de los aminoácidos, adaptado de [131].

Nomeclatura	Aminoácido
A	Alanina
R	Arginina
N	Asparagina
D	Aspartato
C	Cisteína
Q	Glutamina
E	Ácido Glutámico
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
K	Lisina
M	Metionina
F	Fenilalanina
P	Prolina
S	Serina
T	Treonina
W	Triptófano
Y	Tirosina
V	Valina

A.2. Secuencia Nucleotídica

A continuación se muestra la secuencia nucleotídica de la proteína GtXyn10A, donde se respeta la nomenclatura presente en la Tabla A.2.

ATGATTTCTAAGACCTTCACCGTTCTCCTTGCCCTTGCTGCCCCTTGTGCAATGCG
CACCTCCTACTCCCGCCGCTCTTCGGCTTTGCCGACTGGTACATCTACCGTCGC
CCTCAATACTGCGGCGAAGGCGGCAGGGAACTGTACATGGGTACTGCCACCGA
CAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTATACCACTATCCTGGACAACAATGCAAAC
TTCGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAG
CAGGGAACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAACCTCGCGAAGACC
AATGGCCAGCTCCTGAGAGGCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGC
TGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGCCACACTTACTGCCGTAGTTCAGGAC

CATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGGATGTA
 ATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACAAC
 ACCATCGGCCAGCATAACATTCCCATCGCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCCGAC
 CCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGAGTACAACATTGAGTACACGGGTTCCAAG
 GCGACAGCTATGCTGAACCTCGTGGAGAGTCTTAAGGCAGAGGGCGTTCCCATC
 GACGGTGTTGGTCTGCAGTCCCCTTCATCGTTCGGCGAAGTCCCCACCTCGCTT
 CAGTCCATCATGGAGCAGTTCACCGCGCTCGGCGTCGAGGTCGCCATCACCGAG
 CTGGACATCCGCATGACCCTCCCCGAAACTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAG
 ACCGATTATGACACTGTCATCTCTGCATGCAGGGCCGTCTCCGGCTGCGTTGGC
 GTCACCGTTTGGGACTTCACTGACAAGTACTCTTGGGTACCGAGCACCTTCTCC
 GGTCAGGGTGCCGCGACACCTTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTAC
 GACGGAATTGTTGCTGGCTGGCAGTAA

Tabla A.2: Código de escritura de los nucleótidos, adaptado de [131].

Nomeclatura	Nucleótido
A	Adeninda
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Anexo B

Preparación Materiales y Soluciones

B.1. Preparación Buffers

Preparación de *buffer* citrato de sodio 50 [mM] 10X, pH 5

- 1.- En un vaso precipitado de 50 [mL] añadir 1,69 [g] de citrato de sodio y 0,88 [g] de ácido cítrico.
- 2.- Agregar 15 [mL] de agua milli Q y llevar a agitación. Para ajustar el pH a 5 usar NaOH.
- 3.- Con una probeta ajustar el volumen hasta completar 20 [mL] y traspasar la solución a un tubo Falcon de 50 [mL].

Preparación de *buffer* citrato de sodio 50 μ M 10X, pH 6

- 1.- En un vaso precipitado de 50 [mL] añadir 2,4 [g] de citrato de sodio y 0,38 [g] de ácido cítrico.
- 2.- Agregar 15 [mL] de agua milli Q y llevar a agitación. Para ajustar el pH a 6 usar NaOH.
- 3.- Con una probeta ajustar el volumen hasta completar 20 [mL] y traspasar la solución a un tubo Falcon de 50 [mL].

Preparación de *buffer* MOPS, pH 7

- 1.- En un vaso precipitado de 50 [mL] añadir 4,184 [g] de MOPS *free acid*, 0,41 [g] de acetato de sodio y 0,37 [g] de Na₂EDTA.
- 2.- Agregar 15 [mL] de agua milli Q y llevar a agitación. Para ajustar el pH a 7 usar NaOH.
- 3.- Con una probeta ajustar el volumen hasta completar 20 [mL] y traspasar la solución a un tubo Falcon de 50 [mL].

Preparación de *buffer* fosfato de potasio 1 [M], pH 6

El procedimiento fue extraído de la guía del usuario de Invitrogen [69].

- 1.- Mezclar 132 [ml] de K_2HPO_4 1 [M] y 868 [ml] de KH_2PO_4 y verificar que el pH sea $6 \pm 0,1$, de lo contrario ajustar con ácido fosfórico o hidróxido de potasio.
- 2.- Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

B.2. Preparación Soluciones Stock

Los siguientes protocolos fueron extraídos de la guía del usuario de Invitrogen [69].

- YNB 10X (2Y) (1,34 %)

- 1.- Disolver 134 [g] de YNB con sulfato de amonio y sin aminoácidos en 1 [L] de agua.
- 2.- Esterilizar por filtrado y guardar a 4°C.

- YNB 10X (4Y) (1,34 %)

- 1.- Disolver 34 [g] de YNB sin sulfato de amonio y sin aminoácidos y 100 [g] de sulfato de amonio en 1 [L] de agua.
- 2.- Esterilizar por filtrado y guardar a 4°C.

- Biotina 500X (0,02 %)

- 1.- Disolver 20 [mg] de biotina en 100 [mL] de agua.
- 2.- Guardar a 4°C.

- Metanol 10X (5 %)

- 1.- Mezclar 5 [mL] de metanol con 95 [mL] de agua.
- 2.- Esterilizar por filtrado y guardar a 4°C.

B.3. Preparación Medios de Cultivo

B.3.1. Medio MM

A continuación se listan los componentes del medio MM (Minimal Methanol), extraídos de la guía del usuario de Invitrogen [69].

- YNB 1,34 %
- Biotina $4 \cdot 10^{-5}$ %

- Metanol 0,5 %

Protocolo de Preparación:

Para 1 [L] de medio, la preparación es la siguiente:

- 1.- Autoclavar 600 [mL] de agua.
- 2.- Enfriar y añadir 200 [mL] de YNB 10X, 4 [mL] de biotina 500X, 200 [mL] de metanol 10X.
- 3.- Almacenar a 4°C.

B.3.2. Medio BMGY

Protocolo de Preparación: [69]

- 1.- Disolver 10 [g] de extracto de levadura, 20 [g] de peptona en 700 [ml] de agua.
- 2.- Autoclavar.
- 3.- A temperatura ambiente añadir 100 [ml] de fosfato de potasio 1[m] a pH 6, 100 [ml] de YNB 10X, 100 [ml] de glicerol 10X y 2 [ml] de biotina 500X.
- 4.- Mezclar bien y agregar 100 [ml] de glicerol 10X.
- 5.- Almacenar a 4°C. La durabilidad de la solución es de 2 meses aproximadamente.

B.3.3. Medio BMMY

Protocolo de Preparación: [69]

- 1.- Disolver 10 [g] de extracto de levadura, 20 [g] de peptona en 700 [ml] de agua.
- 2.- Autoclavar.
- 3.- A temperatura ambiente añadir 100 [ml] de fosfato de potasio 1[m] a pH 6, 100 [ml] de YNB 10X, 100 [ml] de glicerol 10X y 2 [ml] de biotina 500X.
- 4.- Mezclar bien y agregar 100 [ml] de metanol 10X.
- 5.- Almacenar a 4°C. La durabilidad de la solución es de 2 meses aproximadamente.

Anexo C

Curvas de Calibración

C.1. Curva de Calibración de DNS

La curva de calibración con la cual se hicieron los cálculos para conocer la concentración de azúcares reductores, en este caso xilosa, se muestra en la Figura C.1:

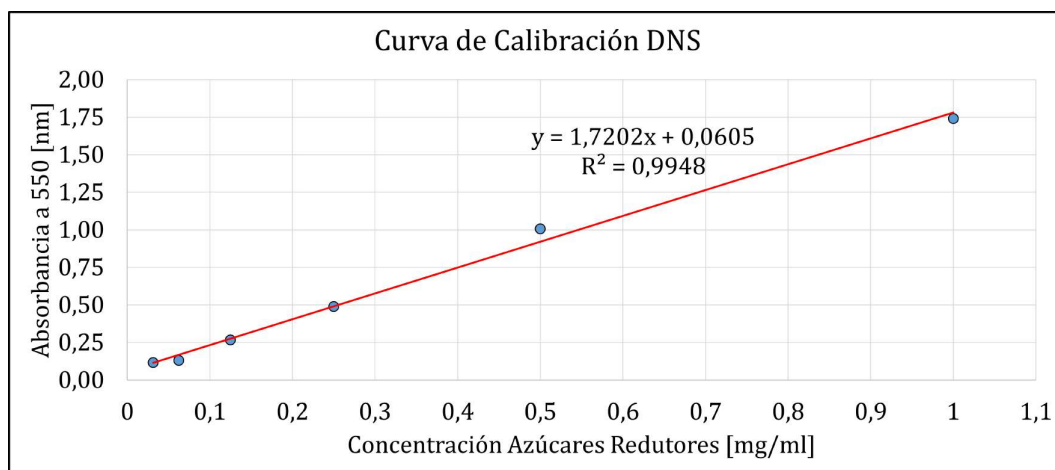


Figura C.1: Curva de Calibración de DNS obtenida para la medición de azúcares reductores obtenidos.

En la Figura C.1, los puntos azules corresponden a datos experimentales obtenidos en el laboratorio, mientras que la curva roja representa la línea de tendencia, esta presenta un $R^2 = 0,9948$ y se representa por la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 1,7202 \cdot x + 0,0605 \quad (C.1)$$

Para determinar la actividad enzimática se usa la siguiente ecuación:

$$Act = \frac{[Xil] \cdot FD \cdot 1000}{PM_{xilosa} \cdot t_{rxn}} \quad (C.2)$$

En la Ecuación 2.1 Act es la actividad enzimática medida en [U/ml], $[Xil]$ es la concentración de xilosa medida en [mg/ml] y que es calculada a partir de la ecuación C.1, FD es el factor de dilución [-], PM_{xilosa} es el peso molecular de la xilosa, la cual es 150,33 [mg/mmol] [86] y t_{rxn} es el tiempo de reacción medido en [min]. Cabe destacar que la ecuación además está multiplicada por 1000, esto se agrega para ajustar correctamente las unidades.

C.2. Curva de Calibración de Bradford

La curva de calibración con la cual se hicieron los cálculos para conocer la concentración de proteína se muestra en la Figura C.2:

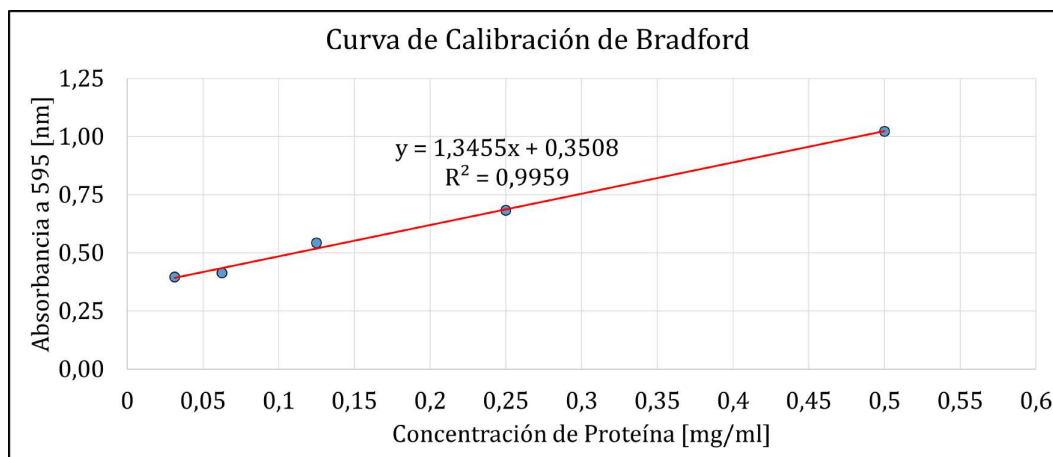


Figura C.2: Curva de Calibración de Bradford obtenida para la medición de la cantidad de proteína presente en el medio.

En la Figura C.2 los puntos azules corresponden a los datos experimentales obtenidos, mientras que la curva roja representa la línea de tendencia, presenta un factor de correlación $R^2 = 0,9959$ y se representa por la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 1,3455 \cdot x + 0,3508 \quad (C.3)$$

En la Ecuación C.3, y representa la absorbancia medida a 595 [nm] y x corresponde a la concentración de proteína presente en el medio, por lo tanto para calcularla, solo se debe despejar x .

Anexo D

Imágenes complementarias

D.1. Cultivo y Crecimiento de *Pichia pastoris*



Figura D.1: Imagen superior del tubo eppendorf con el clon de *Pichia pastoris* usado para el cultivo.

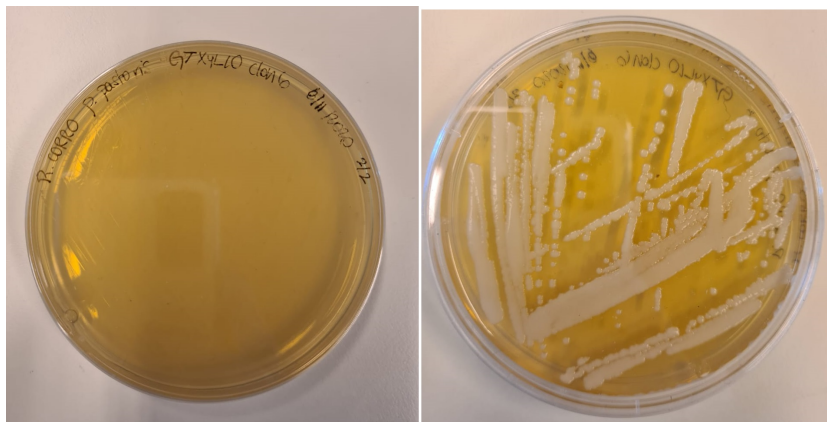


Figura D.2: Placas con medio YPD sólido, a la izquierda se observa la placa a tiempo 0 [h], donde mediante un raspado del tubo eppendorf mostrado en la Figura D.1 las células son colocadas en la placa. A la derecha se observa la misma placa a las 48 [h], donde se aprecian las colonias ya crecidas (líneas y puntos blancos).

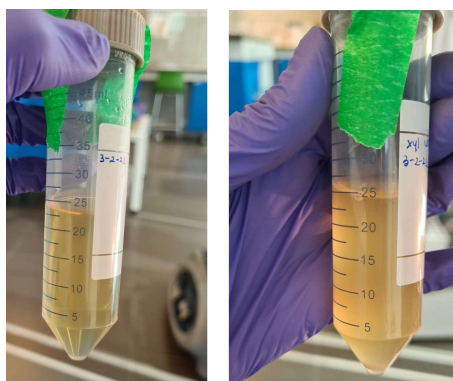


Figura D.3: Tuvo Falcon de 50 ml conteniendo ~ 25 [ml] de medio YPD líquido con células seleccionadas de una de las colonias de la placa ya crecida. A la izquierda, inóculo a tiempo 0 [h], a la derecha inóculo a tiempo 24 [h]. La pérdida de transparencia o cambio de turbiedad indica que las células crecieron.



Figura D.4: Cultivo en matraz de 2,8 [L] con 650 [ml] de medio BMGY y 1,3 [ml] de inóculo proveniente del medio YPD líquido a tiempo 0 [h].

Luego de 16 a 18 horas aproximadamente desde que se inocula, se mide densidad óptica (absorbancia a 600 [nm]), si este valor está en el rango entre 2 y 6 se procede a concentrar las células [69], centrifugándolas. El pellet o fase sólida es guardado para la fase siguiente mientras que el sobrenadante o fase líquida es descartado. El pellet es resuspendido en los distintos medios estudiados (BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit), y luego es distribuido entre 3 matraces de manera equitativa, de este modo los cultivos de cada medio se realizan por triplicado, tal como se ve en la Figura D.5. Se toman muestras diarias de 1 [ml] durante

3 días, las que son almacenadas a -20°C para luego ser procesadas todas juntas al final del cultivo.



Figura D.5: Cultivo de *Pichia pastoris* en los 4 medios estudiados por triplicado a tiempo 0 [h]. Primera columna corresponde al triplicado de los cultivos en medio BMMY fos, segunda columna contiene los triplicados de los cultivos en medio BMMY cit, tercera columna corresponde a los triplicados del cultivo en medio MM* fos y cuarta columna contiene los triplicados de los cultivos en medio MM* cit.

D.2. Medición Peso Seco

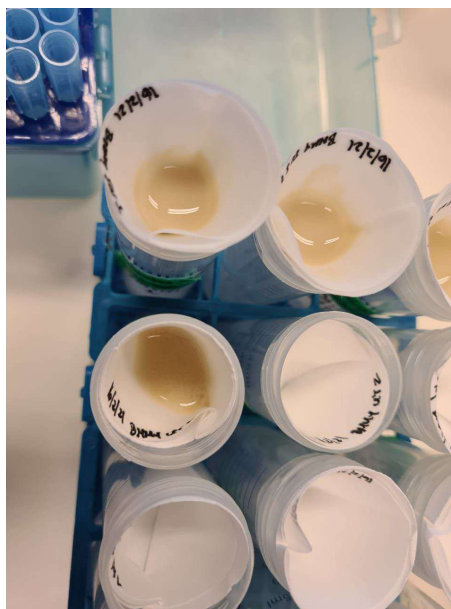


Figura D.6: Vista superior del sistema para medir peso seco a tiempo 0 [h]. Sistema compuesto por un tubo Falcon de 50 [ml], papel filtro y el pellet ya disuelto y vertido en el papel filtro.

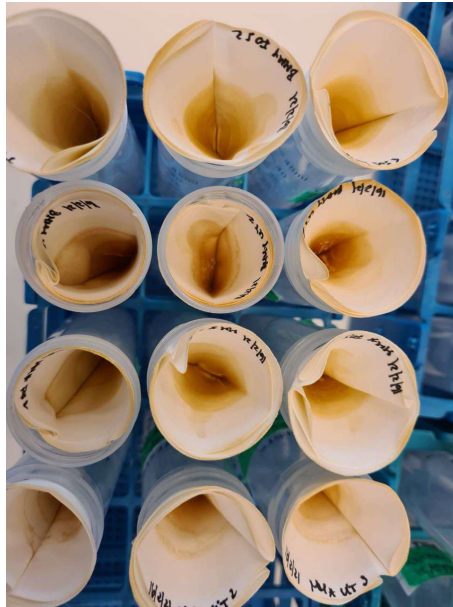


Figura D.7: Vista superior del sistema para medir peso seco completada las 24 [h].

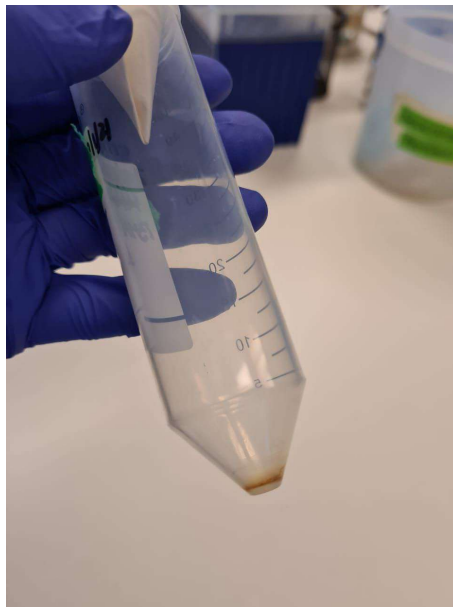


Figura D.8: Vista lateral del sistema para medir peso seco compuesto por un tubo Falcon de 50 [ml], papel filtro y el pellet.

Como se ve en la Figura D.8, al fondo del tubo Falcon se observa pellet seco, deduciendo que hubo una filtración del pellet húmedo a través del papel filtro, por esta razón es que se mide la masa del papel filtro más la del tubo Falcon y esta es considerada como la masa inicial (m_i). Este masa es restada de la masa final (m_f), la cual consta del tubo Falcon, papel filtro y el pellet seco. De este modo se evitan pérdidas de peso seco.

D.3. Filtración Columnas PD10

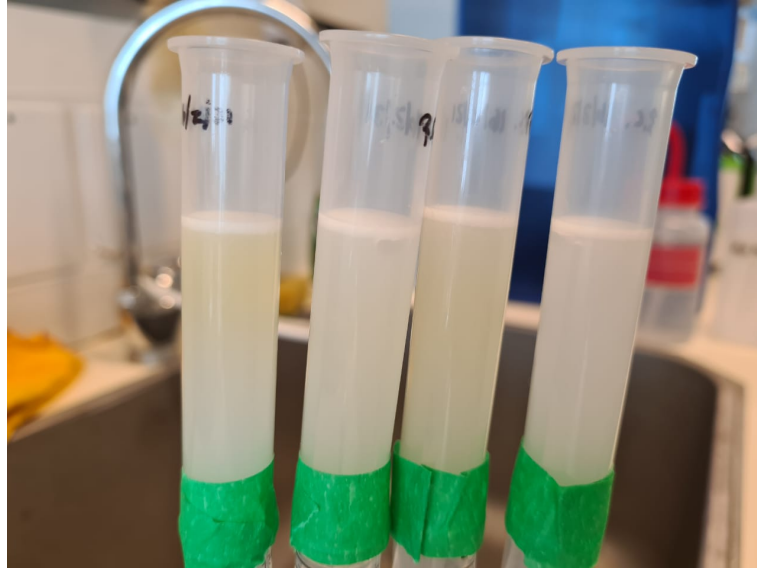


Figura D.9: Columnas PD10 usadas para la filtración de los medios de cultivos.

En la Figura D.9 se muestra el sistema usado para la desalación mediante la utilización de columnas de filtración PD10, por la parte superior se ingresaba el líquido a filtrar, y por la parte inferior se producía el descarte o la obtención del líquido filtrado, dependiendo de la etapa de filtración en la que se encontrara.

Anexo E

Aminoácidos Recomendados y Aportados

A continuación en la Tabla E.1 se muestran los componentes del hidrolizado de casaminoácido y las concentraciones recomendadas por Merck para las fermentaciones.

