



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

**MODELO METABÓLICO Y ESTRATEGIAS TRANSCRIPCIONALES PARA  
EL PROCESO DE ELECTROFERMENTACIÓN EN *ESCHERICHIA COLI***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA  
E INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

CAYETANA ZAMORANO ARANCIBIA

PROFESORA GUÍA:  
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
DANTE TRAVISANY FLORES  
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

SANTIAGO DE CHILE  
2022

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA  
E INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: Cayetana Zamorano Arancibia  
FECHA: 2022  
PROF. GUÍA: Irene Martínez Basterrechea

## MODELO METABÓLICO Y ESTRATEGIAS TRANSCRIPCIONALES PARA EL PROCESO DE ELECTROFERMENTACIÓN EN *ESCHERICHIA COLI*

Los estados celulares redox se pueden expresar y cuantificar como las razones  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ , y son generalmente sostenidos por intrincadas redes con múltiples reacciones de óxido-reducción. De este modo, al enfrentar perturbaciones, los microorganismos ajustarán sus flujos metabólicos hasta alcanzar un apropiado balance intracelular redox. A este respecto, en muchos casos este tipo de regulación surge como cuello de botella más allá de las deficiencias enzimáticas que dificultan vías metabólicas específicas [1, 2]. Por ende, para propósitos industriales, muchos esfuerzos de la ingeniería metabólica hacia la utilización de sustratos específicos o síntesis de compuestos diana se ha realizado en microorganismos a través de la modificación o introducción de vías metabólicas que involucran reacciones redox.

Dentro de las herramientas más prometedoras frente a las limitaciones redox, asociada a la interacción exoelectrogénica, se encuentran la electrosíntesis microbiana (MES, *Microbial Electrosynthesis*) y la electrofermentación (EF, *Electro-Fermentation*) [3, 4]. Estas atañen la utilización de la interacción célula-electrodo para dirigir el metabolismo microbiano hacia una producción incrementada de químicos y combustibles. Es decir, se genera un *input/output* energético extra que es usado para optimizar el metabolismo celular redox y, por lo tanto, incrementar la producción del compuesto de interés [5]. Sin embargo, a pesar del gran auge por el desarrollo de estas técnicas, aún se desconoce de forma minuciosa la interacción genética, transcripcional y metabólica asociada a estas tecnologías. En consecuencia, los dos grandes obstáculos a superar para generar un proceso de relevancia industrial, radican en la baja razón de transferencia de electrones entre los electrodos y los microorganismos empleados, además del bajo valor de productos químicos generados [6, 7].

A partir de lo anterior, es que el trabajo de título propuesto involucra la generación de un modelo metabólico y un análisis de estrategias transcripcionales para el microorganismo *E. coli* bajo condiciones de electrofermentación. Esto, en virtud de identificar y relacionar genes asociados al metabolismo redox e interacción exoelectrogénica con hipótesis del incremento del poder reductor y la generación de productos de alto valor agregado. Así, la sinergia entre un modelo metabólico y redes de factores de transcripción, podrían aportar conocimiento a la regulación entre genes y generación de metabolitos definiendo, de esta manera, el comportamiento y maquinaria necesaria para la optimización y adaptación bajo condiciones de producción de electrofermentación para futuros procesos de validación experimental.

*A mi madre y su terapeuta, abuela, profes, Gina, padre  
y ese algo que aún me mantiene en pie.*

***Les amo y quiero, Cayetana.***

# Agradecimientos

En primer lugar, destacar y agradecer el apoyo incondicional de mi Madre a lo largo de toda mi vida y, especialmente, en mi proceso académico de memoria y transición hacia el descubrimiento de la gran mujer que quiero ser. No esta demás decir que ella es mi *rol model* y siempre me ha enseñado que lo más importante es la integridad y coherencia como herramientas para el desarrollo personal y desenvoltura como ente de esta sociedad. Por otro lado, también me ha enseñado lo que es la fortaleza, fragilidad, las emociones viscerales y el amor sin límites. En ese sentido, a pesar de que en este momento mientras hago este escrito aún siento demasiada ansiedad por mi futuro profesional, y debo reconocer que muchas veces me cuesta dilucidar y dilato decisiones en mis pensamientos, creo estar preparada para lo que el destino me atañe. Y bueno, gran parte de lo que soy hoy te lo debo a ti querida. Te amo.

En esa misma lógica, reconocer otra gran mujer en mi vida, mi abuela. No obstante, aunque en mis albores infantiles fuiste alguien extraño y no muy de mi agrado, te aprendí a conocer y me pude dar cuenta del inmenso amor que tienes para con mi madre, mis hermanas y hacia mí. Me permitiste vivir contigo por temas de cercanía con la universidad y dado mis caprichos de no ser una chica periférica, y aunque al principio nos cotó un montón, hoy puedo decir que lo logramos y nos complementamos a nuestra manera. Gracias por todo el apoyo y siempre hacerme sentir tu orgullo, te amo montones.

Terminando con los agradecimientos familiares, Padre, a pesar de que me dolió mucho que le rompieras el corazón a mi mamá y faltaras con tus deberes de crianza, hoy también reconozco mucho de ti en mí. Esto último, ya que me enseñaste desde chica la importancia de estudiar y el amor por la lectura, y que esto solamente iría en mi beneficio y de nadie más. Por otro lado, también te agradezco haberme mostrado los valores de colectividad, la igualdad en oportunidades, la justicia y el activismo como consecuencia de tu día a día de tu vivir político y pasado estudiantil. Y que sepas que a pesar de todo, te acompañaré y siempre tendrás en mí alguien con quién conversar. Te quiero.

Académicamente, agradecer a la profesora Irene, por siempre haber sido muy comprensiva en todo lo que podría denominar una experiencia de memoria: desde mi accidente, la obtención de mis nuevos documentos legales, hasta el comienzo de mi transición como mujer y tratamiento de hormonal de reemplazo. Siempre me apoyó y jamás me cuestionó, es algo que difícilmente olvidaré en mi vida. Además, incluir a los profesores Ziomara y Dante, que también siempre estuvieron a mi disposición y compartieron la flexibilidad de la profesora. Finalmente, agradecer a Gina, que sin ella no podría haber realizado todos los trámites administrativos a tiempo y que prácticamente me salvó en las prórrogas.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Contexto . . . . .	1
1.2. Motivación . . . . .	2
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>4</b>
2.1. Organismos Exoelectrógenos . . . . .	4
2.1.1. <i>Geobacter sulfurreducens</i> . . . . .	4
2.1.2. <i>Shewanella oneidensis</i> . . . . .	4
2.1.3. <i>Escherichia coli</i> . . . . .	5
2.2. Transferencia de Electrones Extracelulares . . . . .	5
2.2.1. Contacto Directo . . . . .	5
2.2.1.1. Proteínas de Membrana . . . . .	5
2.2.1.2. <i>Nanowires</i> . . . . .	6
2.2.1.3. Proteínas Redox . . . . .	6
2.2.2. Contacto Indirecto . . . . .	6
2.2.2.1. Moléculas Autosecretadas . . . . .	6
2.2.2.2. Mediadores Redox Artificiales . . . . .	7
2.2.2.3. Metabolitos Primarios . . . . .	7
2.2.3. Transferencia de Electrones Extracelular en <i>Escherichia coli</i> cepa JG622 . . . . .	7
2.3. Electrofermentación . . . . .	8
2.3.1. Fermentación No Balanceada . . . . .	8
2.3.1.1. Fermentación No Balanceada Directa . . . . .	8
2.3.1.2. Fermentación No Balanceada Indirecta . . . . .	8
2.3.2. Electrosíntesis Microbiana . . . . .	9
2.4. Modelos Metabólicos a Escala Genómica . . . . .	9
2.4.1. Modelo Base <i>E. coli</i> K-12 . . . . .	10
2.4.2. Funciones Objetivos . . . . .	11
2.4.2.1. <i>Max Biomass</i> . . . . .	11
2.4.2.2. <i>Max ATP</i> . . . . .	11
2.4.2.3. <i>Min/Max Redox Potential</i> . . . . .	11
2.4.2.4. <i>Min ATP Production</i> . . . . .	11
2.4.2.5. <i>Max ATP Production</i> . . . . .	12
2.5. Redes de regulación transcripcional . . . . .	12
2.5.1. Cofactores y regulación transcripcional . . . . .	12
2.5.2. TFs <i>Escherichia coli</i> . . . . .	13
2.5.2.1. FNR . . . . .	14
2.5.2.2. ArcAB . . . . .	15

2.6.	Metabolismo redox . . . . .	16
2.6.1.	Estrategias de modificación del metabolismo redox . . . . .	17
2.6.1.1.	Eliminación o <i>knock-down</i> de vías competitivas de cofactores redox . . . . .	17
2.6.1.2.	Introducción de reacciones de generación de cofactores redox . . . . .	18
2.6.1.3.	Reacciones directas de reducción/oxidación entre NAD y NADP . . . . .	18
<b>3.</b>	<b>Metodología</b>	<b>19</b>
3.1.	Materiales . . . . .	19
3.1.1.	Modelo a Escala Genómica: <i>iML1515 E. coli</i> K-12 . . . . .	19
3.1.2.	Red Transcripcional . . . . .	20
3.2.	Métodos . . . . .	20
3.2.1.	Simulación Metabólica . . . . .	20
3.2.1.1.	Condiciones de Fermentación Anaerobia . . . . .	20
3.2.1.2.	Medio de Cultivo . . . . .	21
3.2.1.3.	Flujos Medio de Cultivo . . . . .	23
3.2.1.4.	Fuente de Carbono . . . . .	23
3.2.1.5.	Sistema EET . . . . .	23
3.2.1.6.	Modelos . . . . .	24
3.2.1.7.	Funciones Objetivo . . . . .	24
3.2.1.8.	<i>Deletions</i> y <i>Knockouts</i> . . . . .	25
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>26</b>
4.1.	Simulación Red Metabólica . . . . .	26
4.1.1.	Validación del modelo <i>iML1515</i> . . . . .	26
4.1.2.	Perfiles de Secreción . . . . .	27
4.1.3.	<i>Input</i> de Electrones . . . . .	29
4.1.4.	Producción de ATP . . . . .	30
4.1.5.	Estrategia de Optimización de Etanol: <i>pflA</i> , <i>ldhA</i> y <i>frdBC</i> . . . . .	31
<b>5.</b>	<b>Discusión</b>	<b>32</b>
5.1.	Transhidrogenasas y NADPH . . . . .	32
5.2.	Electrogenética . . . . .	33
5.2.1.	Sobreexpresión del regulador ArcA . . . . .	33
5.3.	Cofactores redox no canónicos y circuitos ortogonales . . . . .	34
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>36</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>38</b>
<b>Anexo A.</b>	<b>Resultados: perfiles de secreción de simulaciones <i>in silico</i></b>	<b>46</b>
A.1.	Electrosíntesis con glucosa . . . . .	46
A.1.1.	Caso Base . . . . .	46
A.1.2.	Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	47
A.1.3.	Modelo <i>iML1515_NADH</i> . . . . .	47
A.1.4.	Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	48
A.2.	Electrosíntesis con glucosa y CO <sub>2</sub> libre . . . . .	48
A.2.1.	Caso Base . . . . .	48

A.2.2. Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	49
A.2.3. Modelo <i>iML1515_NADH</i> . . . . .	49
A.2.4. Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	50
<b>Anexo B. Resultados: consumo de ATP de simulaciones <i>in silico</i></b>	<b>51</b>
B.1. Electrosíntesis con glucosa . . . . .	51
B.1.1. Caso Base . . . . .	51
B.1.2. Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	52
B.1.3. Modelo <i>iML1515_NADH</i> . . . . .	52
B.1.4. Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	53
B.2. Electrosíntesis con glucosa y CO <sub>2</sub> libre . . . . .	53
B.2.1. Caso Base . . . . .	53
B.2.2. Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	54
B.2.3. Modelo <i>iML1515_NADH</i> . . . . .	54
B.2.4. Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	55
<b>Anexo C. Resultados: <i>knockouts</i></b>	<b>56</b>
C.1. <i>pflA knockouts</i> . . . . .	56
C.1.1. Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	56
C.1.1.1. <i>In silico Electrosynthesis Glucose Simulation</i> . . . . .	57
C.1.1.2. <i>In silico Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation</i> .	58
C.1.2. Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	59
C.1.2.1. <i>In silico Electrosynthesis Glucose Simulation</i> . . . . .	59
C.1.2.2. <i>In silico Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation</i> .	60
C.2. <i>ldhA knockouts</i> . . . . .	61
C.2.1. Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	61
C.2.1.1. <i>In silico Electrosynthesis Glucose Simulation</i> . . . . .	61
C.2.1.2. <i>In silico Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation</i> .	62
C.2.2. Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	63
C.2.2.1. <i>In silico Electrosynthesis Glucose Simulation</i> . . . . .	63
C.2.2.2. <i>In silico Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation</i> .	64
C.3. <i>ldhA &amp; pflA knockouts</i> . . . . .	65
C.3.1. Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	65
C.3.1.1. <i>In silico Electrosynthesis Glucose Simulation</i> . . . . .	65
C.3.1.2. <i>In silico Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation</i> .	66
C.3.2. Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	67
C.3.2.1. <i>In silico Electrosynthesis Glucose Simulation</i> . . . . .	67
C.3.2.2. <i>In silico Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation</i> .	68
C.4. <i>frdBC knockouts</i> . . . . .	69
C.4.1. Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	69
C.4.1.1. <i>In silico Electrosynthesis Glucose Simulation</i> . . . . .	69
C.4.1.2. <i>In silico Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation</i> .	70
C.4.2. Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	71
C.4.2.1. <i>In silico Electrosynthesis Glucose Simulation</i> . . . . .	71
C.4.2.2. <i>In silico Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation</i> .	72
<b>Anexo D. GPR del set de reacciones involucradas en el <i>knockout</i> de los genes <i>ldhA</i>, <i>pflA</i> y <i>frdBC</i></b>	<b>73</b>

D.1. Gen <i>pflA</i> . . . . .	73
D.1.1. Piruvato Formiato Liasa - PFL . . . . .	73
D.1.2. 2-Oxobutanoato Formiato Liasa - OBTFLL . . . . .	73
D.2. Gen <i>ldhA</i> . . . . .	73
D.2.1. D-lactato Deshidrogenasa - LDH_D . . . . .	73
D.3. Gen <i>frdBC</i> . . . . .	74
D.3.1. Fumarato Reductasa - FRD2 . . . . .	74
D.3.2. Fumarato Reductasa - FRD3 . . . . .	74
<b>Anexo E. Código: creación modelos <i>iML1515_NADPH</i>, <i>NADH</i> y <i>Dual</i></b>	<b>75</b>
E.1. Configuración medio de cultivo, condiciones anaeróbicas e incorporación de electrones . . . . .	75
E.2. Modelo <i>iML1515_NADPH</i> . . . . .	77
E.3. Modelo <i>iML1515_NADH</i> . . . . .	77
E.4. Modelo <i>iML1515_Dual</i> . . . . .	78
<b>Anexo F. Código: simulaciones <i>in silico</i></b>	<b>79</b>
F.1. Carga del modelo, funciones de visualización y configuración de funciones objetivo . . . . .	79
F.2. Optimización: <i>Biomass Growth</i> y Diagrama Escher . . . . .	80
F.3. Optimización: <i>Max ATP Production</i> . . . . .	81
<b>Anexo G. Código: <i>knockouts pflA</i>, <i>ldhA</i> y <i>frdBC</i></b>	<b>82</b>
G.1. Establecimiento de modelos y <i>knockouts</i> . . . . .	82
G.2. Optimización y <i>summary</i> . . . . .	83
<b>Anexo H. Composición medio LB</b>	<b>84</b>
<b>Anexo I. Magnitudes de los flujos del medio de cultivo a través de la función <i>minimal_medium</i></b>	<b>87</b>

# Índice de Tablas

3.1.	Composición medio LB considerado para el desarrollo experimental <i>in silico</i> .	21
4.1.	Aumento del rendimiento de productos secretados del modelo <i>iML1515_NADPH</i> con respecto al caso base e independiente de la configuración de ingesta de carbono.	28
4.2.	Aumento del rendimiento de productos secretados del modelo <i>iML1515_Dual</i> con respecto al caso base y una alimentación permisiva de CO <sub>2</sub> referente a la ingesta de carbono. . . . .	28
H.1.	Composición medio LB propuesta por Marinos, Kaleta y Waschina (2020) [83]. Las <i>sources</i> pueden corresponder a BD Bionutrients Technical Manual - Advanced Bioprocessing 4th Edition, PMID: 13949853, PMID: 17905994, Bionumbers 114108, FoodData Central/Yeast (Survey (FNDDS), 343391), <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118198511.ch13400">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118198511.ch13400</a> (SARWAR et al.) . . . . .	84

# Índice de Ilustraciones

2.1.	Sistema de transferencia de electrones extracelular de <i>S. oneidensis</i> introducido en <i>E. coli</i> [23]. . . . .	7
2.2.	Interacciones transcripcionales de los principales TFs en la red regulatoria transcripcional de <i>E. coli</i> [59]. . . . .	14
3.1.	Esquema de desarrollo y principales parámetros del modelo metabólico <i>iML1515</i> [52]. . . . .	19
3.2.	Modulos regulatorios funcionales de la red transcripcional [56]. . . . .	20
3.3.	Esquema resumen del proceso de fermentacion anaerobia en <i>E. coli</i> [82]. . . . .	20
4.1.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515</i> bajo un proceso de fermentación anaerobia con <i>uptake</i> máximo de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa. . . . .	26
4.2.	Diagrama Escher de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo caso base <i>iML1515</i> , bajo un proceso de fermentación anaerobia con <i>uptake</i> máximo de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa. . . . .	27
4.3.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	27
4.4.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	28
4.5.	Distribución de recursos redox a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	29
4.6.	Distribución de recursos redox a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	29
4.7.	Producción de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	30
4.8.	Evaluación de la función objetivo <i>Max ATP Production</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	30
4.9.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> con <i>knockout</i> del gen <i>frdBC</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	31

4.10.	Rendimiento con respecto al caso base del <i>knockout</i> del gen <i>frdBC</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	31
A.1.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515</i> , bajo un proceso de fermentación anaerobia con <i>uptake</i> máximo de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa. . . . .	46
A.2.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	47
A.3.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	47
A.4.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	48
A.5.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515</i> , bajo un proceso de fermentación anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	48
A.6.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	49
A.7.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	49
A.8.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	50
B.1.	Producción y consumo de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	51
B.2.	Producción y consumo de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	52
B.3.	Producción y consumo de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_NADH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	52
B.4.	Producción y consumo de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	53
B.5.	Producción y consumo de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515</i> bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	53

B.6.	Producción y consumo de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	54
B.7.	Producción y consumo de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_NADH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	54
B.8.	Producción y consumo de recursos energéticos a partir del <i>input</i> de electrones, modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	55
C.1.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> del gen <i>plfA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	57
C.2.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> del gen <i>plfA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	58
C.3.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> del gen <i>plfA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	59
C.4.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> del gen <i>plfA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	60
C.5.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> del gen <i>ldhA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	61
C.6.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> del gen <i>ldhA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	62
C.7.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> del gen <i>ldhA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	63
C.8.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> del gen <i>ldhA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO <sub>2</sub> libre. . . . .	64

C.9.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> de los genes <i>ldhA</i> & <i>pflA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	65
C.10.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADPH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> de los genes <i>ldhA</i> & <i>pflA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y $CO_2$ libre. . . . .	66
C.11.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> de los genes <i>ldhA</i> & <i>pflA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones. . . . .	67
C.12.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_Dual</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y <i>knockout</i> de los genes <i>ldhA</i> & <i>pflA</i> con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y $CO_2$ libre. . . . .	68
C.13.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y $CO_2$ libre. . . . .	69
C.14.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y $CO_2$ libre. . . . .	70
C.15.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y $CO_2$ libre. . . . .	71
C.16.	Perfil <i>in silico</i> de secreción de productos de <i>E. coli</i> , modelo <i>iML1515_NADH</i> , bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con <i>uptakes</i> máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y $CO_2$ libre. . . . .	72
D.1.	Relaciones booleanas (GPR) de la reacción PFL afectada por el <i>knockout</i> del gen <i>pflA</i> . . . . .	73
D.2.	Relaciones booleanas (GPR) de la reacción OBTF1 afectada por el <i>knockout</i> del gen <i>pflA</i> . . . . .	73
D.3.	Relaciones booleanas (GPR) de la reacción $LDH_D$ afectada por el <i>knockout</i> del gen <i>ldhA</i> . . . . .	73
D.4.	Relaciones booleanas (GPR) de la reacción FRD2 afectada por el <i>knockout</i> del gen <i>frdBC</i> . . . . .	74
D.5.	Relaciones booleanas (GPR) de la reacción FRD3 afectada por el <i>knockout</i> del gen <i>frdBC</i> . . . . .	74
I.1.	Flujos de metabolitos bajo unidades de [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] calculados a través del código E.1 para un crecimiento de biomasa de 0.19 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ]. . .	87

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Contexto

Los cofactores son compuestos no proteicos o iones metálicos necesario para funciones biológicas y actividades catalíticas de casi todas las enzimas dentro de cualquier organismo. Se encargan de promover desde transformaciones bioquímicas hasta asistir en muchas reacciones desfavorables termodinámicamente [1]. En ese sentido, cumplen un rol fundamental al influir directamente en la expresión y regulación de las diferentes vías metabólicas, determinando así, utilidades y capacidades máximas asociadas a sustratos específicos y síntesis de productos objetivos en las diferentes plataformas biológicas [8].

Dentro de los distintos tipos de cofactores, se encuentran la nicotinamida adenina dinucleótido y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, conocidas como cofactores redox. Estas, existen en forma oxidada ( $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ ) y reducida ( $\text{NADH}/\text{NADPH}$ ), las cuales están generalmente asociadas a reacciones metabólicas y sintéticas como receptores o donadores de electrones, respectivamente. A pesar de su similar químico y estructural, se involucran en procesos metabólicos y cumplen funciones bioquímicas bastante diferentes dentro de los diversos sistemas microbianos [1, 9].

Referente a su origen,  $\text{NADH}$  es principalmente generada a partir de la glicólisis y del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA, por sus siglas en inglés *Tricarboxylic Acid Cycle*), mientras que la vía oxidativa de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés *Pentose Phosphate Pathway*) es considerada como la ruta primordial de generación de  $\text{NADPH}$ . Sumado a esto, en relación a su funcionalidad, dependiendo de la enzima, el microorganismo y su ambiente, tanto  $\text{NADH}$  como  $\text{NADPH}$  participan en distintas reacciones de reducción anabólica y catabólica. Así, pueden verse involucrados en procesos tan importantes como en la fosforilación oxidativa del adenosín difosfato (ADP) a adenosín trifosfato (ATP), mediante la cadena respiratoria aeróbica [1, 10]. En consecuencia, no solo son esenciales para los procesos celulares, sino que también desempeñan un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular [2].

A partir de lo anterior, es que los estados celulares redox se pueden expresar y cuantificar como las razones  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ , y son generalmente sostenidos por intrincadas redes con múltiples reacciones de óxido-reducción. De este modo, al enfrentar perturbaciones, los microorganismos ajustarán sus flujos metabólicos hasta alcanzar el balance

intracelular redox. A este respecto, en muchos casos el metabolismo redox surge como cuello de botella más allá de las deficiencias enzimáticas que dificultan vías metabólicas específicas [1, 2]. Por consiguiente, para propósitos industriales, muchos esfuerzos de la ingeniería metabólica hacia la utilización de sustratos específicos o síntesis de compuestos diana, se ha realizado en microorganismos a través de la modificación o introducción de vías metabólicas que involucran reacciones redox. Sin embargo, tales cambios en la célula casi siempre inducen un desequilibrio redox, el cual podría disminuir dramáticamente el rendimiento de crecimiento y capacidad biosintética de los microorganismos modificados [1, 8]. Por ende, el incremento, transformaciones y nuevas tecnologías relacionadas con el aumento y regulación de la razón de los cofactores NAD y NADP, podrían permitir el escalamiento de procesos característicos de laboratorio a un campo industrial y, además, aumentar los rendimientos de las vías metabólicas, eliminar requerimientos de oxígeno o incluso mejorar los niveles de metabolitos en estado estacionario [2, 8, 11].

## 1.2. Motivación

Muchos microorganismos procariontes son capaces de interactuar de forma extracelular con electrodos, ya sean ánodos o cátodos, utilizándolos como fuentesceptoras o donantes de electrones para reacciones metabólicas [6]. Estos, comúnmente conocidos como organismos exoelectrógenos, se caracterizan por ser activos electroquímicamente, cuyos mayores exponentes, a nivel de investigación, corresponden a las proteobacterias *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis* [12–14]. De esta forma, es que se han desarrollado diversas herramientas asociadas a la interacción exoelectrogénica destacando dentro de sistemas bioelectroquímicos (BESs, *Bioelectrochemical Systems*) y de pilas de combustible microbiano (MFC, *Microbial Fuel Cell*), tecnologías como la electrosíntesis microbiana (MES, *Microbial Electrosynthesis*) y la electrofermentación (EF, *Electro-Fermentation*) [3, 4].

En relación a la MES, esta atañe la utilización de la interacción célula-electrodo para dirigir el metabolismo microbiano hacia una producción incrementada de químicos y combustibles. Es decir, se genera un *input/output* energético extra que es usado para optimizar el metabolismo celular redox y, por lo tanto, incrementar la producción del compuesto de interés mientras que se minimiza la generación de productos secundarios [5]. Del mismo modo, la EF, bajo el mismo principio de acción, amplía su rango de aplicación al incluir sistemas biológicos que utilizan fuentes de carbono alternativas al CO<sub>2</sub> (fuentes renovables y materias primas orgánicas). De hecho, procariontes gram positivas como, por ejemplo, aquellas del género *Clostridium*, y eucariotas como hongos y algas verdes, también han sido usadas exitosamente en sistemas MFC para la producción química y de carburantes [3, 6, 15].

Por consiguiente, es que sistemas MES y EF se posicionan como favoritos en cuanto a herramientas que permiten superar las limitantes asociadas a los cofactores redox, ya que el *input/output* de electrones generado posibilita el aumento y regulación de la razón entre sus formas oxidadas/reducidas. Sin embargo, a pesar del gran auge por el desarrollo de estas técnicas, aún se desconoce de forma minuciosa la interacción genética, transcripcional y metabólica asociada a estas tecnologías. En consecuencia, los dos grandes obstáculos a superar para generar un proceso de relevancia industrial, radican en la baja razón de transferencia de electrones entre los electrodos y los microorganismos empleados, además del bajo valor de productos químicos generados [6, 7].

A partir de lo anterior, es que el trabajo de título propuesto involucra la generación de un modelo metabólico y un análisis de estrategias transcripcionales para el microorganismo *E. coli* bajo condiciones de electrofermentación. Esto, en virtud de identificar y relacionar genes asociados al metabolismo redox e interacción exoelectrogénica con hipótesis del incremento del poder reductor y la generación de productos de alto valor agregado. Así, la sinergia entre un modelo metabólico y redes de factores de transcripción, podrían aportar conocimiento a la regulación entre genes y generación de metabolitos definiendo, de esta manera, el comportamiento y maquinaria necesaria para la optimización y adaptación bajo condiciones de producción de electrofermentación para futuros procesos de validación experimental.

# Capítulo 2

## Marco Teórico

### 2.1. Organismos Exoelectrógenos

Los organismos exoelectrógenos corresponden a cierto tipo de bacterias, arqueas y eucariotas, con vías características de transferencia de electrones extracelulares (EET, *Extracellular Electron Transfer*), capaces de transmitir energía entre depósitos energéticos químicos de la célula y sólidos exógenos, y viceversa, mediante la ocurrencia de reacciones redox [16]. Es decir, dicha interacción electrónica se basa en la reducción y/u oxidación de *carriers* energéticos intracelulares o minerales extracelulares, que pueden o no presentar cierto nivel de movilidad transmembranal. Es así como, dentro de su novedosa aplicación en los procesos de electrofermentación, se encuentran organismos como *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis* y *Escherichia coli* recombinante, asociados a la generación de energía mediante celdas electroquímicas, producción de combustibles y productos químicos a través de fermentación mejorada o electrosíntesis, entre otros [5, 17].

#### 2.1.1. *Geobacter sulfurreducens*

*Geobacter sulfurreducens* como bacteria exoelectrogénica modelo es capaz de formar gruesas biopelículas conductoras sobre la superficie del electrodo y, es por lo tanto, apta para generar altas tasas de transferencia de corriente. En ese sentido, ciertos estudios vinculan su alta capacidad electroquímica con el grosor de la biopelícula o la cantidad total de biomasa a través de una correlación positiva [18]. Referente a procesos bioelectroquímicos, *G. sulfurreducens* puede oxidar completamente moléculas donantes de electrones usando únicamente un electrodo como aceptor de electrones, transferir cuantitativamente electrones a electrodos en ausencia de mediadores y, dado la densidad celular dispuesta sobre el electrodo, es capaz de alcanzar velocidades de transporte de electrones hacia el electrodo similares a aquellas observadas en el transporte de electrones hacia el citrato férrico (III) [19].

#### 2.1.2. *Shewanella oneidensis*

*Shewanella oneidensis* es una bacteria facultativamente anaeróbica que acopla la oxidación del carbono con el flujo del proceso de transferencia de electrones extracelular. Este último, catalogado como *target* común de modificaciones sintéticas debido a las características de crecimiento y trazabilidad genética favorables de la bacteria. Su ruta de transferencia electrónica primaria se realiza mediante el conducto proteico CymA/MtrCAB, el cual comprende

una red de citocromos c de membrana periplasmática o exterior que conecta el metabolismo de carbono con la reducción de sustratos inorgánicos. De este modo, en ausencia de oxígeno, la EET facilita la respiración sobre especies metálicas relevantes tecnológicamente, como por ejemplo, Fe(III), Mn(IV) y Pd(II) [20].

### 2.1.3. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria modelo típica, inactiva eléctricamente, que ha sido ampliamente utilizada para la síntesis de variados compuestos químicos [21]. Es así como, incorporando sus aplicaciones en sistemas bioelectroquímicos para la producción de compuestos de interés, se podría ampliar el espectro de sustratos y productos limitados en microorganismos bacterianos activos electroquímicamente (EAB, por sus siglas en inglés *Electrochemically Active Bacteria*) [22, 23]. De este modo, muchas sofisticadas herramientas moleculares y de síntesis biológicas estarían disponibles para modificar sistemas genéticos. Además, utilizar *E. coli* con un conocimiento claro respecto a sus antecedentes genéticos facilitaría la comprensión del proceso de transferencia de electrones a nivel molecular [22].

## 2.2. Transferencia de Electrones Extracelulares

A partir del estudio de los microorganismos modelos para los procesos de electrofermentación (*G. sulfurreducens* y *S. oneidensis*) es que se conocen distintos modos de transferencia de electrones. Estos, desempeñan un rol importante al estar relacionados con la generación de moléculas energéticas y, por ende, con los distintos procesos de óxido-reducción celulares [24]. De esta manera, es que los diferentes tipos de transferencia de electrones extracelular se dividen ampliamente en aquellos de contacto directo e indirecto, pudiendo diferenciar también dentro de estos, de acuerdo al elemento de interacción [24].

### 2.2.1. Contacto Directo

Los mecanismos directos ocurren a través de una interacción inmediata entre la bacteria exoelectrogénica y una interfaz de electrodos o metales sin involucrar ningún compuesto redox disociativo. Este tipo de interacción puede ser llevada a cabo por diferentes elementos celulares como citocromos, *nanowires* o alguna proteína redox dependiendo del microorganismo [25]. De esta forma, a modo general, es que se pueden identificar tres mecanismos explicados a continuación:

#### 2.2.1.1. Proteínas de Membrana

Principalmente corresponden a proteínas de citocromos expuesta en la superficie celular, cuya prevalencia en las vías de transferencia de electrones las cataloga como las responsables por, ya sea la entrega o consumo de electrones. Es así como, para los microorganismos modelos *G. sulfurreducens* y *S. oneidensis*, son las proteínas de transmembrana citocromo de tipo c las encargadas de ejecutar el proceso de transferencia. De esta forma, en *S. oneidensis*, los electrones provenientes de la oxidación del carbono son incorporados al *pool* quinona, el cual es oxidado por la acción de la proteína deshidrogenasa CymA de membrana interna. En consecuencia, esta última entrega los electrones al complejo ternario MtrABC mediante las proteínas FccA y STC, transmitiendo su disposición energética dentro del periplasma.

Análogamente, los compuestos quinoles también son catalizados para obtener electrones a partir de los citocromos ImCH y CbcL en *G. sulfurreducens*, para luego ser capturados por citocromos periplasmáticos PpcA y transportados hacia el complejo de citocromos OmaB-OmbB-OmcB [25].

#### 2.2.1.2. *Nanowires*

A pesar de que en superficies minerales o de electrodos los electrones pueden ser transportados mediante procesos respiratorios en un complejo celular tipo *biofilm*, únicamente en el espacio entre la capa de este y la superficie es que también se puede establecer un mecanismo de contacto directo. Es decir, como *G. sulfurreducens*, muchos exoelectrógenos pueden producir un pili tipo IV compuesto por las proteínas PilA y el citocromo hexa-hemo polimerizado OmcS, relacionadas con la transferencia directa a larga distancia ( $>10 \mu\text{m}$ ) [26, 27]. Por otro lado, para *S. oneidensis*, los *nanowires* son extensiones de la membrana externa que pueden establecer EET directa mediante los citocromos MtrABC y OmcA [28].

#### 2.2.1.3. **Proteínas Redox**

Muchos otros organismos exoelectrógenos utilizan proteínas redox de producción endógena para realizar procesos de transferencia directa. A modo de ejemplo, algunos acetógenos y metanógenos utilizan la molécula NADH de unión a la membrana, que mediante complejos de ferredoxina oxidoreductasa promueve el transporte de electrones y, a través de una bomba de iones redox, la generación de gradientes de protones [25]. Por otro lado, microorganismos como el *Methanococcus maripaludis*, han podido producir hidrogenasas y formato deshidrogenasas acopladas en la superficie capaces de influir en el consumo de electrones [25, 29].

### 2.2.2. **Contacto Indirecto**

Los mecanismos indirectos son llevados a cabo por compuestos químicos difusibles con actividad redox denominados cofactores o *electron shuttles*, capaces de establecer la transferencia de electrones desde metales insolubles intracelulares o electrodos en organismos exoelectrógenos. Estos, incluyen principalmente a aquellas pequeñas moléculas redox de célula autosecretadas, mediadores redox artificiales y metabolitos primarios [25].

#### 2.2.2.1. **Moléculas Autosecretadas**

Corresponden a aquellas moléculas como los mononucleotidos de flavina y riboflavina, en la especie *Shewanella*, que son secretadas y utilizadas para transportar electrones hacia óxidos metálicos o ánodos [30]. Estas, obtienen los electrones a partir de los citocromos tipo c y, una vez transferidos, pueden ser nuevamente reducidas por citocromos de la membrana externa. Cabe destacar que muchas veces no solo cumplen un rol de *electron shuttle* sino también de cofactor de unión de los mismos citocromos, generando así, una sinergia que conduce a una cinética de acción mejorada [31, 32]. Por otro lado, moléculas como la piocianina, fenazina-1-carboxilato, fenazina-1-carboxamida y 1-hidroxifenazina también han sido capaces de establecer procesos de transferencia de electrones en especies *Pseudomonas* [33].

### 2.2.2.2. Mediadores Redox Artificiales

Este tipo de mediadores, puede considerar el uso de moléculas biológicas y sintéticas exógenas al microorganismo, cuya incorporación al medio extracelular puede favorecer el proceso de transferencia de electrones o ser parte de un sistema de implementación en organismos no exoelectrógenos. Así, se pueden encontrar moléculas como *neutral red*, *methyl viologen*, antraquinona-2, 6-disulfonato, ferricianuro de potasio y polímeros fosfolipídicos sintetizados artificialmente capaces de entablar un sistema de transferencia [34, 35]. No obstante, aunque dichos mediadores ejecutan un rol análogo en los sistemas de transferencia de electrones, los mecanismos podrían diferir en relación a los endógenos. En ese sentido, la variación en los mecanismos se puede deber a muchos factores como lo son la estructura espacial molecular, polaridad y facilidad en la disociación [36].

### 2.2.2.3. Metabolitos Primarios

Los mediadores, como metabolitos primarios, son aquellos producidos o consumidos de forma electroquímica por microorganismos para generar una variación en la transferencia de electrones mediada [34]. Es así como,  $H_2$  y formiato, pueden ser generados en la vecindad de los electrodos y utilizados como donantes de electrones para procesos de electrosíntesis microbiana [37, 38]. Para organismos acetógenos y metanógenos,  $H_2$  corresponde al donante de electrones preferido bajo condiciones de crecimiento autotrófico [39, 40].

## 2.2.3. Transferencia de Electrones Extracelular en *Escherichia coli* cepa JG622

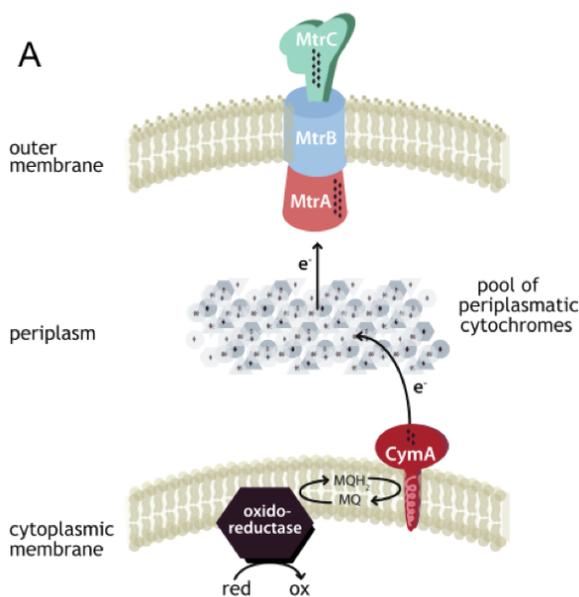


Figura 2.1: Sistema de transferencia de electrones extracelular de *S. oneidensis* introducido en *E. coli* [23].

La cepa JG622 fue desarrollada con el objetivo de exhibir una bacteria *E. coli* con una capacidad mejorada para realizar procesos de transferencia de electrones mediada por *electron shuttles* sobre la superficie de un electrodo (EET indirecta). En ese sentido, en primera instancia, se basaron en la cepa JG146 (Figura 2.1) caracterizada por poseer un operón que codifica para los genes *cymA* y *mtrA* de *S. oneidensis* bajo el control de un promotor de tetraciclina. Es decir, la bacteria era capaz de expresar tanto citocromos CymA tetrahema de tipo c como aquellos periplásmicos MtrA, relacionados con la dirección de electrones desde el conjunto de menaquinol hacia varias reductasas del periplasma y la participación en la respiración del hierro y del ánodo. Posteriormente, la cepa fue modificada por la delección del conjunto de genes que codifican para las proteínas fumarato y nitrato deshidrogenasa periplásmica, *frdA-D* y *napC-F* respectivamente, debido al símil en la funcionalidad enzimática entre NapC y CymA, y dado

que otra molécula como el fumarato capaz de ser un aceptor de electrones podría interferir en el sistema de transferencia extracelular a implementar [41]. Sumado a esto, la realización de experimentos de expresión de diferentes citocromos *c* bajo condiciones reductoras de hierro férrico en *S. oneidensis*, permitió la identificación de 12 proteínas involucradas en la interacción con el electrodo. De este modo, ejecuciones experimentales de bacterias transformadas por plásmidos con uno de los 12 citocromos encontrados, permitió identificar aquel pequeño citocromo tetrahemo SCT cuya expresión resultó en un incremento del 183 % de interacción con respecto a la cepa *wild type*. Finalmente, SCT fue integrado al genoma de *E. coli* JG146 resultando en la cepa mejorada JG622, la cual exhibe un 78 % de incremento en la interacción en relación a la cepa *wild type* y un 20 % referente a la cepa JG146 base [23].

## 2.3. Electrofermentación

### 2.3.1. Fermentación No Balanceada

Dentro del proceso de electrofermentación, la fermentación no balanceada es aquella en donde los microorganismos mantienen un balance redox intracelular y alcanzan una producción de compuestos químicos tanto continua como eficiente. Para esto, es que se utilizan los mecanismos de transferencia de electrones para conducir el exceso electrónico hacia un electrodo (ánodo), a modo de disminuir la generación de productos secundarios y mantener un estado redox constante. Es importante señalar que, en conjunto con el proceso de electrofermentación, la modificación genética de las vías metabólicas es una herramienta fundamental al momento de obtener mejores resultados. De este modo, basado en los mecanismos de transferencia de electrones, es que la fermentación no balanceada también puede ser dividida en aquella de tipo directo e indirecto.

#### 2.3.1.1. Fermentación No Balanceada Directa

Tipo de fermentación basada en los mecanismos nativos de los organismos electroactivos modelos, las especies *Geobacter* y *Shewanella*, que pueden establecer contacto directo con el electrodo mediante estructuras tipo pili y citocromos. De este modo, se libera el exceso de electrones generado por el metabolismo intracelular facilitando la mantención de las condiciones redox. Es así como, proporcionando un ánodo como sumidero de electrones, se puede llegar a eliminar las limitantes redox, cambiar el sentido de reacciones no balanceadas y desacoplar el equilibrio entre electrones y carbono. Por otro lado, cabe resaltar que la estrategia de implementar un sistema de consorcio microbiano como, por ejemplo, entre las bacterias *Clostridium cellobioparum* y *G. sulfurreducens*, incrementa notablemente la eficiencia del proceso de fermentación no balanceada. Lo anterior, ya que cada microorganismo aporta con un proceso complementario, en este caso en particular, *C. cellobioparum* proporciona como productos secundarios lactato y acetato, los cuales son aprovechados por *G. sulfurreducens* para la generación de electrones y la mantención del sistema electroquímico.

#### 2.3.1.2. Fermentación No Balanceada Indirecta

En este tipo de fermentación, la introducción de varios mediadores exógenos en el proceso de transferencia de electrones acelera el flujo de electrones y la generación de productos mas específicos. Asimismo, el uso de mediadores no debe ser exclusivamente como de *electron*

*shuttle*, sino que también se han presentado investigaciones donde cumplen mas bien un rol de surfactante en relaciona a la permeabilidad de la membrana, y de coadyuvante en el proceso de transporte de las moléculas involucradas en la transferencia de electrones. Así se demuestra en la introducción del mediador Tween 80 dentro del sistema bioelectroquímico inoculado por la bacteria *Zymomonas mobilis*, en donde se consigue acelerar de forma simultanea la generación eléctrica y la producción de etanol.

### 2.3.2. Electrosíntesis Microbiana

La electrosíntesis microbiana es el mecanismo por el cual un organismo exoelectrógeno realiza la conversión de un *input* de electrones provenientes de una fuente catódica a equivalentes reducidos (NADH, NADPH, entre otros). Su objetivo consiste en la utilización de esa fuente energética para la reducción de sustratos orgánicos (glucosa, glicerol, fumarato, CO<sub>2</sub>, entre otros) a compuestos químicos mejorados o de mayor valor agregado. Al igual que en la fermentación no balanceada, los mecanismos por el cual los electrones son consumidos para el metabolismo celular o síntesis química se basan en dos fenómenos de transferencia de electrones extracelular distintos; es decir, referente a una transferencia directa, o indirecta a través de mediadores exógenos o metabolitos primarios.

## 2.4. Modelos Metabólicos a Escala Genómica

Los enfoques basados en modelos *in silico*, han sido cada vez más empleados para guiar la ingeniería metabólica en los últimos años. La mayoría de estos estudios han utilizado como perspectiva un modelado de estado estable simple y extensible, modelo basado en restricciones (CBM, por sus siglas en inglés *Constraint-based Modeling*), el cual puede simular los fenotipos celulares en términos de flujos metabólicos con solo la información de la estequiometría de reacción y el balance de masa de los modelos metabólicos subyacentes. A modo de resultados, se obtienen modelos metabólicos a escala genómica (GEMs, por sus siglas en inglés *Genome-scale Metabolic Models*) que permiten experimentar y proponer nuevas hipótesis sobre las funciones metabólicas en un organismo de interés [42].

La versión más comúnmente aplicada del CBM corresponde al análisis de balance de flujos (FBA, por sus siglas en inglés *flux balance analysis*), cuyo desarrollo abarca desde GEMs hasta una amplia gama de aplicaciones y formulaciones computacionales. Este tipo de herramienta mantiene las premisas de optimalidad y estado estacionario a pesar de conocer su inexactitud desde una perspectiva bioquímica. Sin embargo, estas pierden relevancia al ser la mayoría de las representaciones sistemas lineales y, en menor grado convexos, fácilmente resueltos con métodos y *software* estándar. En consecuencia, con un alto grado de precisión, modelos FBA pueden identificar genes esenciales, predecir respuestas metabólicas con interrupción de vías, determinar rutas metabólicas centrales, desarrollar estrategias de ingeniería sintética, así como identificar genes relacionados a la inhibición en la migración del cáncer [43].

Generalmente, el FBA se desarrolla a partir del cómputo del crecimiento celular máximo en diferentes condiciones ambientales. Así, las reacciones de biomasa se maximizan para cuantificar la distribución de flujos internos. En consecuencia, de forma matemática, el problema de optimización para maximizar el flujo de biomasa sujeto a la estequiometría y limitaciones de capacidad puede ser representado como se muestra en la Ecuación 2.1 [42, 44].

$$\max v_{biomasa}$$

$$s.t. \sum S_{ij}v_j = 0 \quad \forall \text{ metabolito } i \quad (2.1)$$

$$v_j^{min} \leq v_j \leq v_j^{max}$$

Donde  $S_{ij}$  es la matriz estequiométrica,  $v_j$  es el flujo a través de la reacción  $j$ , y  $v_j^{min}$  y  $v_j^{max}$  son los posibles límites de  $v_j$ , respectivamente.

De forma específica para este trabajo de título, se utilizaron modelos base de *E. coli* K-12 o DH5 $\alpha$  obtenidos a través del repositorio metabólico de datos BiGG Models. De este modo, el modelo para la cepa JG622 esta basado mediante una construcción sistemática usando anotación genómica, conjunto de datos ómicos y conocimientos publicados. A modo de ejemplo, el modelo para *E. coli* DH5 $\alpha$  puede alcanzar un *performance* con 1951 metabolitos, 2779 reacciones y 1368 genes [45].

### 2.4.1. Modelo Base *E. coli* K-12

El análisis computacional de datos biológicos se está volviendo cada vez más importante, especialmente en esta era de *big data*. En ese sentido, la manipulación de datos biológicos permite obtener de manera eficiente conocimientos biológicos para referencias dadas y, a veces, incluso contraintuitivos que pueden desafiar el conocimiento existente [46]. Así es como, durante los últimos 12 años, el conocimiento base de BiGG Model se ha posicionado como un repositorio centralizado para modelos metabólicos de escala genómica de alta calidad [47]. De este modo, en conjunto con una creciente disponibilidad de recursos computacionales *user-friendly* como Jupyter Notebook, Anaconda, Google Colaboratory, Python y su paquete COBRApy, se han podido desarrollar más de 1000 GEMS asociados al estudio del microorganismo *E. coli* para su simulación *in silico* ya sea como plataforma de producción sintética de compuestos de alto valor industrial, hasta la evaluación de su razón de crecimiento bajo distintas fuentes de carbono [46, 48].

Hoy en día, en la base de datos de BiGG Models existen alrededor de 9 GEMs asociadas a la representación de *E. coli strain* K-12. La mayoría corresponde a la *substrain* MG1655, no obstante también se encuentran aquellas de *substrain* W3110 y DH10B. Todas se caracterizan por ser modelos altamente precisos pero que difieren, como es el caso entre las *substrains* MG1655 y W3110, en 267 sitios nucleotídicos con 251 inserciones o deleciones cortas, en su mayoría de un solo nucleótido o sustituciones de bases, además de 13 sitios con un elemento de secuencia de inserción o profago defectuoso en solo una cepa y dos sitios para la inversión W3110 [49]. De este modo, es que se ha podido establecer experimentaciones *in silico* a través de modificación de las GEMs añadiendo vías enzimáticas exógenas, como es el caso de la incorporación de enzimas relacionadas con la biosíntesis de ácido hialurónico (GLMU2 y HYAD) de *Pasteurella multocida* al modelo *iAF1260* [50].

Dentro de los distintos modelos K-12, destaca la *substrain* MG1655 principalmente por ser una de las más estudiadas y, por ende, poseer el porcentaje de anotación genómico funcional más alto ( $\approx 70\%$ ) [51]. Asimismo, el modelo *E. coli* K-12 *substr.* MG1655 *iML1515* es

considerado una de las novedosas incorporaciones *gold-standard* por su conocimiento base en reacciones y metabolitos biológicos [47], y capacidad para simular *traits* biológicos [52]. En ese sentido, este corresponderá al modelo seleccionado para realizar las simulaciones *in silico* y en el cual se realizará la implementación del sistema de transferencia de electrones para el proceso de electrofermentación, cuyas características específicas se detallan en el apartado 3.1.1.

## 2.4.2. Funciones Objetivos

### 2.4.2.1. *Max Biomass*

Función objetivo relacionada a la maximización del rendimiento de biomasa. La lógica detrás de su planteamiento esta dada ya que la evolución impulsa la selección hacia la obtención máxima de biomasa [53].

$$\max \frac{v_{biomass}}{v_{glucose}} \quad (2.2)$$

### 2.4.2.2. *Max ATP*

Función objetivo relacionada a la maximización del rendimiento de ATP. La lógica detrás de su planteamiento esta dada ya que la evolución impulsa la selección hacia la máxima eficiencia energética [53].

$$\max \frac{v_{ATP}}{v_{glucose}} \quad (2.3)$$

### 2.4.2.3. *Min/Max Redox Potential*

Función objetivo relacionada a la minimización/maximización del potencial redox. La lógica detrás de su planteamiento esta dada ya que las células tienden a disminuir el numero de reacciones oxidantes para conservar su energía o usarla de las formas mas eficientes posibles. Para el caso de *E. coli* se consideran las siguientes reacciones: gapA, aceE/F, maeA, sucAB, mdh, udhA, fdhF, fdoGHI, fdnGHI, ldhA, adhE\_R, mhpF\_R, adhP\_R, adhC\_R, maeB, zwf, gnd, icd, pntAB, frdABCD, sdhAB, dld y sdhABCD\_R [53].

$$\min \frac{\sum v_{NADH}}{v_{glucose}} \quad (2.4)$$

### 2.4.2.4. *Min ATP Production*

Función objetivo relacionada a la minimización de los flujos productores de ATP. La lógica detrás de su planteamiento esta dada ya que las células tienden a crecer utilizando la mínima cantidad de energía posible y, en consecuencia, conservándola. Para el caso de *E. coli* se consideran las siguientes reacciones: pgk, pykA, pykF, sucCD, atpA-H, ackA, ackB, tdcD y purT [53].

$$\min \frac{\sum v_{ATP}}{v_{glucose}} \quad (2.5)$$

### 2.4.2.5. *Max ATP Production*

Función objetivo relacionada a la maximización de los flujos productores de ATP. La lógica detrás de su planteamiento esta dada ya que las células tienden a producir tanto ATP como sea posible. Para el caso de *E. coli* se consideran las siguientes reacciones: pgk, pykA, pykF, sucCD, atpA-H, ackA, ackB, tdcD y purT [53].

$$\max \frac{\sum v_{ATP}}{v_{glucose}} \quad (2.6)$$

## 2.5. Redes de regulación transcripcional

Una red regulatoria transcripcional (TRN, por sus siglas en inglés *Transcriptional Regulatory Network*) cumple un rol fundamental al permitir que un organismo module la expresión de miles de genes en respuesta a perturbaciones ambientales y genéticas. Este sistema regulatorio surge de la interacción entre factores *trans* y elementos reguladores *cis* bajo el contexto de una estructura particular como, por ejemplo, de cromatina o cromosoma. De este modo, los elementos *cis* serán aquellas regiones en el ADN ubicadas en la vecindad de un gen y, de forma complementaria, toda molécula celular difusible capaz de unirse a regiones del ADN serán considerados factores *trans* [54].

La influencia directa de factores *trans*, o mejor conocidos como factores transcripcionales (TFs, por sus siglas en inglés *Transcription Factors*), sobre la actividad transcripcional de diferentes genes objetivos se representa habitualmente mediante una TRN. Esta, desvela la organización global de la regulación, como su estructura modular y jerárquica, o el hecho de que en promedio cada gen está controlado por dos o más TFs. Por otro lado, su funcionamiento yace de la interacción de unidades básicas denominadas *regulon*, las cuales corresponden a conjuntos de genes objetivos co-regulados por el mismo set de TFs. De este modo, existirán regulones controlados por un TF considerados simples y aquellos regulados por dos o más, catalogados complejos (más comunes) [54, 55].

De forma específica, de las TRNs desarrolladas para *E. coli*, se conoce que su expresión está probablemente regulada por menos de diez TFs globales. Estos, actúan en conjunto con TFs locales y, al mismo tiempo, las regulan formando un motivo de bucle *feedforward*. De este modo, reguladores globales y locales tienden a coordinar conjuntamente una condición general y una particular [56].

### 2.5.1. Cofactores y regulación transcripcional

Los TFs se clasifican en varias familias basados en al menos dos dominio que les permiten funcionar como *switches* regulatorios. El primer dominio, actúa como un sensor señal a través de interacciones unión-ligando o proteína-proteína, que en muchos casos relaciona al ligando como un metabolito o señal fisicoquímica que conduce la información endógena o ambiental. Mientras que el segundo, es el elemento respuesta del *switch* que directamente interactúa con la secuencia de ADN objetivo o con el sitio de unión de los TFs (TFBS, por sus siglas en inglés *Transcription Factor Binding-Site*). Generalmente, la mayoría de estos dominios se presentan de forma única en cada proteína a excepción de los sistemas de dos componentes

[54, 57].

Usualmente, TFs negativos se unen al promotor interfiriendo de forma directa con la ARN polimerasa (RNAP, por sus siglas en inglés *RNA Polymerase*). En contraste, los TFs positivos se unen a la región río arriba del promotor ayudando a reclutar la RNAP y comenzar la transcripción. No obstante, existen TFs con un rol regulatorio dual, siendo activadores y represores al mismo tiempo. En ese sentido, los TFs cumplen sus funciones regulatorias en conjunto y una región puede ser ocupada por más de un TF debido a la degeneración del ADN. Así, sus efectos dependerán de la concentración del factor y la afinidad entre TF-TFBS, donde sitios de unión débiles requerirán altas concentraciones de TFs y viceversa [54, 58].

### 2.5.2. TFs *Escherichia coli*

En *E. coli* solo siete proteínas regulatorias (CRP, FNR, IHF, FIS, ArcA, NarL and Lrp) son necesarias para la modulación directa del 51 % de su genoma (ver Figura 2.2). Esta gran influencia de unos pocos reguladores es consistente con las propiedades estadísticas de la red, ya que su conectividad expresa una distribución de tipo *power-law*. De los siete TFs mencionados anteriormente, solamente FIS regula la mayoría de sus genes (67 %) de manera independiente. Mientras que, en NarL y ArcA como extremo opuesto, todos sus genes regulados son co-regulados conjuntamente por otras proteínas, incluyendo TFs como FNR y en menor grado CRP u otros, comprendido por la necesidad de una firme regulación entre la detección del equilibrio potencial redox del oxígeno y aceptores de electrones alternativos como el fumarato o nitrato, y la precisa regulación en las respuestas aeróbicas o anaeróbicas por parte de ArcA y NarL [59]. De esta forma, TFs amplifican su rango de control mediante la regulación de otros TFs para abarcar un conjunto de genes regulados indirectamente. De hecho, CRP es por lejos, el factor de transcripción en *E. coli* que regula el mayor número de TFs (incluyendo el mismo). Sin embargo, ya que TFs regulan a otros TFs, incluyéndose así mismos en *feedback loops* y relaciones complejas, no se puede asumir una estructura jerárquica de la red a partir de estas interacciones [59, 60].

En relación a su funcionalidad, a modo general, CRP es la proteína reguladora primordial que detecta el nivel energético celular a través de los niveles de cAMP. FNR y ArcA están relacionados directamente con la producción de energía mediante el control de los modos de respiración. Lrp registra el estado nutricional general censando la concentración de L-leucina celular y, además, ajusta el metabolismo ante condiciones nutricionales variables. FIS, IHF y Hns son proteínas de unión al DNA que regulan su transcripción por medio de la modulación de su topología, que depende de los niveles energéticos en la célula [59].

Summary of transcriptional interactions of major TFs, in the transcriptional regulatory network of <i>E. coli</i> .						
Transcription factor	Genes regulated <sup>a</sup>	Co-regulators <sup>b</sup>	TFs regulated <sup>c</sup>	Sigma factors <sup>d</sup>	Functional classes of genes regulated <sup>e</sup>	Family (members) <sup>f</sup>
CRP	197	47	22	$\sigma^{70,38,32,24}$	48	CRP (2)
IHF	101	28	9	$\sigma^{70,54,38}$	26	HI-HNS (2)
FNR	111	20	5	$\sigma^{70,54,38}$	22	CRP (2)
FIS	76	15	4	$\sigma^{70,38,32}$	20	EBP (14)
ArcA	63	18	2	$\sigma^{70,38}$	17	OmpR (14)
Lrp	53	14	3	$\sigma^{70,38}$	15	AsnC (3)
Hns	26	14	5	$\sigma^{70,38,32}$	17	Histone-like (1)
NarL <sup>v</sup>	65	10	1	$\sigma^{70,38}$	14	LuxR/UhpA (17)
OmpR	10	9	3	$\sigma^{70,38}$	5	OmpR (14)
Fur <sup>y</sup>	26	8	2	$\sigma^{70,19}$	9	Fur (2)
PhoB	26	1	3	$\sigma^{70}$	9	OmpR (14)
CpxR	9	2	1	$\sigma^{70,38,24}$	5	OmpR (14)
SoxRS	9	10	3	$\sigma^{70,38}$	10	AraC/XylIS (24)
Mic <sup>y</sup>	5	3	1	$\sigma^{0,32}$	3	NagC/XylR (7)
CspA <sup>v</sup>	2	2	1	$\sigma^{70}$	2	Cold (9)
Rob <sup>**</sup>	7	8	2	$\sigma^{70,38}$	6	AraC/XylIS (27)
PurR <sup>**</sup>	28	7	1	$\sigma^{70}$	10	GalR/LacI (13)

<sup>a</sup>Total number of genes regulated directly. <sup>b</sup>Number of different TFs with which at least a gene or TU is jointly co-regulated. <sup>c</sup>Number of regulated genes that codify for TFs. <sup>d</sup>List of  $\sigma$  factors of the regulated promoters. <sup>e</sup>Number of functional classes of the gene products regulated [44]. <sup>f</sup>TF family and in parenthesis the number of members of the family. In addition to the seven global TFs considered here there are TFs suggested by <sup>v</sup>Babu and Teichmann, 2003, [42\*\*] and <sup>\*\*</sup>Shen-Orr et al., 2002, [50\*\*].