Tabla E.1: Concentraciones de aminoácidos recomendados para las fermentaciones [114] y concentraciones de aminoácidos aportados por el hidrolizado de casaminoácidos [117].

Aminoácido	Conc. Recomendada	Conc. en Casaminoácidos
Alanina	-	2 % m/m (20 [g/L])
Arginina	20 [mg/L]	2,2 % m/m (22 [g/L])
Ácido Aspártico	100 [mg/L]	4,4 % m/m (45 [g/L])
Ácido Glutámico	-	12,5 % m/m (13 [g/L])
Glicina	-	1,2 % m/m (12 [g/L])
Histidina	20 [mg/L]	1,8 % m/m (18 [g/L])
Isoleucina	30 [mg/L]	2,4 % m/m (24 [g/L])
Leucina	60 [mg/L]	3,4 % m/m (35 [g/L])
Lisina	30 [mg/L]	5,6 % m/m (57 [g/L])
Metionina	20 [mg/L]	1,2 % m/m (12 [g/L])
Fenilalanina	40 [mg/L]	2,5 % m/m (25 [g/L])
Prolina	-	6,1 % m/m (62 [g/L])
Serina	-	2,7 % m/m (27 [g/L])
Treonina	300 [mg/L]	2,2 % m/m (22 [g/L])
Tirosina	25 [mg/L]	0,6 % m/m (66 [g/L])
Valina	150 [mg/L]	3,9 % m/m (70 [g/L])

En la tercera columna de la Tabla E.1 (Conc. en Casaminoácidos), los datos en % m/m fueron extraídos directamente de [117] y los datos mostrados en [g/L] fueron calculados considerando que la densidad del agua a 30°C es 995,65 [kg/m³] [132].

Anexo F

Gráficos complementarios

F.1. Crecimiento de *P. pastoris*

A continuación se muestran los gráficos complementarios de medición crecimiento de *P. pastoris*, ya sea por el seguimiento del peso seco, como de la densidad óptica. Se graficaron los datos individualizados por matraz, por medio de cultivo y se comparan pares de medios de cultivos.

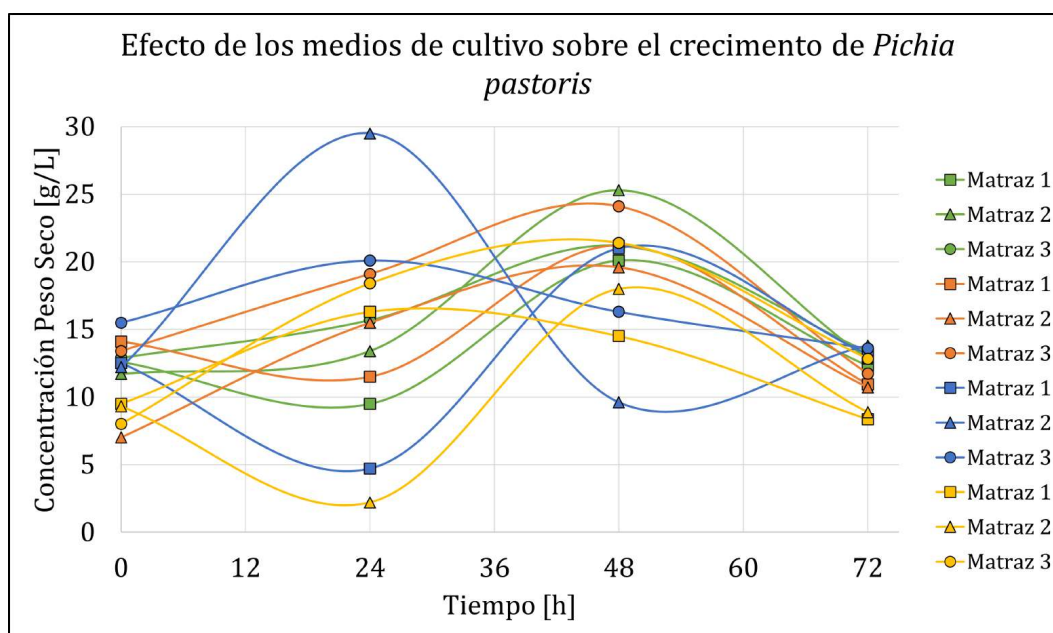


Figura F.1: Efecto de los medios de cultivos individualizados por matraz sobre el crecimiento celular de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Cada curva representa un matraz, donde las mediciones fueron hechas por triplicado. Curvas verdes: matraces con medio BMMY fos, curvas anaranjadas: matraces con medio BMMY cit, curvas azules: matraces con medio MM* fos, curvas amarillas: matraces con medio BMMY cit.

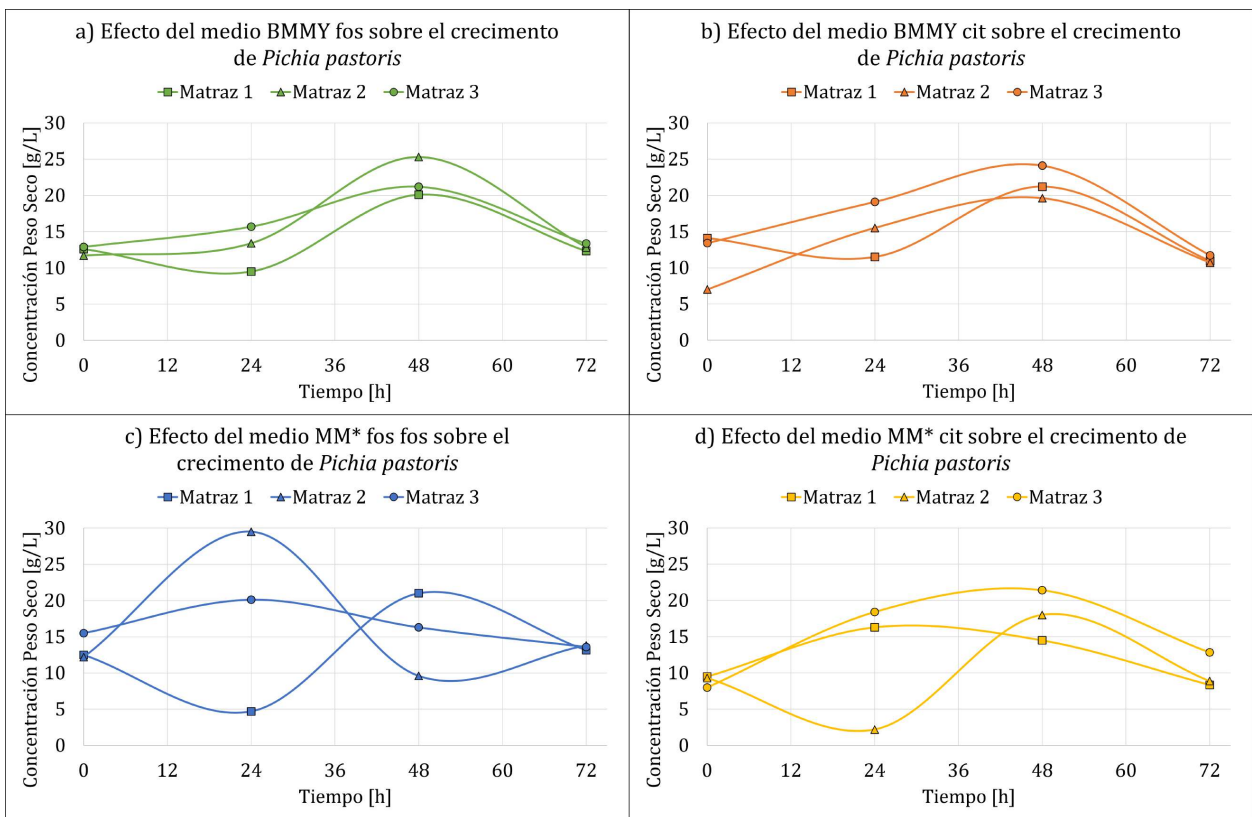


Figura F.2: Efecto de los medios de cultivos sobre el crecimiento celular en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

Al ver en los gráficos c y d de la Figura F.2 se observa que hay curvas que no se asemejan completamente, como en los gráficos a y b de la misma Figura, por lo que se calculan los *p-values* para determinar si hay alguna diferencia significativa entre los matraces (curvas). Los *p-values* para los datos experimentales de los matraces donde se cultivó en medio MM* fos se muestran en la Tabla F.1, mientras que los *p-values* obtenidos para los matraces donde se cultivó el medio MM* cit se muestran en la Tabla F.2.

Tabla F.1: Resultados del análisis *t-student* para las mediciones de peso seco en los matraces que contenían el medio MM* fos.

Matraces Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
Matraz 1 y 2	0,6828	No significativo
Matraz 1 y 3	0,4681	No significativo
Matraz 2 y 3	0,9793	No significativo

De la Tabla F.1 se desprende que ningún matraz puede ser descartado ya que todos los *p-values* son mayores a 0,05. Sin embargo, se tiene el antecedente de que el matraz 2 presentó poca concordancia de los datos con los otros matraces, al punto de tener que ser descartado según el análisis estadístico hecho. (Ver Tablas F.4 y F.5)

Tabla F.2: Resultados del análisis *t-student* para las mediciones de peso seco en los matraces que contenían el medio MM* cit.

Matraces Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
Matraz 1 y 2	0,5590	No significativo
Matraz 1 y 3	0,1931	No significativo
Matraz 2 y 3	0,2331	No significativo

De la Tabla F.2 se desprende que ningún matraz puede ser descartado ya que todos los *p-values* son mayores a 0,05.

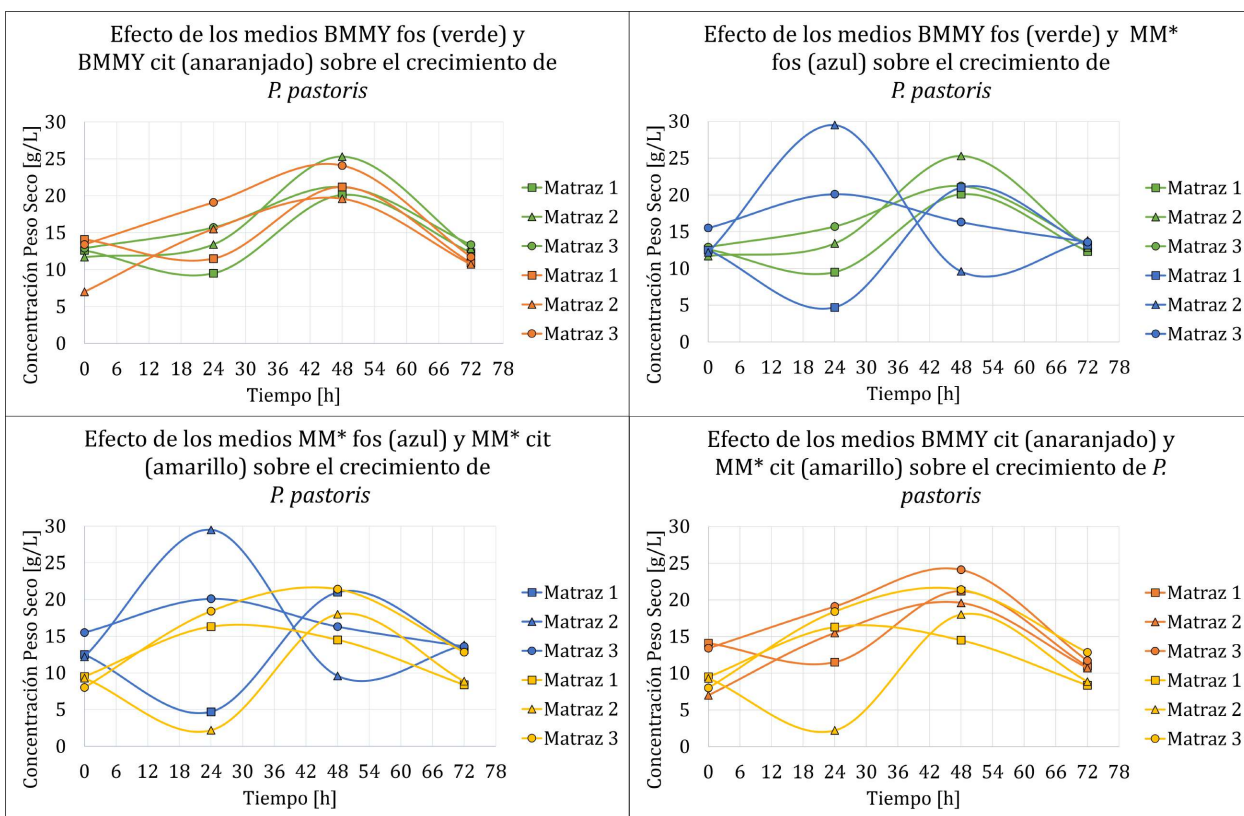


Figura F.3: Efecto de los medios de cultivos sobre el crecimiento celular de *P. pastoris* individualizados por matraz y presentadas de a pares de medios de cultivos. a) Peso seco medios BMMY con buffer fosfato (verde) y BMMY con buffer citrato (anaranjado), b) peso seco medios MM* con buffer fosfato (azul) y MM* con buffer citrato (amarillo), c) peso seco medios BMMY con buffer fosfato (verde) y MM* con buffer fosfato (azul) y d) peso seco medios BMMY con buffer citrato (anaranjado) y MM* con buffer citrato (amarillo).

A continuación se muestran gráficos complementarios de medición de densidad óptica, segunda forma de cuantificar el crecimiento celular donde nuevamente se graficaron los datos individualizados por matraz, luego por medio de cultivo y finalmente se compararon los de medios de cultivos de a pares.

La densidad óptica fue medida diariamente a 600 [nm], los resultados fueron graficados y se

muestran en la Figura F.4.

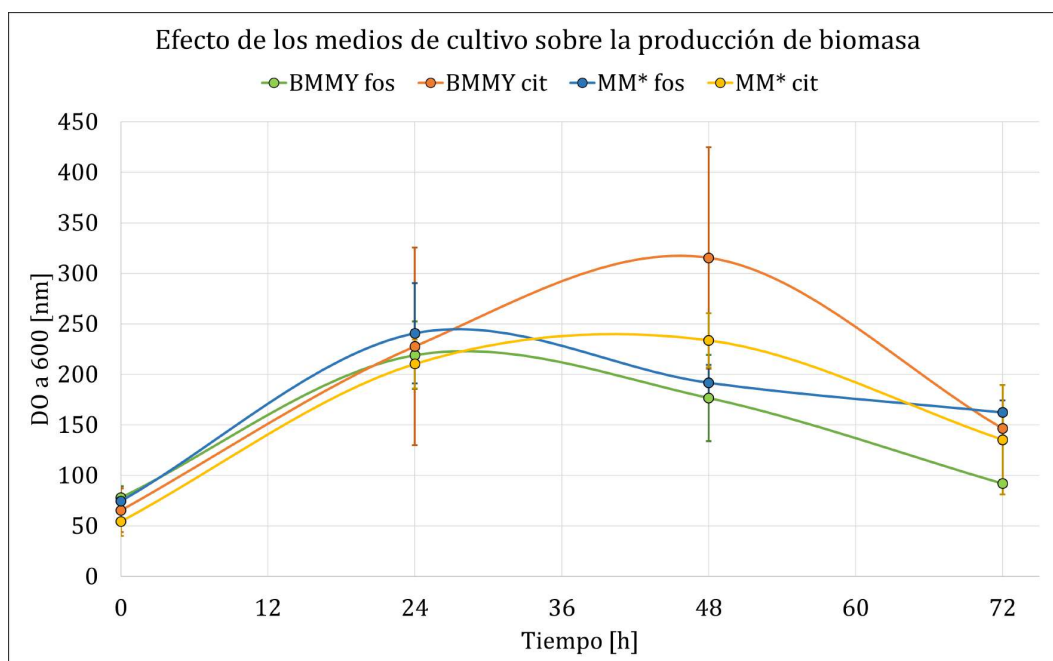


Figura F.4: Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre la producción de biomasa en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Curvas medios BMMY cit y MM* fos estadísticamente distintas a la curva de referencia (medio BMMY fos), curva medio MM* cit **no** es estadísticamente distinta con respecto a la curva de referencia. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

Nuevamente se observan comportamientos similares entre las 4 curvas. Los máximos de los medios con *buffer* citrato se encuentran a las 48 [h], mientras que los máximos de los medios con *buffer* fosfato se encuentran a las 24 [h].

Después de las 48 horas se aprecia una disminución de la densidad óptica para todos los medios. Este fenómeno de decaimiento al tercer día reafirma que los cultivos deben ser hechos durante 2 días.

Con los análisis hechos no se puede decidir aún cuál es el medio a proponer para el sistema *in situ* debido a las similitudes entre las curvas y a las bajas diferencias significativas que tienen. Por esto se analizan las relaciones entre actividad enzimática y concentración de proteína (actividad específica), la concentración de proteína y peso seco; y la actividad enzimática y el peso seco.

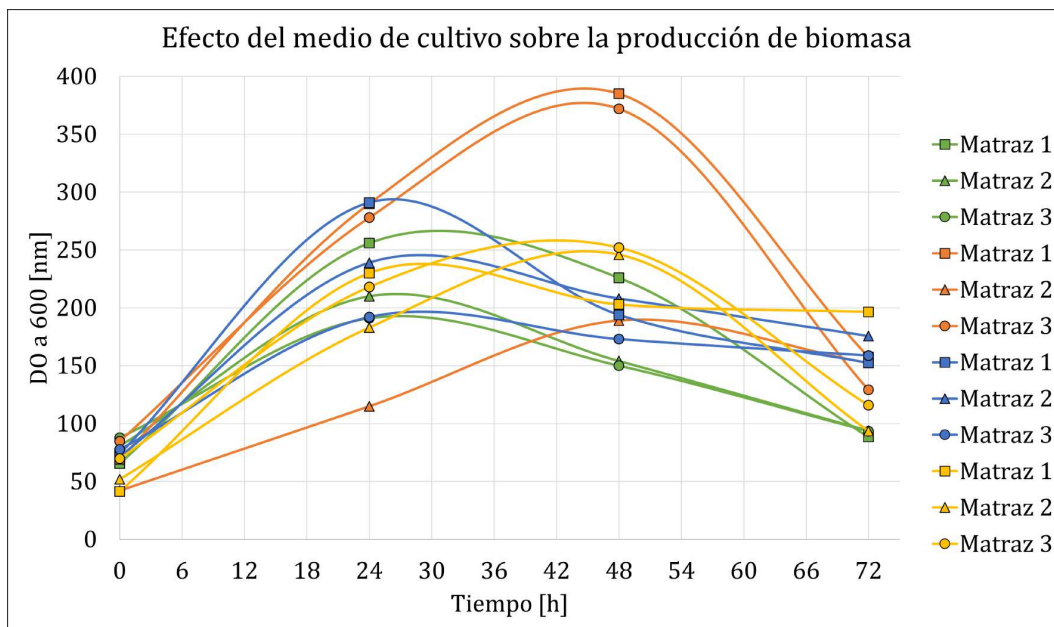


Figura F.5: Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de biomasa en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Cada curva representa un matraz, donde las mediciones fueron hechas por triplicado. Curvas verdes: matraces con medio BMMY fos, curvas anaranjadas: matraces con medio BMMY cit, curvas azules: matraces con medio MM* fos, curvas amarillas: matraces con medio BMMY cit.