Figura 2.2: Interacciones transcripcionales de los principales TFs en la red regulatoria transcripcional de *E. coli* [59].

### 2.5.2.1. FNR

La proteína FNR es miembro de la superfamilia CRP-FNR de TFs, caracterizada por la presencia de un dominio sensorial N-terminal y un dominio de unión a DNA C-terminal. Este regulador global es capaz de regular la transcripción de genes involucrados bajo condiciones anaeróbicas mediante la incorporación de un *cluster* [4Fe-4S] sensible al oxígeno dentro del dominio sensorial de la proteína [61]. La adquisición de grupos azufre-sulfuro promueven la formación de dímeros del regulador a partir de dos monómeros de FNR, los cuales poseen actividad de unión a DNA mejorada y se ligan de una manera secuencia-específica a los promotores objetivos, en donde actúan como activadores de genes anaeróbicos y represores de genes aeróbicos [62, 63].

En presencia de oxígeno, el *cluster* [4Fe-4S] es degradado a [2Fe-2S] vía el intermediario [3Fe-4S]. Como consecuencia, el dímero FNR se separa y la unión sitio específica se inhibe. La forma [2Fe-2S] de FNR almacena sulfuro producto de la separación del dímero, de este modo se facilita la reparación del *cluster* y la restauración de la actividad del TF en periodos donde la disponibilidad de oxígeno fluctúa. Sin embargo, si el oxígeno persiste en el ambiente, la forma [2Fe-2S] de FNR se degrada hasta apoFNR, la cual puede adquirir un grupo [4Fe-4S] por medio de la interacción con la maquinaria biosintética del grupo de hierro y azufre de la célula [63, 64].

Los genes asociados a la regulación por parte de la proteína FNR involucran a las enzimas fumarato, nitrato, nitrito, DMSO y TMAO reductasas, junto con las piruvato formato-liasa, asparaginasa II, aspartasa, hidrogenasa, formato y G3P deshidrogenasa [65].

En relación a la fumarato reductasa, su expresión es dependiente de la proteína FNR, no obstante mutantes del gen *fnr* muestran de todas formas una actividad basal incremen-

tada durante el crecimiento anaerobio. En ese sentido y según bibliografía, la transcripción de *frd* es positivamente regulada por FNR y reprimida por NarL en presencia de nitrato y molibdato; sin embargo, la existencia de una proteína reguladora específica no caracterizada involucrada en el proceso no puede ser descartada [66].

Referente a la nitrato reductasa, la transcripción del operon *nar* es virtualmente indetectable en mutantes del gen *fnr*, como también lo es su inducción por nitrato mediante las proteínas NarL y NarX. De este modo, el control de su expresión solo es ejecutado bajo la acción del operón *nar* activado a través de la proteína FNR [67].

Con respecto a la nitrito reductasa, cuyo principal exponente es la enzima soluble sirohaem ligada a NADH, su expresión anaerobia también requiere directamente la presencia del gen *fnr* permitiendo la remoción de nitrito, y su posterior conversión a amoníaco biológicamente útil y regeneración de NADH. Una menor actividad de nitrito reductasa reside en la enzima formato-nitrito oxidoreductasa, que acopla la reducción de nitrito a la oxidación de formato y lactato, relacionada con el citocromo periplasmático  $c_{552}$  cuya expresión es anaerobiamente inducible y dependiente de FNR [67, 68].

Acerca de la piruvato formato-liasa (PFL), enzima involucrada de forma esencial en el catabolismo anaeróbico de la glucosa, cataliza la conversión no oxidativa del piruvato a acetil-Coa y formato. La transcripción del gen *pfl* es totalmente compleja, hay un total de siete promotores aparentemente regulados por la proteína FNR, piruvato y nitrato. De hecho, su expresión anaeróbica es reducida hasta 5 veces en mutantes del gen *fnr*, sin embargo, esto sigue siendo 3 veces por sobre el nivel basal aeróbico [65].

En cuanto a la formato deshidrogenasa (FDH), bajo condiciones de crecimiento anaeróbico *E. coli* expresa dos formas enzimáticas, una fermentativa ( $FDH_H$ ) como parte del complejo formato hidrógeno-liasa, y otra ( $FDH_N$ ) involucrada en la conservación de energía durante la respiración de nitrato y fumarato. De acuerdo a evidencia experimental, la expresión del gen *fdhF* sería inducida mediante formato, y su dependencia de la proteína FNR correspondería a una consecuencia más bien secundaria a la falta de la proteína PFL y dado la eliminación de los recursos metabólicos de procesamiento de formato en mutantes *fnr*. Por otro lado, en células crecidas en nitrato, la expresión anaeróbica de  $FDH_N$  es fuertemente dependiente de factor global *fnr* [69].

### 2.5.2.2. ArcAB

El sistema de dos componentes de control respiratorio aeróbico (ArcBA) es un sensor indirecto de oxígeno bajo condiciones microaeróbicas compuesto por la proteína ArcB, una quinasa sensora unida a la membrana tripartita, y ArcA, el regulador de respuesta afín [63, 70, 71]. ArcB, perteneciente a la subclase de kinasas sensoras híbridas posee un dominio que comprende 16 residuos de aminoácidos, seguido por un *aleucine-zipper* y un dominio Per-Arnt-Sim (PAS) que conecta la parte transmembranal con el dominio catalítico de ArcB. El dominio PAS son estructuras sensoriales versátiles relacionadas con detectar cambios en la luz, potencial redox y el estado energético general de la célula. En el citoplasma, los dominios PAS de cada monómero ArcB contienen dos residuos de cisteína claves que deben permanecer en estado reducido para alcanzar una máxima actividad autoquinasa. Por otro lado,

su oxidación se debe principalmente a la detección del estado redox de quinonas en la ETC, con productos fermentados actuando como efectores alostéricos para acelerar la actividad quinasa. A medida que aumenta la disponibilidad de oxígeno, ArcB cambia su funcionalidad pasando de una actividad autoquinasa a una fosfatasa mediante la formación de dos enlaces disulfuros intermoleculares que resultan en un dímero ArcB unido covalentemente. En estado reducido, su funcionalidad sera autofosforilar ciertos residuos de los dominios H1, D1 y H2, hasta transferir el grupo fosfato al residuo conservado Asp (Asp54) del dominio receptor de ArcA. De este modo, fosforilada ArcA se vuelve una proteína de unión a DNA de secuencia específica octamérica capaz de controlar la expresión de variados operones en el cromosoma de *E. coli* [63, 72, 73].

Bajo condiciones anaeróbicas, ArcA-P directamente reprime los operones codificantes de enzimas relacionadas con el ciclo TCA (gltA, icdA, sdhCDAB-sucABCD, mdh, lpdA), la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (fadH, fadBA, fadL, fadE, fadD, fadIF), la oxidación de lactaldehído (aldA)/lactato (lldPRD) y la oxidación de glicolato/glioxilato (glcC, glcDEFGBA). Por el contrario, activa la expresión de operones codificantes para tres enzimas esenciales en la adaptación a medios microanaeróbicos o anaeróbicos, como lo son el citocromo bd oxidasa (cydAB), la piruvato formato liasa (focA-pflB) y la hidrogenasa I (hya) [74].

Su mecanismo de represión, basado en datos de CHIP-seq recopilados bajo condiciones de crecimiento anaeróbico, exhiben una significativa reducción en la ocupación del factor sigma 70 en relación a datos de crecimiento aeróbico, consistente con la noción de ArcA como un represor de la unión de la RNA polimerasa. Además, la correlación de la posición de los sitios de unión de ArcA predichos con los sitios de inicio de transcripción (TSSs por sus siglas en inglés) dependientes de  $\sigma^{70}$  conocidos, indican que la mayoría de los objetivos reprimidos con un TSS confirmado poseen un sitio de unión ArcA que se sobrepone a la región de acople de la  $\sigma^{70}$ -RNAP. De este modo, el posicionamiento de lo sitios de unión a ArcA son consistentes con la disminución en la ocupación de  $\sigma^{70}$  dependiente de  $O_2$  observada en casi todos los operones reprimidos, sugiriendo que ArcA probablemente reprime la transcripción a través de la oclusión del promotor. Sin embargo, para el mecanismo de activación, tanto la posición como la orientación de los sitios de unión de ArcA predichos relativos a los TSS de cada operon, son variables entre cada objetivo activado y, por ende, permanece poco claro si ArcA puede activar la transcripción mediante contacto directo del complejo  $\sigma^{70}$ -RNAP [74].

## 2.6. Metabolismo redox

A grueso modo, el metabolismo redox corresponde al conjunto de cambios químicos y biológicos asociados a cofactores de procesos de óxido-reducción, que se producen continuamente en las células vivas de un organismo. Estos, relacionan los diferentes flujos de vías metabólicas dependientes de cofactor con la disponibilidad de la enzima de la ruta, como también con la del cofactor y la razón entre sus formas oxidadas y reducidas. A este respecto, su regulación, además de intervenir en muchas reacciones de óxido-reducción, también regula la actividad de enzimas y procesos genéticos. Por lo tanto, su consideración juega un rol importante y crítico en el mantenimiento del balance redox intracelular, condición básica para el crecimiento de todos los microorganismos [10].

Dentro de los distintos tipos de cofactores, se encuentran el NAD y el NADP, conocidos como cofactores redox. Estos, existen en forma oxidada y reducida, las cuales están generalmente asociadas a reacciones metabólicas y sintéticas como receptores o donadores de electrones, respectivamente. A partir de lo anterior, es que los estados celulares redox se pueden expresar y cuantificar como las razones  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  y  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ , y son generalmente sostenidos por intrincadas redes con múltiples reacciones de óxido-reducción. En consecuencia, no solo son esenciales para los procesos celulares, sino que también desempeñan un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular, ya que su optimización se ha visto asociada con un fuerte crecimiento y metabolismo en los microorganismos estudiados [1, 2, 9].

Para reacciones redox catalizadas por células microbianas, el análisis de los cofactores involucrados es de especial interés puesto que la disponibilidad de moléculas NADH o NADPH son usualmente un factor limitante y crucial en el rendimiento y eficiencia del proceso. Esto, en muchos casos surge como cuello de botella más allá de las deficiencias enzimáticas que dificultan vías metabólicas específicas [1, 2, 75]. Por consiguiente, para propósitos industriales, muchos esfuerzos de la ingeniería metabólica hacia la utilización de substratos específicos o síntesis de compuestos diana, se ha realizado en microorganismos a través de la modificación o introducción de vías metabólicas que involucran reacciones redox [75].

Las modificaciones al metabolismo redox son parte de la ingeniería de cofactor, subconjunto de la ingeniería metabólica, que se define como la manipulación de cofactores en las vías metabólicas y, de forma paralela, la optimización del control dinámico de los flujos del compuesto de interés. Estas, generalmente refieren a cambios hacia las rutas que involucran las moléculas NAD y NADP. Con respecto a esto, sistemas de manipulación de  $\text{NAD}^+$ , han sido exitosamente usados para mejorar la producción de metabolitos primarios como etanol, 1,2-propanodiol, acetoína y piruvato. Así, según bibliografía, se señala que la forma más efectiva de ajustar las razones de los cofactores redox consiste en la expresión heteróloga de sistemas de regeneración NAD/NADP [1, 10].

### 2.6.1. Estrategias de modificación del metabolismo redox

Para propósitos industriales, se han realizado en diferentes microorganismos muchos esfuerzos, por parte de la ingeniería metabólica, dirigidos hacia la utilización de substratos específicos o síntesis de compuestos *target*. Sin embargo, la modificación o introducción de vías que involucran reacciones redox, generalmente inducen un desequilibrio en los procesos de óxido-reducción que desencadenan una disminución drástica del crecimiento y capacidad sintética del organismo modificado. De este modo, procedimientos metabólicos efectivos deben considerar cuidadosamente el consumo y generación de cofactores NAD(P)H, como también la maximización del flujo de carbono hacia vías sintéticas deseadas evitando largas fluctuaciones redox [1]. Así, dentro de estrategias experimentalmente comprobadas y revisadas por Liu J. *et al.* (2018), se encuentran:

#### 2.6.1.1. Eliminación o *knock-down* de vías competitivas de cofactores redox

Esta estrategia consiste en incrementar la biodisponibilidad de cofactores redox a través del bloqueo o *knock-down* de vías de consumo competitivas. A modo de ejemplo, se ha demostrado que la delección o activación de los genes *ldh* y *ald*, codificantes para lactato deshidrogenasa

y alanina deshidrogenasa respectivamente, permiten mayor disponibilidad de NADH para impulsar la producción de propanodiol, butanol y otros alcoholes en *E. coli* [76, 77]. Por otro lado, el uso de ARNs sintéticos relacionados con procesos de *down-regulation* de enzimas competidoras de NADPH, ha conducido a incrementos de hasta un 70 % en la producción de S-adenosilmetionina dependiente de NADPH [78].

### 2.6.1.2. Introducción de reacciones de generación de cofactores redox

Esta estrategia involucra la introducción de sistemas heterólogos de regeneración de cofactores en plataformas biológicas. Este tipo de procedimiento ha sido exitosamente aplicado en la biosíntesis de variados productos dependientes de NAD(P). Por ejemplo, se puede destacar la introducción de la enzima formiato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (FDH, por sus siglas en inglés *Formate Dehydrogenase*) de *Candida boidinii* en *E. coli*, cuyo resultado permitió mayor tolerancia al químico furfural debido a una mayor reserva de NADH que, al mismo tiempo, incrementó la productividad de isobutanol del proceso de fermentación [79]. Por otro lado, también cabe resaltar la introducción heteróloga de la vía altamente activa Entner–Doudorof de *Zymomonas mobilis* en *E. coli*, cuyos resultados demuestran un incremento de 25 veces en la tasa de regeneración de NADPH [80].

### 2.6.1.3. Reacciones directas de reducción/oxidación entre NAD y NADP

Esta estrategia se centra en la interacción directa entre NAD y NADP. Para esto, investigadores aconsejan utilizar la enzima piridina nucleótido transhidrogenasa (PNT, por sus siglas en inglés *Pyridine nucleotide transhydrogenase*), que reversiblemente transfiere hidruros desde NADH a NADP<sup>+</sup>, en combinación con otras enzimas regeneradoras de cofactores. En particular, el uso en conjunto de una de las isoformas de PNT, PntAB, con la enzima FDH, logra un comportamiento sinérgico ya que al alcanzar mayores tasas NADH/NAD<sup>+</sup> vía FDH se impulsa a PntAB a generar más NADPH a partir de NAD<sup>+</sup>. En ese sentido, no solo incrementa la biodisponibilidad de NADPH sino también mantiene la homeostasis de la razón NADH/NAD<sup>+</sup> [81].

# Capítulo 3

## Metodología

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Modelo a Escala Genómica: *iML1515 E. coli* K-12

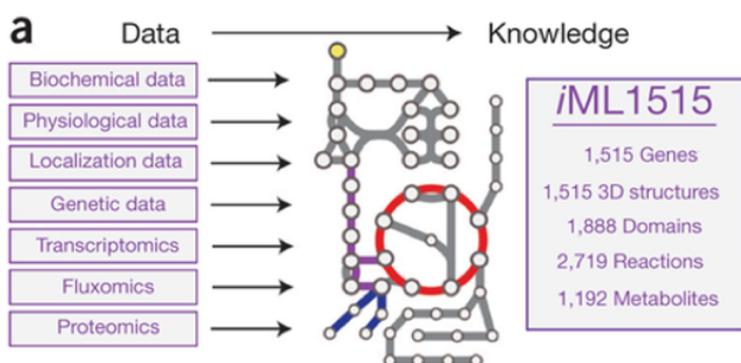


Figura 3.1: Esquema de desarrollo y principales parámetros del modelo metabólico *iML1515* [52].

Para la simulación metabólica *in silico* se utilizó el modelo a escala genómica *iML1515* del microorganismo *E. coli* cepa K-12 (*substrain* MG1655) obtenido del repositorio de fuente abierta BiGG Models. Esta representación contiene el conjunto de genes característicos y reacciones metabólicas más actualizadas al año 2017, en donde la mayoría fueron descubiertas desde la publicación del último modelo *iJO1366* en el 2011. Dichas modificaciones refieren a la información estructural para todas las proteínas involucradas a modo de conocer sus dominios proteicos, el metabolismo de especies reactivas al oxígeno, vías de reparación de metabolitos y coeficientes de mantenimiento de crecimiento actualizados. Es así como, el modelo *iML1515* ha sido validado y personalizado para su uso en diferentes condiciones de crecimiento y es la reconstrucción más exhaustiva de *E. coli* a la fecha [52].

Particularmente, *iML1515* cuenta con 1,515 marcos abiertos de lectura, 1,516 genes, y 2,719 reacciones metabólicas incluyendo 1,192 metabolitos únicos. En ese sentido, la base de conocimiento del modelo está relacionada a 1,515 estructuras proteicas que proporcionan un marco integrado que conecta sistemas y biología estructural. De este modo, es que la representación permite el análisis de varios tipos de datos incluyendo transcriptomas, proteomas y metabolomas, además de predecir la esencialidad genética en 16 condiciones de experimentación *in silico* vs. datos experimentales con una precisión del 93.4% [52].



la producción de succinato. Por lo tanto, dicha representación dentro del modelo se ve reflejada en el *knock out* de la reacción de citrato sintetasa (CS) incorporada manualmente, cuyo curso, la formación de citrato, corresponde al comportamiento opuesto esperado en relación a procesos de fermentación anaerobios.

### 3.2.1.2. Medio de Cultivo

De acuerdo a la bibliografía experimental [21], el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* para procesos de electrosíntesis corresponde al tradicional *LB broth*. Este, se caracteriza por una composición basada en triptona, extracto de levadura, NaCl y agua destilada. Es así como, su incorporación dentro del modelo metabólico hace uso de la formulación desarrollada por Marinos, Kaleta y Waschina (2020) [83] (ver Tabla H.1 en el Anexo H), considerando solo 54 compuestos existentes dentro de los metabolitos del modelo *iJO1366* (ver Tabla 3.1), uno de los antecesores del modelo *iML1515*.

Tabla 3.1: Composición medio LB considerado para el desarrollo experimental *in silico*

LB Broth		
Compound	BIGG Metabolite	Exchange Reaction
Sodium	na1	EX_na1(e)
Chloride	cl	EX_cl(e)
Calcium	ca2	EX_ca2(e)
Iron	fe2	EX_fe2(e)
Iron	fe3	EX_fe3(e)
Sulfate	so4	EX_so4(e)
Phosphate	pi	EX_pi(e)
Magnesium	mg2	EX_mg2(e)
Potassium	k	EX_k(e)
Alanine	ala__L	EX_ala__L(e)
Aspartic	asp__L	EX_asp__L(e)
Asparagine	asn__L	EX_asn__L(e)
Glutamic	glu__L	EX_glu__L(e)
Glutamine	gln__L	EX_gln__L(e)
Glycine	gly	EX_gly(e)
Histidine	his__L	EX_his__L(e)
Isoleucine	ile__L	EX_ile__L(e)
Leucine	leu__L	EX_leu__L(e)
Lysine	lys__L	EX_lys__L(e)
Methionine	met__L	EX_met__L(e)
Phenylalanine	phe__L	EX_phe__L(e)

Proline	pro__L	EX_pro__L(e)
Serine	ser__L	EX_ser__L(e)
Threonine	thr__L	EX_thr__L(e)
Tryptophan	trp__L	EX_trp__L(e)
Tyrosine	tyr__L	EX_tyr__L(e)
Valine	val__L	EX_val__L(e)
Arginine	arg__L	EX_arg__L(e)
Cystine	cys__L	EX_cys__L(e)
Cadmium	cd2	EX_cd2(e)
Cobalt	cobalt2	EX_cobalt2(e)
Cooper	cu	EX_cu(e)
Cooper	cu2	EX_cu2(e)
Manganese	mn2	EX_mn2(e)
Nickel	ni2	EX_ni2(e)
Zinc	zn2	EX_zn2(e)
Adenine	ade	EX_ade(e)
Guanine	gua	EX_gua(e)
Cytosine	csn	EX_csn(e)
Uracil	ura	EX_ura(e)
Ammonia	nh4	EX_nh4(e)
D-Mannose	man	EX_man(e)
(R)-Pantothenate	pnto__R	EX_pnto__R(e)
Biotin	btn	EX_btn(e)
L-Ascorbate	ascb__L	EX_ascb__L(e)
Thiamin	thm	EX_thm(e)
Nicotinate	nac	EX_nac(e)
Pyridoxal	pydx	EX_pydx(e)
Choline	chol	EX_chol(e)
Oxygen	o2	EX_o2(e)
Water	h2o	EX_h2o(e)
Protons	h	EX_h(e)
Molybdate	mobd	EX_mobd(e)

En relación a condiciones de electrosíntesis, se introduce al electrón como metabolito dentro del medio de cultivo, cuya incorporación a través de la reacción EX\_electron\_e, representa el *input* de electrones producto de la interacción entre la bacteria y el electrodo. Su flujo máximo de ingreso al sistema esta restringido según bibliografía experimental realizada sobre *G. sulfurreducens* [19, 84, 85], cuya similitud entre su proceso de transferencia de electrones y aquel expresado heterológamente en *E. coli* permiten utilizar este valor como un máximo teórico. De este modo, dentro del modelo, la reacción de *exchange* de electrones esta acotada inferiormente por un valor de  $-30$  [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] [84, 86], mientras que de

forma superior es igual a 0 ya que en procesos de electrosíntesis microbiana no se involucra la producción de corriente.

### 3.2.1.3. Flujos Medio de Cultivo

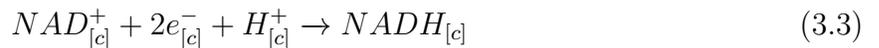
Para calcular la magnitud de los flujos del medio de cultivo, asociados al medio LB, se utiliza la función *minimal\_medium* del *toolkit* del *software* cobraPY. Para esto, de bibliografía se obtiene la razón de crecimiento de *E. coli* bajo condiciones de fermentación anaerobia, que según Aditya Pandit y Radhakrishnan Mahadevan (2011) alcanza un valor máximo de 0.19 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] [84]. Finalmente, tal combinación de flujos determinada (ver Figura I.1 en el Anexo I para conocer valores exactos) se ocupa en la simulación para todos los modelos, es decir, para el caso base y las tres formas de representar la transferencia de electrones extracelular.

### 3.2.1.4. Fuente de Carbono

Se considera la evaluación de dos tipos de fuente primordiales de carbono, glucosa y dióxido de carbono, según el tipo de ingesta: exclusiva de azúcar y una forma mixta que, además de glucosa, permite la incorporación de CO<sub>2</sub> si el sistema lo requiere. Su implementación dentro del modelo atañe la regulación de los compuestos presentes en el objeto *medium* de tipo *dict*, donde la alimentación por glucosa esta fijada a 10.93 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] [87] y, la supresión completa del ingreso de CO<sub>2</sub> o no, esta dada por la presencia de la restricción de nulidad para con la reacción tipo *exchange* del óxido.

### 3.2.1.5. Sistema EET

Para la simulación del proceso de electrofermentación, es que al modelo metabólico *iML1515* se le añadieron reacciones de regeneración de cofactores redox junto con la incorporación del electrón al *pool* de metabolitos. De este modo, se estableció la representación del fenómeno de transferencia de electrones extracelular entre *E. coli* y un electrodo catódico a través de las Ecuaciones 3.1, 3.2 y 3.3 [84, 86, 88].



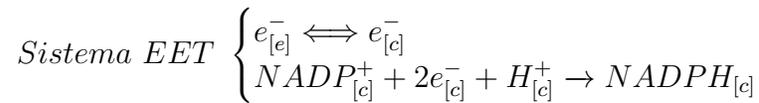
Los limites cinéticos establecidos para estas reacciones fueron configurados de acuerdo al sentido biológico dado por ensayos experimentales de electrosíntesis microbiana. Por lo tanto, para la reacción de intercambio de electrones (Ecuacion 3.1) el limite inferior tendrá un valor igual a -30 [ $mmol e^-/(gDW \cdot h)$ ] que hace referencia al máximo *input* electrónico obtenido por el microorganismo modelo *G. sulfurreducens*. En ese sentido, el limite superior corresponderá a 0 [ $mmol e^-/(gDW \cdot h)$ ], pues la representación esta enfocada en procesos de electrosíntesis y no de fermentación no balanceada [84]. En relación a las reacciones de regeneración (Ecuaciones 3.2 y 3.3), sus limites inferiores y superiores fueron establecidos a un valor de 0 y 1000 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] respectivamente, en concordancia con el concepto de

un *input* de electrones y que dichos recursos se orientan preferencialmente hacia la formación de moléculas redox.

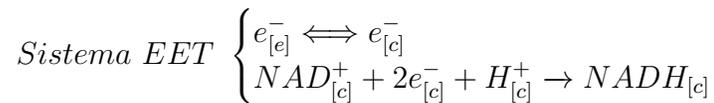
### 3.2.1.6. Modelos

A partir del establecimiento de un sistema de ecuaciones simplificado que representa el proceso de electrosíntesis, y ya que no se posee conocimiento validado referente a la preferencia por una u otra expresión cinética (Ecuaciones 3.2 y 3.3), es que se proponen tres modelos metabólicos considerando la transferencia de electrones como: únicamente por la regeneración de NADPH, únicamente por la regeneración de NADH e involucrando ambas ecuaciones.

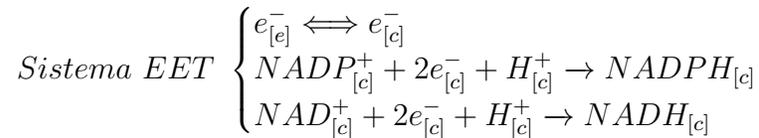
#### Modelo *iML515\_NADPH*



#### Modelo *iML515\_NADH*



#### Modelo *iML515\_Dual*



### 3.2.1.7. Funciones Objetivo

La selección de las funciones objetivo se lleva acabo a través del comando *model.objective*, mientras que su configuración y algoritmo mediante la sentencia *model.problem.Objective*. En esta ultima, se define la expresión matemática, el sentido de la reacción que se quiere optimizar, y si se requerirá una minimización o maximización. De este modo, para la función de maximización de la biomasa se optimiza sobre la reacción ya preexistente del modelo *iML515*, *BIOMASS\_Ec\_iML515\_core\_75p37M*. Mientras que, para las demás, según la sumatoria de los diferentes genes implicados en cada estadio metabólico señalados en el apartado 2.4.2, las reacciones involucradas son las siguientes:

## Min/Max Redox Potential

$$\sum \left\{ \begin{array}{l} GAPD \text{ (b1779 BiGG ID)}, PDH \text{ (b0115/b0114 BiGG ID)}, ME1 \text{ (b1479 BiGG ID)}, \\ AKGDH \text{ (b0726/b0727 BiGG ID)}, MDH \text{ (b3236 BiGG ID)}, NADTRHD \text{ (b3962 BiGG ID)}, \\ LDH_D \text{ (b1380 BiGG ID)}, ACALD \text{ (b0351 BiGG ID)}, ALCD2x \text{ (b1478 BiGG ID)}, \\ ME2 \text{ (b2463 BiGG ID)}, G6PDH2r \text{ (b1852 BiGG ID)}, GND \text{ (b2029 BiGG ID)}, \\ ICDH_{yr} \text{ (b1136 BiGG ID)} \text{ y } THD2pp \text{ (b1602/b1603 BiGG ID)} \end{array} \right.$$

## Min/Max ATP Production

$$\sum \left\{ \begin{array}{l} PGK \text{ (b2926 BiGG ID)}, PYK \text{ (b1854 BiGG ID)}, SUCOAS \text{ (b0728/b0729 BiGG ID)}, \\ ATPS4rpp \text{ (b3734 BiGG ID)} \text{ y } ACKr \text{ (b2296 BiGG ID)} \end{array} \right.$$

### 3.2.1.8. Deletions y Knockouts

Los mecanismos de *knockouts* se realizan mediante la función *model.genes.gene.knockout()* (o *model.reactions.reaction.knockout()* si se requiere eliminar una reacción) proporcionada por el *software* cobraPY, que permite generar *knockouts* acumulativos en el modelo al establecer los límites superiores e inferiores de las reacciones involucradas iguales a cero. Cabe destacar, que para el *knockout* genético, la restricción de flujo hacia las reacciones asociadas a determinado gen también dependerán de las relaciones GPR (*gene-protein reaction*, por sus siglas en inglés) con otros. Es decir, dado que las GPR interactúan a través de operadores Booleanos, puede darse el caso de que “apagar” un gen no imprima la nulidad de flujo en la reacción asociada pues el estamento presenta conectores bicondicionales.