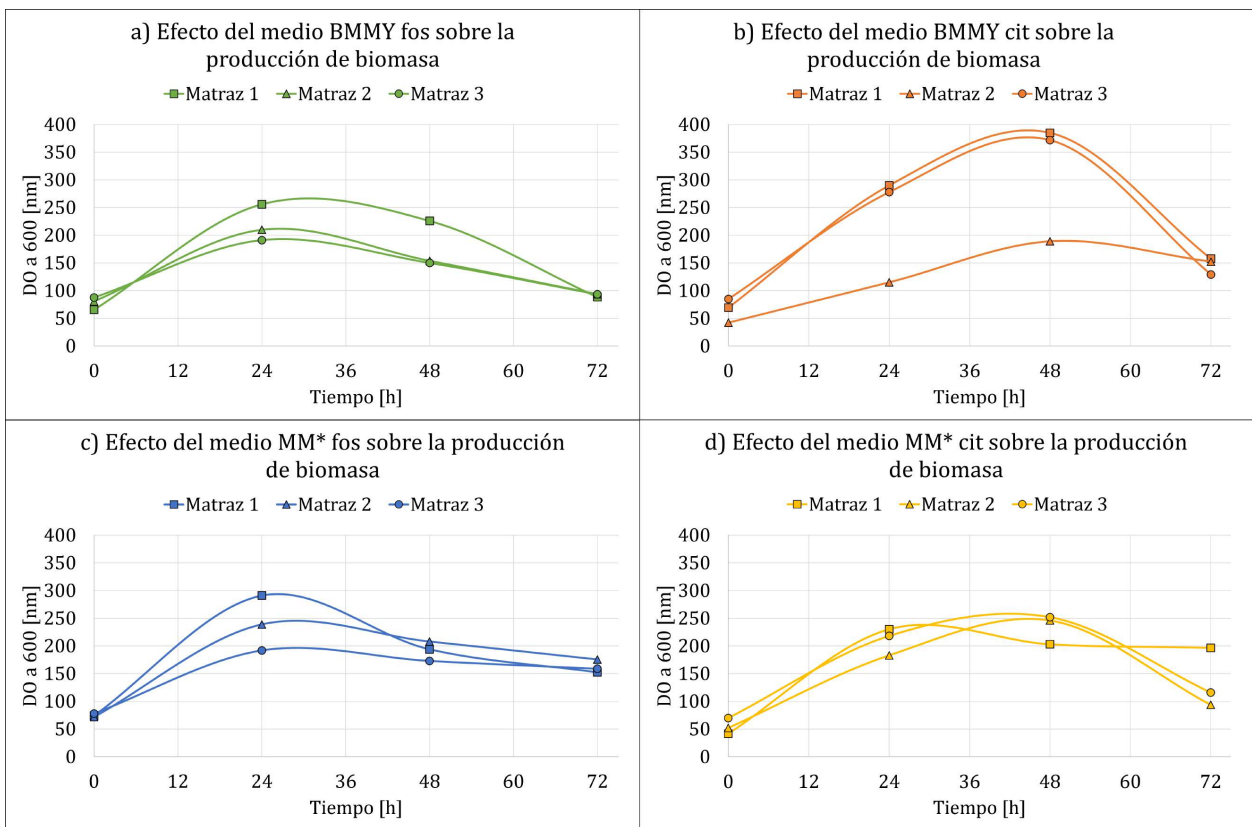


Figura F.6: Efecto de los medios de cultivos sobre la la producción de biomasa en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

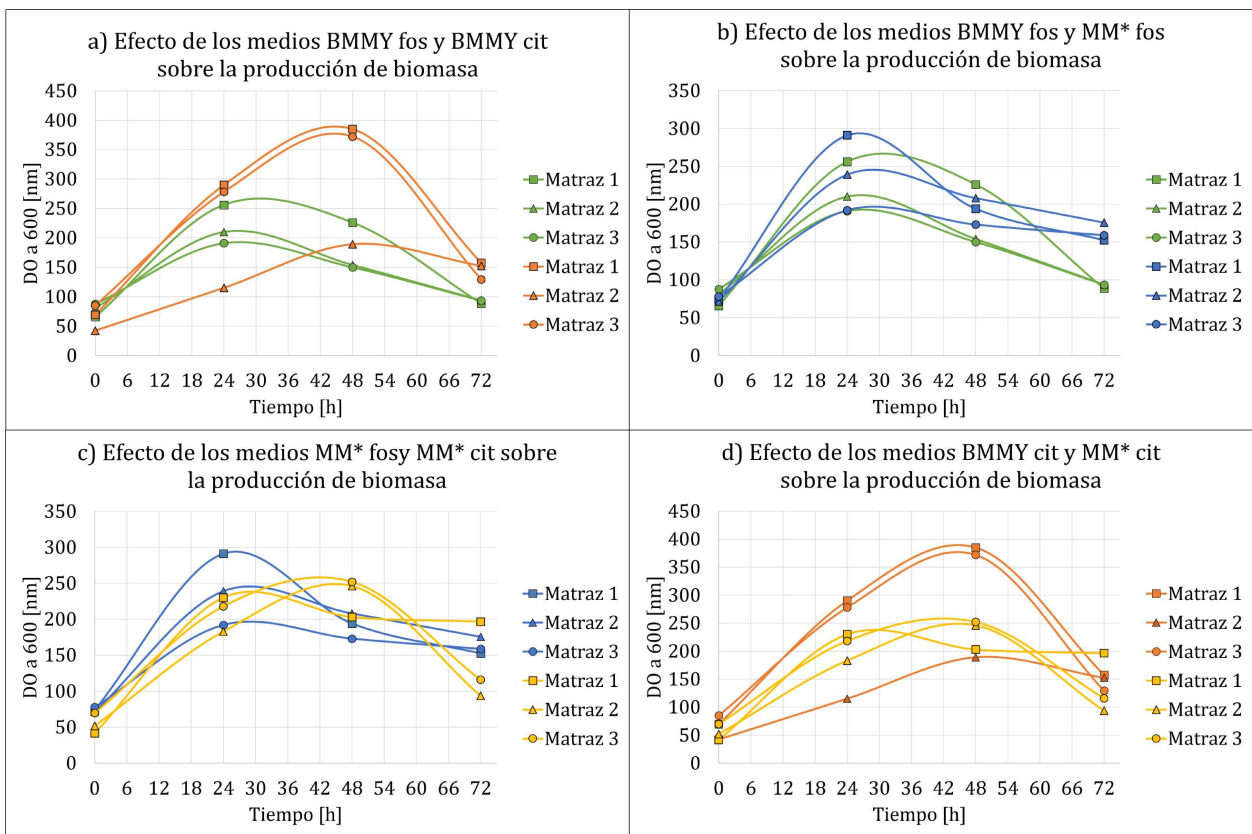


Figura F.7: Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de biomasa individualizados por matraz y presentadas de a pares de medios de cultivos. a) Peso seco medios BMMY con buffer fosfato (verde) y BMMY con buffer citrato (anaranjado), b) peso seco medios MM* con buffer fosfato (azul) y MM* con buffer citrato (amarillo), c) peso seco medios BMMY con buffer fosfato (verde) y MM* con buffer fosfato (azul) y d) peso seco medios BMMY con buffer citrato (anaranjado) y MM* con buffer citrato (amarillo).

F.2. Producción de Enzima Recombinante

A continuación se muestran gráficos complementarios de producción de proteína recombinante, se graficaron los datos individualizados por matraz, por medio de cultivo y se comparan pares de medios de cultivos.

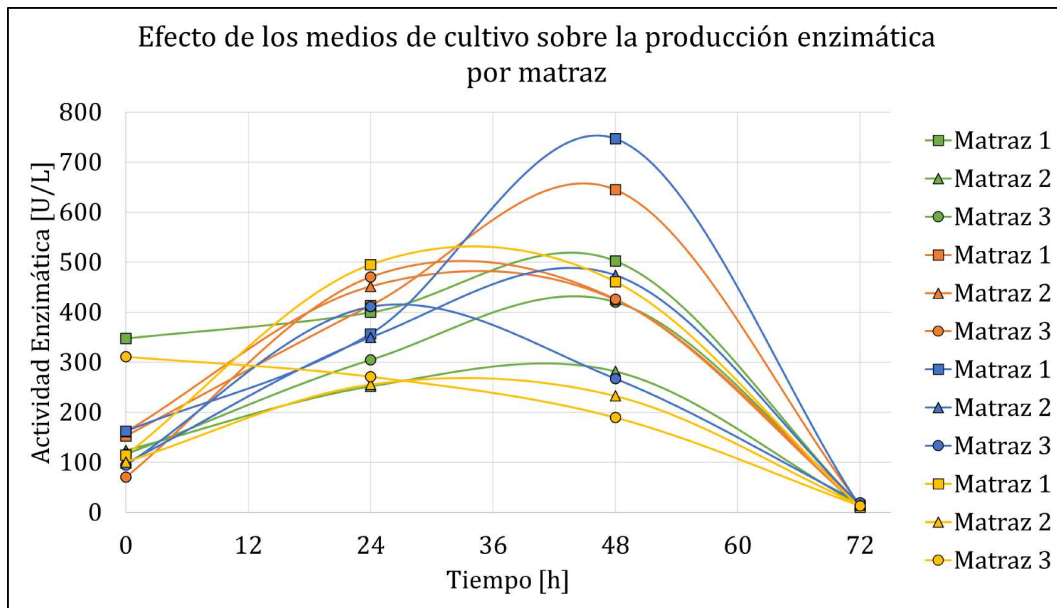


Figura F.8: Efecto de los medios de cultivos sobre la actividad enzimática en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Cada curva representa un matraz, donde las mediciones fueron hechas por triplicado. Curvas verdes: matraces con medio BMMY fos, curvas anaranjadas: matraces con medio BMMY cit, curvas azules: matraces con medio MM* fos, curvas amarillas: matraces con medio BMMY cit.

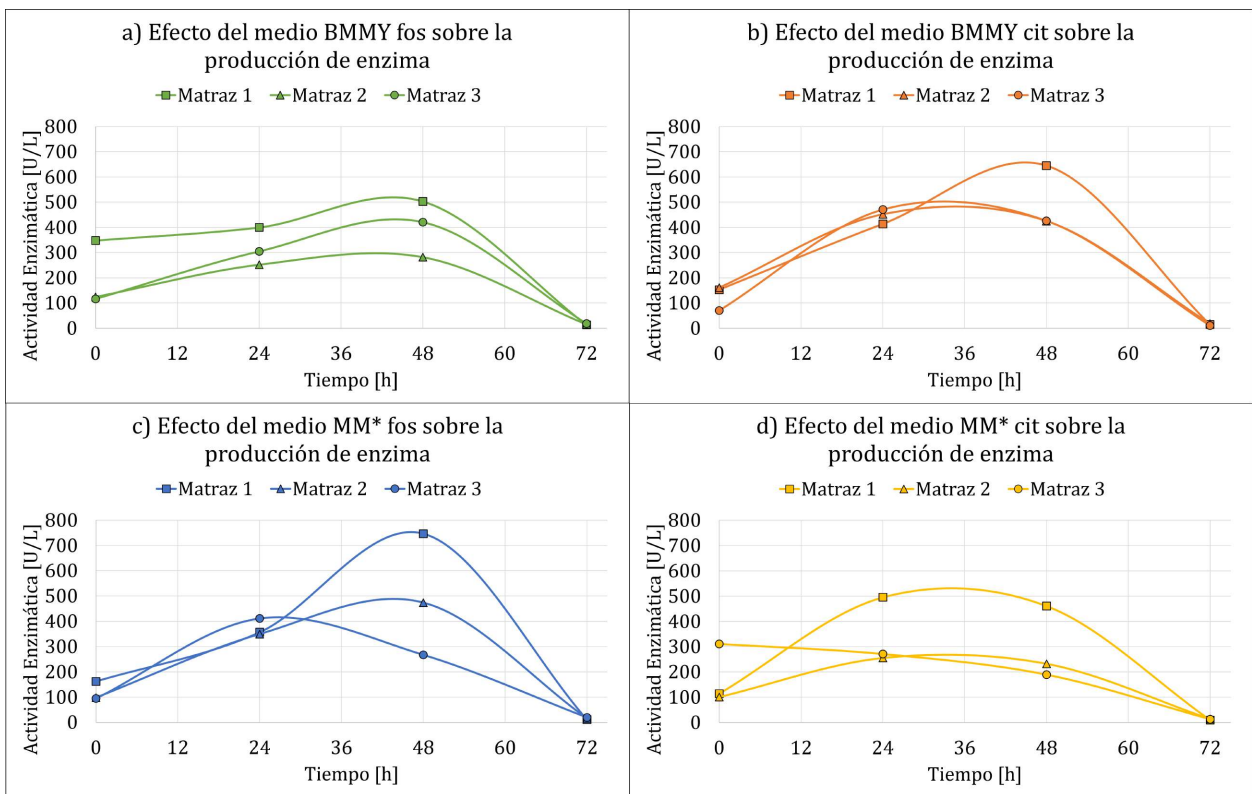


Figura F.9: Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM*cit sobre producción de enzima recombinante individualizadas por matraz en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

Para saber si existe alguna curva que se aleja de las mediciones, se calcularon los *p-values*, donde se obtuvo que no existen diferencias significativas entre matraces que contienen el mismo medio, por lo tanto ninguna curva es descartada. Para ver los valores numéricos de los *p-values* ver documento adjunto "*Cultivo_P.pastoris.xlsx*"

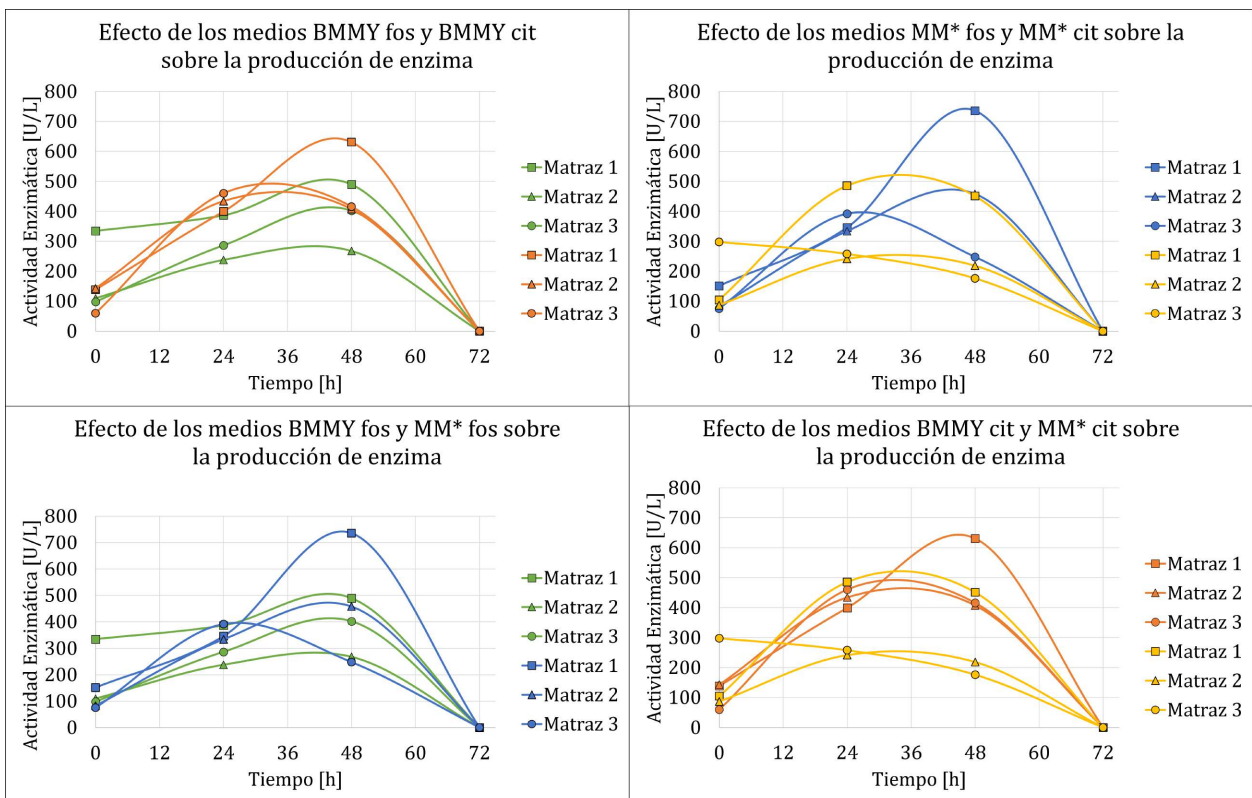


Figura F.10: Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de enzima recombinante individualizadas por matraz y presentadas de a pares de medios de cultivos. a) Actividad enzimática medios BMMY con buffer fosfato (verde) y BMMY con buffer citrato (anaranjado), b) actividad enzimática medios MM* con buffer fosfato (azul) y MM* con buffer citrato (amarillo), c) actividad enzimática medios BMMY con buffer fosfato (verde) y MM* con buffer fosfato (azul) y d) actividad enzimática medios BMMY con buffer citrato (anaranjado) y MM* con buffer citrato (amarillo).

A continuación se muestran gráficos complementarios sobre la medición de concentración de proteína total.

En la Figura F.11 se observan las concentraciones de proteína total medidas diariamente en los 4 medios de cultivos durante 72 [h].

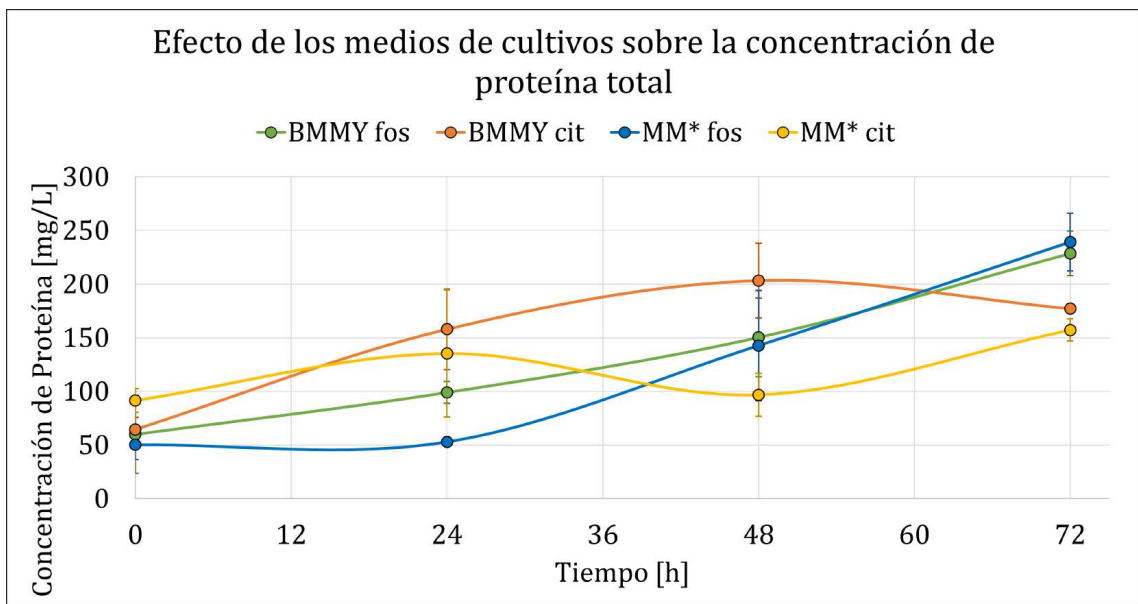


Figura F.11: Efecto de los medios de cultivos sobre la concentración de proteína total promedio en cultivos de *P.pastoris* hechos a 30°C y pH 6. El resultado del análisis estadístico indica que las curvas no son estadísticamente distintas con respecto a la curva de referencia (medio BMMY fos). Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

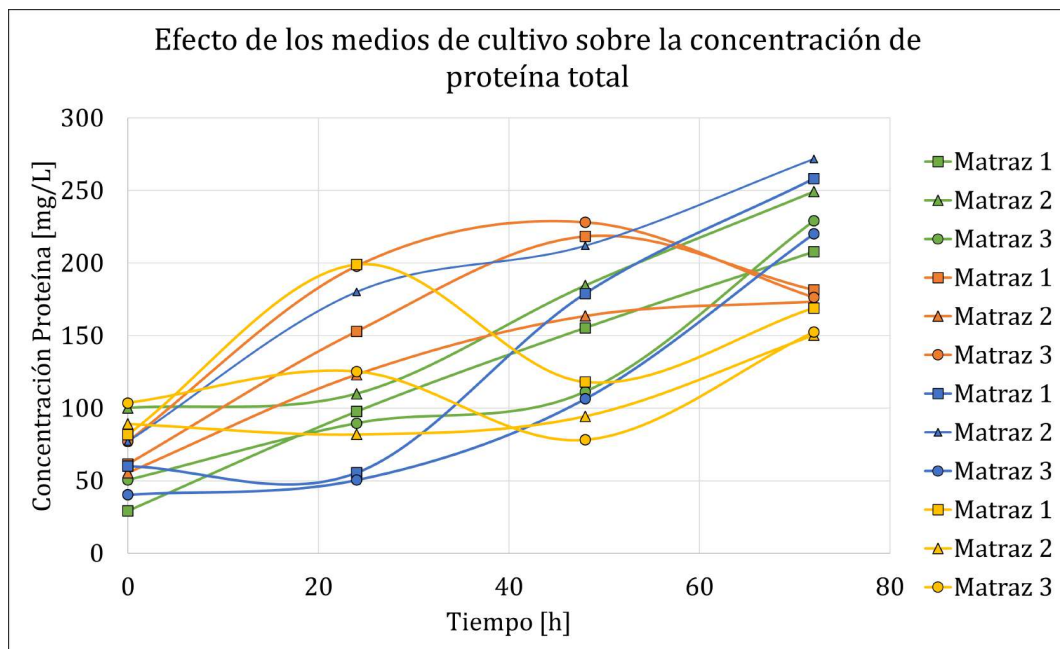


Figura F.12: Efecto de los medios de cultivos individualizados por matraz sobre la concentración de proteína total en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Cada curva representa un matraz, donde las mediciones fueron hechas por triplicado. Curvas verdes: matraces con medio BMMY fos, curvas anaranjadas: matraces con medio BMMY cit, curvas azules: matraces con medio MM* fos, curvas amarillas: matraces con medio BMMY cit.

Nuevamente se observan comportamientos similares entre los 4 medios de cultivo, sin embargo, para los medios con citrato (BMMY cit y MM* cit) se observa un estancamiento a las 24 [h], ya que al compararlas las concentraciones a las 24 y 72 [h], el aumento es de 5 y 19 [mg/L] para cada medio respectivamente, a diferencia de los medios con fosfato, BMMY fos y MM* fos, donde se aprecia un aumento de 130 y 186 [mg/L] entre las 24 y 72 [h]. Esto podría indicar que el *buffer* citrato afecta negativamente a la producción de proteína.

Para saber realmente qué tan distintas son las curvas de los medios propuestos en relación al medio BMMY, se realizó un análisis estadístico de *t-student*, obteniendo los valores mostrados en la Tabla F.3.

Tabla F.3: Resultados del análisis *t-student* para las mediciones de concentración de proteína en los medios donde se cultivó *P. pastoris*.

Medios Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
BMMY fos y BMMY cit	0,193	No significativo
BMMY fos y MM* fos	0,499	No significativo
BMMY fos y MM* cit	0,224	No significativo

De la Tabla F.3 se observa que todos los *p-values* son mayores a 0,05, por lo tanto, la diferencia entre las curvas no es estadísticamente significativa, lo cual indica que el efecto que tiene el *buffer* citrato no es realmente un efecto negativo dentro del sistema de producción enzimática.

Cabe destacar que la inducción empieza a las 0 [h], por lo tanto se deduce que la proteína inicial proviene del medio de cultivo y no corresponde a xilanas recombinante. Luego de una revisión bibliográfica, se encontró que la peptona contiene un hidrolizado enzimático de proteínas de origen animal y se halló que la peptona al ser usada en medio de cultivo para levaduras, esta presenta actividad estrógenica [133], lo cual podría justificar la cantidad de proteína inicial, ya que el Ensayo de Bradford realizado mide cantidad total de proteína y no es específico para xilanas.

También se determina que es posible que el extracto de levadura y los casaminoácidos estén aportando proteína inicial, ya que ambos son hidrolizados, de levaduras y proteínas animales respectivamente, por lo que es posible que algunas proteínas hayan quedado sin hidrolizar y se hayan filtrado [134] [135]. Sin embargo, la cantidad de proteína otorgada por el medio de cultivo sólo disminuye o se mantiene, por lo que no debería afectar al resto de las mediciones.