Las simulaciones consideran ambos casos de ingesta de carbono (glucosa y CO<sub>2</sub>), medio de cultivo LB descrito anteriormente, modelos *iML1515\_NADPH* e *iML1515\_Dual* dado su efectividad en la incorporación de electrones en las simulaciones de secreción, y un set de genes candidatos a *knockout* implicados en la vías de disimilación de piruvato como lo son *pflA* (b0902 *gene BiGG ID*), *ldhA* (b1380 *gene BiGG ID*) y *frdBC* (b4152 y b4153 *gene BiGG ID*) que han sido reportados debido a su incremento en la producción de etanol [87, 89, 90]. La evaluación se realiza mediante la implementación, en primer lugar, particular del *knockout* de los genes *pflA* y *ldhA*, para luego considerar su efecto de a pares; es decir, *pflA* y *ldhA* en un solo modelo, y *frdBC* en otro. De este modo, se busca disminuir el sesgo en los resultados dado por la redundancia genética. Para una revisión más detallada de los resultados de los *knockouts* y su código revisar los Anexos C y G respectivamente.

# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Simulación Red Metabólica

#### 4.1.1. Validación del modelo *iML1515*

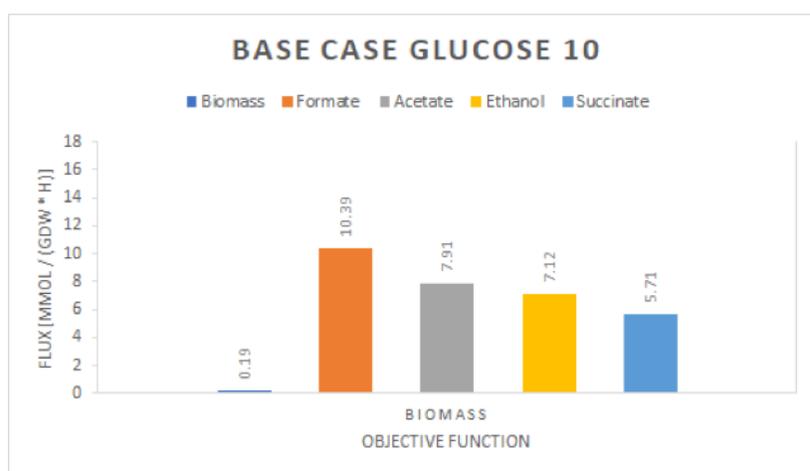


Figura 4.1: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515* bajo un proceso de fermentación anaerobia con *uptake* máximo de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa.

tación perfiles de secreción típicos descritos según bibliografía; es decir, se obtiene mayoritariamente formato, acetato y etanol en similares proporciones, y succinato. En ese sentido, también se evalúan las rutas metabólicas de obtención de tales productos, y de acuerdo al diagrama de la simulación presentado en la Figura 4.2, la dirección de los flujos coincide con lo experimental al producir formato a partir de piruvato, acetato y etanol a partir de acetil-Coa, y generar succinato mediante la apertura del ciclo de Krebs teniendo como predecesores fumarato, malato y oxalacetato.

La validación del modelo *iML1515* se realiza mediante la simulación bajo condiciones de fermentación anaerobia, lo que corresponde al caso base, tanto para una alimentación exclusiva por glucosa como aquella permisiva para el dióxido de carbono. Los resultados se aprecian en la Figura 4.1, no obstante resultan idénticos para ambas condiciones (ver Anexo A para mas detalle por condición). Estos, obtienen como principales productos de fermentación

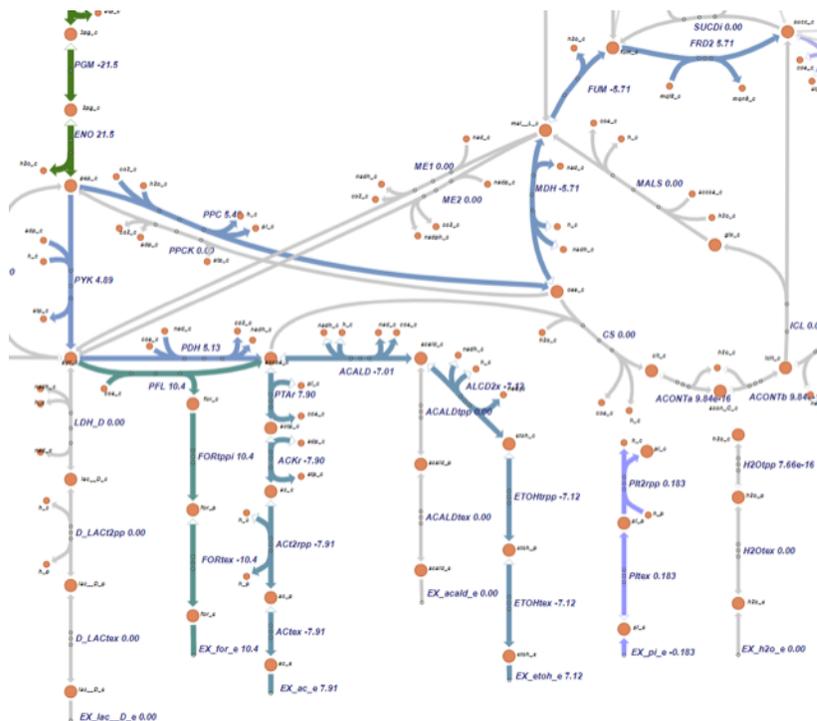


Figura 4.2: Diagrama Escher de secreción de productos de *E. coli*, modelo caso base *iML1515*, bajo un proceso de fermentación anaerobia con *uptake* máximo de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa.

#### 4.1.2. Perfiles de Secreción

En relación a las simulaciones del proceso de electrosíntesis, los modelos *iML1515\_NADPH* y *iML1515\_Dual*, son los únicos que adquieren recursos del sistema de transferencia de electrones extracelular implementado para ambas condiciones de ingesta de carbono. Es así como, para el modelo solo con la reacción de regeneración de NADPH, se obtiene un perfil de secreción como se muestra en la Figura 4.3, desplazado hacia la formación de etanol con un incremento del 75% con respecto al caso base e independiente de la configuración en la alimentación. Además, como se aprecia en la Tabla 4.1, se genera mas formato, mientras que, al mismo tiempo, disminuye la secreción de acetato y succinato. Por ultimo, cabe destacar que se presenta una acumulación de piruvato junto con la generación del dióxido de carbono como subproducto de la fermentación.

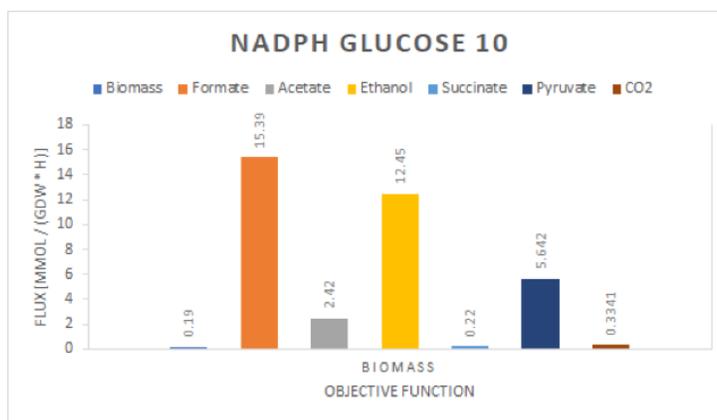


Figura 4.3: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

Tabla 4.1: Aumento del rendimiento de productos secretados del modelo *iML1515\_NADPH* con respecto al caso base e independiente de la configuración de ingesta de carbono.

<b><i>iML1515_NADPH</i> Yield Increase</b>	
Secreted Products	Objective Function: Biomass
	Increased Percentage [%]
Biomass	0.00
Formate	48.10
Acetate	-69.40
Ethanol	74.80
Succinate	-96.10

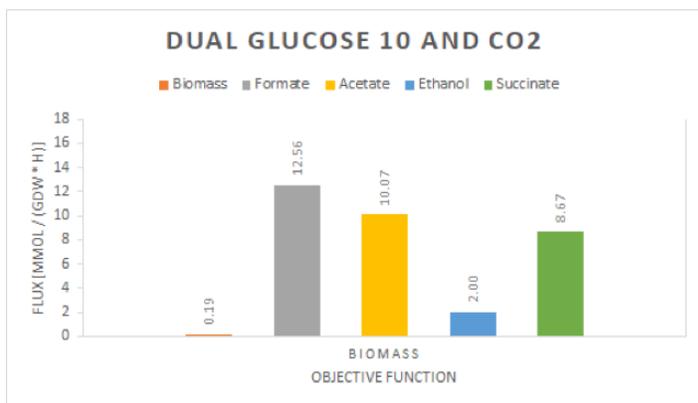


Figura 4.4: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC, por sus siglas en ingles) que genera moléculas de oxalacetato, intermediario primario para la formación de succinato en condiciones anaeróbicas.

Tabla 4.2: Aumento del rendimiento de productos secretados del modelo *iML1515\_Dual* con respecto al caso base y una alimentación permisiva de CO<sub>2</sub> referente a la ingesta de carbono.

<b><i>iML1515_Dual</i> Yield (glucose 10 &amp; CO<sub>2</sub>) Increase</b>	
Secreted Products	Objective Function: Biomass
	Increased Percentage
Biomass	-0.50
Formate	20.90
Acetate	27.30
Ethanol	-71.90
Succinate	52.00

### 4.1.3. *Input* de Electrones

Como se mencionó en el apartado anterior, los únicos modelos que incorporan la introducción de electrones en la simulación del sistema son *iML1515\_NADPH* y *iML1515\_Dual*. El primero considera un *uptake* de 9.68 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones determinado por la simulación, lo que se traduce en la disposición de un flujo de 4.84 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de  $NADPH^+$  extra al sistema. La distribución de este recurso redox dentro de la célula se esquematiza en la Figura 4.5, en donde la mayoría del flujo se utiliza en la formación de S-propano-1,2-diol a través de la reacción LCARSyi por medio de la enzima lactaldehído reductasa. Las fracciones remanentes del cofactor son utilizadas por enzimas glutamato deshidrogenasa y reductoisomerasas cetolácidas para la generación de glutamato, (R)-2,3-dihidroxi-3-metilbutanoato y (R)-2,3-dihidroxi-3-metilpentanoato.

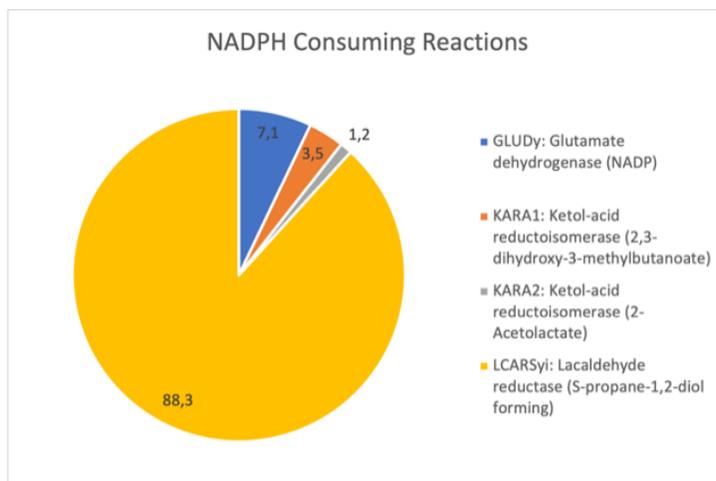


Figura 4.5: Distribución de recursos redox a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y  $CO_2$  libre.

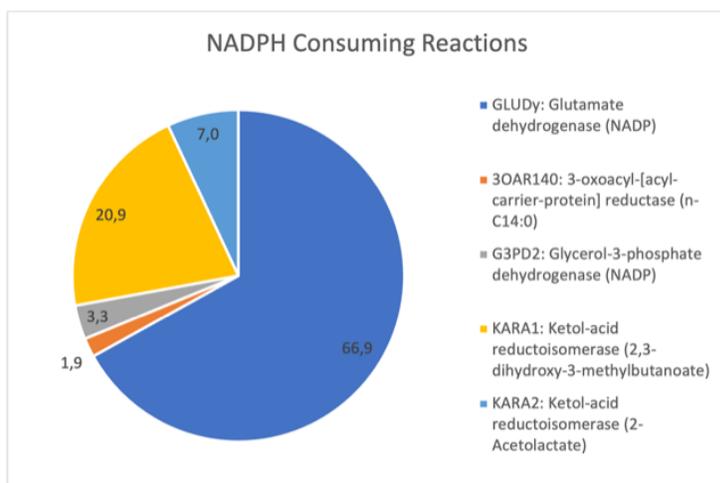


Figura 4.6: Distribución de recursos redox a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y  $CO_2$  libre.

Por otro lado, el segundo modelo bajo la ingesta de glucosa y  $CO_2$  presenta un *uptake* de 1.631 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones, cuya incorporación también se realiza mediante la generación de la molécula redox  $NADPH^+$  en el sistema. Su distribución se aprecia en la Figura 4.6, donde casi la totalidad del recurso se destina hacia la producción de glutamato, la segunda mayoría hacia la formación de (R)-2,3-dihidroxi-3-metilbutanoato y, las fracciones residuales, hacia la producción de (R)-2,3-dihidroxi-3-metilpentanoato, glicerol 3-fosfato y (R)-3-hidroxitetradecanoil.

#### 4.1.4. Producción de ATP

La formación de ATP, transversal a todos los modelos y condiciones de ingesta de carbono, alcanza un valor de  $\approx 30$  [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] dado que para todos los casos se estableció una generación máxima de biomasa de  $0.19$  [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ]. Como muestra la Figura 4.7, su producción se genera a partir principalmente de las reacciones de formación de piruvato (PYK) y 3-fosfo-D-glicerato (PGK) dentro del proceso de glicólisis, y de la formación de acetato (ACKr). Por otro lado, como se aprecia en la Figura B.8.b, la molécula es consumida en un 43.84% por la reacción de formación de biomasa tendencia mantenida para todos los casos, y su remanente, distribuido y variable según condición entre las reacciones de mantenimiento de ATP (ATPM), ATP sintetasa (ATPS4rpp), fosfofructoquinasa (PFK) y fosfofructoquinasa s7p (PFK\_3) (ver Anexo B para más detalle).

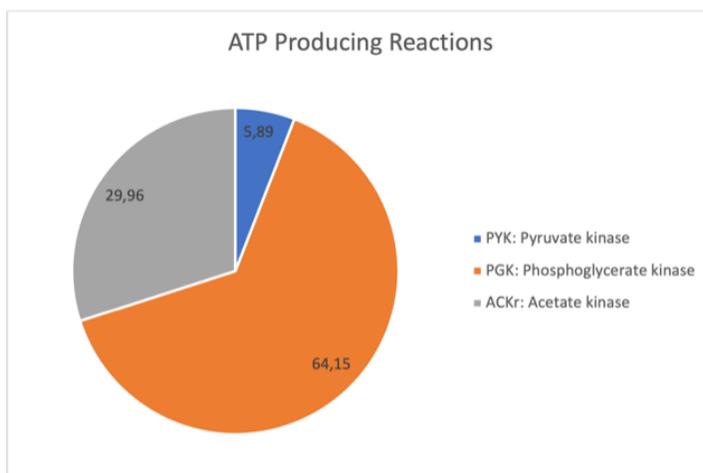


Figura 4.7: Producción de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de  $10$  [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa,  $30$  [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y  $CO_2$  libre.

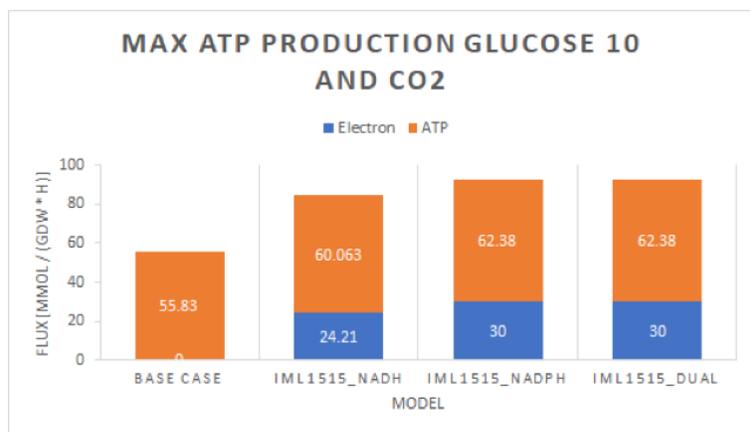


Figura 4.8: Evaluación de la función objetivo *Max ATP Production*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de  $10$  [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa,  $30$  [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y  $CO_2$  libre.

ATP sintetasa corresponde al mecanismo utilizado por la célula para enfrentar cambios en el gradiente de  $H^+$ , donde por cada cuatro moles de protones transferidos al citoplasma también se genera un mol de ATP. Por lo que, la incorporación de electrones al sistema biológico puede incrementar de manera directa la producción de ATP mediante la inversión de la ATP sintetasa del consumo de ATP a la generación de ATP [84].

La evaluación de la función objetivo *Max ATP Production*, como se muestra en la Figura 4.8, señala un incremento máximo en la producción de ATP de hasta un 12% para modelos que incorporan el consumo de electrones con respecto al caso base. Esto, puede deberse ya que durante los procesos de bioelectrosíntesis, electrones son transferidos dentro de la célula y, por ende, a modo de mantener la neutralidad de carga, su adición debe ir acompañada por la transferencia de protones dentro del citoplasma. En ese sentido, la

#### 4.1.5. Estrategia de Optimización de Etanol: pflA, ldhA y frdBC

Los *knockouts* particulares y a pares de los genes pflA y ldhA, relacionados con las reacciones piruvato formiato liasa (PFL) y 2-oxobutanoato formiato liasa (OBTFL), y D-lactato deshidrogenasa (LDH\_D) respectivamente, no mostraron cambios en los perfiles de secreción tanto para el modelo *iML1515\_NADPH* como para el *iML1515\_Dual* bajo cualquier régimen de ingesta de carbono. Esto, podría deberse pues las simulaciones base ya mostraban producción nula de lactato como se aprecia en la Figura 4.3, y ya que la GPR de las reacciones PFL y OBTFL no dependen exclusivamente del gen pflA, como se muestra en las Figs D.1 y D.2, que explaya una gran interacción de vectores Booleanos y variados genes.

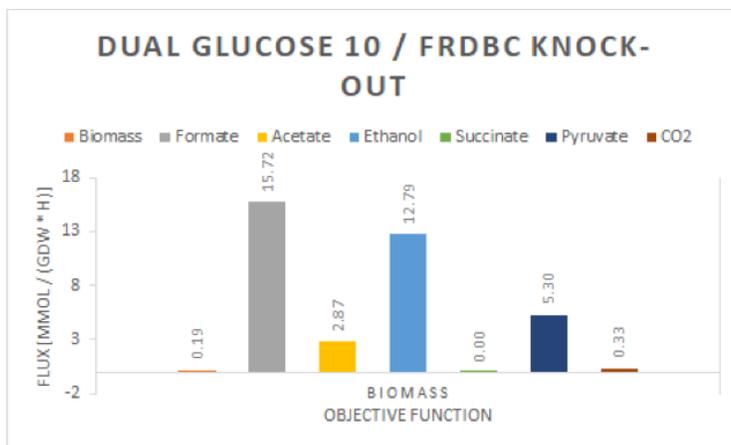


Figura 4.9: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli* con *knockout* del gen frdBC, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

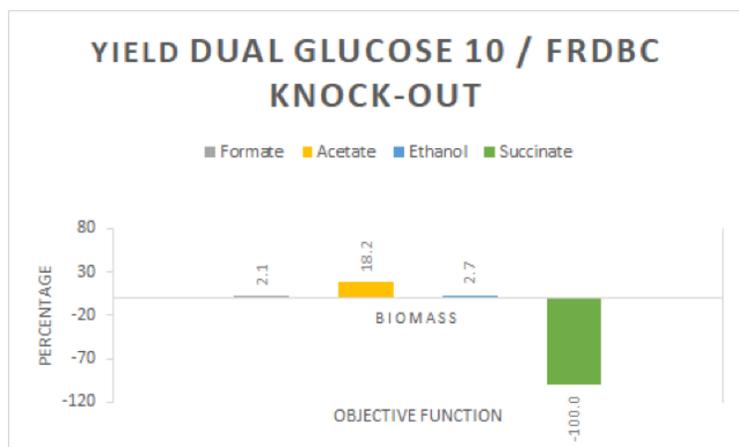


Figura 4.10: Rendimiento con respecto al caso base del *knockout* del gen frdBC, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa y 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones.

En relación al gen frdBC, sus resultados se muestran en la Figura 4.9 para el modelo *iML1515\_Dual* bajo ingesta de glucosa y CO<sub>2</sub>, en donde su eliminación impide la acción de la fumarato reductasa y, por ende, la generación de succinato a partir de fumarato y los cofactores menaquinol 8 y 2-demetilmenaquinol 8. Como consecuencia, no se justifica el consumo de dióxido de carbono y, por lo tanto, el perfil de secreción coincide con el del modelo *iML1515\_NADPH* sin obtener mayores incrementos en la formación de etanol como se muestra en la Figura 4.10.

# Capítulo 5

## Discusión

A pesar de que los cofactores redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y su forma fosforilada  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  son las moléculas más relevantes para la formación de productos de alta valor agregado mediante distintas plataformas celulares, su gran nivel de interiorización, distribución sobre toda la red metabólica y, en consecuencia, complejidad dentro del metabolismo celular, vuelven su regulación y optimización un desafío tremendo sobretodo para herramientas y estrategias moleculares y de representación *in silico*. Para estas últimas, la dificultad se refleja en los reportes de la base de datos *The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) en donde el número de reacciones dependientes de  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$  alcanzan un valor de 983 y 1051 respectivamente, siendo en su mayoría reacciones de tipo redox. Del mismo modo, en el modelo metabólico de *E. coli* a escala genómica más actual y utilizado en el desarrollo de esta memoria *iML1515*, se listan 127 y 113 reacciones acopladas a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  correspondientemente. En ese sentido, y de acuerdo a los resultados obtenidos de la simulación metabólica *in silico*, que si bien logran representar de forma macro y acotada el proceso de electrofermentación en *E. coli*, se vislumbra la necesidad de establecer nuevos enfoques de optimización a partir del conocimiento de regulación transcripcional proporcionado por los resultados del modelo desarrollado por Xin Fang et al. y nuevas tecnologías en desarrollo más allá de la disponibilidad de un *input* de poder reductor bruto.

### 5.1. Transhidrogenasas y $\text{NADPH}$

Las transhidrogenasas como un método para corregir la desproporción en la tasa del poder reductor del cofactor  $\text{NADPH}$ . Ambas isoformas presentes en *E. coli*, PntAB y UdhA, se relacionan en procedimientos fisiológicos diferentes pudiendo regular el metabolismo redox desde una vía biosintética o a través de la respiración celular respectivamente. No obstante, por medio de análisis de expresión de mRNA, ninguna es influenciada directamente por la demanda ya sea de la concentración de cofactores o por el estado redox global de la célula. Mas bien, las actividades del promotor transhidrogenasa se ven afectadas o por la disponibilidad de aminoácidos detectados vía los factores de transcripción Lrp y ArgP, o por los niveles intracelulares de cAMP. En ese sentido, ArgP activa la transcripción de pntAB, mientras que Lrp regula de forma inversa ambas enzimas, activando la transcripción de pntAB y reprimiendo la de udhA. Con respecto a cAMP, su detección se realiza de forma alostérica por el factor CRP, para luego reprimir la transcripción de pntAB a bajas tasas de crecimiento cuando menos  $\text{NADPH}$  es requerido para biosíntesis [91].

De forma específica, la regulación mediante aminoácidos involucra la concentración de aquellos tales como histidina, metionina, lisina y leucina. En relación a la adición de leucina, reduce la actividad del promotor de *pntAB* pero también incrementa la de *udhA* a través de la disminución de la actividad del factor de transcripción Lrp. Mientras que, La incorporación de lisina también reduce la transcripción de *pntAB* debido posiblemente a la reducción en la actividad del factor ArgP. En cuanto a la metionina, activa la transcripción de *udhA* y, por otro lado, la histidina reprime la actividad de la enzima *pntAB* [91].

## 5.2. Electrogenética

A partir de ensayos experimentales en *S. oneidensis* se ha podido identificar una expresión genética diferencial dependiendo del potencial aplicado en sistemas bioelectroquímicos (BESs, por sus siglas en inglés). Este comportamiento y nueva arista de investigación denominada electrogenética, evidenciada particularmente para vías catabólicas, se relaciona intrínsecamente con la regulación del factor de transcripción global ArcA. Es decir, en presencia de un electrodo de bajo potencial, ArcS parte homóloga de ArcB en *E. coli* de *S. oneidensis*, es reducida mediante quinonas reductoras activando su funcionalidad kinasa. Por consiguiente, se desencadena la fosforilación de la parte efectora ArcA y su unión a regiones promotoras de genes bajo control transcripcional. De forma contraria, al tratarse con un electrodo de alto potencial, ArcS es oxidada a través de quinonas oxidantes que desatan la liberación de factores ArcA desfosforilados de las regiones promotoras. En ese sentido y dado la compatibilidad estructural genética como transcripcional entre *S. oneidensis* y *E. coli*, la suposición de un comportamiento similar por parte de esta última sumado a estrategias de regulación, podrían usarse en combinación con procesos de electrofermentación para el desarrollo de procedimientos de bioproducción eficientes. En otras palabras, regular la expresión de vías de producción exógenas por medio de la variación del potencial de los electrodos para así sincronizar los niveles de expresión génica y fuentes energéticas [92].

### 5.2.1. Sobreexpresión del regulador ArcA

Del apartado anterior y dado la ventaja del proceso fermentativo por sobre el respiratorio, es decir, de la capacidad de prescindir de la maquinaria proteica necesaria para la generación de un flujo de ATP óptimo para un rápido crecimiento, sumado a la posibilidad de incorporar un *input* electrónico exógeno mediante el proceso de electrofermentación y la regulación por medio de la electrogenética, es que la estrategia de sobreexpresión del regulador ArcA se vislumbra prometedora en relación a que, incluso en condiciones aeróbicas, permite dirigir el metabolismo energético hacia una dependencia mayoritariamente fermentativa. De esta manera, ensayos experimentales con *E. coli* modificadas a un nivel intermedio de sobreexpresión del regulador, han mostrado incrementos en las tasas de crecimiento para todas las fuentes de carbono consultadas. Siendo aquellas, denominadas de procesamiento lento como la fructosa y la manosa, cuya incorporación en el metabolismo celular se realiza casi exclusivamente por vías respiratorias, las que exhiben una mejora sustancial en cuanto a la rapidez con respecto al crecimiento. Del mismo modo, se aprecia una mayor excreción de productos fermentados, particularmente de acetato, ausente en fermentaciones de cepas *wildtype*, junto con un incremento en la tasa de consumo de carbono. Por tanto, se visualiza que la sobreexpresión del regulador actúa con mayor fuerza sobre la inactivación de genes

relacionados con el ciclo TCA que aquellos derivados del de glioxilato. No obstante, se señalan también la represión de proteínas no esenciales fuera del metabolismo respiratorio, como posible contribuyente al efecto de crecimiento mejorado bajo condiciones de sobreexpresión [91].

La construcción de la cepa de sobreexpresión de ArcA, incluyendo la región 5'-UTR, se realiza a través de la amplificación, a partir de DNA genómico proveniente de la cepa *E. coli* NCM37722, por medio de los *primers* Ptet-ArcA-XhoI-F y ArcA-BamHI-R. Tanto la secuencia promotora Ptet como el sitio de escisión XhoI se incluyen dentro del *forward primer* Ptet-ArcA-XhoI-F. De la misma forma, el sitio de escisión BamHI también se incluye dentro del *reverse primer* ArcA-BamHI-R. De este modo, el fragmento de DNA resultante se utiliza como reemplazante del Ptet-*gfp* en el plásmido pZA31-*gfp* obteniendo la variante pZA31 Ptet-ArcA [91].

### 5.3. Cofactores redox no canónicos y circuitos ortogonales

En base a la complejidad del uso de cofactores redox como  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  debido al nivel de conexiones y grados de regulación celular, la generación eficaz de vías ortogonales específicas y el uso de cofactores no canónicos podría permitir el establecimiento de nuevos mecanismos de transferencia de electrones junto con un mayor control regulatorio en relación al curso del flujo electrónico y, por ende, grandes *upgrades* asociados con la formación de productos de alto valor agregado por medio de bioprocesos. De esta manera, en un verdadero y eficiente circuito ortogonal sus reacciones no deben estar acopladas a masivos cofactores redox como lo son las moléculas  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , flavinas, nicotinamidas y dezaflavinas, además de que la interacción del cofactor no canónico (NRC, por sus siglas en inglés) debe estar aislada tanto como se pueda de otras actividades metabólicas. Sumado a lo anterior, el desarrollo molecular del cofactor debe permitir su uso biomimético en las reacciones enzimáticas involucradas junto con prerrequisitos con respecto al potencial redox, especificidad, ubicación de acción y regulación antes de su aplicación *in vivo* [93–95].

Dentro de los primeros cofactores redox no canónicos identificado eficaz en aplicaciones MFC se encuentra la molécula nicotinamida citosina dinucleótido (NCD, por sus siglas en inglés) utilizada en la producción de malato en *E. coli* a través del uso del fosfito/fosfato como donante de electrones. En ese sentido, la fosfito deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  junto a la enzima málica fueron modificadas de tal manera de aceptar las moléculas de  $\text{NCD}^+/\text{NCDH}$  como cofactor redox. De este modo, su incorporación al medio de cultivo, junto con su bajo potencial y alta tasa inicial [fosfito]/[fosfato] revirtieron la reacción catalizada por la enzima málica convirtiendo piruvato y  $\text{CO}_2$  en malato [93]. Por otro lado, investigaciones relacionadas con este cofactor no canónico han podido crear una NCD sintetasas (NcdS, por sus siglas en inglés) mediante la reprogramación de los sitios de unión de sustrato de la mononucleótido de ácido nicotínico adenililtransferasa (NaMN, por sus siglas en inglés) a favor de la trifosfato de citidina y mononucleótido de nicotinamida por sobre sus sustratos regulares ATP y NaMN respectivamente. Así, la producción intracelular ha sido válida en *E. coli*, además de la autosuficiencia del cofactor no natural por medio de la implementación de un circuito metabólico vinculado a NCD para convertir L-malato en

D-lactato [94, 96].