Del mismo análisis se desprende que un fenómeno similar se puede encontrar en la Figura 3.10, ya que la actividad el tiempo 0 [h] no es cero como se podría esperar, al contrario, se inicia con una actividad enzimática la cual podría estar asociada al propio medio de cultivo. Nuevamente, la única forma de que aumente es que se produzca más proteína, por lo que desde el tiempo 0, las mediciones de actividad no se ven alteradas.

Luego, en las Figuras F.12 y F.13, se ven las curvas obtenidas para cada matraz, primero todas juntas, luego separadas por medio de cultivo.

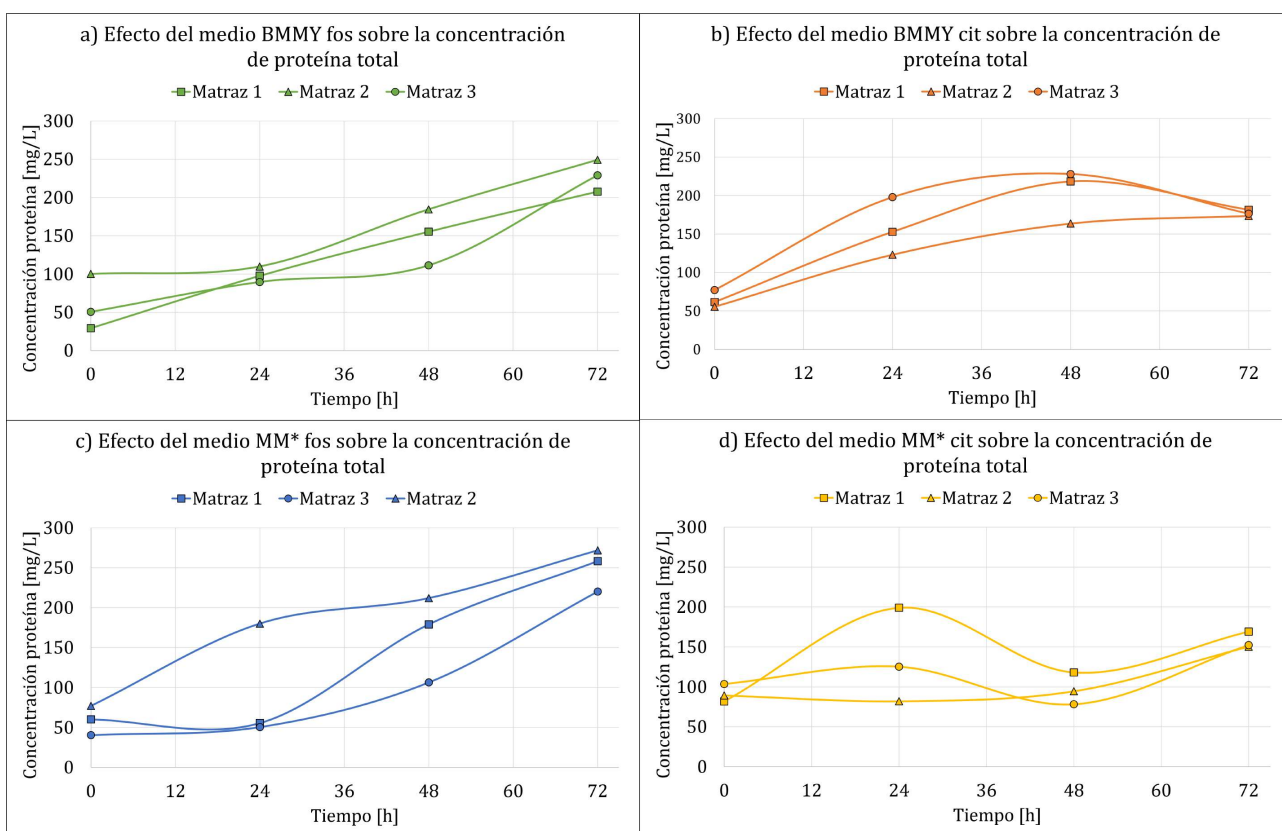


Figura F.13: Efecto de los medios de cultivos sobre la concentración de proteína total en cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

Las mediciones fueron hechas por triplicado, donde cada curva representa un matraz, sin embargo, el matraz 2 del medio MM* fos presentó un comportamiento anómalo. Para determinar si la curva podía eliminarse del set de datos o no, se realizó un tratamiento de datos seguido de un análisis *t-student*. Los valores de los *p-values* están mostrados en la Tabla F.4

Tabla F.4: Resultados del análisis *t-student* para las mediciones de concentración de proteína en los matraces que contenían el medio MM* fos.

Matraces Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
Matraz 1 y 2	0,17079	No significativo
Matraz 1 y 3	0,10325	No significativo
Matraz 2 y 3	0,03481	Significativo

De la Tabla F.4 se observa que la diferencia entre los mediciones del matraz 2 y del matraz 3 son estadísticamente distintas, para decidir cuál de las 2 curvas eliminar, se hace un análisis visual del gráfico, del cual se observó que la curva del matraz 2 se encontraba muy por sobre las curvas de los matraces 1 y 3. Además, se analizaron los valores críticos de cada día y los resultados se observan en la Tabla F.5. De ella se desprende que los mayores valores críticos

se obtienen entre los matraces 1 y 3, es decir, la semejanza entre esos matraces es mayor. Finalmente, debido a la lejanía de datos entre el matraz 2 y los otros matraces, además de los bajos *p-values* obtenidos, los datos recolectados para el matraz 2 son eliminados del análisis.

Tabla F.5: Resultados del análisis *t-student* para las mediciones diarias de concentración de proteína en los matraces que contenían el medio MM* fos.

Matraces Comparados	<i>p-value</i>			
	0 [h]	24 [h]	48 [h]	72 [h]
Matraz 1 y 2	0,261	0,203	0,320	0,942
Matraz 1 y 3	0,910	0,772	0,919	0,162
Matraz 2 y 3	0,229	0,157	0,373	0,069

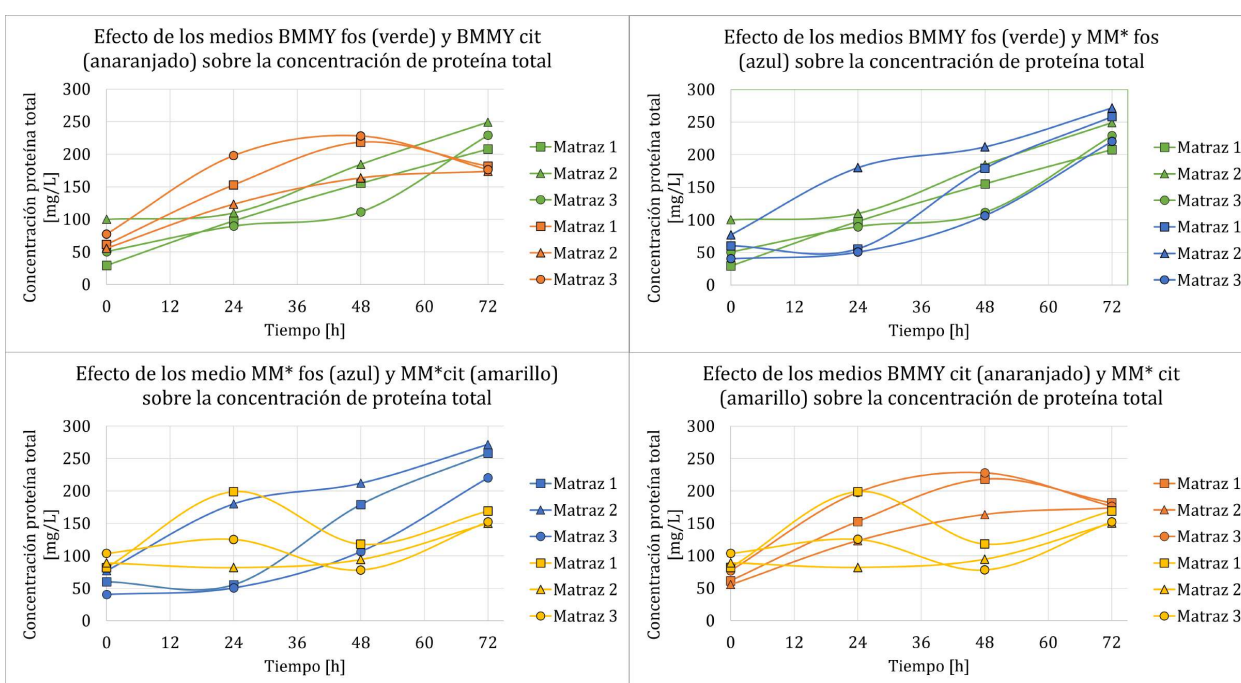


Figura F.14: Efecto de los medios de cultivos sobre la concentración de proteína total individualizadas por matraz y presentadas de a pares de medios de cultivos. a) Concentración de proteínas medios BMMY con buffer fosfato (verde) y BMMY con buffer citrato (anaranjado), b) concentración de proteínas medios MM* con buffer fosfato (azul) y MM* con buffer citrato (amarillo), c) concentración de proteínas medios BMMY con buffer fosfato (verde) y MM* con buffer fosfato (azul) y d) concentración de proteínas medios BMMY con buffer citrato (anaranjado) y MM* con buffer citrato (amarillo).

F.3. Relaciones

En el presente anexo se muestran gráficos complementarios sobre las relaciones entre los datos medidos, de este modo en un mismo gráfico se muestran los datos obtenidos para 2 variables a fin de poder compararlas directamente. Los gráficos se presentan según el promedio de los triplicados de cada variable, o bien, según medio de cultivo individualizando los matraces.

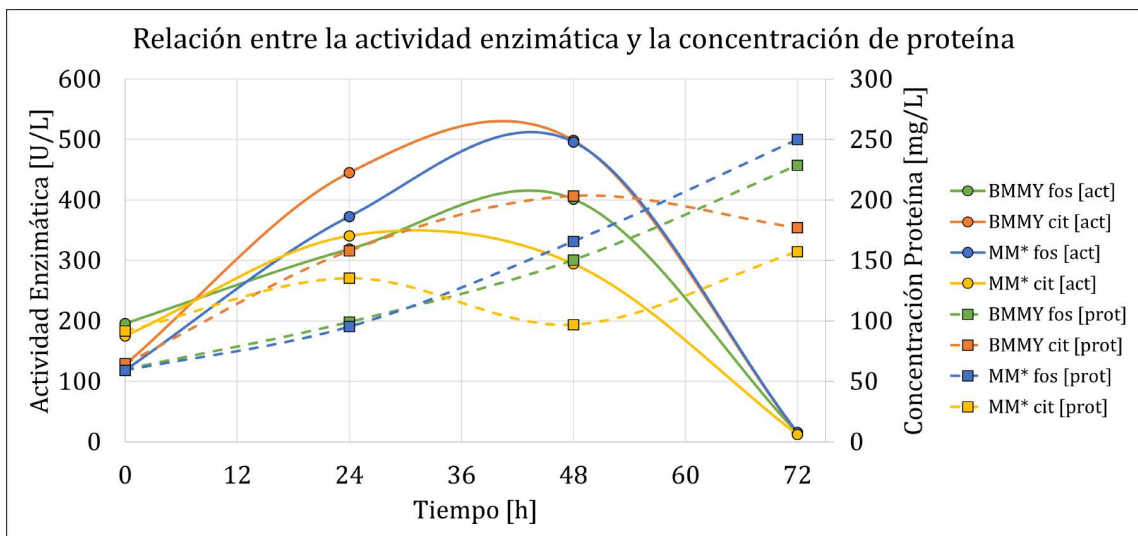


Figura F.15: Relación entre la actividad enzimática promedio presente en los medios de cultivo y la concentración de proteína promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje derecho.

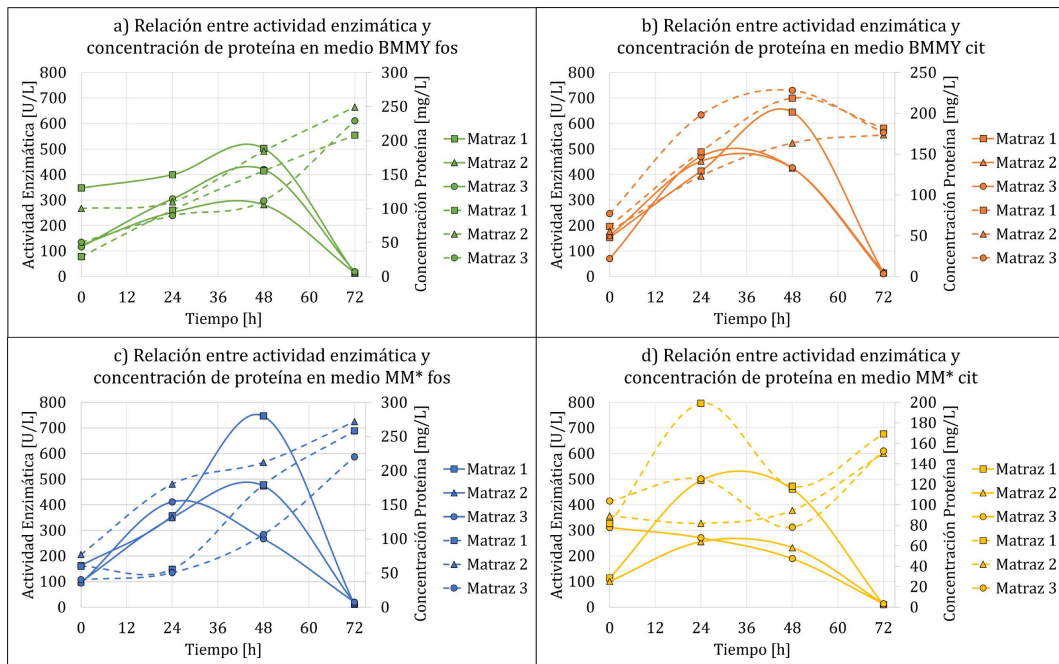


Figura F.16: Relación entre la actividad enzimática presente en los medios de cultivo y la concentración de proteína total individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.

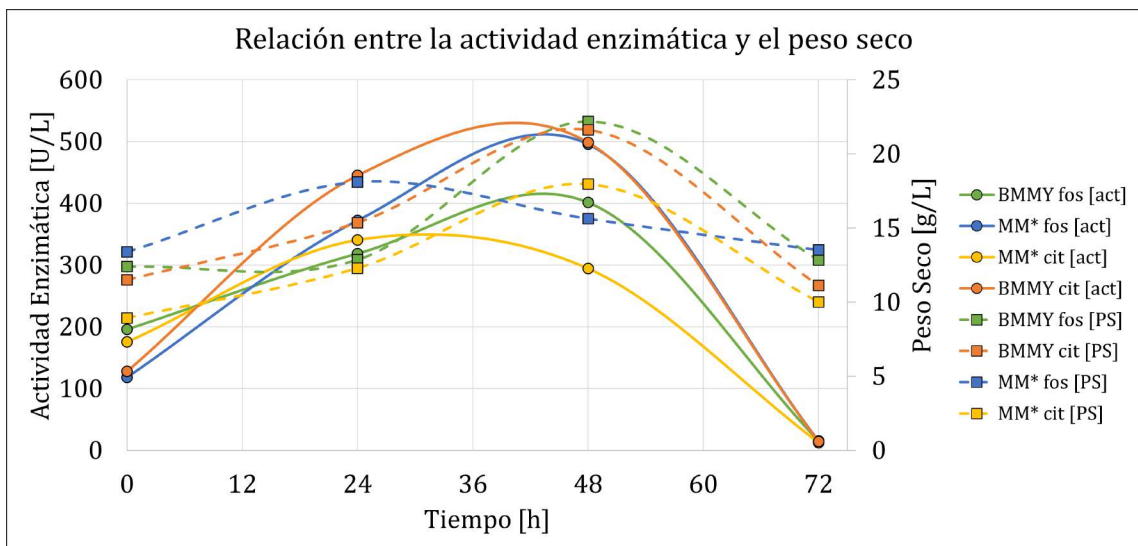


Figura F.17: Relación entre la actividad enzimática promedio presente en los medios de cultivo y el peso seco promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje derecho.

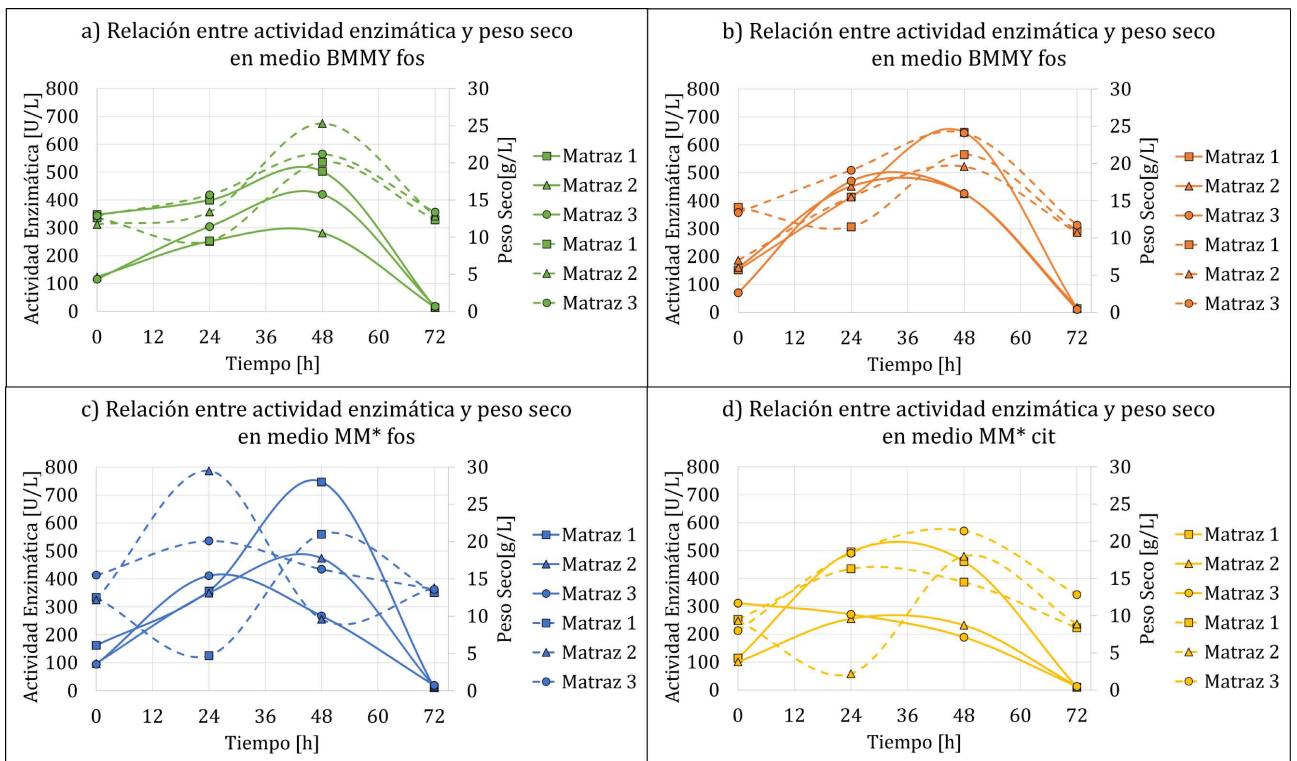


Figura F.18: Relación entre la actividad enzimática presente en los medios de cultivo y el peso seco individualizados por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.

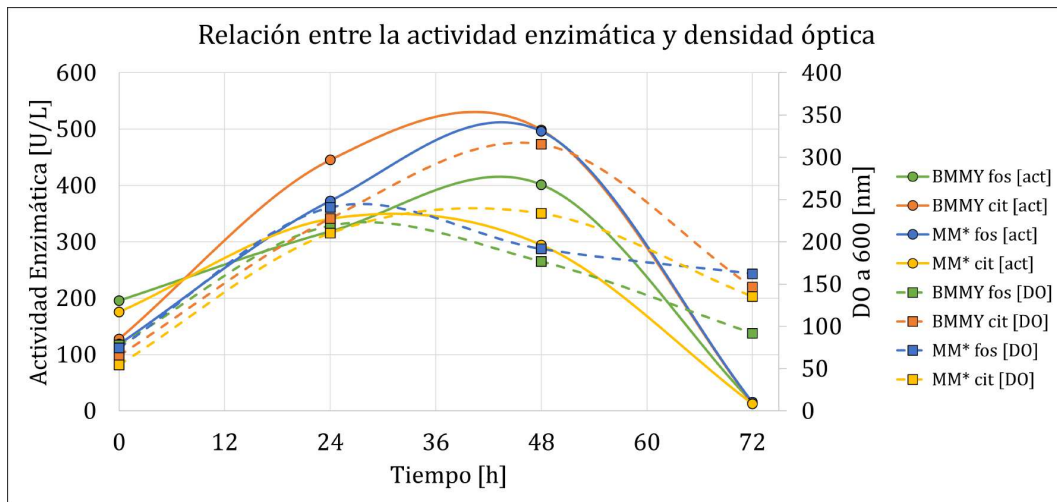


Figura F.19: Relación entre la actividad enzimática promedio presente en los medios de cultivo y la densidad óptica promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho.