Otro cofactor redox no canónico corresponde a la molécula mononucleótido de nicotinamida (NMN<sup>+</sup>/NMNH, por sus siglas en inglés) utilizada primeramente en la conversión de cetoisoforona, agregada al medio de cultivo como agente oxidante, cuya reducción culmina en la obtención de levodiona. De esta manera, el circuito ortogonal se basaría en la mejora de la disponibilidad del cofactor a través de la incorporación de la nicotinamida como nutriente, por medio de la sobreexpresión de genes involucrados en la biosíntesis de NMN (*nadE* and *nadV*) y mediante la eliminación genes implicados en el metabolismo de NMN (*nadR* and *pnnC*). Sumado a esto, la introducción y aceptación del cofactor NMN<sup>+</sup>/NMNH se realizó gracias a la modificación de las enzimas glucosa deshidrogenasa (GDH) y ene reductasa (XenA) encargadas de la transferencia de electrones del circuito. Finalmente, el direccionamiento del flujo metabólico hacia el circuito ortogonal se llevó acabo por intermedio de *knock-outs* de las enzimas clave de las vías Embden-Meyerhoff-Parnas (*pgi*) y pentosa fosfato (*zwf* and *gnd*). Por ende, solo cepas portadoras de las dos enzimas modificadas fueron capaces de crecer bajo regímenes exclusivos de glucosa, lo que indica el establecimiento exitoso del circuito [93, 97].

A partir de la evidencia del uso de cofactores no convencionales y circuitos ortogonales en el diseño y desarrollo de bioprocesos [98], nuevos enfoques referente a su aplicación en el campo de la electrofermentación pueden ser considerados. En ese marco, el procedimiento de implementación del sistema EET a partir de genes exógenos de *S. oneidensis* en *E. coli* posee gran compatibilidad y semejanza con la elaboración de circuitos metabólicos ortogonales. Tal como se exployó en párrafos anteriores, se necesitan de cofactores redox específicos y mínimos en cuanto a la distribución metabólica, moléculas similares ya incorporadas por el proceso de electrofermentación en la interacción del electrodo mediante *shuttles* como NR y . De esta manera, solo faltaría acoplar cofactores redox intracelulares, como NCD<sup>+</sup>/NCDH o NMN<sup>+</sup>/NMNH si fuese necesario, y realizar modificaciones a los sitios activos de las enzimas involucradas (*CymA* y *MtrABC*) de acuerdo al producto optimizado. Por lo tanto, considerar este punto de vista, es decir, la aplicación de cofactores no canónicos a procesos de electrofermentación permitiría, además de dotar de un sistema EET y potencial exoelectrogénico a un microorganismo carente de estas, establecer un firme control sobre el flujo de electrones y, en consecuencia, la posibilidad de alcanzar rendimientos teóricos máximos.

# Capítulo 6

## Conclusiones

De forma general, los resultados mostraron potencial en cuanto a la incorporación de poder reductor mediante el uso de electrodos y que efectivamente se podría aumentar la producción de compuestos fermentados como lo fue en el caso de etanol. De esta manera, la simulación se basó en el supuesto de trabajar con cepas modificadas de *E. coli* capaces de interactuar con los electrodos a través de la incorporación de un sistema de transferencia de electrones extracelular a partir de genes del microorganismo *S. oneidensis*. Así, el ingreso energético fue propuesto exclusivamente a través de los pares de cofactores redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . En ese sentido, de los 3 modelos metabólicos desarrollados, cuya principal diferencia radicó en la forma de incorporar el ingreso de electrones ya sea exclusivamente por  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  o ambos, solo *iML1515\_NADPH* y *iML1515\_Dual* hicieron uso de los recursos dispuestos por la ETT y, por ende, obtuvieron resultados acorde con la evidencia experimental revisada como se detalla en el punto 4.1.2 de los resultados. Ahora bien, en cuanto a los regímenes alimentarios, la fijación de  $\text{CO}_2$  fue indiferente en la mayoría de los casos a excepción del modelo dual donde se vio incrementada la formación de formato, acetato y succinato dado el acoplamiento por medio de la enzima PPC encargada de generar moléculas de oxalacetato. Finalmente, con respecto a la estrategia de optimización de producción de etanol simulada a partir del *knockout* de los genes candidatos identificados por [87, 89, 90], solo aquella referente del gen *frdBC* muestra un incremento del 2.7%, y se atribuye la falla de las demás principalmente porque se identifican brechas tecnológicas y de simulación del *software* *cobrapy* en cuanto a las interacciones GPR y dado que los modelos metabólicos no consideran niveles de expresión génica.

Del análisis de las metodologías transcripcionales a partir del modelo propuesto por Xin Fang et al. y la bibliografía revisada, se reconocen los factores de transcripción globales ArcA, CRP, Lrp y ArgP como posibles *targets* en cuanto a la regulación del proceso de fermentación. De esta manera, se identifica el control de las transhidrogenasas dependientes de NADPH (PntAB y UdhA) como un posible método enfocado a la corrección en la desproporción del poder reductor del cofactor redox  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . Es así como, de forma indirecta, pueden ser reguladas mediante la detección de los aminoácidos de histidina, metionina, lisina y leucina por parte de los factores globales ArgP y Lrp, o por los niveles de cAMP intracelular a través del regulador CRP, ambas mediante su influencia en la zona promotora. Por ende, la utilización de medios enriquecidos con estas moléculas podría generar una mayor activación enzimática dirigida hacia el traspaso de poder reductor desde la vía biosintética a la fermentativa. Por otro lado, dado la evidencia experimental de una expresión diferencial dependiente

del potencial aplicado en sistemas BESs basado en la regulación del factor global ArcA en *S. oneidensis*, es que la estrategia de sobreexpresión en *E. coli* del regulador se vislumbra prometedora en relación a que, incluso en condiciones aeróbicas, permite dirigir el metabolismo energético hacia una dependencia mayoritariamente fermentativa. De este modo, a partir de la compatibilidad entre los microorganismos, es que la electrogenética podría utilizarse en conjunto con la sobreexpresión del gen en procesos de electrofermentación. Finalmente, cabe destacar que el control del proceso de fermentación a través de la regulación transcripcional de factores globales sigue siendo un desafío debido a su alcance a nivel metabólico y, por ende, análisis de enriquecimiento utilizando redes transcripcionales más acotadas e identificando genes particulares de mayor influencia en las diferentes vías metabólicas se entreve necesario.

A partir de los resultados y el enfoque de la discusión propuesta sobre la dificultad del control de flujo de electrones por medio de cofactores convencionales, es que se menciona el uso de cofactores no canónicos y circuitos ortogonales como otra arista a las estrategias de optimización mediante la regulación transcripcional. En ese sentido, de las ventajas del desarrollo de circuitos y cofactores aislados y altamente específicos evidenciados en bioprocesos, el mecanismo de electrofermentación en *E. coli* atisba alta compatibilidad en relación a que el establecimiento de una apropiada ETT depende del uso de moléculas *shuttles* y genes exógenos. De esta manera, aprovechando el conocimiento de los cofactores no convencionales ya desarrollados, NCD+/NCDH y NMN+/NMNH, se podría evaluar su potencial y/o modificaciones para llegar a actuar como molécula *shuttle*. Del mismo modo, variaciones en los dominios activos del sistema ETT exportado de *S. oneidensis* conformado por los citocromos CymA y MtrABC, permitiría dotar de especificidad al circuito e idealmente alcanzar rendimientos teóricos máximos debido al control sobre el *input* del poder reductor.

# Bibliografía

- [1] J. Liu, H. Li, G. Zhao, Q. Caiyin, and J. Qiao, “Redox cofactor engineering in industrial microorganisms: strategies, recent applications and future directions,” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 45, no. 5, pp. 313–327, 2018.
- [2] K. Schroer, B. Zelic, M. Oldiges, and S. Lütz, “Metabolomics for biotransformations: Intra-cellular redox cofactor analysis and enzyme kinetics offer insight into whole cell processes,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 104, no. 2, pp. 251–260, 2009.
- [3] M. F. Umar, S. Z. Abbas, M. N. M. Ibrahim, N. Ismail, and M. Rafatullah, “Insights into advancements and electrons transfer mechanisms of electrogens in benthic microbial fuel cells,” *Membranes*, vol. 10, no. 9, p. 205, 2020.
- [4] M. Li, M. Zhou, X. Tian, and C. T. J. HassettbTingyueGua, “Microbial fuel cell (mfc) power performance improvement through enhanced microbial electrogenicity,” *Biotechnology Advances*, vol. 36, no. 4, pp. 1316–1327, 2018.
- [5] B. E. Logan, R. Rossi, A. Ragab, and P. E. Saikaly, “Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 17, no. 5, pp. 307–319, 2019.
- [6] F. Kracke, B. Lai, S. Yu, and J. O. Krömer, “Balancing cellular redox metabolism in microbialelectrosynthesis and electro fermentation – a chance for metabolic engineering,” *Metabolic Engineering*, vol. 45, pp. 109–120, 2018.
- [7] Y. Yang, Y. Wu, Y. Hu, Y. Cao, C. L. Poh, B. Cao, and H. Song, “Engineering electrode-attached microbial consortia for high-performance xylose-fed microbial fuel cell,” *ACS Catalysis*, vol. 5, no. 11, pp. 6937–6945, 2015.
- [8] J. K. B. Cahn, C. A. Werlang, A. Baumschlager, S. Brinkmann-Chen, S. L. Mayo, and F. H. Arnold, “A general tool for engineering the nad/nadp cofactor preference of oxidoreductases,” *ACS Synthetic Biology*, vol. 6, no. 2, pp. 326–333, 2017.
- [9] W. B. Black, L. Zhang, W. S. Mak, S. Maxel, Y. Cui, E. King, B. Fong, A. S. Martinez, J. B. Siegel, and H. Li, “Engineering a nicotinamide mononucleotide redox cofactor system for biocatalysis,” *Nature Chemical Biology*, vol. 16, no. 1, pp. 87–94, 2020.
- [10] L. Su, Y. Shen, W. Zhang, T. Gao, Z. Shang, and M. Wang, “Cofactor engineering to regulate nad<sup>+</sup>/nadh ratio with its application to phytosterols biotransformation,” *Microbial Cell Factories*, vol. 16, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [11] M. J. van Hoek and R. M. Merks, “Redox balance is key to explaining full vs. partial-switching to low-yield metabolism,” *BMC Systems Biology*, vol. 6, no. 22, 2012.
- [12] R. L. Heydorn, C. Engel, R. Krull, and K. Dohnt, “Strategies for the targeted impro-

- vement of anodic electron transfer in microbial fuel cells,” *ChemBioEng Reviews*, vol. 7, no. 1, pp. 4–17, 2020.
- [13] F. Kracke and J. O. Krömer, “Identifying target processes for microbial electrosynthesis by elementary mode analysis,” *BMC Bioinformatics*, vol. 15, no. 410, 2014.
- [14] F. Kracke, I. Vassilev, and J. O. Krömer, “Microbial electron transport and energy conservation - the foundation for optimizing bioelectrochemical systems,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, 2015.
- [15] A. H. Förster, S. Beblawy, F. Golitsch, and J. Gescher, “Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. biotechnology for biofuels,” *Membranes*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2017.
- [16] P. Gupta, P. Parkhey, K. Joshi, A. Mahilkar, J. K. Bhatia, and L. N. Meena, “Comparative study of microbial fuel cell for electricity generation by enriched exoelectron generating bacteria from environmental samples,” *Asian Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 3, pp. 137–142, 2012.
- [17] M. A. Teravest and C. M. Ajo-Franklin, “Transforming exoelectrogens for biotechnology using synthetic biology,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 113, no. 4, pp. 687–697, 2016.
- [18] L. Ren, S. McCuskey, A. Moreland, G. Bazan, and T.-Q. Nguyen, “Tuning *Geobacter sulfurreducens* biofilm with conjugated polyelectrolyte for increased performance in bioelectrochemical system,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 144, 2019.
- [19] D. R. Bond and D. R. Lovley, “Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 3, pp. 1548–1555, 2003.
- [20] C. Dundas, D. Walker, and B. Keitz, “Tuning extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis* using transcriptional logic gates,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 2301–2315, 2020.
- [21] Z. Wu, J. Wang, J. Liu, Y. Wang, C. Bi, and X. Zhang, “Engineering an electroactive *Escherichia coli* for the microbial electrosynthesis of succinate from glucose and CO<sub>2</sub>,” *Microb Cell Fact*, vol. 18, no. 5, 2019.
- [22] H. Jensen, A. Albers, K. Malley, Y. Londer, B. E. Cohen, B. Helms, P. Weigele, J. Groves, and C. Ajo-Franklin, “Engineering of a synthetic electron conduit in living cells,” *PNAS*, vol. 107, no. 45, pp. 19213–19218, 2010.
- [23] K. Sturm-Richter, F. Golitsch, G. S. E. Kipf, A. Dittrich, S. Beblawy, S. Kerzenmacher, and J. Gescher, “Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells,” *Bioresour Technol*, vol. 186, pp. 89–96, 2015.
- [24] O. Choi and B. Sang, “Extracellular electron transfer from cathode to microbes: application for biofuel production,” *Biotechnol Biofuels*, vol. 9, no. 11, pp. 1–14, 2016.
- [25] Z. Gong, H. Yu, J. Zhang, F. Li, and H. Song, “Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bi-directional extracellular electron transfer,” *Synthetic and Systems Biotechnology*, vol. 5, no. 4, pp. 304–313, 2020.

- [26] T. Y., A. RY, M. N.S., W. J.E., N. K.P., W. T.L., S. J.A., S.-W. O.L., F. A.E., T. M.T., and L. D.R., “The low conductivity of *geobacter uraniireducens* pili suggests a diversity of extracellular electron transfer mechanisms in the genus *geobacter*,” *Front Microbiol.*, vol. 1, no. 24, pp. 1–10, 2016.
- [27] F. Wang, Y. Gu, J. P. O’Brien, S. Yi, S. E. Yalcin, V. Srikanth, C. Shen, D. Vu, N. Ing, A. Hochbaum, E. Egelman, and N. Malvankar, “Structure of microbial nanowires reveals stacked hemes that transport electrons over micrometers,” *Cell*, vol. 177, no. 2, pp. 361–369, 2019.
- [28] A. Kumar, P. K. Leo Huan-Hsuan Hsu, F. Barrière, P. N. L. Lens, L. Lapinsonnière, J. H. L. V, U. Schröder, X. Jiang, and D. Leech, “The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions,” *Nature Reviews Chemistry*, vol. 1, no. 24, 2017.
- [29] J. S. Deutzmann, M. Sahina, and A. M. Spormann, “Extracellular enzymes facilitate electron uptake in biocorrosion and bioelectrosynthesis,” *ASM Journals*, vol. 6, no. 2, pp. 361–369, 2015.
- [30] T. Lin, W. Ding, L. Sun, L. Wang, C.-G. Liu, and H. Song, “Engineered *shewanella oneidensis*-reduced graphene oxide biohybrid with enhanced biosynthesis and transport of flavins enabled a highest bioelectricity output in microbial fuel cells,” *Nano Energy*, vol. 50, pp. 639–648, 2018.
- [31] M. Breuer, K. M. Rosso, and J. Blumberger, “Flavin binding to the deca-heme cytochrome *mtrC*: Insights from computational molecular simulation,” *Biophysical Journal*, vol. 109, no. 12, pp. 2614–2624, 2015.
- [32] A. Okamoto, K. Hashimoto, K. H. Neelson, and R. Nakamura, “Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones,” *PNAS*, vol. 110, no. 19, pp. 7856–7861, 2013.
- [33] X. Liu, L. Shi, and J.-D. Gu, “Microbial electrocatalysis: Redox mediators responsible for extracellular electron transfer,” *Biotechnology Advances*, vol. 36, no. 7, pp. 1815–1827, 2018.
- [34] X. Liu and X. Yu, “Enhancement of butanol production: From biocatalysis to bioelectrocatalysis,” *ACS Energy Lett.*, vol. 5, no. 3, pp. 867–878, 2020.
- [35] H. Chen, F. Dong, and S. D. Minter, “The progress and outlook of bioelectrocatalysis for the production of chemicals, fuels and materials,” *Nat Catal*, vol. 3, pp. 867–878, 2020.
- [36] K. Watanabe, M. Manefield, M. Lee, and A. Kouzuma, “Electron shuttles in biotechnology,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 20, no. 6, pp. 633–641, 2009.
- [37] E. Blanchet, F. Duquenne, Y. Rafrafi, L. Etcheverry, B. Erablea, and A. Bergel, “Importance of the hydrogen route in up-scaling electrosynthesis for microbial  $\text{CO}_2$  reduction,” *Energy Environmental Science*, vol. 8, no. 12, pp. 3731–3744, 2015.
- [38] H. Li, P. H. Opgenorth, D. G. Wernick, S. Rogers, T.-Y. Wu, W. Higashide, P. Malati, Y.-X. Huo, K. M. Cho, and J. C. Liao, “Integrated electromicrobial conversion of  $\text{CO}_2$  to higher alcohols,” *SCIENCE*, vol. 335, no. 6076, p. 1596, 2012.
- [39] M. Villano, F. Aulenta, C. Ciucci, T. Ferri, A. Giuliano, and M. Majone, “Bioelectro-

- chemical reduction of co<sub>2</sub> to ch<sub>4</sub> via direct and indirect extracellular electron transfer by a hydrogenophilic methanogenic culture,” *Bioresour Technol*, vol. 101, no. 9, pp. 3085–3090, 2010.
- [40] C. Marshall, D. Ross, E. Fichot, R. Norman, and H. May, “Electrosynthesis of commodity chemicals by an autotrophic microbial community,” *Appl Environ Microbio*, vol. 78, no. 23, pp. 8412–8420, 2012.
- [41] J. S. Gescher, C. D. Cordova, and A. M. Spormann, “Dissimilatory iron reduction in escherichia coli: identification of cyma of shewanella oneidensis and napc of e. coli as ferric reductases,” *Molecular microbiology*, vol. 68, no. 3, pp. 706–719, 2008.
- [42] M. Lakshmanan, K. Yu, L. Koduru, and D.-Y. Lee, “In silico model-driven cofactor engineering strategies for improving the overall nadp(h) turnover in microbial cell factories,” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 42, no. 10, pp. 1401–1414, 2015.
- [43] M. MacGillivray, A. Ko, E. Gruber, M. Sawyer, E. Almaas, and A. Holder, “Robust analysis of fluxes in genome-scale metabolic pathways,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 268, 2017.
- [44] J. W. Lee, D. Na, J. M. Park, J. Lee, S. Choi, and S. Y. Lee, “Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals,” *Nat Chem Biol*, vol. 8, pp. 536–546, 2012.
- [45] J. M. Monk, A. Koza, M. A. Campodonico, D. Machado, J. M. Seoane, B. O. Palsson, M. J. Herrgård, and A. M. Feist, “Multi-omics quantification of species variation of escherichia coli links molecular features with strain phenotypes,” *Cell Syst*, vol. 3, no. 3, pp. 238–251, 2016.
- [46] J. Jeon and H. U. Kim, “Setup of a scientific computing environment for computational biology: Simulation of a genome-scale metabolic model of escherichia coli as an example,” *Journal of Microbiology*, vol. 58, no. 3, pp. 227–234, 2020.
- [47] C. J. Norsigian, N. Pusarla, J. L. McConn, J. T. Yurkovich, A. D. ger, B. O. Palsson, and Z. King, “Bigg models 2020: multi-strain genome-scale models and expansion across the phylogenetic tree,” *Nucleic Acids Research*, vol. 48, 2020.
- [48] B. S. Mienda and A. Dräger, “Genome-scale metabolic modeling of escherichia coli and its chassis design for synthetic biology applications,” *Computational Methods in Synthetic Biology*, pp. 217–229, 2021.
- [49] K. Hayashi, N. Morooka, Y. Yamamoto, K. Fujita, K. Isono, S. Choi, E. Ohtsubo, T. Baba, B. L. Wanner, H. Mori, and T. Horiuchi, “Highly accurate genome sequences of escherichia coli k-12 strains mg1655 and w3110,” *Molecular Systems Biology*, vol. 2, no. 1, pp. 2006–2007, 2006.
- [50] P. Pasomboon, P. Chumnpanuen, and T. E-kobon, “Modified genome-scale metabolic model of escherichia coli by adding hyaluronic acid biosynthesis-related enzymes (glmu2 and hyad) from pasteurella multocida,” *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, vol. 15, no. 5, pp. 54–58, 2021.
- [51] Y. Gao, J. T. Yurkovich, S. W. Seo, I. Kabimoldayev, A. Dräger, K. Chen, A. V. Sastry, X. Fang, N. Mih, L. Yang, J. Eichner, B.-K. Cho, D. Kim, and B. O. Palsson, “Systematic discovery of uncharacterized transcription factors in escherichia coli k-12 mg1655,”

- Nucleic Acids Research*, vol. 46, no. 20, pp. 10682–10696, 2018.
- [52] J. Monk, C. Lloyd, E. Brunk, N. Mih, A. Sastry, Z. King, R. Takeuchi, W. Nomura, Z. Zhang, H. Mori, A. M. Feist, and B. Palsson, “*iml1515*, a knowledgebase that computes *escherichia coli* traits,” *Nature Biotechnology*, vol. 35, no. 10, pp. 904–908, 2017.
- [53] R. Schuetz, L. Kuepfer, and U. Sauer, “Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *escherichia coli*,” *Mol Syst Biol*, vol. 3, no. 119, 2007.
- [54] E. Balleza, L. N. López-Bojorquez, A. Martínez-Antonio, O. Resendis-Antonio, I. Lozada-Chávez, Y. I. Balderas-Martínez, S. Encarnación, and J. Collado-Vides, “Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, no. 1, pp. 133–151, 2009.
- [55] H. Zare, D. Sangurdekar, P. Srivastava, M. Kaveh, and A. Khodursky, “Reconstruction of *escherichia coli* transcriptional regulatory networks via regulon-based associations,” *BMC Systems Biology*, vol. 3, no. 39, 2009.
- [56] X. Fang, A. Sastry, N. Mih, D. Kim, J. Tan, J. Yurkovich, C. Lloyd, Y. Gao, L. Yang, and B. Palsson, “Global transcriptional regulatory network for *escherichia coli* robustly connects gene expression to transcription factor activities,” *PNAS*, vol. 114, no. 38, pp. 10286–1029, 2017.
- [57] D. F. Browning and S. J. W. Busby, “Local and global regulation of transcription initiation in bacteria,” *Rev Microbiol*, vol. 14, no. 39, pp. 635–650, 2016.
- [58] Ángeles Arzalluz-Luque and A. Conesa, “Single-cell rnaseq for the study of isoforms—how is that possible?,” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, no. 110, 2018.
- [59] A. M. Antonio and J. C. Vides, “Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, no. 0, pp. 482–489, 2003.
- [60] A. M. Antonio, S. C. Janga, and D. Thieffry, “Functional organisation of *escherichia coli* transcriptional regulatory network,” *J. Mol. Biol.*, vol. 381, pp. 238–247, 2008.
- [61] S. E. Nicolau and K. Lewis, “The role of integration host factor in *escherichia coli* persister formation,” *American Society for Microbiology*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2022.
- [62] D. C. Grainger, H. Aiba, D. Hurd, D. F. Browning, and S. J. W. Busby, “Transcription factor distribution in *escherichia coli*: studies with *fnr* protein,” *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 1, pp. 269–278, 2007.
- [63] K. Bettenbrock, H. Bai, M. Ederer, J. Green, K. J. Hellingwerf, M. Holcombe, S. Kunz, M. D. Rolfe, G. Sanguinetti, O. Sawodny, P. Sharma, S. Steinsiek, and R. K. Poole, “Towards a systems level understanding of the oxygen response of *escherichia coli*,” *Advances in Microbial Physiology*, vol. 64, pp. 67–108, 2014.
- [64] E. L. Mettert and P. J. Kiley, “Reassessing the structure and function relationship of the o<sub>2</sub> sensing transcription factor *fnr*,” *ANTIOXIDANTS REDOX SIGNALING*, vol. 0, no. 0, pp. 1–11, 2017.
- [65] R. Gupta and N. Gupta, “Bacterial response to oxygen availability. in: Fundamentals of bacterial physiology and metabolism,” *Springer, Singapore*, pp. 575–592, 2021.

- [66] E. E. Price, F. Román-Rodríguez, and J. M. Boyd, “Bacterial approaches to sensing and responding to respiration and respiration metabolites,” *Molecular Microbiology*, vol. 116, no. 4, pp. 1009–1021, 2021.
- [67] G. Unden and R. Klein, “Sensing of o<sub>2</sub> and nitrate by bacteria: alternative strategies for transcriptional regulation of nitrate respiration by o<sub>2</sub> and nitrate,” *Environmental Microbiology*, vol. 23, no. 1, pp. 5–14, 2021.
- [68] S. Durand and M. Guillier, “Transcriptional and post-transcriptional control of the nitrate respiration in bacteria,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 8, 2021.
- [69] R. Gupta and N. Gupta, “Regulation of anaerobic respiration. in: Fundamentals of bacterial physiology and metabolism,” *Springer, Singapore*, pp. 593–609, 2021.
- [70] N. Nochino, Y. Toya, and H. Shimizu, “Transcription factor arca is a flux sensor for the oxygen consumption rate in escherichia coli,” *Biotechnology Journal*, vol. 15, no. 6, pp. 1–7, 2020.
- [71] S. Alexeeva, K. J. Hellingwerf, and M. J. T. de Mattos, “Requirement of arca for redox regulation in escherichia coli under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions,” *Biotechnology Journal*, vol. 15, no. 6, pp. 1–7, 2020.
- [72] R.P.Gunsalus and S. Park, “Aerobic-anaerobic gene regulation in escherichia coli: control by the arcab and fnr regulons,” *12th Forum in Microbiology*, pp. 1–14, 2002.
- [73] B.-K. Cho, E. M. Knight, and B. Palsson, “Transcriptional regulation of the fad regulon genes of escherichia coli by arca,” *Microbiology*, vol. 152, no. 6, pp. 2207–2219, 2006.
- [74] D. M. Park, M. S. Akhtar, A. Z. Ansari, R. Landick, and P. J. Kiley, “The bacterial response regulator arca uses a diverse binding site architecture to regulate carbon oxidation globally,” *PLOS Genetics*, vol. 9, no. 10, pp. 1–18, 2013.
- [75] K. Sander, K. G. Asano, D. Bhandari, G. J. V. Berkel, S. D. Brown, B. Davison, and T. J. Tschaplinski, “Targeted redox and energy cofactor metabolomics in clostridium thermocellum and thermoanaerobacterium saccharolyticum,” *Biotechnol Biofuels*, vol. 10, no. 270, 2017.
- [76] S. S. Lim JH, K. SY, and J. GY, “Model-driven rebalancing of the intracellular redox state for optimization of a heterologous n-butanol pathway in *Escherichia coli*,” *Metab Eng*, vol. 20, pp. 56–62, 2013.
- [77] S. M, H. CM, C. CJ, and C. YP, “Potential production platform of n-butanol in escherichia coli,” *Metab Eng*, vol. 27, pp. 76–82, 2015.
- [78] C. Y, X. D, F. L, Z. X, and T. T, “Manipulating multi-system of nadph regulation in escherichia coli for enhanced s-adenosylmethionine production,” *Rsc Adv*, vol. 5, pp. 41103–41111, 2015.
- [79] S. HS, J. JM, K. HJ, B. SK, S. G, K. J, W. H. J, G. H. Y, Y. C. K, K. YG, K. W, and Y. YH, “Increase in furfural tolerance by combinatorial overexpression of nad salvage pathway enzymes in engineered isobutanol-producing e. coli,” *Bioresour Technol*, vol. 245, pp. 1430–1435, 2017.
- [80] N. CY, F. I, M. CD, and S. HM, “Rational design of a synthetic entner–doudoroff pathway for improved and controllable nadph regeneration,” *Metab Eng*, vol. 29, pp. 68–

96, 2015.

- [81] S. U. C. F., H. S., P. A., and F. E., “The soluble and membrane-bound transhydrogenases *udha* and *pntab* have divergent functions in nadph metabolism of *escherichia coli*,” *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 6613–6619, 2004.
- [82] A. Förster and J. Gescher, “Metabolic engineering of *escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products,” *Front. Bioeng. Biotechnol*, vol. 2, pp. 2296–4185, 2014.
- [83] G. Marinos, C. Kaleta, and S. Waschina, “Defining the nutritional input for genome-scale metabolic models: A roadmap,” *PLoS ONE*, vol. 15, no. 8, 2020.
- [84] A. Pandit and R. Mahadevan, “*In silico* characterization of microbial electrosynthesis for metabolic engineering of biochemicals,” *Microbial Cell Factories*, vol. 10, no. 76, pp. 1–14, 2011.
- [85] X.-H. Xie, E. L. Li, and Z. K. Tang, “Redox modulation and non-invasive evaluation of phenotypic adaptation of *escherichia coli* biofilm,” *Int J Electrochem Sci*, vol. 5, pp. 1379–1389, 2010.
- [86] M. Volpers, N. Claassens, E. Noor, J. van der Oost, W. de Vos, S. Kengen, and V. M. dos Santo, “Integrated *In Silico* analysis of pathway designs for synthetic photo-electro-autotrophy,” *PLoS ONE*, vol. 11, no. 6, pp. 1–25, 2016.
- [87] B. S. Mienda, M. S. Shamsir, I. Shehu, A. A. Deba, and I. Galadima, “In silico metabolic engineering interventions of *escherichia coli* for enhanced ethanol production, based on gene knockout simulation,” *IIOABJ*, vol. 5, no. 2, pp. 16–23, 2014.
- [88] R. Gallardo, A. Acevedo, J. Quintero, I. Paredes, R. Conejeros, and G. Aroca, “*In silico* analysis of *clostridium acetobutylicum* atcc 824 metabolic response to an external electron supply,” *Bioprocess Biosyst Eng* ., vol. 39, no. 2, pp. 295–305, 2016.
- [89] A. Hildebrand, T. Schlacta, R. Warmack, T. Kasuga, and Z. Fan, “Engineering *escherichia coli* for improved ethanol production from gluconate,” *Journal of Biotechnology*, vol. 168, no. 1, pp. 101–106, 2014.
- [90] Z. Fan, W. Wu, A. Hildebrand, T. Kasuga, R. Zhang, and X. Xiong, “A novel biochemical route for fuels and chemicals production from cellulosic biomass,” *Plos ONE*End volume =.
- [91] B. R. B. H. van Rijsewijk, K. Kochanowsk, M. Heinemann, and U. Sauer, “Distinct transcriptional regulation of the two *escherichia coli* transhydrogenases *pntab* and *udha*,” *Microbiology*, vol. 162, pp. 1672–1679, 2016.
- [92] I. Sota, Y. Takamatsu, M. Tsuchiya, K. Suga, Y. Tanaka, A. Kouzuma, and K. Watanabe, “*Shewanella oneidensis* mr-1 as a bacterial platform for electro-biotechnology,” *Essays in Biochemistry*, vol. 65, pp. 355–364, 2021.
- [93] W. R. A., P. L. Folch, A. Pozo-Rodríguez, and C. E. Paul, “Applying non-canonical redox cofactors in fermentation processes,” *Iscience*, vol. 23, no. 9, 2020.
- [94] W. Xueying, Y. Feng, X. Guo, Q. Wang, S. Ning, Q. L. J. Wang, L. Wang, and Z. K. Zhao, “Creating enzymes and self-sufficient cells for biosynthesis of the non-natural cofactor nicotinamide cytosine dinucleotide,” *Nature communications*, vol. 12, no. 1, pp. 1–9,

2021.

- [95] J. WA, X. GU, Q. LI, L. WA, and Z. ZH, “Creation of non-natural cofactor-dependent methanol dehydrogenase,” *Synthetic Biology Journal*, vol. 2, no. 4, p. 651, 2021.
- [96] W. Lei, D. Ji, Y. Liu, Q. Wang, X. Wang, Y. J. Zhou, Y. Zhang, W. Liu, and Z. K. Zhao, “Synthetic cofactor-linked metabolic circuits for selective energy transfer,” *ACS Catalysis*, vol. 7, no. 3, pp. 1977–1983, 2017.
- [97] B. W. B., L. Zhang, W. S. Mak, S. Maxel, Y. Cui, E. King, B. Fong, A. S. Martinez, J. B. Siegel, and H. Li, “Engineering a nicotinamide mononucleotide redox cofactor system for biocatalysis,” *Nature chemical biology*, vol. 16, no. 1, pp. 87–94, 2020.
- [98] F. P. L., “Harnessing additional metabolic energy during fermentation processes: will the proton-motive force be with you?,” *Wageningen University*, 2021.

# Anexo A

## Resultados: perfiles de secreción de simulaciones *in silico*

### A.1. Electrosíntesis con glucosa

#### A.1.1. Caso Base

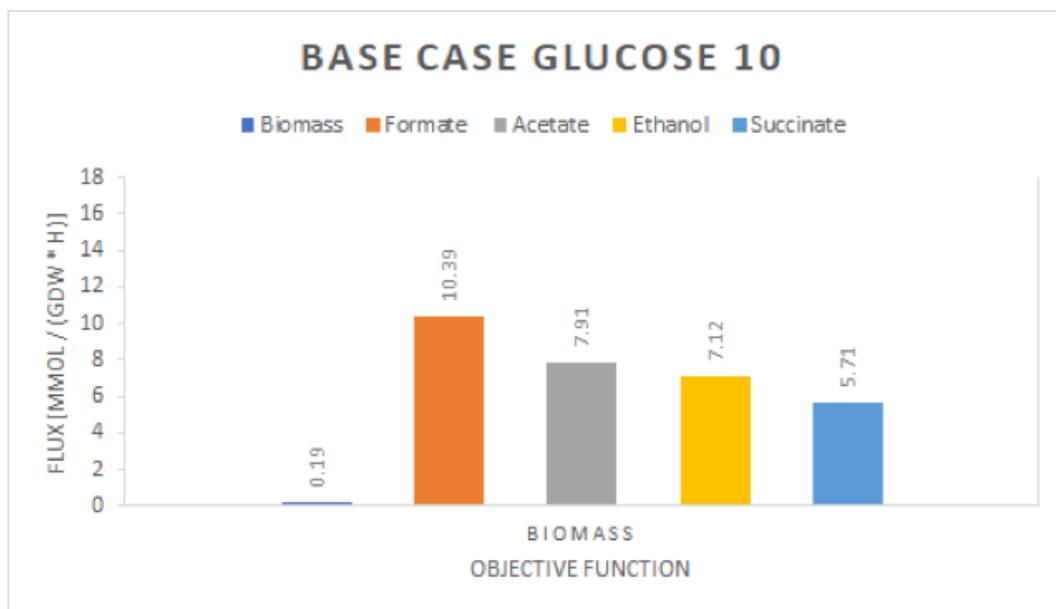


Figura A.1: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515*, bajo un proceso de fermentación anaerobia con *uptake* máximo de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa.

### A.1.2. Modelo *iML1515\_NADPH*

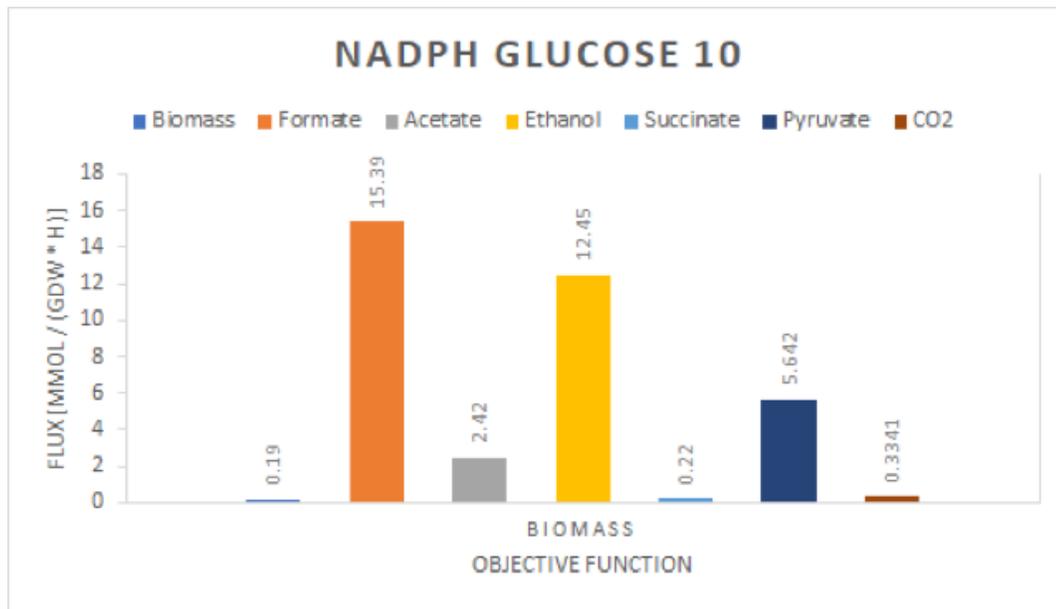


Figura A.2: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa y 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones.

### A.1.3. Modelo *iML1515\_NADH*

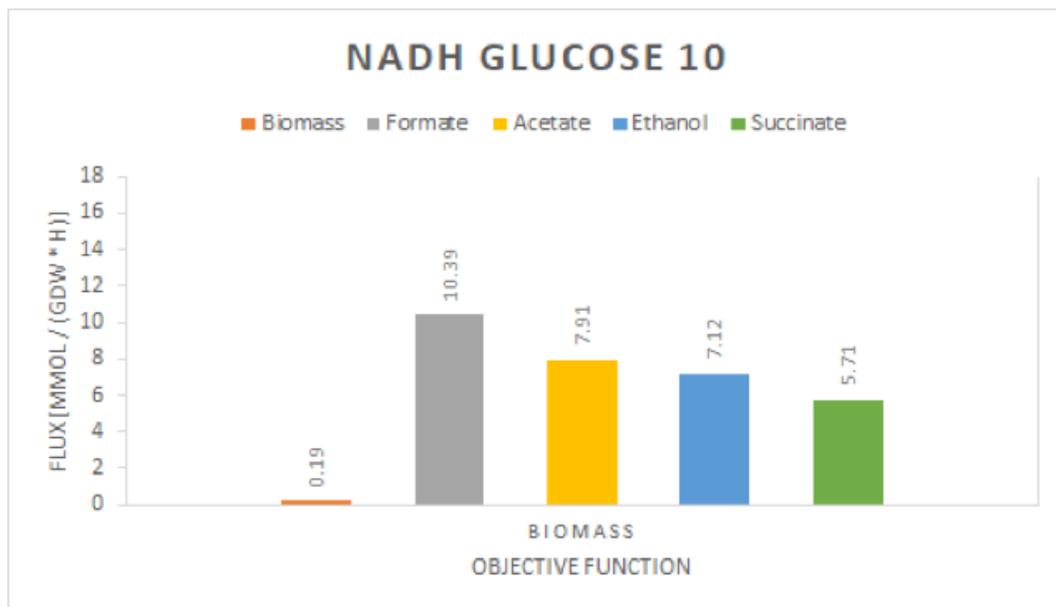


Figura A.3: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa y 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones.

### A.1.4. Modelo *iML1515\_Dual*

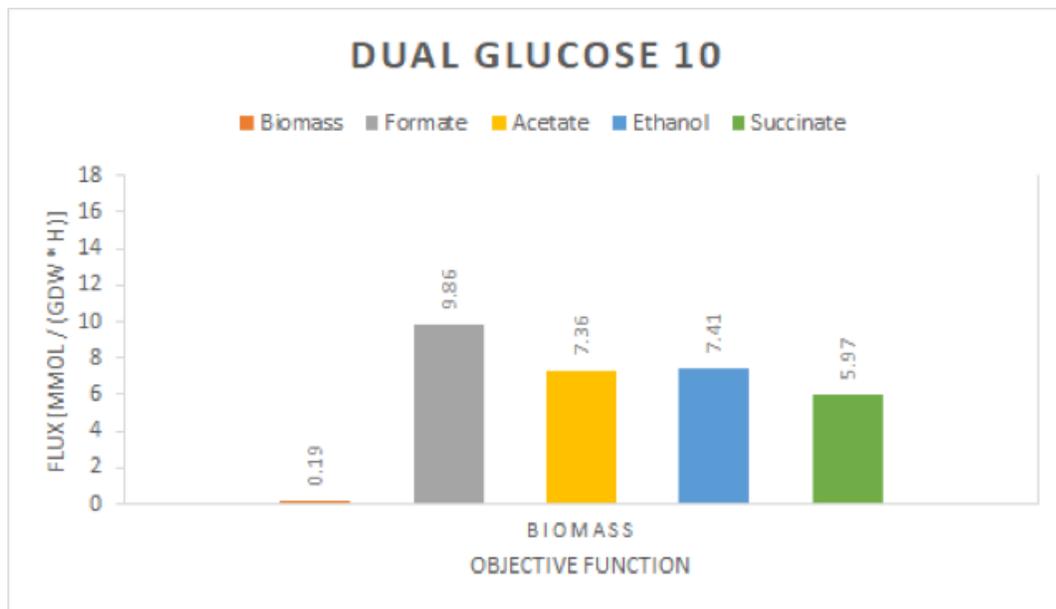


Figura A.4: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa y 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones.

## A.2. Electrosíntesis con glucosa y CO<sub>2</sub> libre

### A.2.1. Caso Base

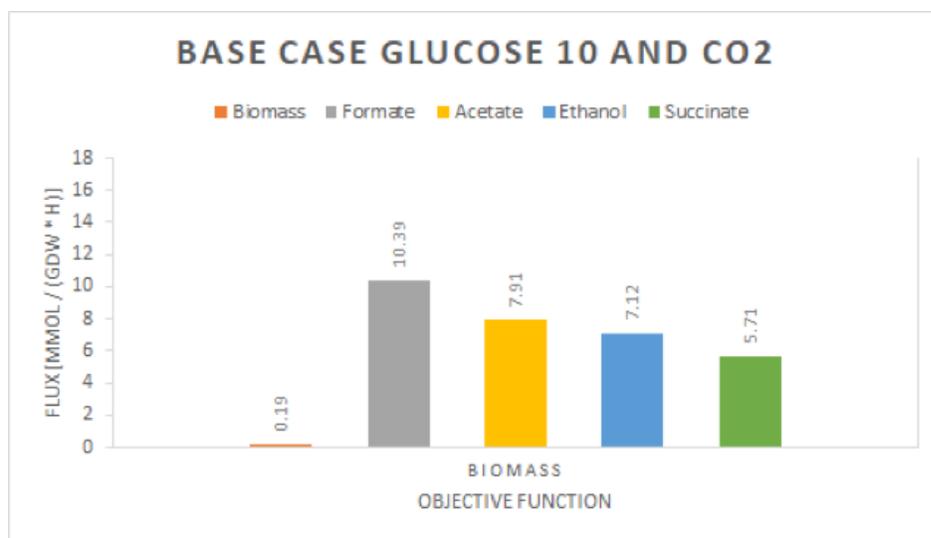


Figura A.5: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515*, bajo un proceso de fermentación anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa y CO<sub>2</sub> libre.

### A.2.2. Modelo *iML1515\_NADPH*

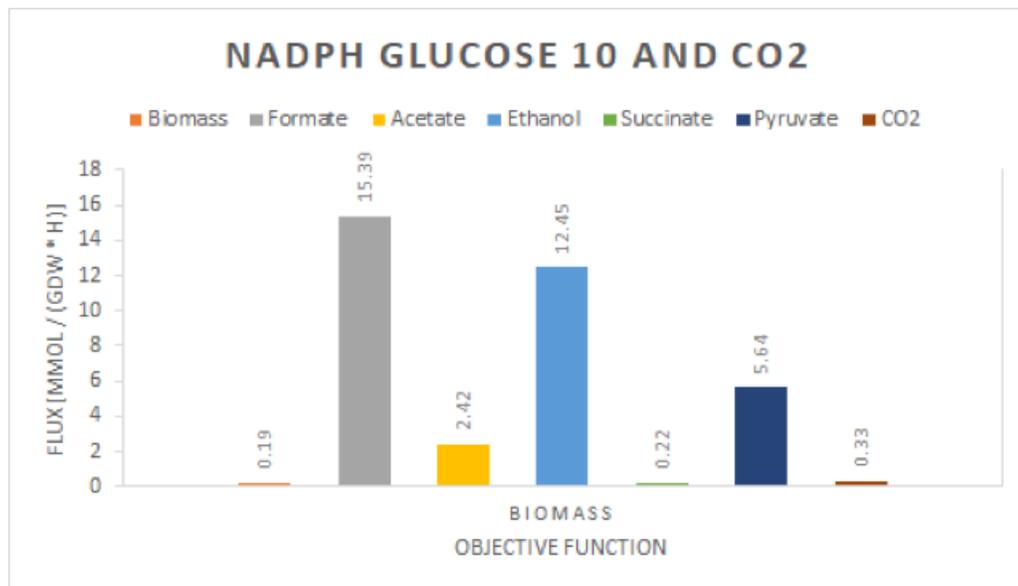


Figura A.6: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

### A.2.3. Modelo *iML1515\_NADH*

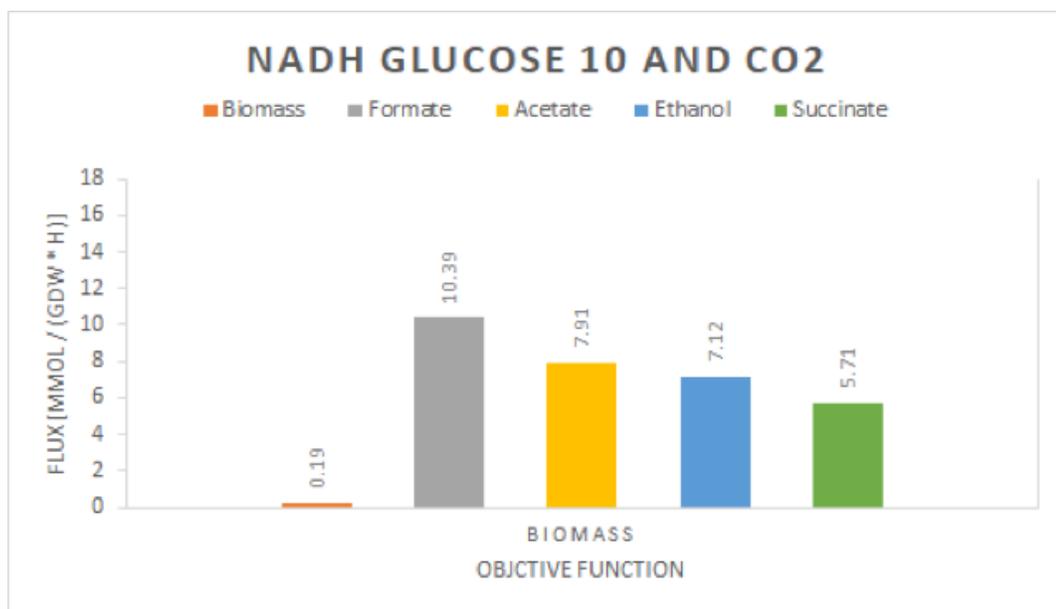


Figura A.7: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

#### A.2.4. Modelo *iML1515\_Dual*

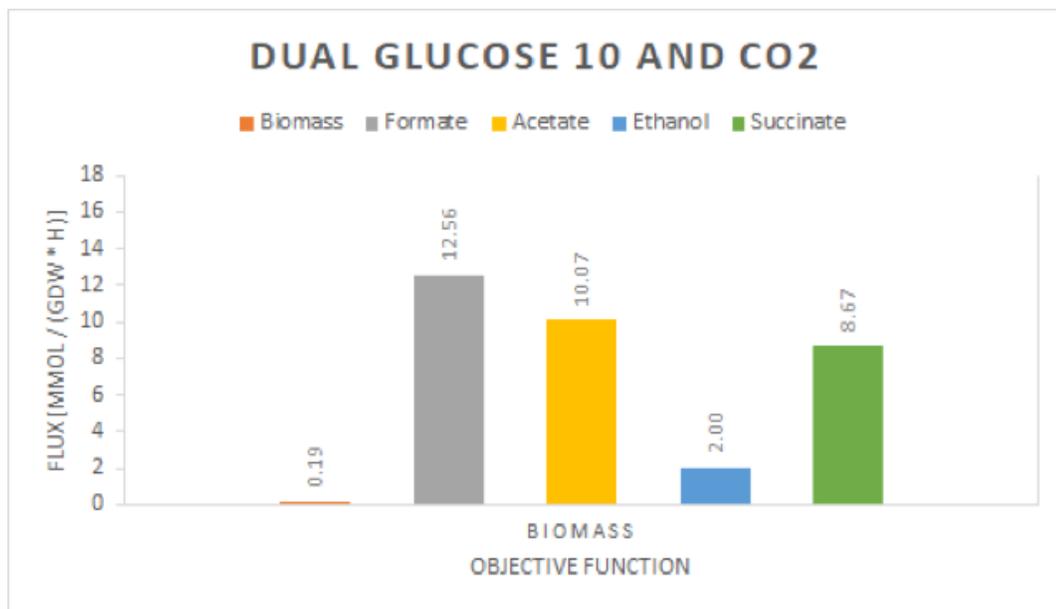


Figura A.8: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

# Anexo B

## Resultados: consumo de ATP de simulaciones *in silico*

### B.1. Electrosíntesis con glucosa

#### B.1.1. Caso Base

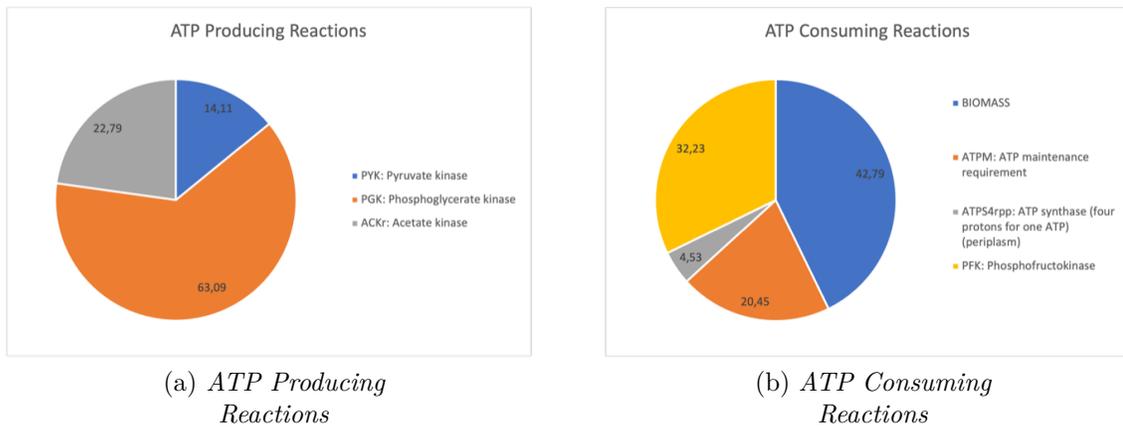


Figura B.1: Producción y consumo de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

## B.1.2. Modelo *iML1515\_NADPH*

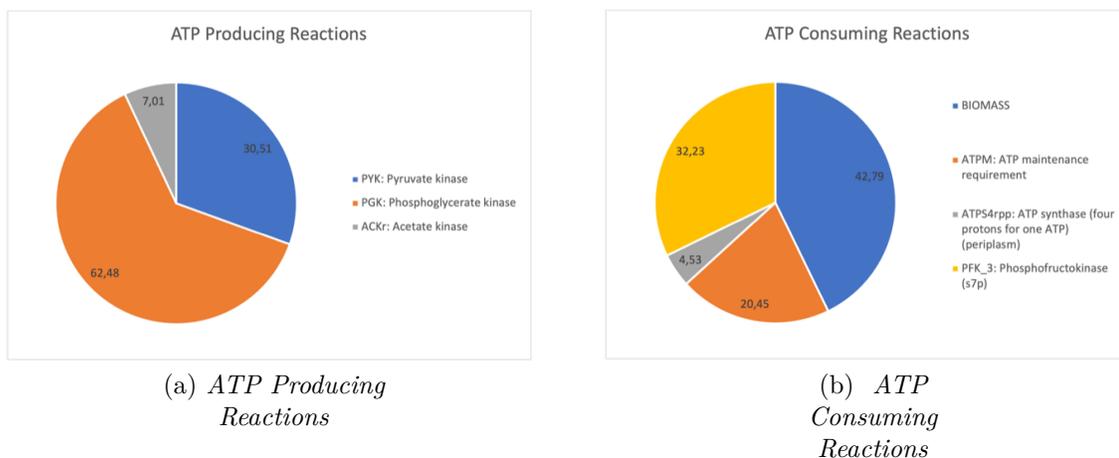


Figura B.2: Producción y consumo de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

## B.1.3. Modelo *iML1515\_NADH*

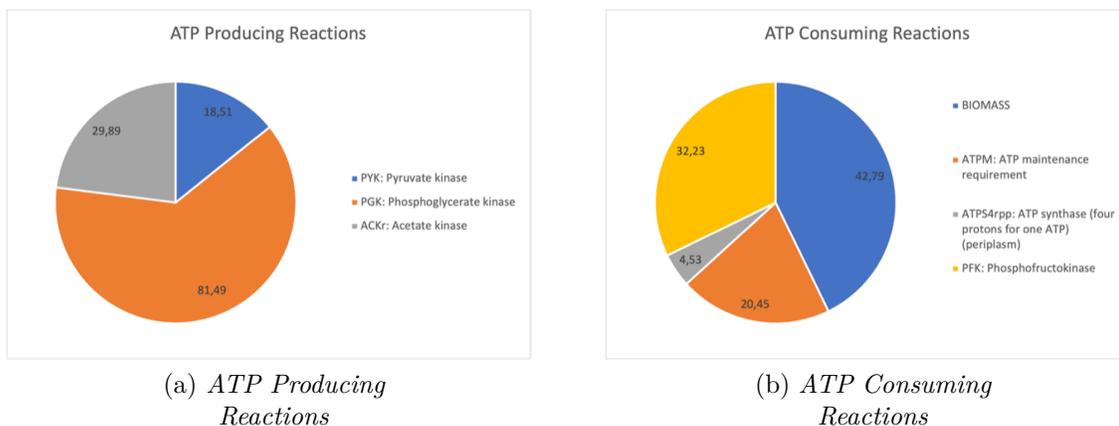


Figura B.3: Producción y consumo de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_NADH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

## B.1.4. Modelo *iML1515\_Dual*

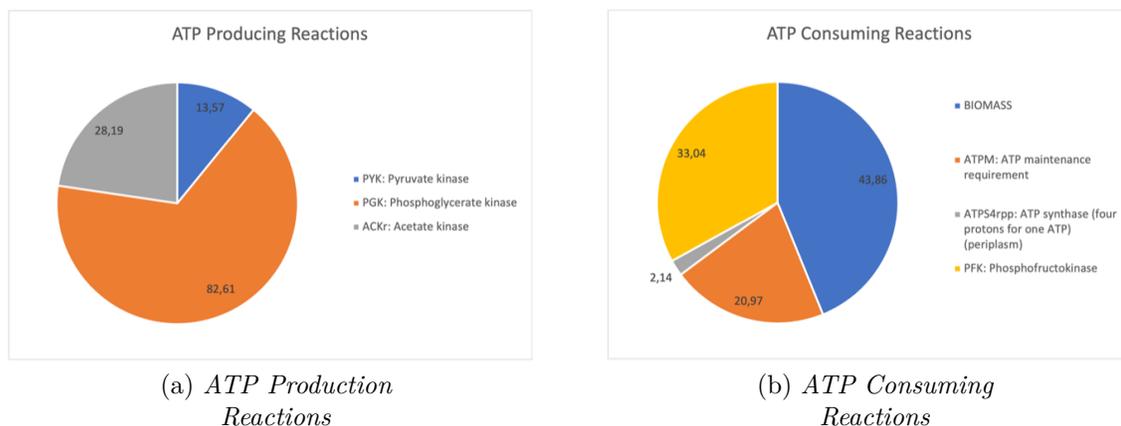


Figura B.4: Producción y consumo de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

## B.2. Electrosíntesis con glucosa y CO<sub>2</sub> libre

### B.2.1. Caso Base

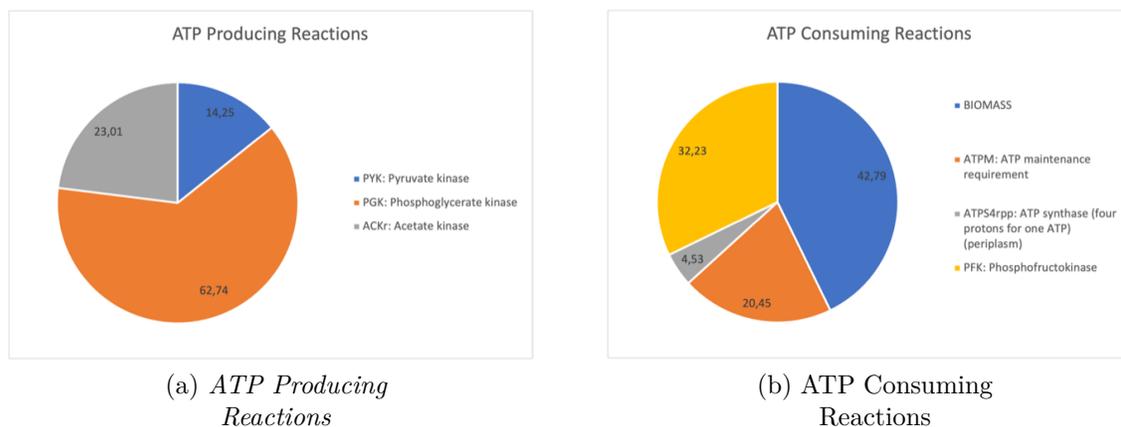


Figura B.5: Producción y consumo de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515* bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

## B.2.2. Modelo *iML1515\_NADPH*

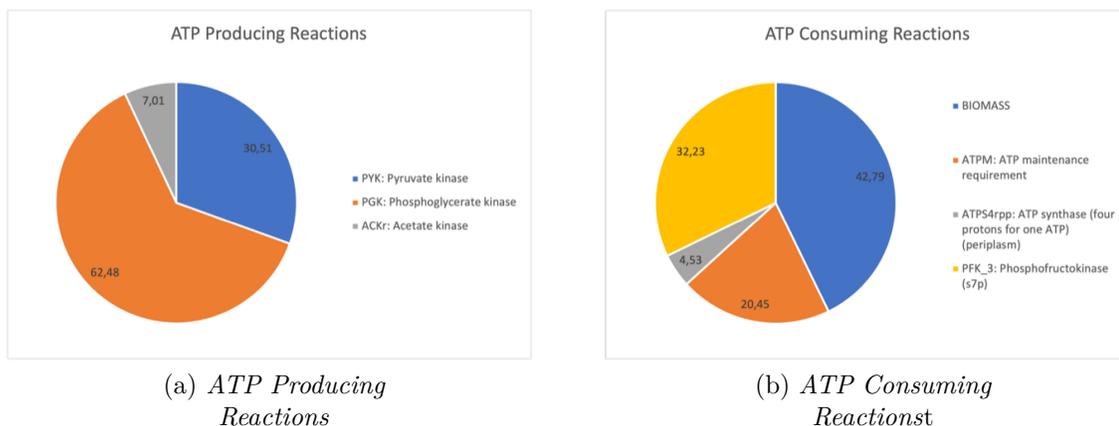


Figura B.6: Producción y consumo de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y  $CO_2$  libre.