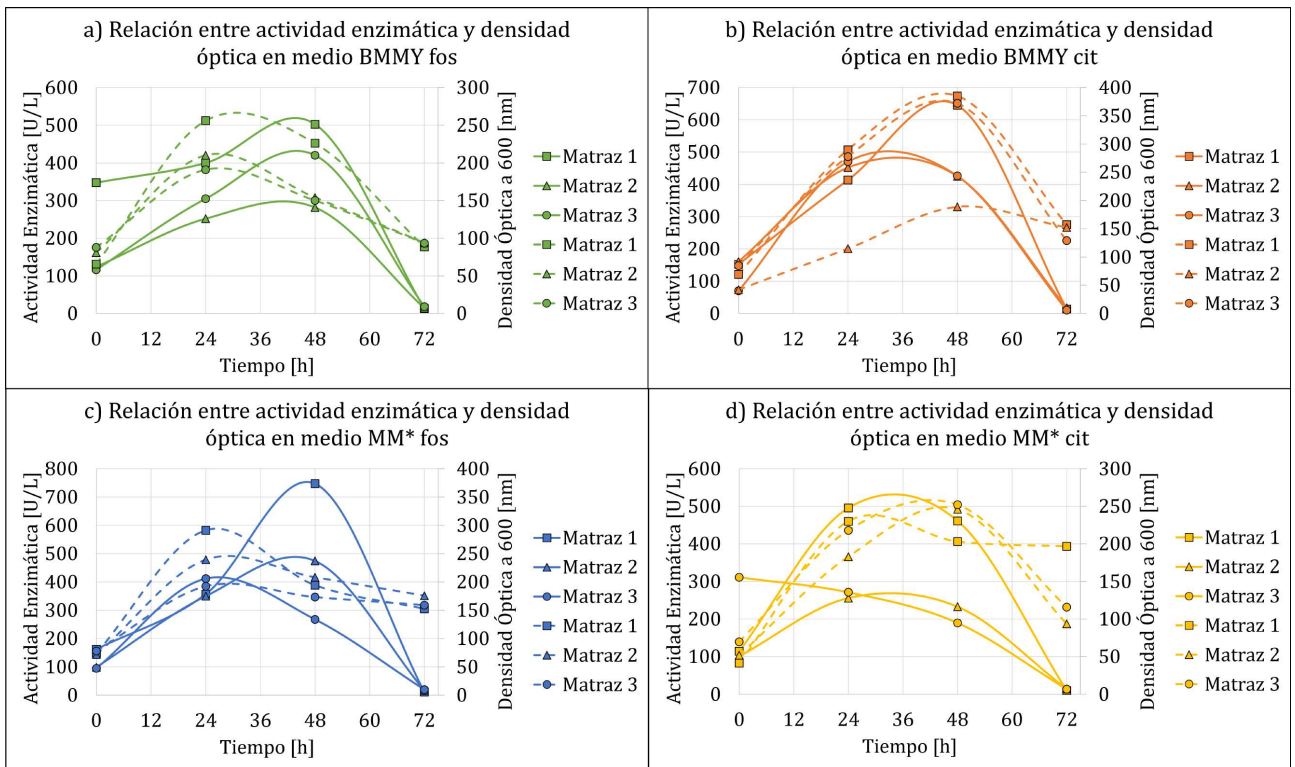


Figura F.20: Relación entre la actividad enzimática presente en los medios de cultivo y la densidad óptica individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de actividad enzimática y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.

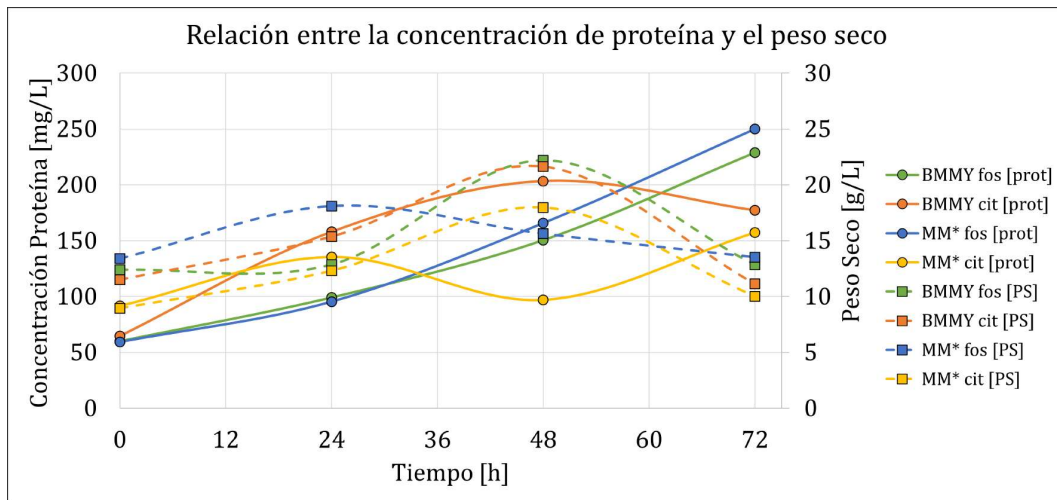


Figura F.21: Relación entre la concentración promedio de proteína presente en los medios de cultivo y el peso seco promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje derecho.

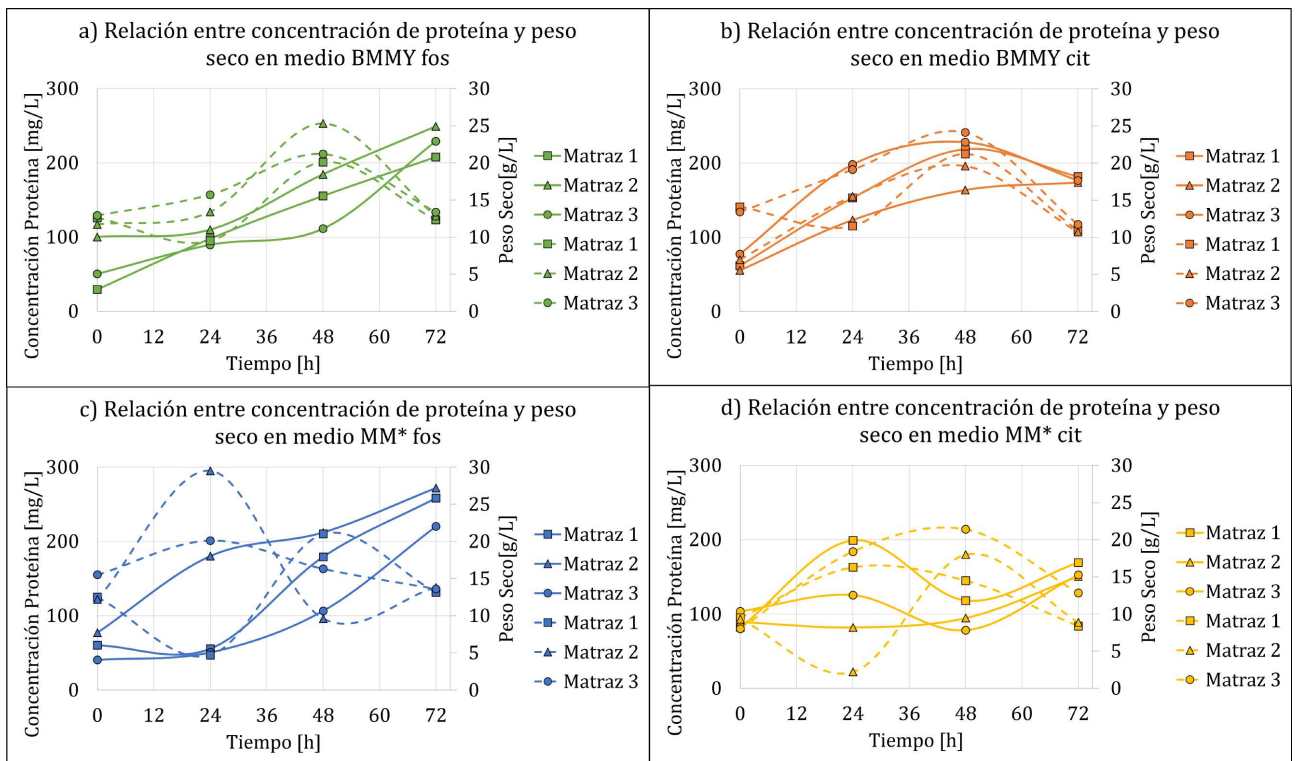


Figura F.22: Relación entre la concentración de proteína total presente en los medios de cultivo y el peso seco individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.

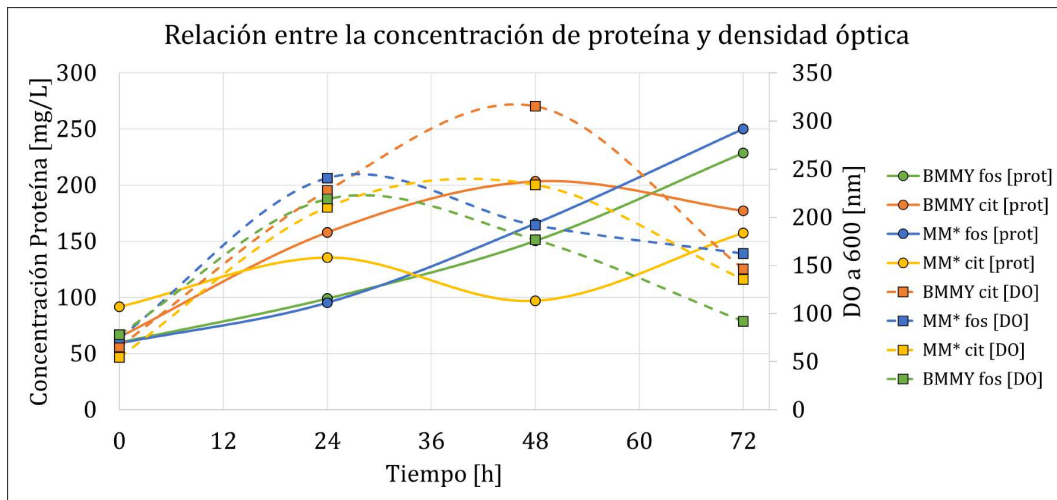


Figura F.23: Relación entre la concentración de proteína promedio presente en los medios de cultivo y la densidad óptica promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho.

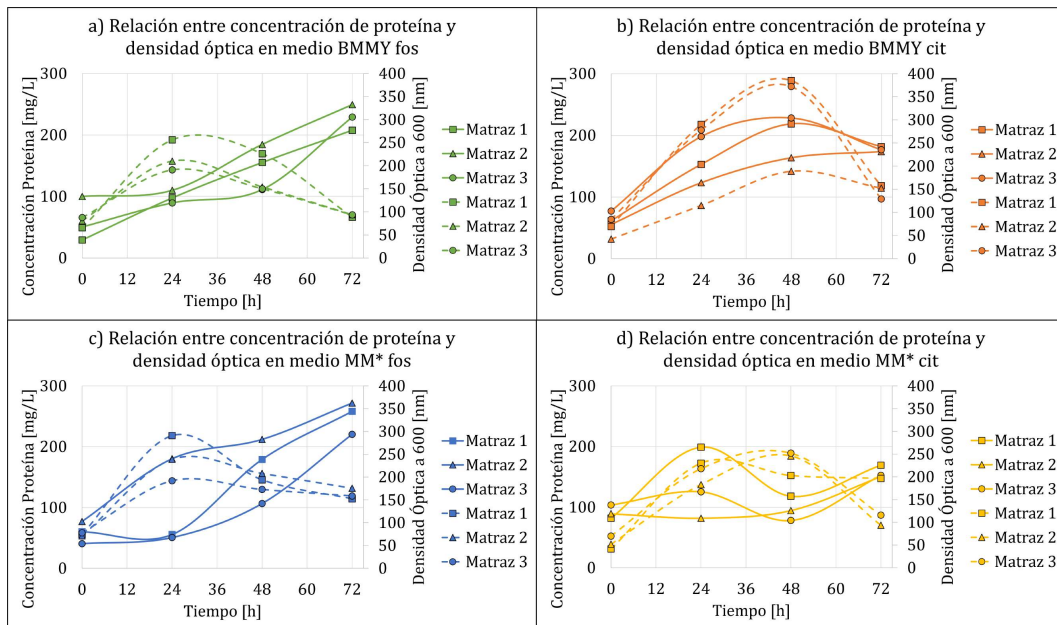


Figura F.24: Relación entre la concentración de proteína total presente en los medios de cultivo y la densidad óptica individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de concentración de proteína y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho.

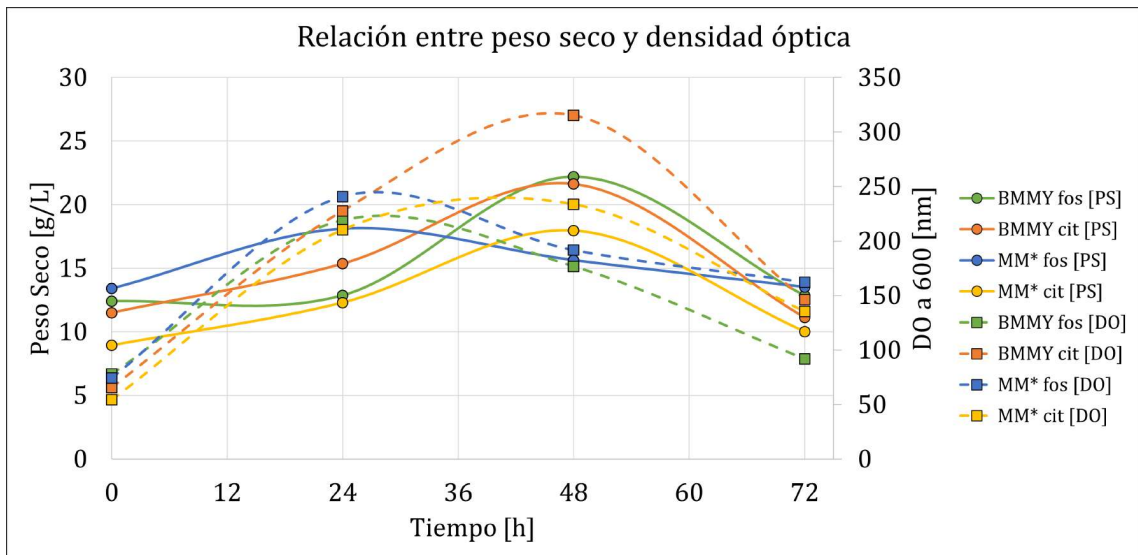


Figura F.25: Relación entre el peso seco promedio obtenido de los medios de cultivo y la densidad óptica promedio. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.

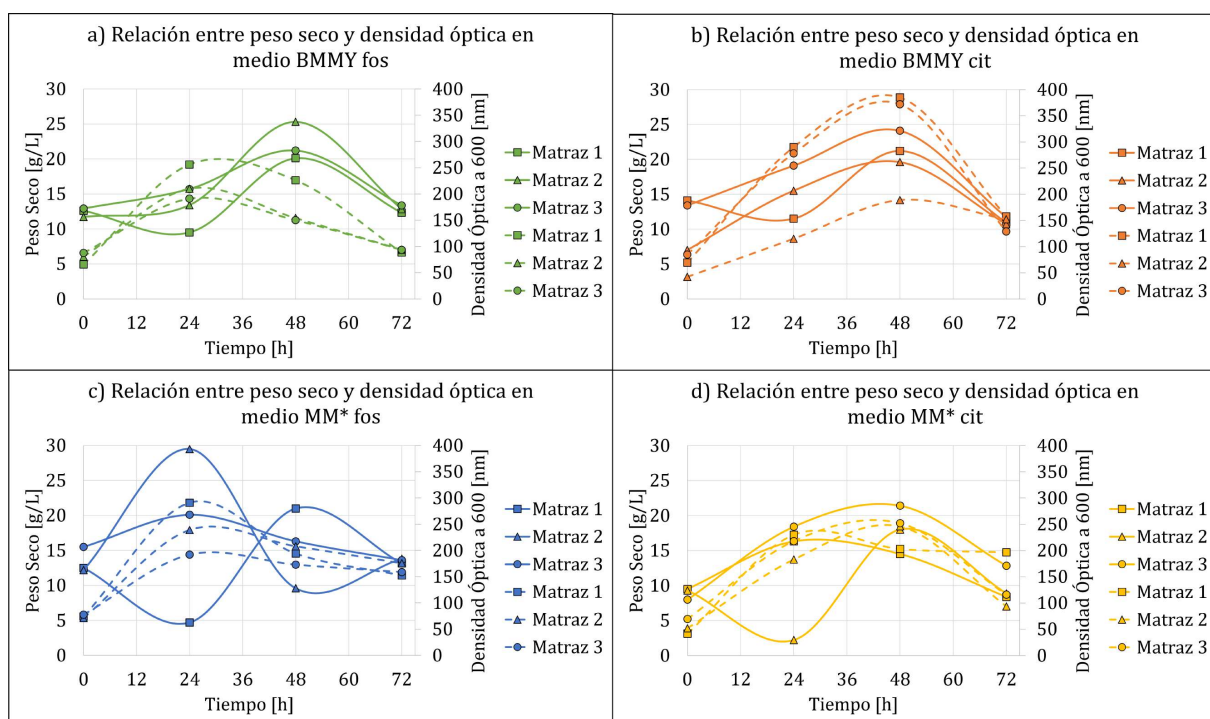


Figura F.26: Relación entre el peso seco obtenido de los medios de cultivo y la densidad óptica individualizadas por matraz. Curvas con línea continua corresponden a las curvas de peso seco y los datos deben ser leídos según el eje izquierdo, curvas con línea discontinua representan las curvas de densidad óptica y los datos deben ser leídos según el eje derecho. a) Datos del medio BMMY fos, b) datos del medio BMMY cit, c) datos del medio MM* fos y d) datos del medio MM* cit.

A la mayoría de los resultados se le realizan análisis estadísticos para saber si hay o no diferencias significativas. Los valores de los *p-values* se encuentran en el documento adjunto "*Cultivo_P.pastoris.xlsx*".

F.4. Proporciones

En esta sección se muestran los gráficos complementarios sobre las razones entre los distintos datos medidos. El objetivo principal de esta sección es demostrar la similitud de las curvas entre matraces de un mismo cultivo, o en caso contrario, poder hacer los filtros necesarios para poder trabajar con datos confiables.

Los gráficos se presentan según el promedio de lo triplicados de cada variable, o bien, según medio de cultivo individualizando los matraces. Las proporciones calculadas fueron:

- 1) actividad enzimática/concentración de proteína,
- 2) actividad enzimática/peso seco,
- 3) actividad enzimática/densidad óptica,
- 4) concentración de proteína/peso seco,

- 5) concentración de proteína/densidad óptica y
- 6) peso seco/densidad óptica.

La definición de actividad específica corresponde a la actividad enzimática [U/ml] normalizada por unidad de proteína [mg/ml], de este modo las unidades obtenidas para la actividad específica son [U/mg] [119]. Por esta razón es que el eje *y* de la Figura 3.11 lleva este nombre, en reemplazo de actividad enzimática/concentración de proteína. Lo mismo ocurre para los ejes *y* de los gráficos mostrados en la Figura F.27.

El gráfico del efecto del medio de cultivo sobre la razón entre concentración de proteína y peso seco promedio se encuentra en el cuerpo del informe, en la sección de Resultados. A continuación se muestra el resultado de los medios de cultivos individualizados por matraz.

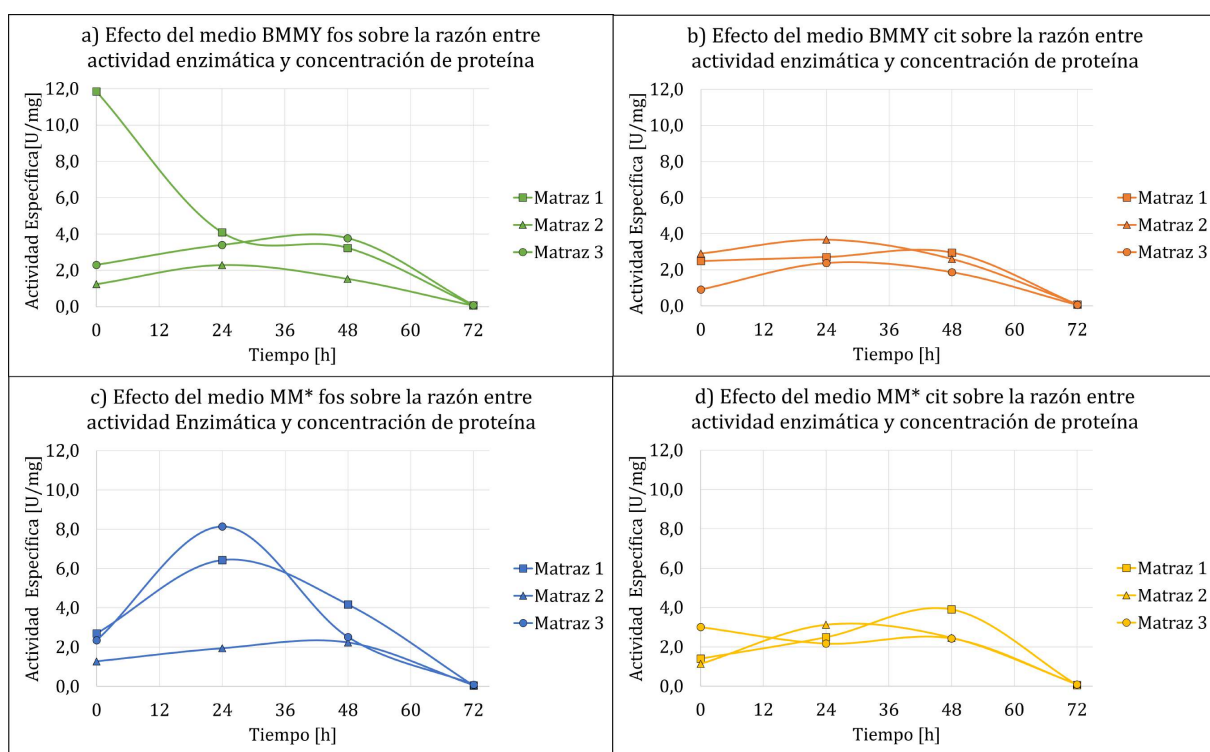


Figura F.27: Efecto de los medios de cultivos sobre la actividad específica en cultivos de *P. pastoris* hechos a 30°C y pH 6 individualizados por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

El gráfico del efecto del medio de cultivo sobre la razón entre actividad enzimática y peso seco promedio se encuentra en el cuerpo del informe, en la sección de Resultados. A continuación se muestra el resultado de los medios de cultivos individualizados por matraz.