## B.2.3. Modelo *iML1515\_NADH*

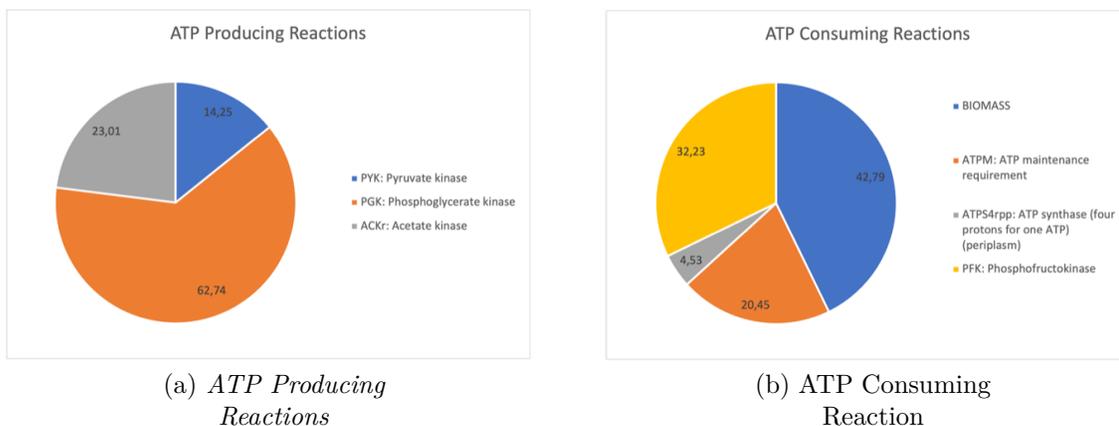


Figura B.7: Producción y consumo de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_NADH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y  $CO_2$  libre.

## B.2.4. Modelo *iML1515\_Dual*

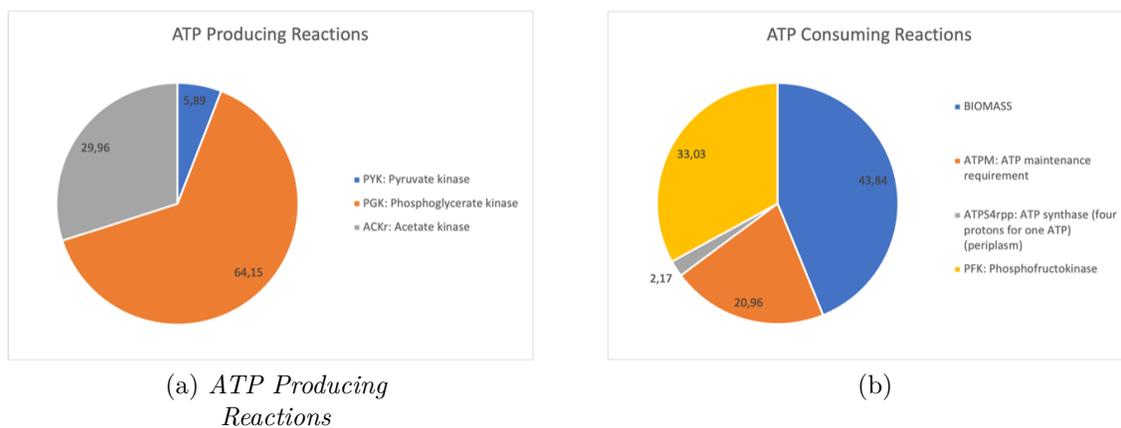


Figura B.8: Producción y consumo de recursos energéticos a partir del *input* de electrones, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa, 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones y  $CO_2$  libre.

# Anexo C

## Resultados: *knockouts*

Los resultados

### C.1. *pflA* *knockouts*

#### C.1.1. Modelo *iML1515\_NADPH*

### C.1.1.1. *In silico* Electrosynthesis Glucose Simulation

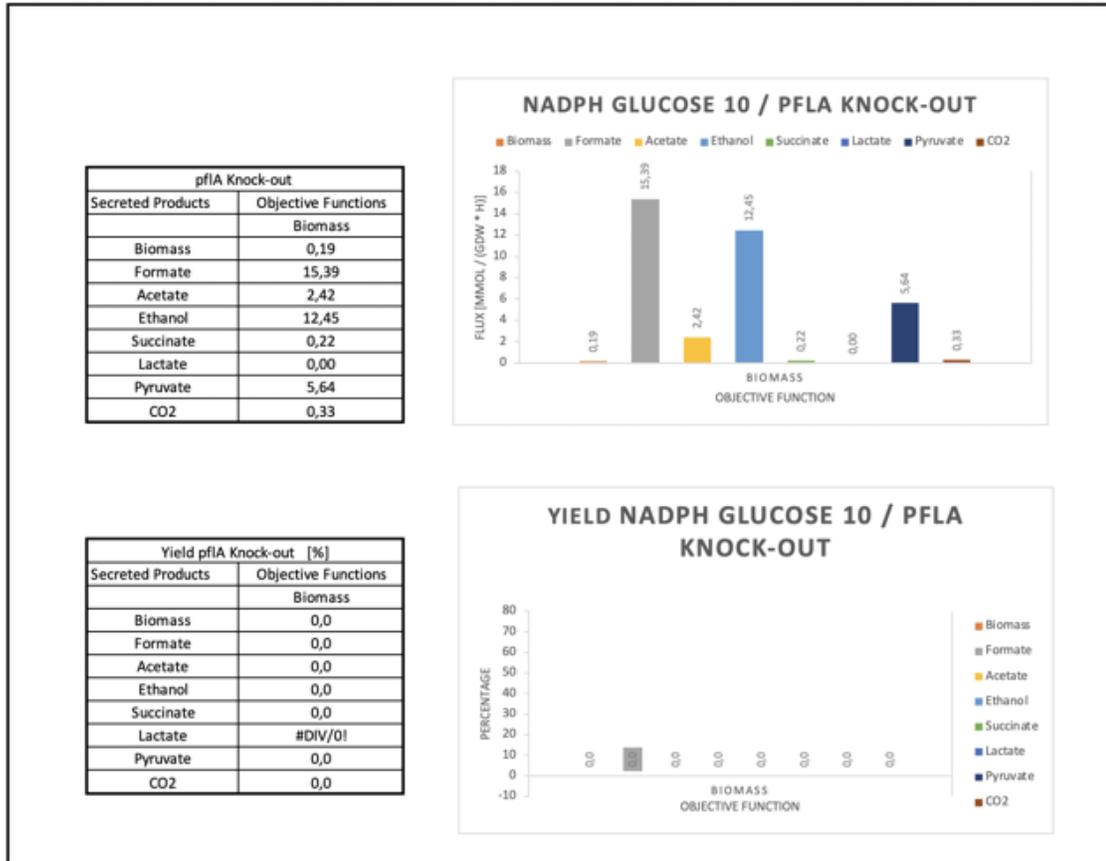


Figura C.1: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* del gen *pflA* con *uptakes* máximas de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

### C.1.1.2. *In silico* Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation

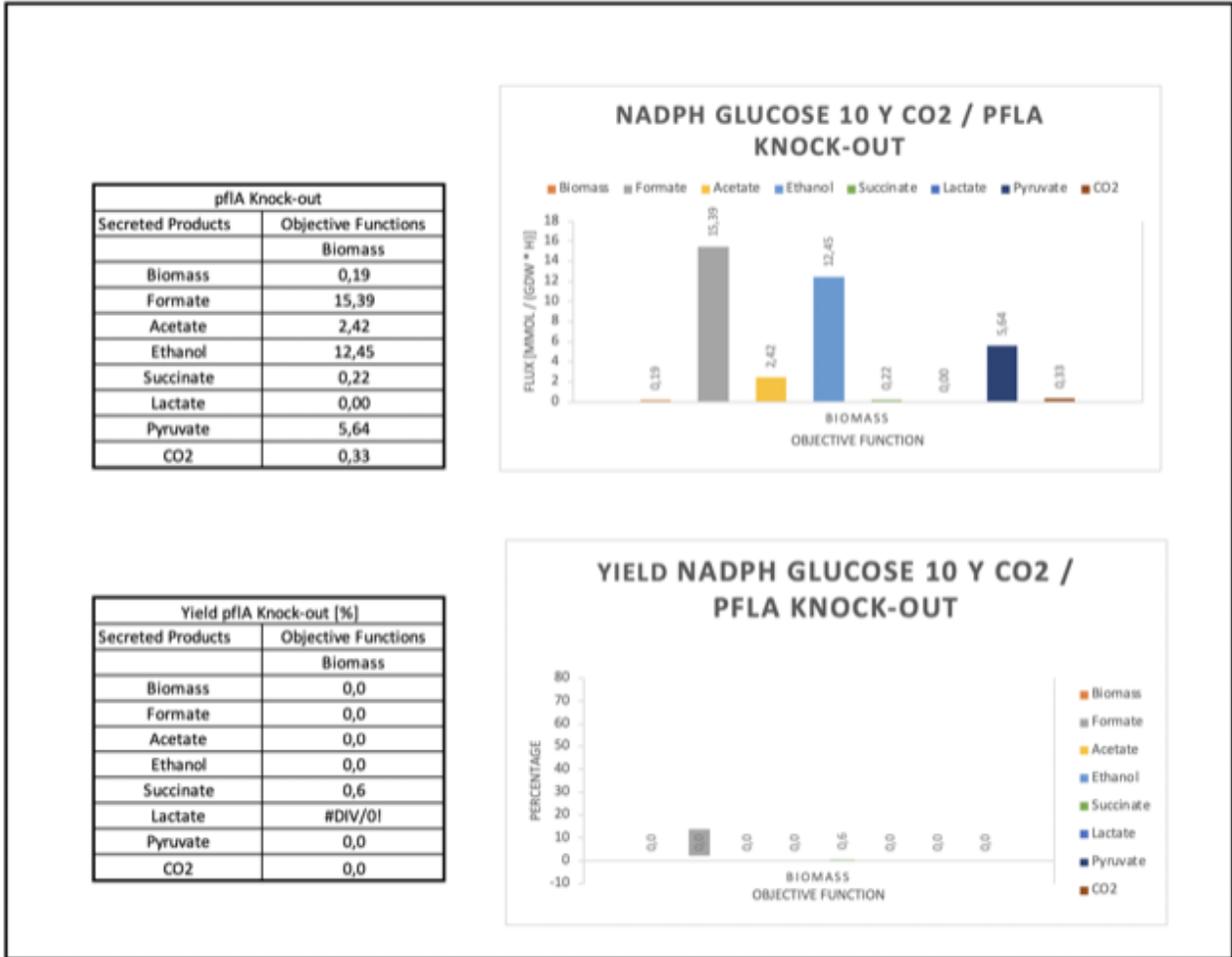


Figura C.2: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* del gen *pflA* con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

## C.1.2. Modelo *iML1515\_Dual*

### C.1.2.1. *In silico Electrosynthesis Glucose Simulation*

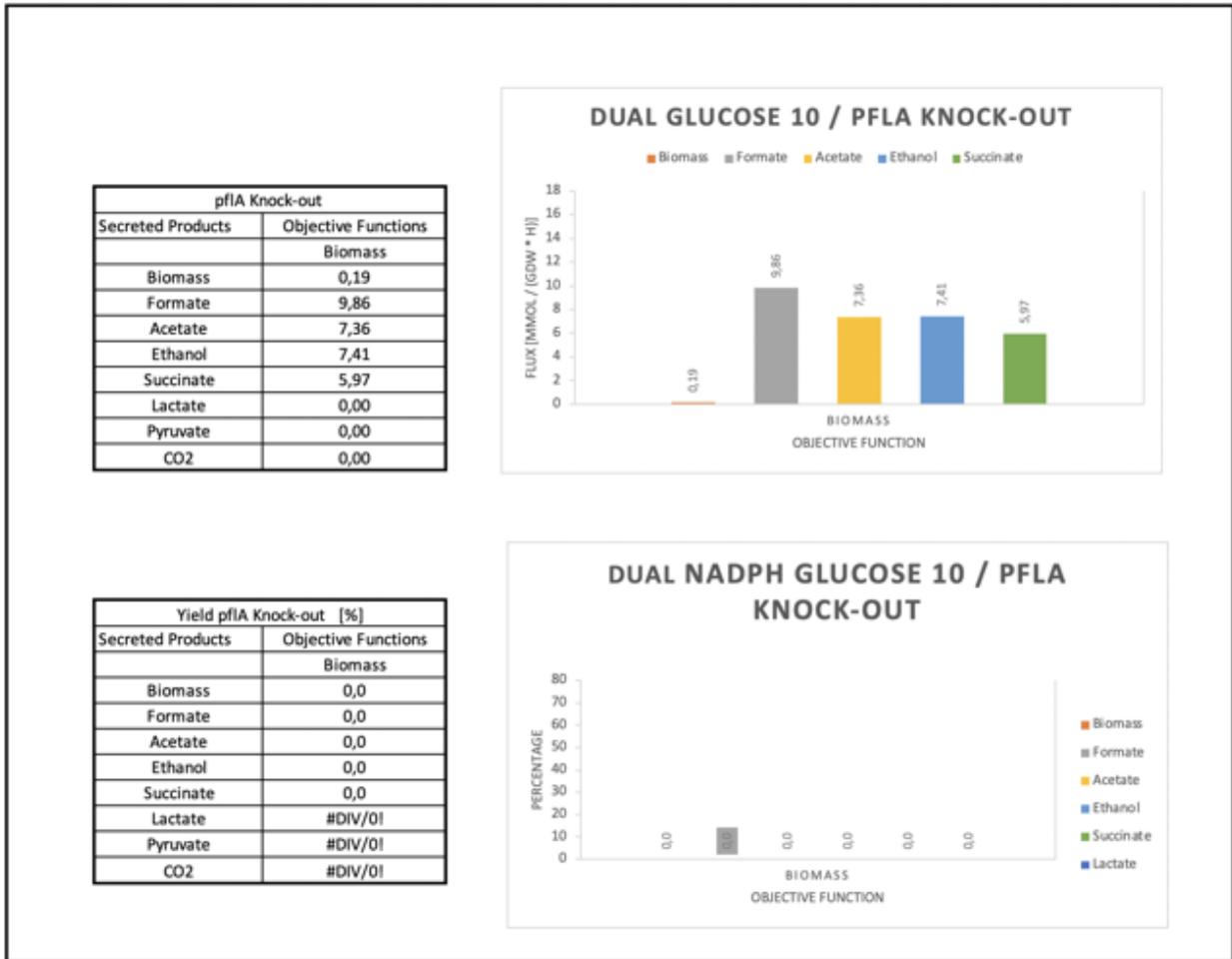


Figura C.3: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* del gen *pflA* con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa y 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones.

### C.1.2.2. *In silico* Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation

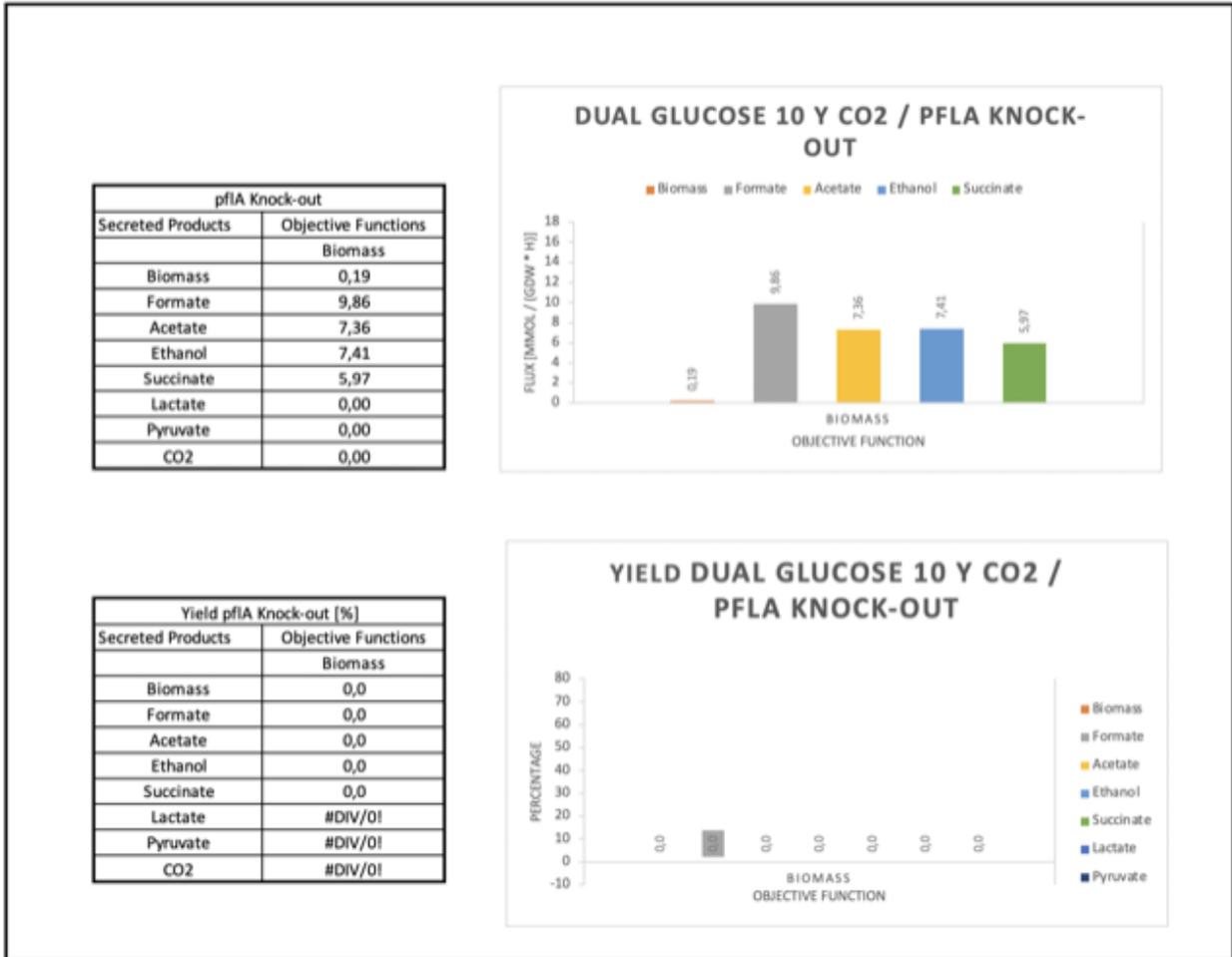


Figura C.4: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* del gen *plfA* con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

## C.2. *ldhA* knockouts

### C.2.1. Modelo *iML1515\_NADPH*

#### C.2.1.1. *In silico* Electrosynthesis Glucose Simulation

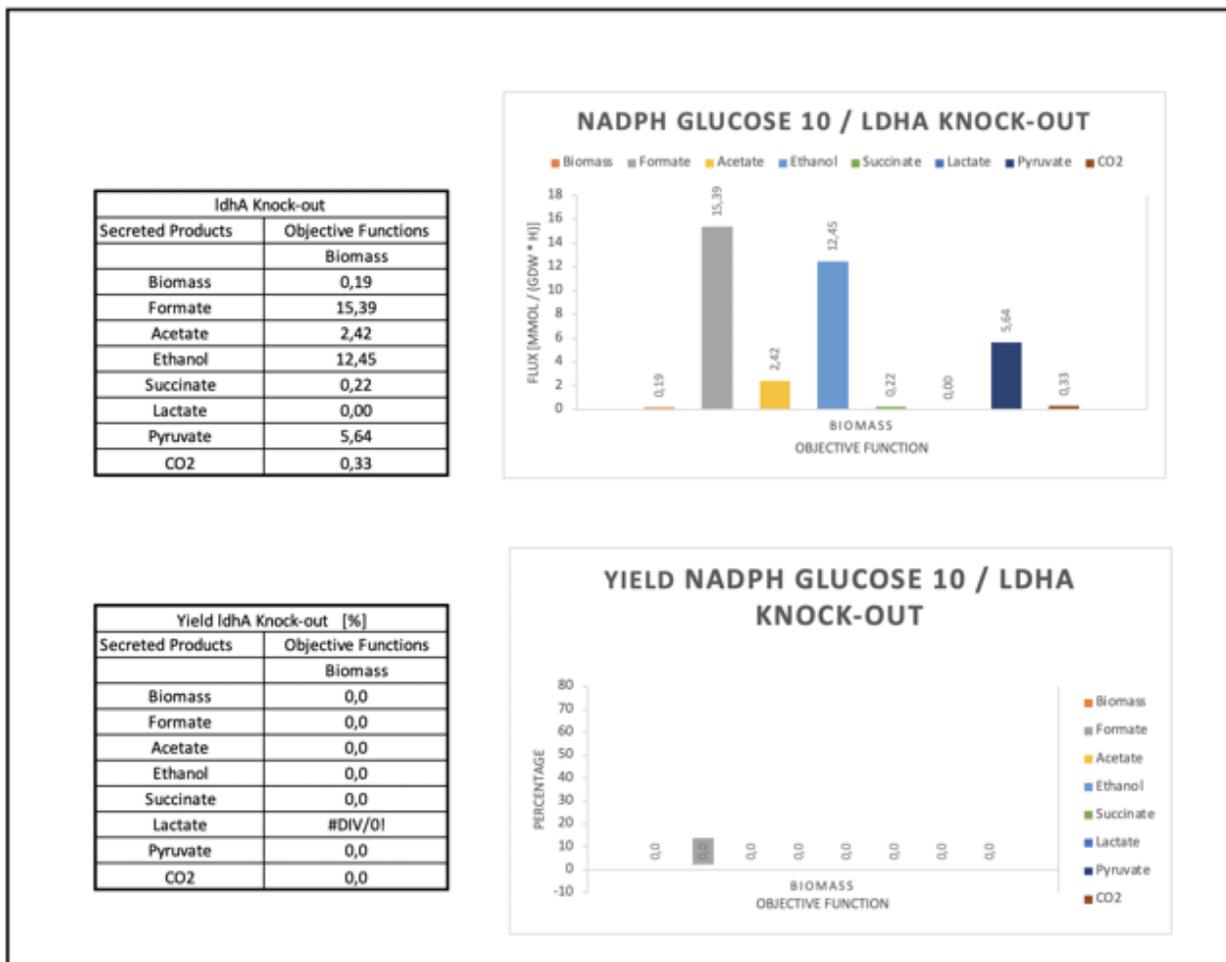


Figura C.5: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* del gen *ldhA* con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

### C.2.1.2. *In silico* Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation

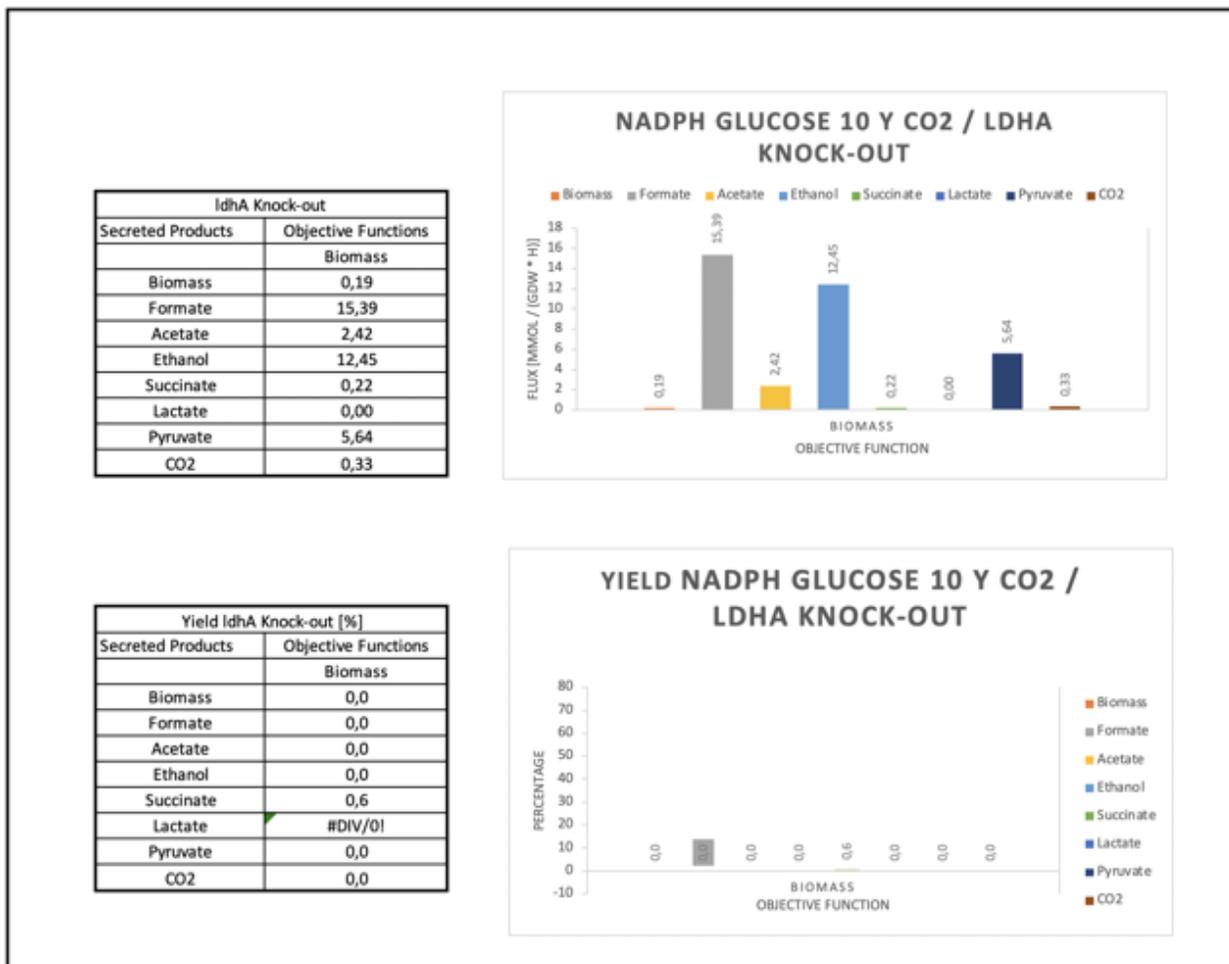


Figura C.6: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* del gen *ldhA* con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

## C.2.2. Modelo *iML1515\_Dual*

### C.2.2.1. *In silico Electrosynthesis Glucose Simulation*

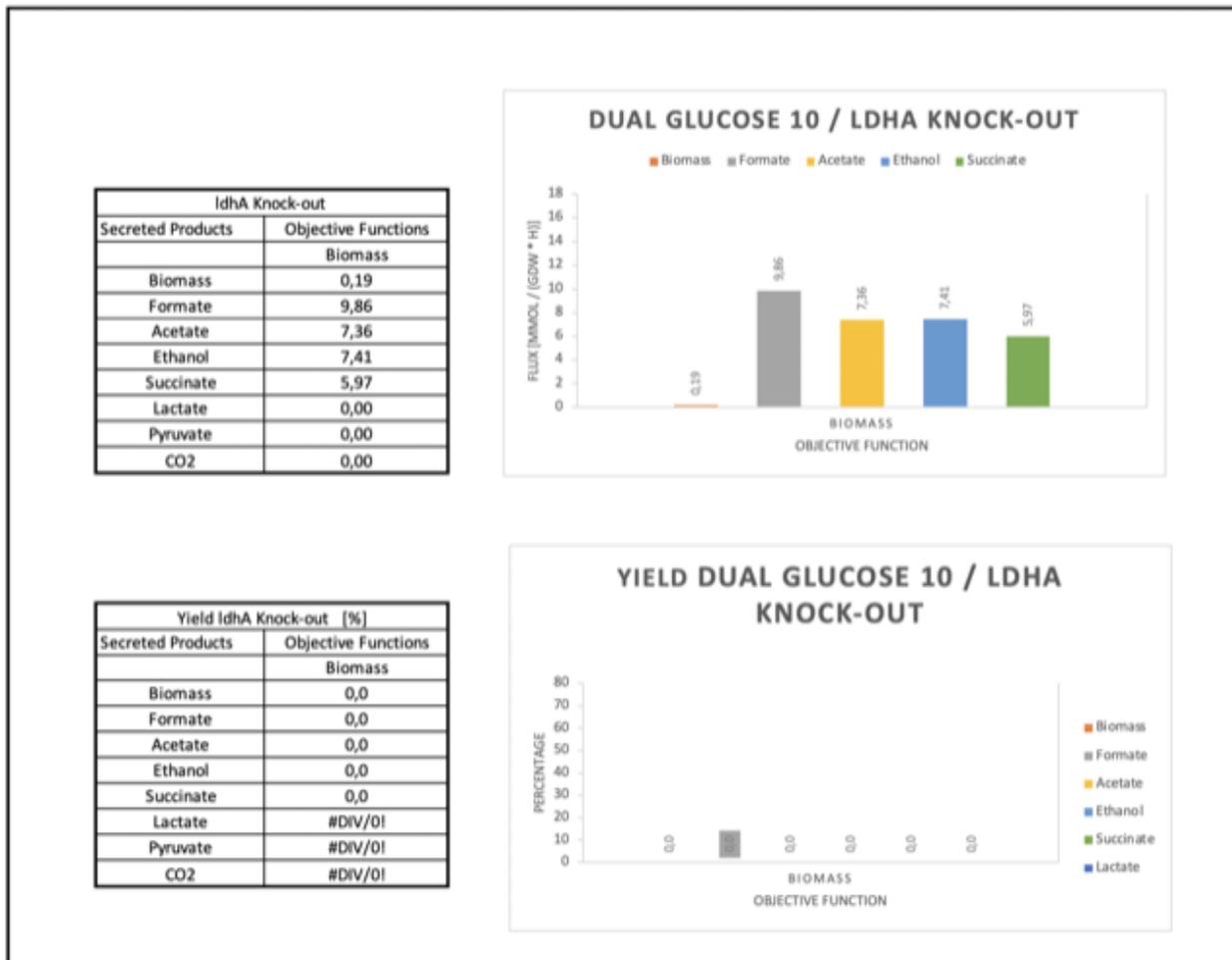


Figura C.7: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* del gen *ldhA* con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa y 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones.