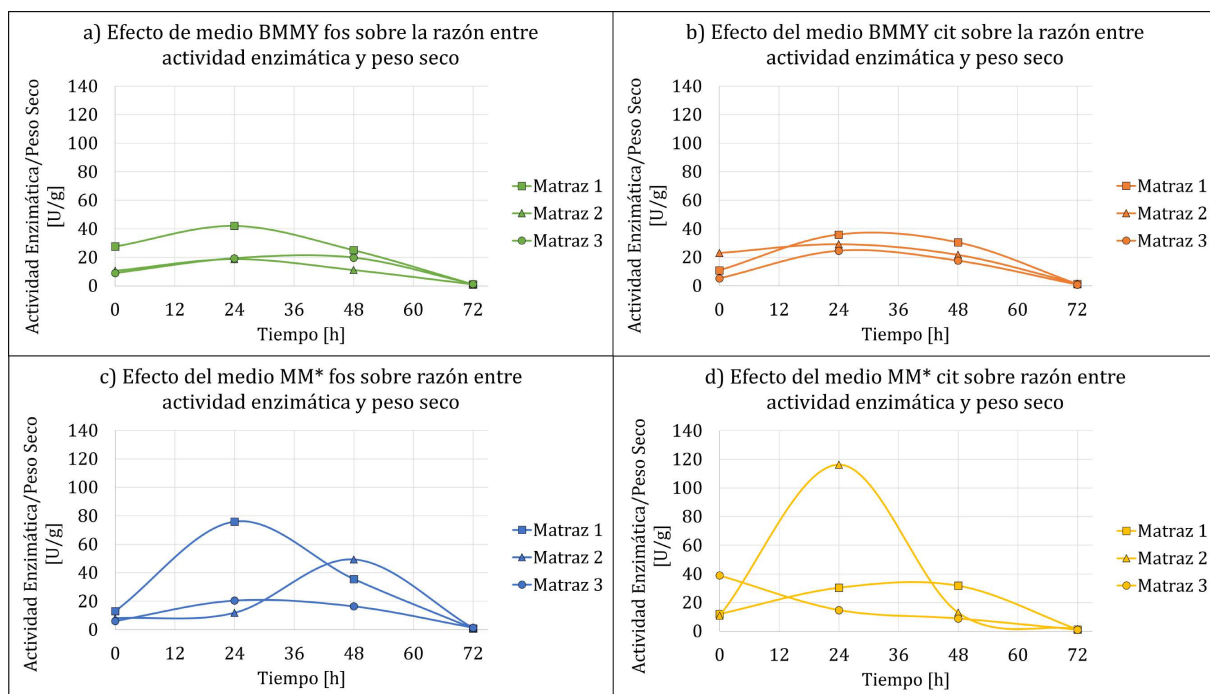


Figura F.28: Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la actividad enzimática y el peso seco en cultivos de *P.pastoris* hechos a 30°C y pH 6 individualizados por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

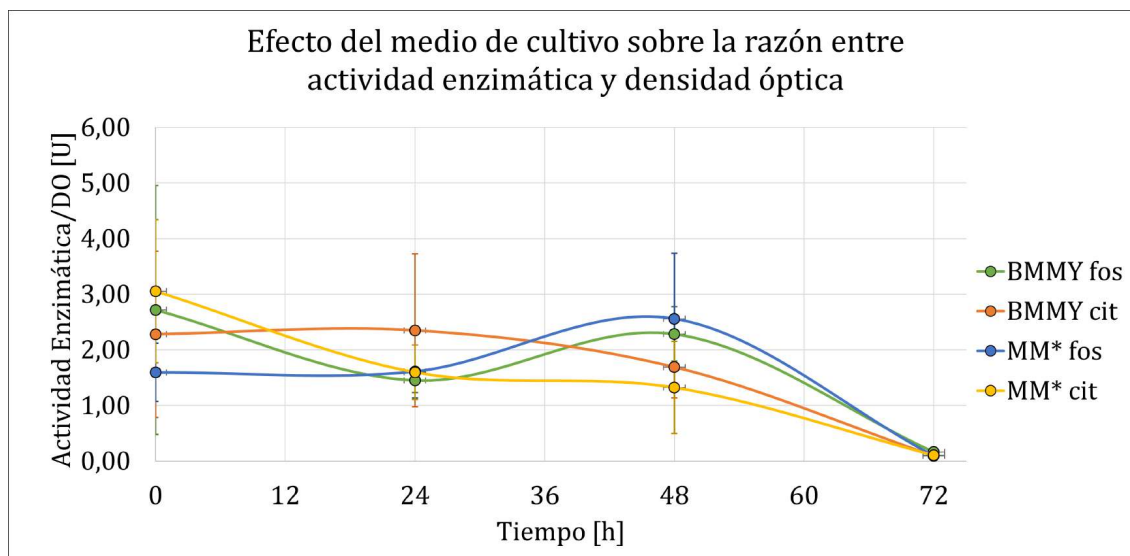


Figura F.29: Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la actividad enzimática y la densidad óptica (DO) promedio en cultivos de *P.pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

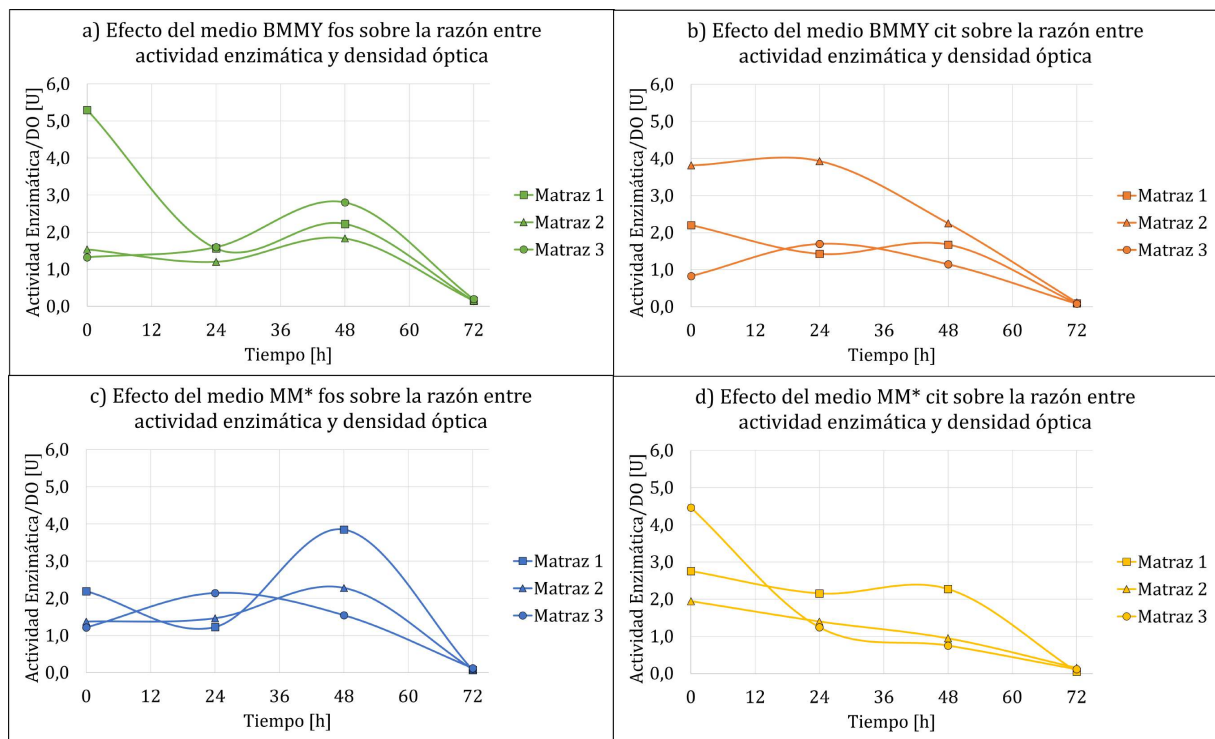


Figura F.30: Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la actividad enzimática y la densidad óptica (DO) en cultivos de *P. pastoris* hechos a 30°C y pH 6 individualizados por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

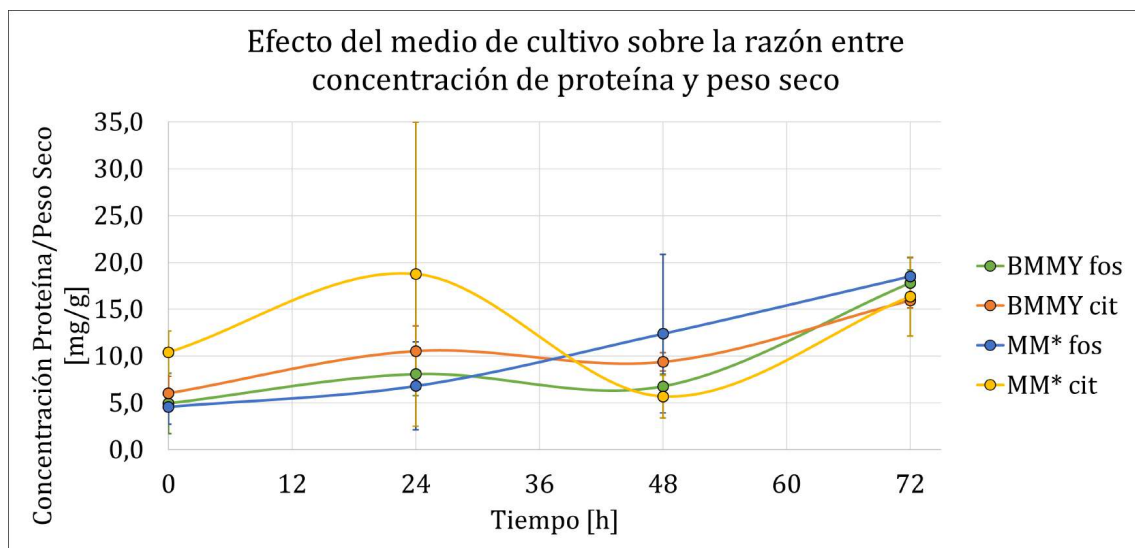


Figura F.31: Efecto de los medios de cultivos BMMY fos, BMMY cit, MM* fos y MM* cit sobre la relación entre concentración de proteína total y peso seco cultivos de *Pichia pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

Luego, en la Figura F.31, se muestran las curvas que representan la relación entre la

concentración de proteína y el peso seco. Esta relación hace referencia a la cantidad de proteína producida por célula [mg/g].

De la Figura F.31 se observa un leve aumento a las 24 horas de esta relación, luego de un estancamiento hasta las 48 horas para los medios BMMY fos, BMM cit y MM* fos. Esto no se cumple para el medio MM* cit el cual presenta un gran aumento en las primeras 24 horas, siendo el medio, nuevamente, con el mayor máximo. Por otro lado, luego de las 24 horas se observa una caída, llegando a igualar a los demás medios.

Seguidamente, al realizar el análisis estadístico mostrado en la Tabla F.6, se encuentra que ningún valor crítico pasa el límite, pero el más cercano corresponde al *p-value* del medio MM* cit, indicando nuevamente que es el medio de cultivo más cercano a tener un efecto positivo frente a la relación concentración de proteína y peso.

Tabla F.6: Resultados del análisis *t-student* para la relación entre concentración de proteína y peso seco de los medios donde se cultivó *P. pastoris*.

Medios Comparados	<i>p-value</i>	Nivel de Significancia
BMMY fos y BMMY cit	0,187	No significativo
BMMY fos y MM* fos	0,272	No significativo
BMMY fos y MM* cit	0,163	No significativo

Finalmente, se observa un incremento similar de esta relación por parte de los 4 medios a las 72 horas, esto se atribuye principalmente a la muerte celular, ya que al iniciarse esta fase, las células al lisarse, liberan la proteína que queda al interior de ellas, aumentando su concentración y disminuyendo la del peso seco.

Para ver los gráficos de otras relaciones ver el Anexo F.3 y para ver gráficos adicionales sobre otras proporciones, ver el Anexo F.4.

Dado que el medio MM* cit demuestra tener buenos resultados en comparación con el medio BMMY, y sumado a esto, es el único medio que presenta realmente actividad enzimática al estar la enzima en contacto directo con el medio (Figura 3.7), es que se propone su uso para el diseño de un eventual sistema *in situ* de producción de XOS.

También se adjuntan los datos experimentales obtenidos en la planilla Excel "*Cultivo_P.pastoris.xlsx*" presente en el link la referencia [99].

El gráfico del efecto del medio de cultivo sobre la razón entre concentración de proteína y peso seco promedio se encuentra en el cuerpo del informe, en la sección de Resultados. A continuación se muestra el resultado de los medios de cultivos individualizados por matraz.

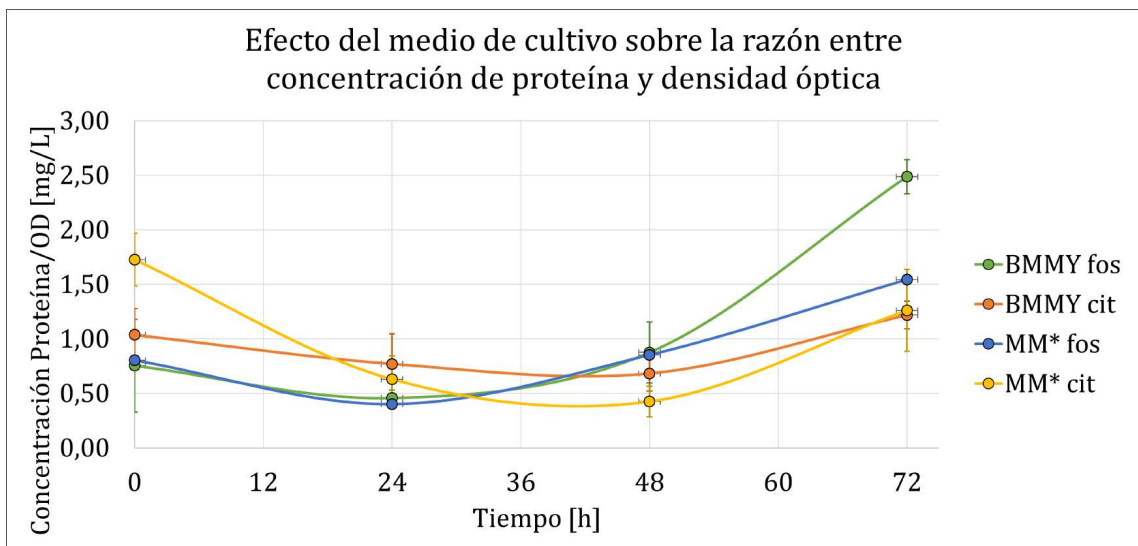


Figura F.32: Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la concentración de proteína y la densidad óptica (DO) promedio en cultivos de *P.pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

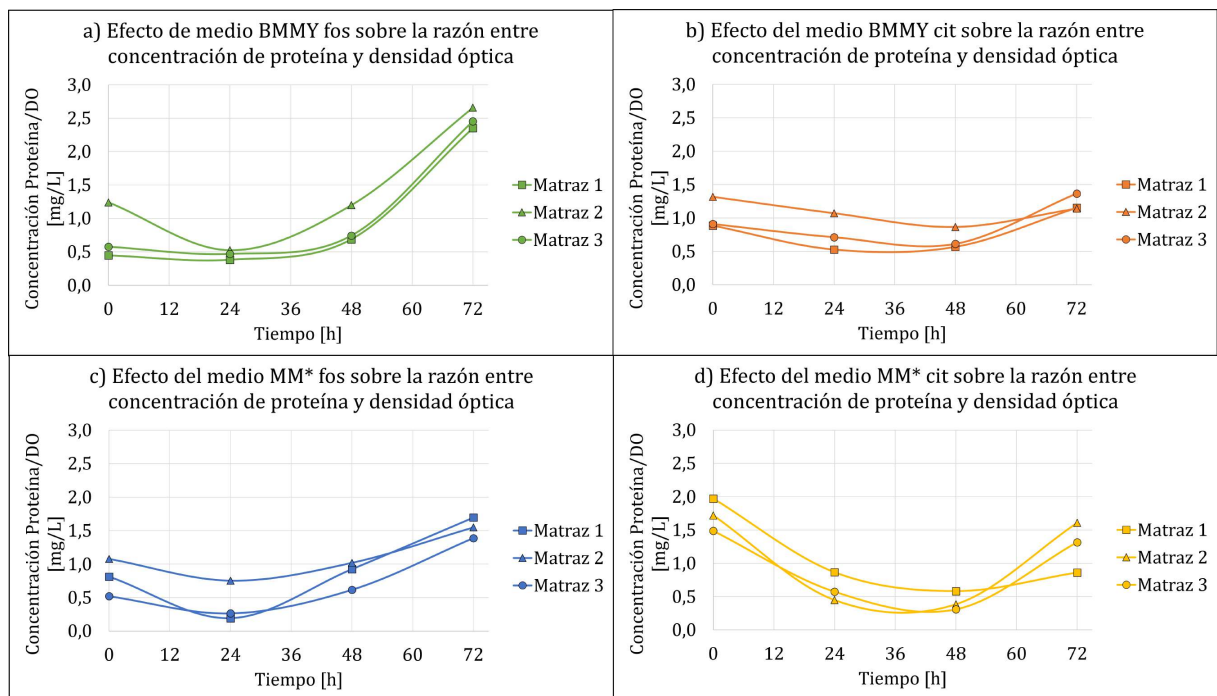


Figura F.33: Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre la concentración de proteína total y la densidad óptica (DO) en cultivos de *P.pastoris* hechos a 30°C y pH 6 individualizadas por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

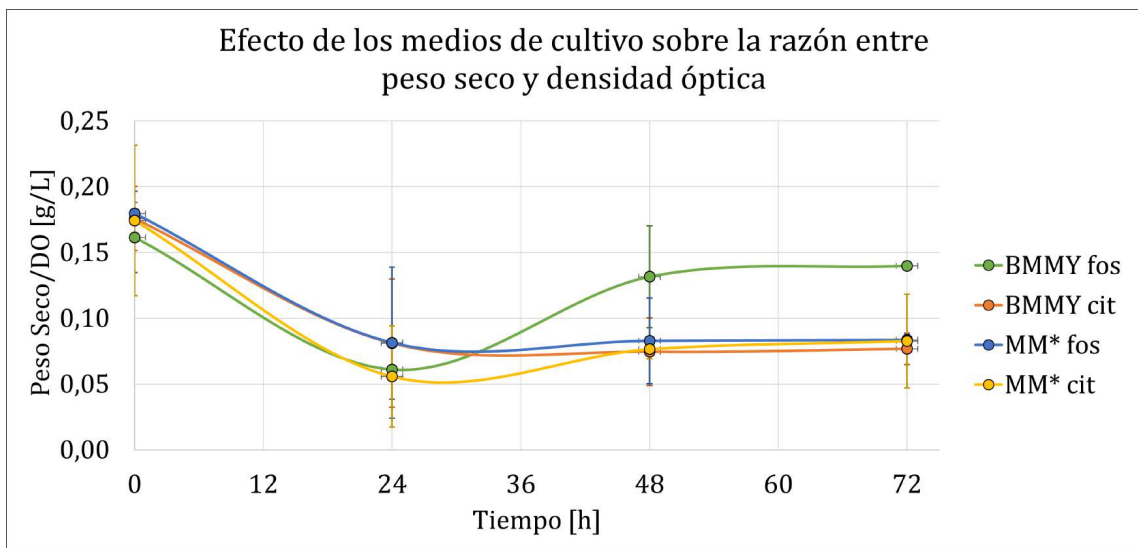


Figura F.34: Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre el peso seco y la densidad óptica (DO) promedio en cultivos de *P.pastoris* hechos a 30°C y pH 6. Las barras corresponden a las desviaciones estándar de los triplicados respectivos.

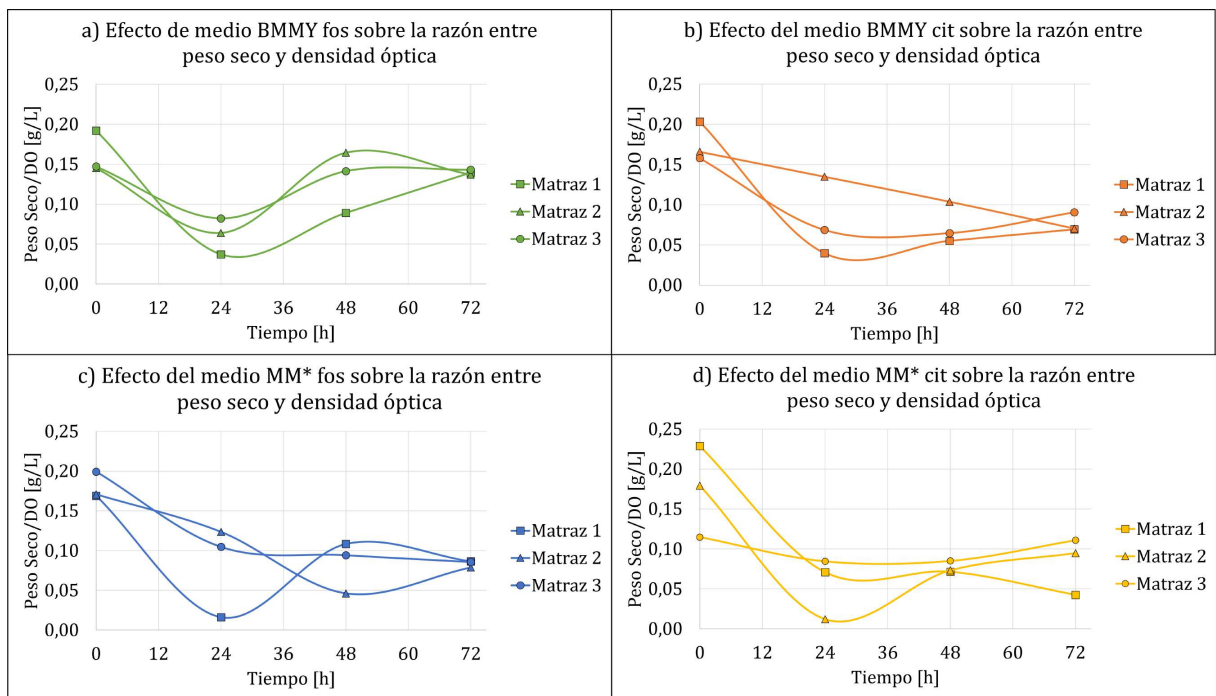


Figura F.35: Efecto de los medios de cultivos sobre la razón entre el peso seco y la densidad óptica (DO) en cultivos de *P.pastoris* hechos a 30°C y pH 6 individualizadas por matraz. a) Efecto del medio BMMY fos, b) efecto del medio BMMY cit, c) efecto del medio MM* fos y d) efecto del medio MM* cit.

Anexo G

Modelo Matemático

G.1. Metabolitos

Tabla G.1: Metabolitos usados en el modelo matemático y nomenclatura usada.

Nomenclatura	Nombre Metabolito
AcCoA	Acetil coenzima A
ACEADH	Acetaldehído
Acet	Acetato
AKG	α -Ketoglutarato
ATP	Adenosin trifosfato
Bic	Ion Bicarbonato
BM	Biomasa
Cit	Citrato
CO ₂	Dióxido de carbono
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
E4P	Eritrosa 4-fosfato
EN6D	Enzima N ₆ -(dihidrolipoil) lisina
EN6L	Enzima N ₆ -(lipoil) lisina
EN6S	Enzima N ₆ -(S-succinildihidrolipoil) lisina
F6P	Fructosa 6-fosfato
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido
FALD	Folmaldehído
FDP	Fructosa 1,6-bifosfato
FOR	Formato
Fum	Fumarato
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
G6P	Glucosa 6-fosfato
GL3P	Glicerol 3-fosfato
GLX	Glioxilato
GTH	Glutati3n

Continuaci3n en la p3gina siguiente

Tabla G.1 Continuación de la página anterior

Nomenclatura	Nombre Metabolito
H	Protón
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HTP	2-(α hidroxietil) tiamina bifosfato
Icit	Isocitrato
Mal	Malato
MetOH	Metanol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NH ₃	Nitrógeno
O ₂	Oxígeno
OAA	Oxaloacetato
P2G	Ácido 2-fosfoglicérico
P3G	Ácido 3-fosfoglicérico
PEP	Fosfoenolpiruvato
PDG	Ácido 6-fosfoglucónico
PGP	3-Fosfo-D-glicerol fosfato
PhAc	Ácido fosfórico
pPh	Polifosfato _(n-1)
pPn	Polifosfato _(n)
Pyr	Piruvato
R5P	Ribosa 5-fosfato
RL5P	Ribulosa 5-fosfato
S7P	Sedoheptulosa-7-fosfato
SFG	S-Formil glutatión
SHG	S-(hidroximetil) glutatión
Succ	Succinato
SucCoA	Succinil-CoA
T2P	Tiamin bifosfato
X5P	D-xilulosa 5-fosfato
Xyl	Xilanasasa

G.2. Reacciones

A continuación se muestran las reacciones usadas para la construcción del modelo matemático de *P. pastoris*.

Tabla G.2: Set de reacciones usadas para el modelamiento matemático de *P. pastoris*.

Nombre	Reacción
R1	$G6P \leftrightarrow F6P$
R2	$F6P + ATP \rightarrow FDP + ADP$
R3	$FDP + H_2O \rightarrow F6P + H_3PO_4$
R4	$FDP \leftrightarrow G3P + DHAP$
R5	$G3P \leftrightarrow DHAP$
R6a	$G3P + NAD^+ + H_3PO_4 \leftrightarrow PEP + H^+ + NADH$
R6b	$PGP + ADP \leftrightarrow P3G + ATP$
R6c	$P3G \leftrightarrow P2G$
R6d	$P2G \leftrightarrow PEP + H_2O$
R7	$PEP + ADP \rightarrow PYR + ATP$
R8	$GL3P + FAD_{mit} \leftrightarrow DHAP + FADH_{2mit}$
R9	$DHAP + NADH + H^+ \leftrightarrow GL3P + NAD^+$
R10	$DHAP + NADH_{mit} \leftrightarrow GL3P + NAD_{mit}$
R11a	$G6P + NADP^+ \rightarrow GLP + NADPH + H^+$
R11b	$GLP + H_2O \rightarrow PDG$
R11c	$PDG + NADP^+ \rightarrow RL5P + NADPH + CO_2 + H^+$
R12	$RL5P \leftrightarrow R5P$
R13	$RL5P \leftrightarrow X5P$
R14	$R5P + X5P \leftrightarrow G3P + S7P$
R15	$X5P + E4P \leftrightarrow F6P + G3P$
R16	$G3P + S7P \leftrightarrow E4P + F6P$
R17	$AcCoA + OAA + H_2O \leftrightarrow CoA + Cit$
R18	$Cit \leftrightarrow Icit$
R19	$Icit + NADP^+ \leftrightarrow CO_2 + NADPH + AKG + H^+$
R20	$Fum + FADH_{2mit} \leftrightarrow Succ + FAD_{2mit}$
R21	$Fum + H_2O \leftrightarrow Mal$
R22	$Mal + NAD^+ \leftrightarrow NADH + OAA + H^+$
R23	$ATP_{mit} + AC_{mit} + CoA_{mit} \rightarrow ADP_{mit} + AcCoA_{mit} + H_3PO_4$
R24	$ATP + AC + CoA \rightarrow ADP + AcCoA + H_3PO_4$
R25	$Pyr + ATP + CO_2 \rightarrow ADP + OAA + H_3PO_4$
R26a	$Pyr + T2P \rightarrow HTP + CO_2$
R26b	$HTP \rightarrow ACEADH + T2P$
R27	$ACEADH + NADP + H_2O \leftrightarrow AC + NADPH + H^+$
R28	$OAA + ATP \rightarrow PEP + CO_2 + ADP$
R29	$Icit \rightarrow GLX + Succ$
R30	$AcCoA + GLX + H_2O \leftrightarrow CoA + Mal$
R31a	$28 ADP + 28 pPn \rightarrow 28 ATP + 28 pPh$
R31b	$28 pPh + 28 H_3PO_4 \rightarrow 28 pPn + 28 H_2O$
R31c	$20 NADH_{mit} + 10 O_2 + 20 H^+ \rightarrow 20 NAD_{mit}^+ + 20 H_2O$
R32a	$20 FADH_{2mit} + 20 NAD_{mit} \rightarrow 20 FAD_{mit} + 20 NADH_{mit} + 20 H^+$
R32b	$28 ADP + 28 pPn \rightarrow 28 ATP + 28 pPh$
R32c	$28 pPh + 28 H_3PO_4 \rightarrow 28 pPn + 28 H_2O$
Continuación en la página siguiente	

Tabla G.2 Continuación de la página anterior

Nombre	Reacción
R32d	$20 \text{ NADH}_{mit} + 10 \text{ O}_2 + 20 \text{ H}^+ \rightarrow 20 \text{ NAD}^+_{mit} + 20 \text{ H}_2\text{O}$
R33	$36,3 \text{ G6P} + 36,3 \text{ F6P} + 25,2 \text{ PEP} + 29,4 \text{ PYR}_{mit} + 16,5 \text{ G3P} + 62,6 \text{ NAD}^+ + 199 \text{ NADPH} + 56 \text{ NADPH}_{mit} + 24,2 \text{ OAA} + 0,8 \text{ OAA}_{mit} + 26,6 \text{ AKG} + 3,3 \text{ AcCoA} + 8 \text{ AcCoA}_{mit} + 14,6 \text{ E4P} + 11 \text{ R5P} + 0,024 \text{ O}_2 + 0,00003 \text{ MetOH} \rightarrow 62,6 \text{ NADH} + 199 \text{ NADP}^+ + 56 \text{ NADP}^+_{mit} + 3,3 \text{ CoA} + 8 \text{ CoA}_{mit} + 12,7 \text{ CO}_2 + 1000 \text{ BM}$
R34a	$\text{AKG}_{mit} + \text{EN6L} \leftrightarrow \text{EN6S} + \text{CO}_2$
R34b	$\text{COA}_{mit} + \text{EN6S} \leftrightarrow \text{SuCCoA}_{mit} + \text{EN6D}$
R34c	$\text{EN6D} + \text{NAD}^+_{mit} \leftrightarrow \text{EN6L} + \text{NADH}_{mit} + \text{H}^+$
R35	$\text{SuCCoA}_{mit} + \text{ADP}_{mit} + \text{H}_3\text{PO}_4 \leftrightarrow \text{ATP}_{mit} + \text{CoA}_{mit} + \text{Succ}_{mit}$
R36a	$\text{Pyr}_{mit} + \text{EN6L} \leftrightarrow \text{EN6S} + \text{CO}_2$
R36b	$\text{EN6S} \rightarrow \text{AcCoA}_{mit} + \text{EN6D}$
R36c	$\text{EN6D} + \text{NAD}^+_{mit} \leftrightarrow \text{EN6L} + \text{NADH}_{mit} + \text{H}^+$
R37	$\text{OAA}_{mit} + \text{AcCoA}_{mit} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Cit}_{mit} + \text{CoA}_{mit}$
R38	$\text{Cit}_{mit} \leftrightarrow \text{Icit}_{mit}$
R39	$\text{Icit}_{mit} + \text{NAD}^+_{mit} \leftrightarrow \text{AKG}_{mit} + \text{NADH}_{mit} + \text{CO}_2 + \text{H}^+$
R40	$\text{Icit}_{mit} + \text{NADP}^+_{mit} \leftrightarrow \text{AKG}_{mit} + \text{NADPH}_{mit} + \text{CO}_2 + \text{H}^+$
R41	$\text{Succ}_{mit} + \text{FAD}_{mit} \leftrightarrow \text{Fum}_{mit} + \text{FADH}_2_{mit}$
R42	$\text{Fum}_{mit} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Mal}_{mit}$
R43	$\text{Mal}_{mit} + \text{NAD}^+_{mit} \leftrightarrow \text{OAA}_{mit} + \text{NADH}_{mit} + \text{H}^+$
R44	$\text{Mal}_{mit} + \text{NADP}^+_{mit} \leftrightarrow \text{Pyr}_{mit} + \text{NADPH}_{mit} + \text{CO}_2 + \text{H}^+$
R45	$\text{Mal}_{mit} + \text{NAD}^+_{mit} \leftrightarrow \text{Pyr}_{mit} + \text{NADH}_{mit} + \text{CO}_2 + \text{H}^+$
R46	$\text{ACEADH}_{mit} + \text{NAD}^+_{mit} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{AC}_{mit} + \text{NADH}_{mit} + \text{H}^+$
R47	$\text{ACEADH}_{mit} + \text{NADP}^+_{mit} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{AC}_{mit} + \text{NADPH}_{mit} + \text{H}^+$
R48	$\text{MetOH}_{ext} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FALD} + \text{H}_2\text{O}_2$
R49	$\text{DHA} + \text{ATP} \rightarrow \text{DHAP} + \text{ADP}$
R50	$\text{FALD} + \text{X5P} \rightarrow \text{DHA} + \text{G3P}$
R51a	$\text{FALD} + \text{GTH} \leftrightarrow \text{SFG}$
R51b	$\text{SHG} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{SFG} + \text{NADH} + \text{H}^+$
R52	$\text{FOR} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$
R53	$\text{SFG} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{FOR} + \text{GTH}$
R54	Producción de proteína recombinante

G.3. Matriz Estequiométrica

G.4. Código

A continuación se muestra el código del modelo matemático usado en Cobrapy.

```
1 import cobra
3
4 from cobra import Model, Reaction, Metabolite
5 from cobra.io import write_sbml_model
7
8 model = Model('pastoris')
9 ##### DEFINICION DE METABOLITOS #####
11 #Sustratos (externos):
13 MetOH = Metabolite('MetOH_e', name='Methanol', formula="CH4O", compartment='
    e')
14 O2 = Metabolite('O2_e', name='Oxygen', formula="O2", compartment='
    e')
15 NH3 = Metabolite('NH3_e', name='Ammonia', formula="NH3", compartment='
    e')
17 #Productos (externos):
19 CO2 = Metabolite('CO2_e', name='Carbon dioxide', formula="CO2",
    compartment='e')
20 Xyl = Metabolite('Xyl_e', name='Xylanase', formula="
    C1695H3315O881N437S10", compartment='e')
21 BM = Metabolite('BM_e', name='Biomass',
    compartment='e')
23 #Intermediarios:
25 ACEADH = Metabolite('ACEADH_c', name='Acetaldehyde',
    formula="C2H4O", compartment='c')
26 Acet = Metabolite('Acet_c', name='Acetate',
    formula="C2H4O2", compartment='c')
27 AcCoA = Metabolite('AcCoA_c', name='Acetyl coenzyme A',
    formula="C23H38N7O17P3S", compartment='c')
28 #CoA = C21H36N7O16P3S
29 ATP = Metabolite('ATP_c', name='Adenosine triphosphate',
    formula="C10H16N5O13P3", compartment='c')
30 #ADP = formula = C10H15N5O10P2
31 AKG = Metabolite('AKG_c', name='Alpha ketoglutarate',
    formula="C5H6O5", compartment='c')
32 Cit = Metabolite('Cit_c', name='Citrate',
    formula="C6H8O7", compartment='c')
33 X5P = Metabolite('X5P_c', name='D-Xylulose 5-phosphate',
    formula="C5H11O8P", compartment='c')
34 DHAP = Metabolite('DHAP_c', name='Dihydroxyacetone phosphate',
    formula="C3H7O6P", compartment='c')
35 #DHA = Dihydroxyacetone, C3H6O3
36 E4P = Metabolite('E4P_c', name='Erythrose 4-phosphate',
    formula="C4H9O7P", compartment='c')
```

```

37 EN6D = Metabolite('EN6H_c', name='Enzyme N6-(dihydrolipoyl)lysine',
    formula="C8H16NOS2R", compartment='c')
EN6L = Metabolite('EN6L_c', name='Enzyme N6-(lipoyl)lysine',
    formula="C8H14NOS2R", compartment='c')
39 EN6S = Metabolite('EN6S_c', name='Enzyme N6-(S-succinyldihydrolipoyl)lysine
    ', formula="C12H20NO4S2R", compartment='c')
FADH2 = Metabolite('FADH2_c', name='Dihydroflavine-adenine dinucleotide',
    formula="C27H35N9O15P2", compartment='c')
41 # FAD = C27H33N9O15P2
FALD = Metabolite('FALD_c', name='Formaldehyde',
    formula="CH2O", compartment='c')
43 FOR = Metabolite('FOR_c', name='Formate',
    formula="CH2O2", compartment='c')
FDP = Metabolite('FDP_c', name='Fructose 1,6-bisphosphate',
    formula="C6H14O12P2", compartment='c')
45 F6P = Metabolite('F6P_c', name='Fructose 6-phosphate',
    formula="C6H13O9P", compartment='c')
Fum = Metabolite('Fum_c', name='Fumarate',
    formula="C4H4O4", compartment='c')
47 G6P = Metabolite('G6P_c', name='Glucose 6-phosphate',
    formula="C6H13O9P", compartment='c')
GTH = Metabolite('GTH_c', name='Glutathione',
    formula="C10H17N3O6S", compartment='c')
49 G3P = Metabolite('G3P_c', name='Glyceraldehyde 3-phosphate',
    formula="C3H7O6P", compartment='c')
GL3P = Metabolite('GL3P_c', name='Glycerol 3-phosphate',
    formula="C3H9O6P", compartment='c')
51 GLP = Metabolite('GLP_c', name='D-Glucono-1,5-lactone 6-phosphate',
    formula="C6H11O9P", compartment='c')
GLX = Metabolite('GLX_c', name='Glyoxylate',
    formula="C2H2O3", compartment='c')
53 HTP = Metabolite('HTP_c', name='2-(Alpha-Hydroxyethyl)thiamine
    diphosphate', formula="C14H23N4O8P2S", compartment='c')
Icit = Metabolite('Icit_c', name='Isocitrate',
    formula="C6H8O7", compartment='c')
55 Mal = Metabolite('Mal_c', name='Malate',
    formula="C4H6O5", compartment='c')
NADH = Metabolite('NADH_c', name='Nicotinamide Adenine dinucleotide',
    formula="C21H29O14P2N2", compartment='c')
57 #NAD = formula = C21H28O14P2N2
NADPH = Metabolite('NADPH_c', name='Nicotinamide adenine dinucleotide
    phosphate', formula="C21H30N7O17P3", compartment='c')
59 #NADP = C21H29N7O17P3
OAA = Metabolite('OAA_c', name='Oxaloacetate',
    formula="C4H4O5", compartment='c')
61 PEP = Metabolite('PEP_c', name='Phosphoenolpyruvate',
    formula="C3H5O6P", compartment='c')
PDG = Metabolite('PDG_c', name='6-Phospho-D-gluconate',
    formula="C6H13O10P", compartment='c')
63 PGP = Metabolite('PGP_c', name='3-Phospho-D-glyceroyl phosphate',
    formula="C3H8O10P2", compartment='c')
P3G = Metabolite('2PG_c', name='3-Phospho-D-glycerate',
    formula="C3H7O7P", compartment='c')
65 P2G = Metabolite('2PG_c', name='2-Phospho-D-glycerate',
    formula="C3H7O7P", compartment='c')
Pyr = Metabolite('Pyr_c', name='Pyruvate',

```

```

67     formula="C3H4O3"           , compartment='c')
R5P = Metabolite('R5P_c',      name='Ribose 5-phosphate',
                 formula="C5H11O8P" , compartment='c')
RL5P = Metabolite('RL5P_c',   name='Ribulose 5-phosphate',
                  formula="C5H11O8P" , compartment='c')
69 SFG = Metabolite('SFG_c',   name='S-Formylglutathione',
                  formula="C11H17N3O7S" , compartment='c')
SHG = Metabolite('SHG_c',     name='S-(Hydroxymethyl) glutathione',
                  formula="C11H19N3O7S" , compartment='c')
71 S7P = Metabolite('S7P_c',   name='Sedoheptulose 7-phosphate',
                  formula="C7H15O10P" , compartment='c')
Succ = Metabolite('Succ_c',    name='Succinate',
                  formula="C4H6O4"     , compartment='c')
73 SucCoA = Metabolite('SucCoA_c', name='Succinyl-CoA',
                     formula="C25H40N7O19P3S" , compartment='c')
T2P = Metabolite('T2P_c',     name='Thiamin diphosphate',
                  formula="C12H19N4O7P2S" , compartment='c')
75
#Extras Curacion:
77
H2O = Metabolite('H2O_c',     name='Water',                formula="H2O",
                 compartment='c')
79 H2O2 = Metabolite('H2O2_c', name='Hydrogen peroxide',    formula="H2O2",
                  compartment='c')
PhAc = Metabolite('AcP_c',    name='Phosphoric acid',      formula="H3PO4",
                  compartment='c')
81 H     = Metabolite('H_c',    name='Proton',                formula="H+",
                  compartment='c')
Bic = Metabolite('Bic_c',     name='Bicarbonate',          formula="HCO3+",
                  compartment='c')
83 pPn = Metabolite('pPn_c',   name='Polyphosphate(n)',     formula="H4P2O7(
                  HPO3)n", compartment='c')
pPh = Metabolite('pPh_c',     name='Polyphosphate(n-1)',   formula="H4P2O7(
                  HPO3)(n-1)", compartment='c')
85
87 ##### REACCIONES DE BORDE #####
#Unidades: mmol/gDWC*h
89
#R*: entrada de metanol
91 reaction = Reaction('MetOHtr')
reaction.name = 'MetOHtr'
93 reaction.lower_bound = -0.537
reaction.upper_bound = 3*10**(-7)
95 reaction.add_metabolites({MetOH: 1.0})
model.add_reactions([reaction])
97
#R*: entrada de oxigeno
99 reaction = Reaction('O2tr')
reaction.name = 'O2tr'
101 reaction.lower_bound = -18.83
reaction.upper_bound = 18.83
103 reaction.add_metabolites({O2: 1.0})
model.add_reactions([reaction])
105
#R*: entrada de amoniaco

```

```

107 reaction = Reaction('NH3tr')
    reaction.name = 'NH3tr'
109 reaction.lower_bound = -0.00009
    reaction.upper_bound = 0.00009
111 reaction.add_metabolites({NH3: 1.0})
    model.add_reactions([reaction])
113
114 #R*: Salida de CO2
115 reaction = Reaction('CO2tr')
    reaction.name = 'CO2tr'
117 reaction.lower_bound = -12.55
    reaction.upper_bound = 12.55
119 reaction.add_metabolites({CO2: 1.0})
    model.add_reactions([reaction])
121
122 #R*: Salida de Xyl *****
123 reaction = Reaction('Xyltr')
    reaction.name = 'Xyltr'
125 reaction.lower_bound = -0.0000051
    reaction.upper_bound = 0.0000051
127 reaction.add_metabolites({Xyl: 1.0})
    model.add_reactions([reaction])
129
130 #R*: Salida de Biomasa *****
131 reaction = Reaction('BMtr')
    reaction.name = 'BMtr'
133 reaction.lower_bound = -1.56
    reaction.upper_bound = 1.56
135 reaction.add_metabolites({BM: 1.0})
    model.add_reactions([reaction])
137
138 #R*: Salida de GL3P (sumidero)
139 reaction = Reaction('GL3Ptr')
    reaction.name = 'GL3Ptr'
141 reaction.lower_bound = -1000.0
    reaction.upper_bound = 1000.0
143 reaction.add_metabolites({GL3P: 1.0})
    model.add_reactions([reaction])
145
146 ##### DEFINICION DE REACCIONES #####
149 def add_reaction(model, name, display_name, lbound, ubound, metabolites):
    reaction = Reaction(name)
151     reaction.name = display_name
    reaction.lower_bound = float(lbound)
153     reaction.upper_bound = float(ubound)
    reaction.add_metabolites(metabolites)
155     model.add_reactions([reaction])
157
158 #----- Glycolysis Reactions -----
159 #R1: G6P <=> F6P
    add_reaction(model, 'R00771', 'G6P_F6P', -1000, 1000, {G6P: -1.0, F6P: 1.0})
161 #R2: F6P + ATP -> FDP + ADP
    add_reaction(model, 'R00756', 'F6P.ATP_FDP.ADP', 0, 1000, {F6P: -1.0, ATP:

```

```

-1.0, FDP: 1.0})
163
#R3: FDP + H2O -> F6P + PhAc
165 add_reaction(model, 'R00762', 'FDP.H2O_F6P.H3PO4', 0, 1000, {FDP: -1.0, H2O:
-1.0, F6P: 1.0, PhAc: 1.0})
167
#R4: FDP <=> G3P + DHAP
add_reaction(model, 'R01068', 'FDP_DHAP.G3P', -1000, 1000, {FDP: -1.0, DHAP:
1.0, G3P: 1.0})
169
#R5: G3P <=> DHAP
171 add_reaction(model, 'R01015', 'G3P_DHAP', -1000, 1000, {G3P: -1.0, DHAP: 1.0})
173
#R6: G3P + NAD + ADP + H3PO4 <=> PEP + ATP + NADH+ H2O + H
175
#R6a: G3P + PhAc + NAD <=> PGP + NADH + H
add_reaction(model, 'R01061', 'G3P.PhAc.NAD_PGP.NADH.H', -1000, 1000, {G3P:
-1.0, PhAc: -1.0, PGP: 1.0, NADH: 1.0, H :1.0})
177
#R6b: PGP + ADP <=> ATP + P3G
179 add_reaction(model, 'R01512', 'PGP.ADP_P3G.ATP', -1000, 1000, {PGP: -1.0, ATP:
1.0, P3G: 1.0})
181
#R6c: P3G <=> P2G
add_reaction(model, 'R01518', 'P3G_P2G', -1000, 1000, {P3G: -1.0, P2G: 1.0})
183
#R6d: P2G <=> PEP + H2O
185 add_reaction(model, 'R00658', 'P2G_PEP.H2O', -1000, 1000, {P2G: -1.0, PEP: 1.0,
H2O: 1.0})
187
#R7: PEP + ADP -> Pyr + ATP
add_reaction(model, 'R00200', 'PEP.ADP_Pyr.ATP', 0, 1000, {PEP: -1.0, Pyr: 1.0,
ATP: 1.0})
189
#R8: GL3P + FAD_mit <=> DHAP + FADH2_mit
191 add_reaction(model, 'R00848', 'GL3P.FAD_DHAP.FADH2', -1000, 1000, {GL3P: -1.0,
DHAP: 1.0, FADH2: 1.0})
193
#R9: DHAP + NADH + H <=> GL3P + NAD
add_reaction(model, 'R00842', 'DHAP.NADH.H_GL3P.NAD', -1000, 1000, {DHAP: -1.0,
NADH: -1.0, H:-1.0, GL3P: 1.0})
195
#R10: DHAP + NADH_mit + H <=> GL3P + NAD_mit
197 add_reaction(model, 'R00842m', 'DHAP.NADH.H_GL3P.NAD', -1000, 1000, {DHAP:
-1.0, NADH: -1.0, H:-1.0, GL3P: 1.0})
199 #-----Pentose Phosphate Pathway Reactions-----
201
#R11: G6P + 2NADP + H2O -> 2NADPH + CO2 + RL5P + 2H
203
#R11a: G6P + NADP -> GLP + NADPH + H
add_reaction(model, 'R00835', 'G6P.NADP_GLP.NADPH.H', 0, 1000, {G6P: -1.0, GLP:
1.0, NADPH: 1.0, H: 1.0})
205
#R11b: GLP + H2O -> PDG
207 add_reaction(model, 'R02035', 'GLP.H2O_PDG', 0, 1000, {GLP: -1.0, H2O: -1.0,

```



```

    PDG: 1.0})

209 #R11c: PDG + NADP → RL5P + H + CO2 + NADPH
add_reaction(model, 'R01528', 'PDG.NADP_RL5P.H.NADPH.CO2', 0, 1000, {PDG: -1.0,
    RL5P: 1.0, NADPH: 1.0, H: 1.0, CO2: 1.0})

211 #R12: RL5P ↔ R5P
213 add_reaction(model, 'R01056', 'RL5P_R5P', -1000, 1000, {RL5P: -1.0, R5P: 1.0})

215 #R13: RL5P ↔ X5P
add_reaction(model, 'R01529', 'RL5P_X5P', -1000, 1000, {RL5P: -1.0, X5P: 1.0})

217 #R14: R5P + X5P ↔ G3P + S7P
219 add_reaction(model, 'R01641', 'R5P.X5P_G3P.S7P', -1000, 1000, {R5P: -1.0, X5P:
    -1.0, G3P: 1.0, S7P: 1.0})

221 #R15: X5P + E4P ↔ F6P + G3P
add_reaction(model, 'R01067', 'X5P.E4P_F6P.G3P', -1000, 1000, {X5P: -1.0, E4P:
    -1.0, F6P: 1.0, G3P: 1.0})

223 #R16: G3P + S7P ↔ E4P + F6P
225 add_reaction(model, 'R01827', 'G3P.S7P_E4P.F6P', -1000, 1000, {G3P: -1.0, S7P:
    -1.0, E4P: 1.0, F6P: 1.0})

227 #-----Cytosolic Reacions-----

229 #R17: AcCoA + OAA + H2O ↔ CoA + Cit
add_reaction(model, 'R00351', 'AcCoA.OAA.H2O_CoA.Cit', -1000, 1000, {AcCoA:
    -1.0, OAA: -1.0, H2O:-1.0, Cit: 1.0})

231 #R18: Cit ↔ Icit
233 add_reaction(model, 'R01324', 'Cit_Icit', -1000, 1000, {Cit: -1.0, Icit: 1.0})

235 #R19: Icit + NADP ↔ CO2 + NADPH + AKG + H
add_reaction(model, 'R00267', 'Icit.NADP_CO2.NADPH.AKG.H', -1000, 1000, {Icit:
    -1.0, CO2: 1.0, NADPH: 1.0, AKG: 1.0, H: 1.0})

237 #R20: Fum + FADH2_mit ↔ Succ + FAD_mit
239 add_reaction(model, 'R00408', 'Fum.FADH2_Succ.FAD', -1000, 1000, {Fum: -1.0,
    FADH2: -1.0, Succ: 1.0})

241 #R21: Fum + H2O ↔ Mal
add_reaction(model, 'R01082', 'Fum.H2O_Mal', -1000, 1000, {Fum: -1.0, H2O:
    -1.0, Mal: 1.0})

243 #R22: Mal + NAD ↔ NADH + OAA + H
245 add_reaction(model, 'R00342', 'Mal.NAD_NADH.OAA.H', -1000, 1000, {Mal: -1.0,
    NADH: 1.0, OAA: 1.0, H: 1.0})

247 #R23: ATP_mit + Acet_mit + CoA_mit → ADP_mit + AcCoA_mit + PhAc
add_reaction(model, 'R00229m', 'ATP.Acet.CoA_ADP.AcCoA.PhAc', 0, 1000, {Acet:
    -1.0, ATP: -1.0, AcCoA: 1.0, PhAc: 1.0})

249 #R24: ATP + Acet + CoA → ADP + AcCoA +PhAc
251 add_reaction(model, 'R00229', 'ATP.Acet.CoA_ADP.AcCoA.PhAc', 0, 1000, {Acet:
    -1.0, ATP: -1.0, AcCoA: 1.0, PhAc: 1.0})

```

```

253 #R25: Pyr + ATP + Bic -> ADP + OAA + PhAc
add_reaction(model, 'R00344', 'Pyr.ATP.Bic_ADP.OAA.PhAc', 0, 1000, {Pyr: -1.0,
ATP: -1.0, Bic: -1.0, OAA: 1.0, PhAc: 1.0})
255
257 #R26: Pyr -> ACEADH + CO2
#R26a: Pyr + T2P -> HTP + CO2
259 add_reaction(model, 'R00014', 'Pyr.T2P_HTP.CO2', 0, 1000, {Pyr: -1.0, T2P:
-1.0, HTP: 1.0, CO2: 1.0})
261 #R26b: HTP -> T2P + ACEADH
add_reaction(model, 'R00755', 'HTP_T2P.ACEADH', 0, 1000, {HTP: -1.0, T2P: 1.0,
ACEADH: 1.0})
263
265 #R27: ACEADH + NADP + H2O <=> Acet + NADPH + H
add_reaction(model, 'R00711', 'ACEADH.NADP.H2O_Acet.NADPH.H', -1000, 1000, {
ACEADH: -1.0, H2O: -1.0, Acet: 1.0, NADPH: 1.0, H: 1.0})
267 #R28: OAA + ATP -> PEP + CO2 + ADP
add_reaction(model, 'R00341', 'OAA.ATP_PEP.CO2.ADP', 0, 1000, {OAA: -1.0, ATP:
-1.0, PEP: 1.0, CO2: 1.0})
269
271 #R29: Icit -> GLX + Succ
add_reaction(model, 'R00479', 'Icit_GLX.Succ', 0, 1000, {Icit: -1.0, GLX: 1.0,
Succ: 1.0})
273
275 #R30: AcCoa + GLX + H2O <=> CoA + Mal
add_reaction(model, 'R00472', 'AcCoA.GLX.H2O_CoA.Mal', -1000, 1000, {AcCoA:
-1.0, GLX: -1.0, H2O: -1.0, Mal: 1.0})
277
#-----Oxidative Phosphorylation Reactions-----
279
#R31: 28 ADP + 28PhAc + 20 NADH_mit + 10 O2 + 20H -> 28 ATP + 20 NAD_mit + 48
H2O
281 #R31a: 28 ADP + 28pPn -> 28 ATP + 28 pPh
#add_reaction(model, 'R02184', '28ADP.28pPn_28ATP.28PpH', 0, 1000, {pPn: -28.0,
ATP: 28.0, pPh: 28.0})
283 #R31b: 28 pPh + 28 PhAc -> 28pPn + 28 H2O
#add_reaction(model, 'R03042', '28pPh.28PhAc_28pPn.28H2O', 0, 1000, {pPh:
-28.0, PhAc: -28.0, pPn: 28.0, H2O: 28.0})
285 #R31c: 20 NADH + 10O2 + 20H -> 20 NAD + 20 H2O
287 #add_reaction(model, 'R10517', '20NADH.10O2.20H_20NAD.20H2O', 0, 1000, {NADH:
-20.0, O2: -10.0, H2O: 20.0})
289 #R32: 28 ADP + 28PhAc + 20 FADH2_mit + 10 O2 -> 28 ATP + 20 FAD_mit + 48H2O
291 #R32a: 20FADH2 + 20NAD -> 20FAD + 20 NADH + 20H
add_reaction(model, 'R09748m', '20FADH2.20NAD_20FAD.20NADH.20H', 0, 1000, {
FADH2: -20.0, NADH: 20.0, H: 20.0})
293 #R32b: 2x 28 ADP + 28pPn -> 28 ATP + 28 pPh
295 add_reaction(model, 'R02184', '56ADP.56pPn_56ATP.56PpH', 0, 1000, {pPn: -56.0,

```

```

ATP: 56.0, pPh: 56.0})

297 #R32c: 2x 28 pPh + 28 PhAc -> 28pPn + 28 H2O
add_reaction(model, 'R03042', '56Ph.56PhAc_56pPn.56H2O', 0, 1000, {pPh: -56.0,
PhAc: -56.0, pPn: 56.0, H2O: 56.0})

299 #R32d: 2x 20 NADH + 10O2 + 20H -> 20 NAD + 20 H2O
301 add_reaction(model, 'R10517m', '40NADH.20O2.40H_40NAD.40H2O', 0, 1000, {NADH:
-40.0, O2: -20.0, H: -40.0, H2O: 40.0})

303 #-----Biosynthesys Reactions-----

305 #R33: 5629 G6P + 603 G3P + 426 R5P + 116 E4P + 384 PEP + 1511 PYR + 130
AcCoa_mit + 1041 AcCoa + 1046 AKG +
#961 OAA + 1095 NAD + 411 NAD_mit + 6070 NADPH + 1484 NADPH_mit + 35315 ATP +
5556 NH3 -> 1000 BM + 268 CO2 +
307 #130 Coa_mit + 1041 Coa + 1095 NADH + 411 NADH_mit + 6070 NADP + 1484 NADP_mit
+ 35315 ADP
add_reaction(model, 'biomass_prod', 'Biomass_prod', 0, 1000, {\
309 #REACTIVOS
G6P: -36.3, F6P: -36.3, PEP: -25.2, Pyr: -29.4, G3P: -16.5, NADPH: -255.0, OAA
: -25.0, AKG: -26.6, \
311 AcCoA: -11.3, E4P: -14.6, R5P: -11.0, O2: -0.024, MetOH: -0.00003, \
#PRODUCTOS
313 BM: 1000.0, CO2: 12.7, NADH: 62.6})

315 #-----Mitochondrial Reactions-----

317 #R34: AKG_mit + NAD_mit + CoA_mit -> CO2 + NADH_mit + SucCoA_mit + H (R08549)

319 #R34a: AKG_mit + EN6L <=> EN6S + CO2
321 add_reaction(model, 'R01700', 'AKG.EN6L_EN6S.CO2', 0, 1000, {AKG: -1.0, EN6L:
-1.0, EN6S: 1.0, CO2: 1.0})

323 #R34b: CoA + EN6S <=> SucCoA + EN6D
add_reaction(model, 'R02570', 'CoA.EN6S_SucCoA.EN6D', 0, 1000, {EN6S: -1.0,
EN6D: 1.0, SucCoA: 1.0})

325 #R34c: EN6D + NAD <=> EN6L + NADH + H
327 add_reaction(model, 'R07618', 'EN6D.NAD_EN6L.NADH.H', 0, 1000, {EN6D: -1.0,
EN6L: 1.0, NADH: 1.0, H: 1.0})

329 #R35: SucCoA_mit + ADP_mit + PhAc <=> ATP_mit + CoA_mit + Succ_mit
add_reaction(model, 'R00405', 'SucCoA.ADP.PhAc_ATP.CoA.Succ', -1000, 1000, {
SucCoA: -2.0, PhAc: -2.0, ATP: 2.0, Succ: 2.0}) #repetida en R36c
331

333 #R36: Pyr_mit + CoA_mit + NAD_mit -> AcCoA_mit + NADH_mit + CO2 + H (R00209)

335 #R36a: Pyr + EN6L <=> EN6S + CO2
add_reaction(model, 'R01699', 'Pyr.EN6L_EN6S.CO2', -1000, 1000, {Pyr: -1.0,
EN6L: -1.0, EN6S: 1.0, CO2: 1.0})

337 #R36b: EN6S <=> AcCoA + EN6D
339 add_reaction(model, 'R02569', 'EN6S_AcCoA.EN6D', -1000, 1000, {EN6S: -1.0,

```

```

AcCoA: 1.0, EN6D: 1.0})
341 #R36c: EN6D + NAD <=> EN6L + NADH + H
#add_reaction(model, 'R07618', 'EN6D.NAD_EN6L.NADH.H', -1000, 1000, {EN6D:
-1.0, EN6L: 1.0, NADH: 1.0, H: 1.0})
343
345 #R37: OAA_mit + AcCoA_mit H2O <=> Cit_mit + CoA_mit
add_reaction(model, 'R00351m', 'OAA.AcCoA.H2O_Cit.CoA', -1000, 1000, {OAA:
-1.0, AcCoA: -1.0, H2O: -1.0, Cit: 1.0})
347
#R38: Cit_mit <=> Icit_mit
349 add_reaction(model, 'R01324m', 'Cit_Icit', -1000, 1000, {Cit: -1.0, Icit: 1.0})
351 #R39: Icit_mit + NAD_mit <=> AKG_mit + NADH_mit + CO2 + H
add_reaction(model, 'R00709', 'Icit.NAD_AKG.NADPH.CO2.H', -1000, 1000, {Icit:
-1.0, AKG: 1.0, NADH: 1.0, CO2: 1.0, H: 1.0})
353
#R40: Icit_mit + NADP_mit <=> AKG_mit + NADPH_mit + CO2 + H
355 add_reaction(model, 'R00267m', 'Icit.NADP_AKG.NADPH.CO2.H', -1000, 1000, {Icit:
-1.0, AKG: 1.0, NADPH: 1.0, CO2: 1.0, H: 1.0})
357 #R41: Succ_mit + FAD_mit <=> Fum_mit + FADH2_mit
add_reaction(model, 'R00408m', 'Succ.FAD_Fum.FADH2', -1000, 1000, {Succ: -1.0,
Fum: 1.0, FADH2: 1.0})
359
#R42: Fum_mit + H2O <=> Mal_mit
361 add_reaction(model, 'R01082m', 'Fum.H2O_Mal', -1000, 1000, {Fum: -1.0, H2O:
-1.0, Mal: 1.0})
363 #R43: Mal_mit + NAD_mit <=> OAA_mit + NADH_mit +H
add_reaction(model, 'R00342m', 'Mal.NAD_OAA.NADH.H', -1000, 1000, {Mal: -1.0,
OAA: 1.0, NADH: 1.0, H: 1.0})
365
#R44: Mal_mit + NADP_mit <=> Pyr_mit + NADPH_mit + CO2 +H
367 add_reaction(model, 'R00216m', 'Mal.NADP_Pyr.NADPH.CO2.H', -1000, 1000, {Mal:
-1.0, Pyr: 1.0, NADPH: 1.0, CO2: 1.0, H: 1.0})
369 #R45: Mal_mit + NAD_mit <=> Pyr_mit + NADH_mit + CO2 + H
add_reaction(model, 'R00214m', 'Mal.NAD_Pyr.NADH.CO2.H', -1000, 1000, {Mal:
-1.0, Pyr: 1.0, NADH: 1.0, CO2: 1.0, H: 1.0})
371
#R46: ACEADH_mit + NAD_mit + H2O <=> Acet_mit + NADH_mit + H
373 add_reaction(model, 'R00710m', 'ACEADH.NAD.H2O_Acet.NADH.H', -1000, 1000, {
ACEADH: -1.0, H2O: -1.0, Acet: 1.0, NADH: 1.0, H: 1.0})
375 #R47: ACEADH_mit + NADP_mit + H2O <=> Acet_mit + NADPH_mit + H
add_reaction(model, 'R00711m', 'ACEADH.NADP.H2O_Acet.NADPH.H', -1000, 1000, {
ACEADH: -1.0, H2O: -1.0, Acet: 1.0, NADPH: 1.0, H: 1.0})
377
#----- Methanol Utilization Pathways Reactions -----
379
#R48: MetOH_ext + O2 -> FALD + H2O2
381 add_reaction(model, 'R00608', '2MetOH.O2_2FALD.H2O2', 0, 1000, {MetOH: -1.0,
O2: -1.0, FALD: 1.0, H2O2: 1.0})

```

```

383 #R49: DHA + ATP -> DHAP + ADP
add_reaction(model, 'R01011', 'DHA.ATP_DHAP.ADP', 0, 1000, {ATP: -1.0, DHAP:
1.0})
385
387 #R50: FALD + X5P -> DHA + G3P
add_reaction(model, 'R01440', 'FALD.X5P_DHA.G3P', 0, 1000, {FALD: -1.0, X5P:
-1.0, G3P: 1.0})
389
391 #R51: FALD + GTH + NAD -> SFG + NADH + H
add_reaction(model, 'R06982', 'FALD.GTH_SHG', -1000, 1000, {FALD: -1.0, GTH:
-1.0, SHG: 1.0})
393
395 #R51b: SHG + NAD -> SFG + NADH + H
add_reaction(model, 'R06983', 'SHG.NAD_SFG.NADH.H', 0, 1000, {SHG: -1.0, SFG:
1.0, NADH: 1.0, H: 1.0})
397
399 #R52: FOR + NAD -> CO2 + NADH + H
add_reaction(model, 'R00519', 'FOR.NAD_CO2.NADH.H', 0, 1000, {FOR: -1.0, CO2:
1.0, NADH: 1.0, H: 1.0})
401
403 #R53: SFG + H2O -> FOR + GTH
add_reaction(model, 'R00527', 'SFG.H2O_FOR.GTH', 0, 1000, {SFG: -1.0, H2O:
-1.0, FOR: 1.0, GTH: 1.0})
405
407 #-----Recombinant Xylanase synthesis-----
#R56: rxn de Xyl
add_reaction(model, 'xyl_prod', 'Xyl_prod', 0, 1000, {\
#REACTIVOS
409 F6P: -1.964, PEP: -0.975, G3P: -0.984, DHAP: -2.0, NADH: 5.848, GL3P: -1.0, \
NADPH: 4.245, Succ: -2.0, AKG: -0.973, MetOH: -0.037, NH3: 0.000089, O2:
-17.87, \
411 #PRODUCTOS
G6P: 1.536, ATP: 1.0, Pyr: 1.029, FADH2: 1.714, RL5P: 1.5, X5P: 2.0, \
413 OAA: 0.0248, Icit: 2.0, Fum: 2.0, ACEADH: 1.0, AcCoA: 0.011, \
E4P: 0.014, R5P: 0.011, CO2: 5.043, BM: 0.558, Xyl: 0.0000051 })
415
417 ##### SIMULACION FBA #####
419
421 write_sbml_model(model, "reconstruction.xml")
423
425 # The objects have been added to the model
print(f'{len(model.reactions)} reactions initially')
print(f'{len(model.metabolites)} metabolites initially')
427
429 # Iteracion sobre los objetos del modelo
print("Reactions")
431 print("_____")

```

```

433 for x in model.reactions:
    print("%s : %s" % (x.id, x.reaction))

435 print("")
    print("Metabolites")
437 print("_____")
    for x in model.metabolites:
439         print('%s : %s' % (x.id, x.formula))

441 model.objective = 'xyl_prod'

443 print(model.objective.expression)
    print(model.objective.direction) #muestra si esta maximizando o minimizando
445

447 solution = model.optimize()
    print(solution.fluxes[solution.fluxes.abs() > model.tolerance]) #muestra la
        solucion del FBA
449 model.summary(fva=0.95)

```