### C.2.2.2. *In silico* Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation

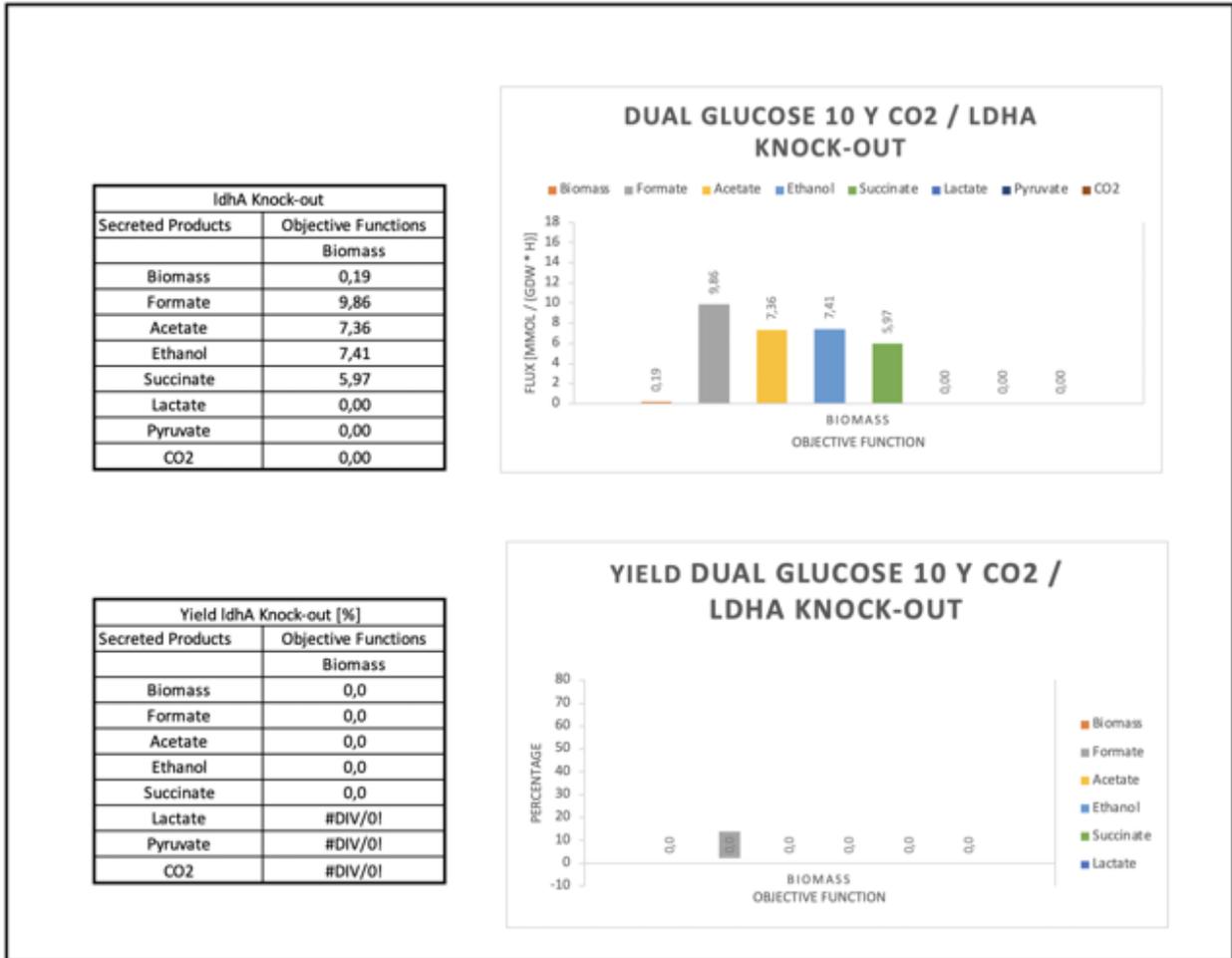


Figura C.8: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* del gen *ldhA* con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

## C.3. *ldhA* & *pflA* knockouts

### C.3.1. Modelo *iML1515\_NADPH*

#### C.3.1.1. *In silico* Electrosynthesis Glucose Simulation

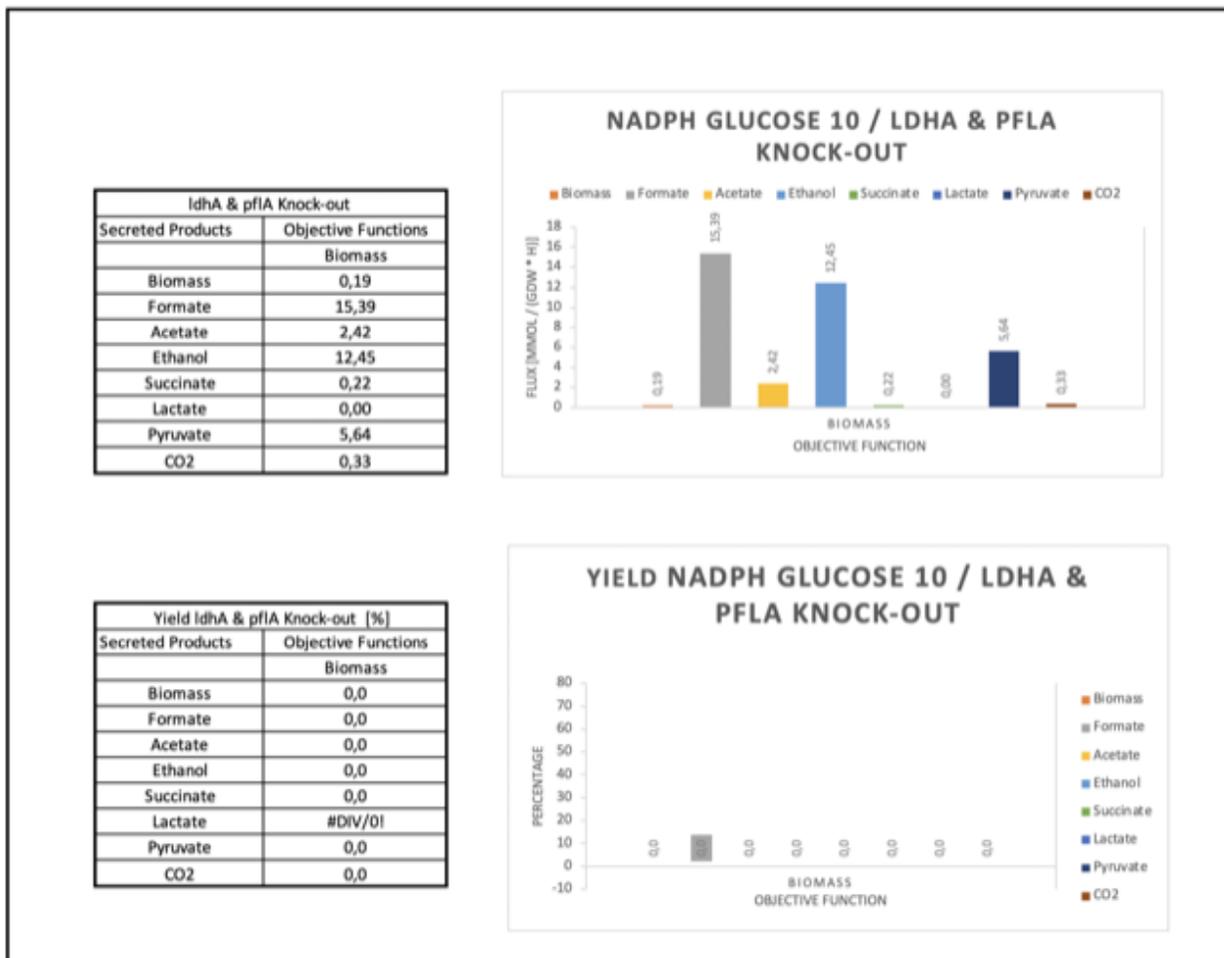


Figura C.9: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* de los genes *ldhA* & *pflA* con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

### C.3.1.2. *In silico* Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation

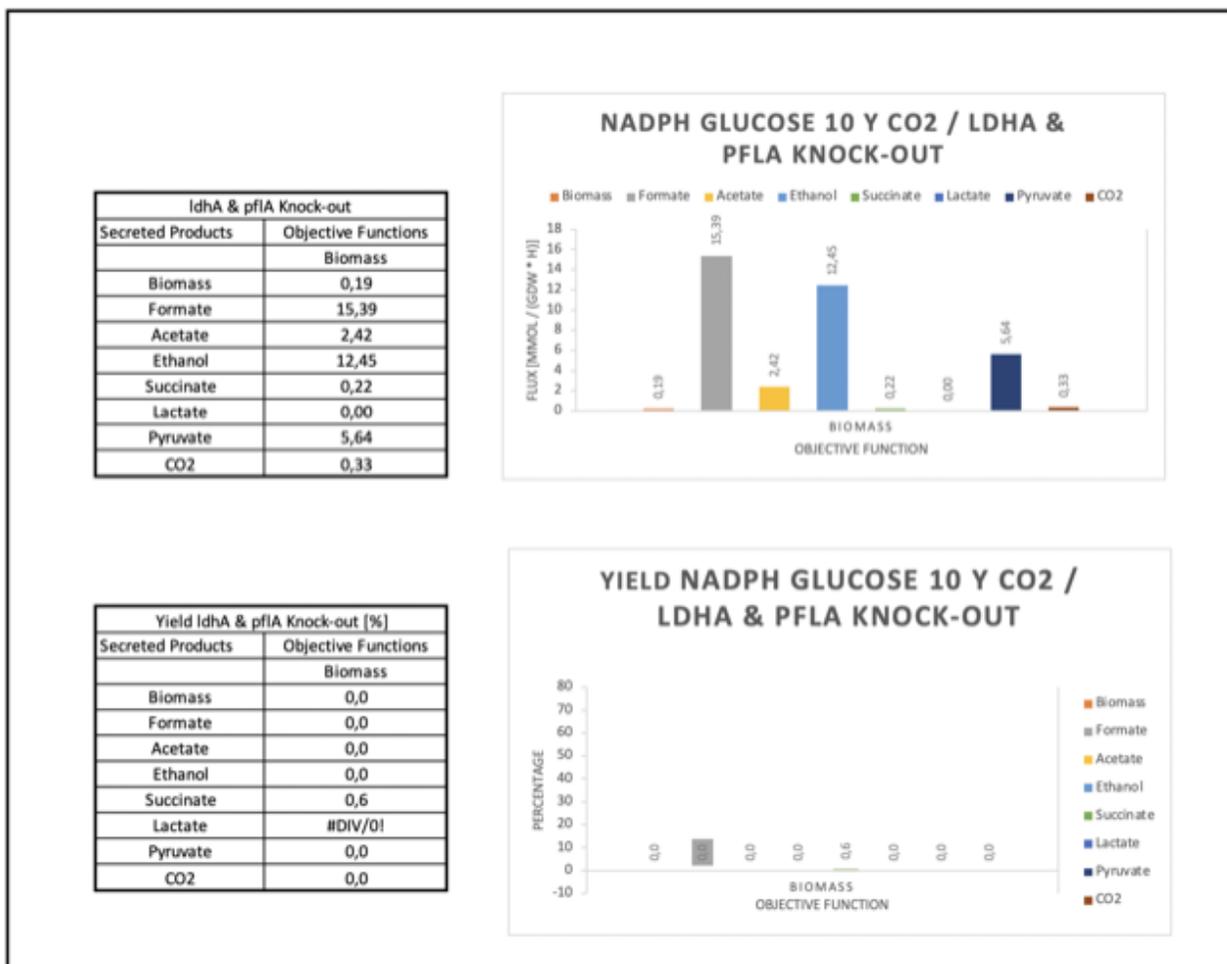


Figura C.10: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* de los genes *ldhA* & *pflA* con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

## C.3.2. Modelo *iML1515\_Dual*

### C.3.2.1. *In silico Electrosynthesis Glucose Simulation*

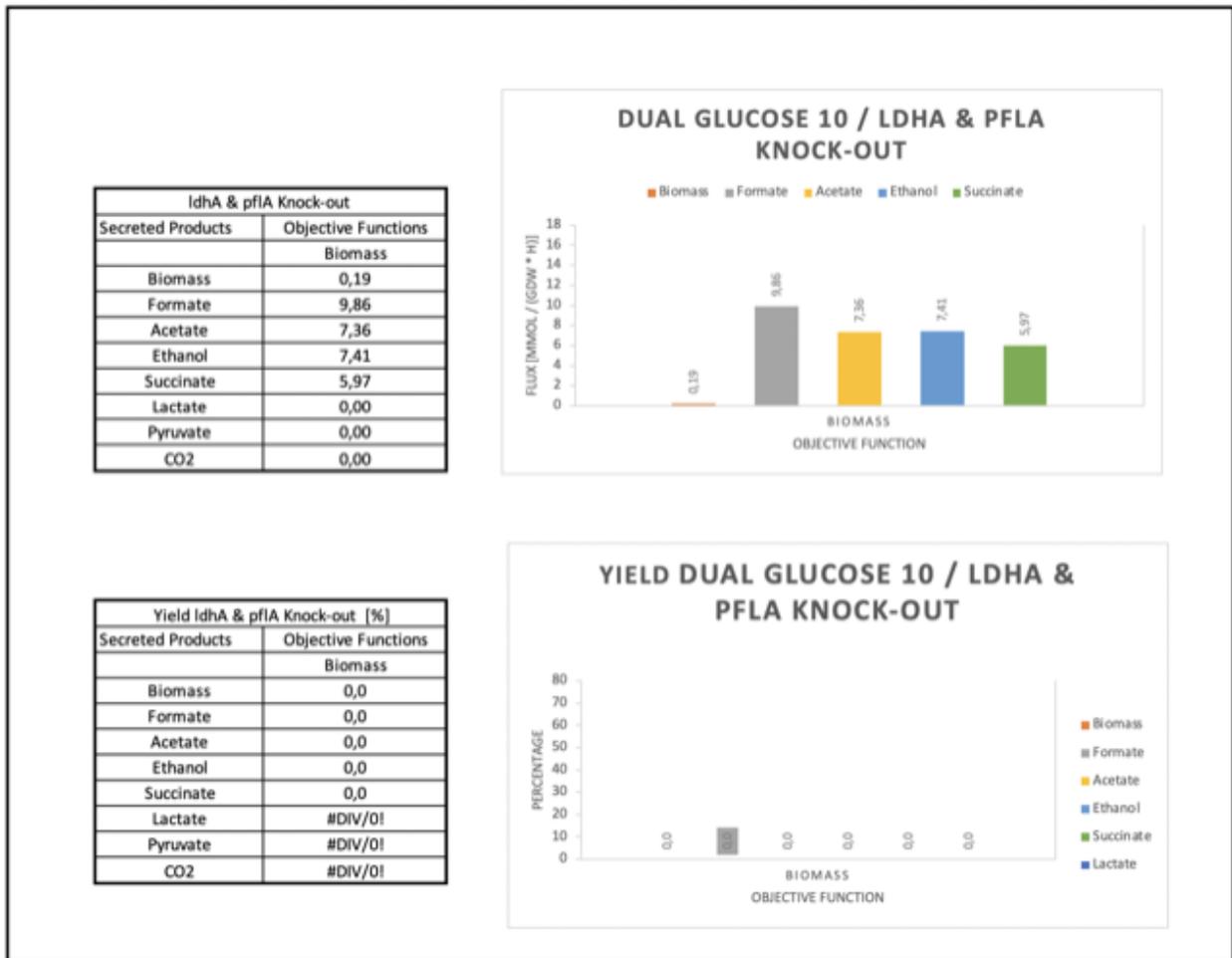


Figura C.11: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* de los genes *ldhA* & *pflA* con *uptakes* máximos de 10 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de glucosa y 30 [ $mmol/(gDW \cdot h)$ ] de electrones.

### C.3.2.2. *In silico* Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation

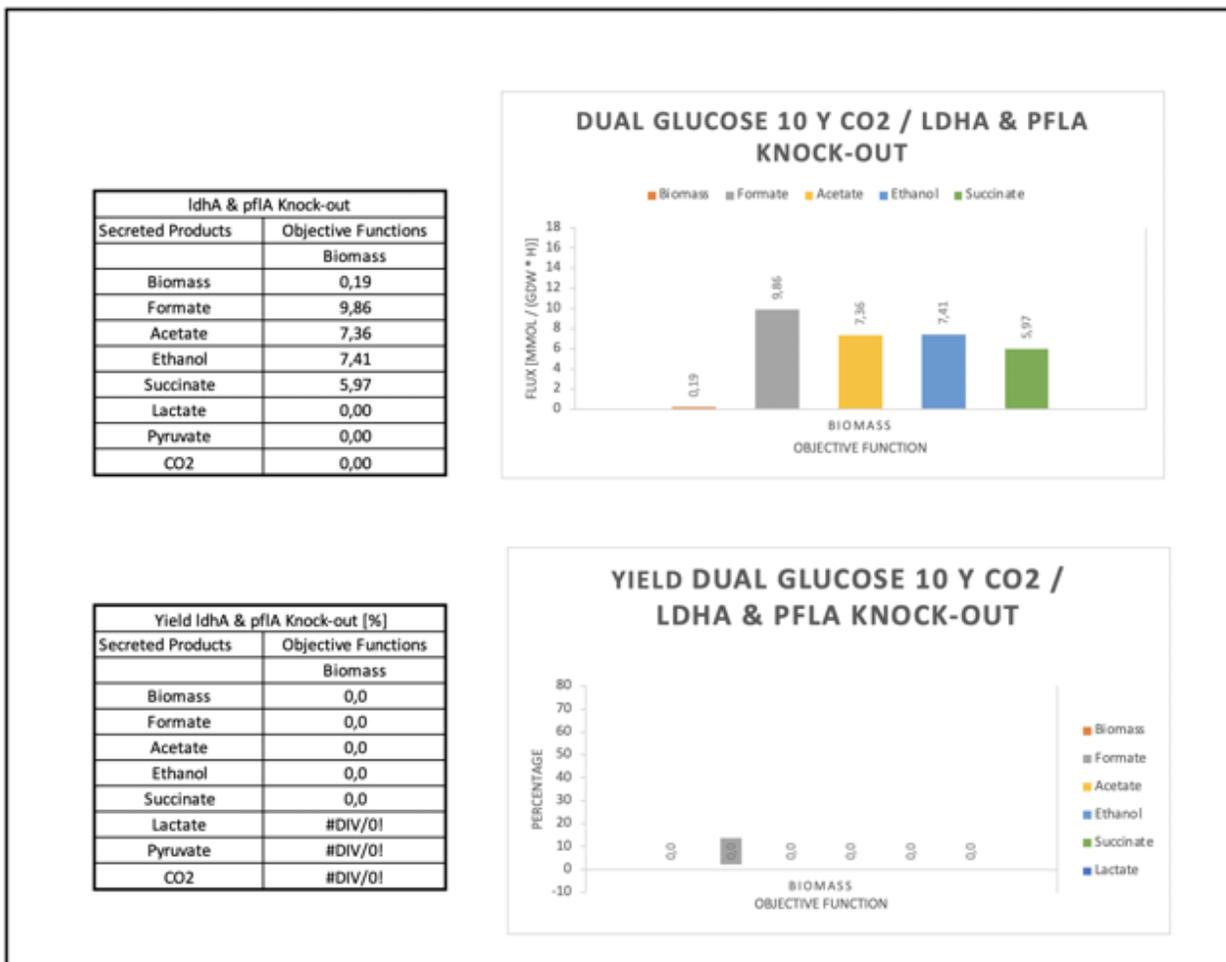


Figura C.12: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_Dual*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia y *knockout* de los genes *ldhA* & *pflA* con *uptakes* máximos de 10 [*mmol*/(*gDW* · *h*)] de glucosa, 30 [*mmol*/(*gDW* · *h*)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

## C.4. frdBC knockouts

### C.4.1. Modelo *iML1515\_NADPH*

#### C.4.1.1. *In silico Electrosynthesis Glucose Simulation*

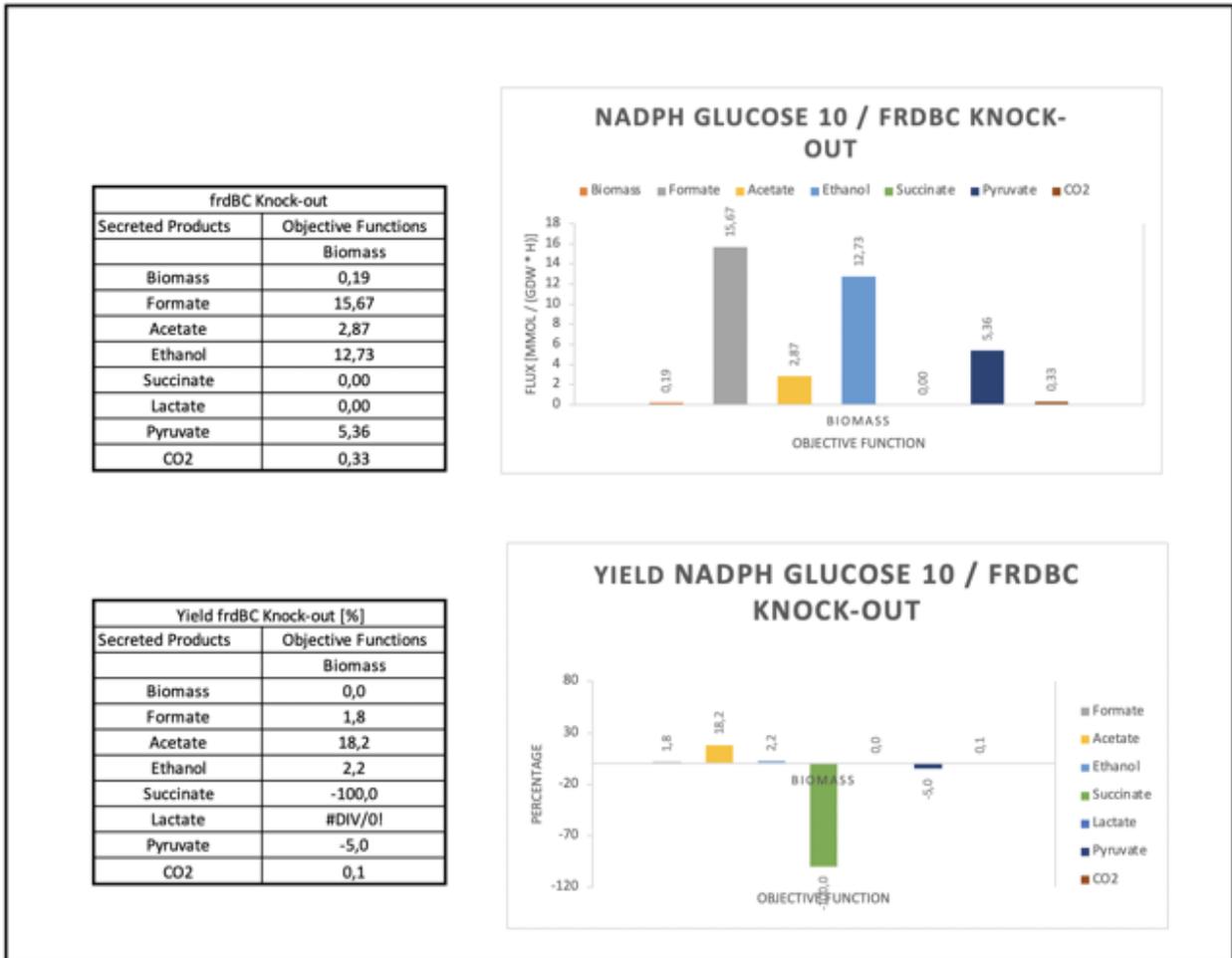


Figura C.13: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADPH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

### C.4.1.2. *In silico* Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation

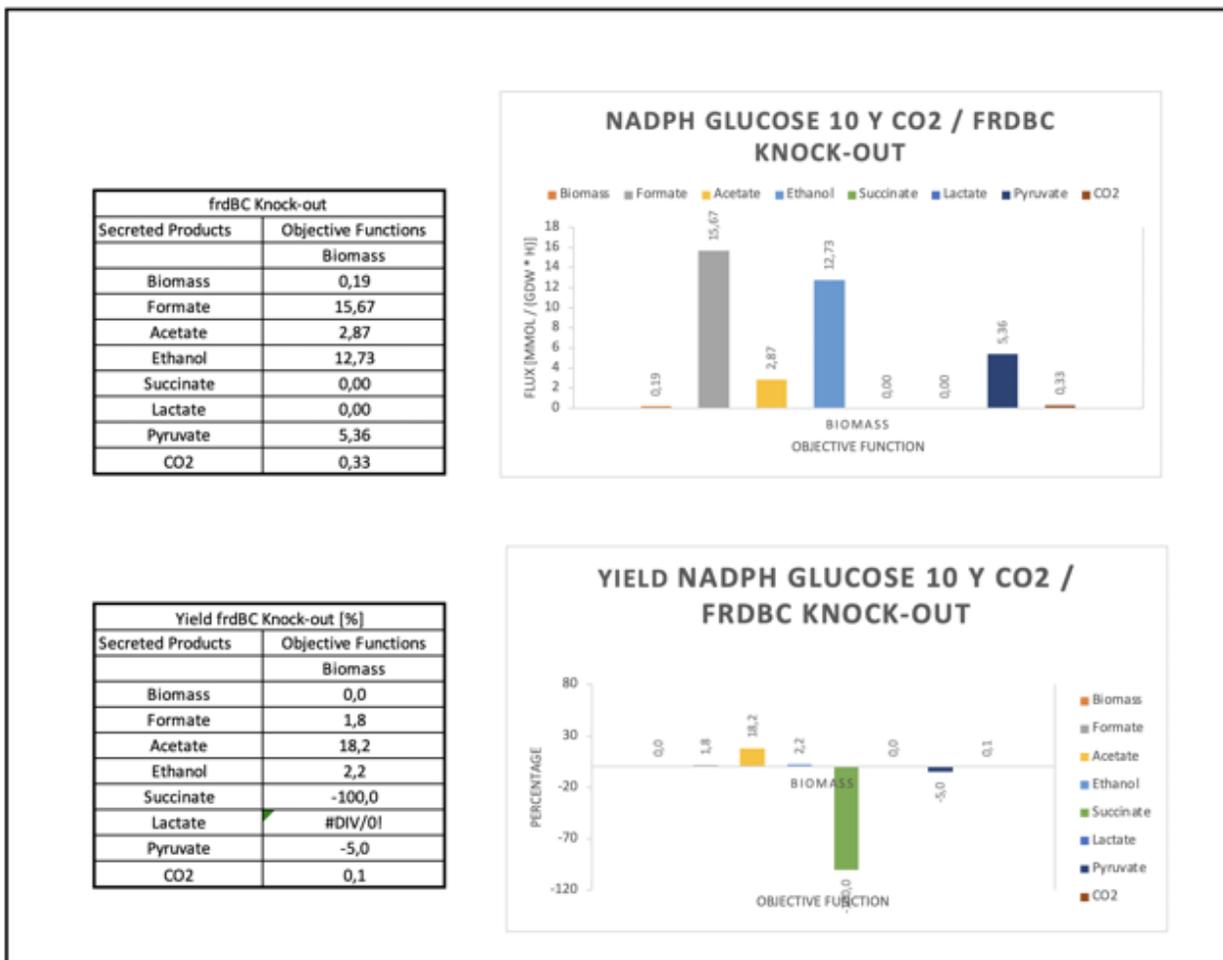


Figura C.14: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *i*ML1515\_NADH, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

## C.4.2. Modelo *i*ML1515\_Dual

### C.4.2.1. *In silico* Electrosynthesis Glucose Simulation

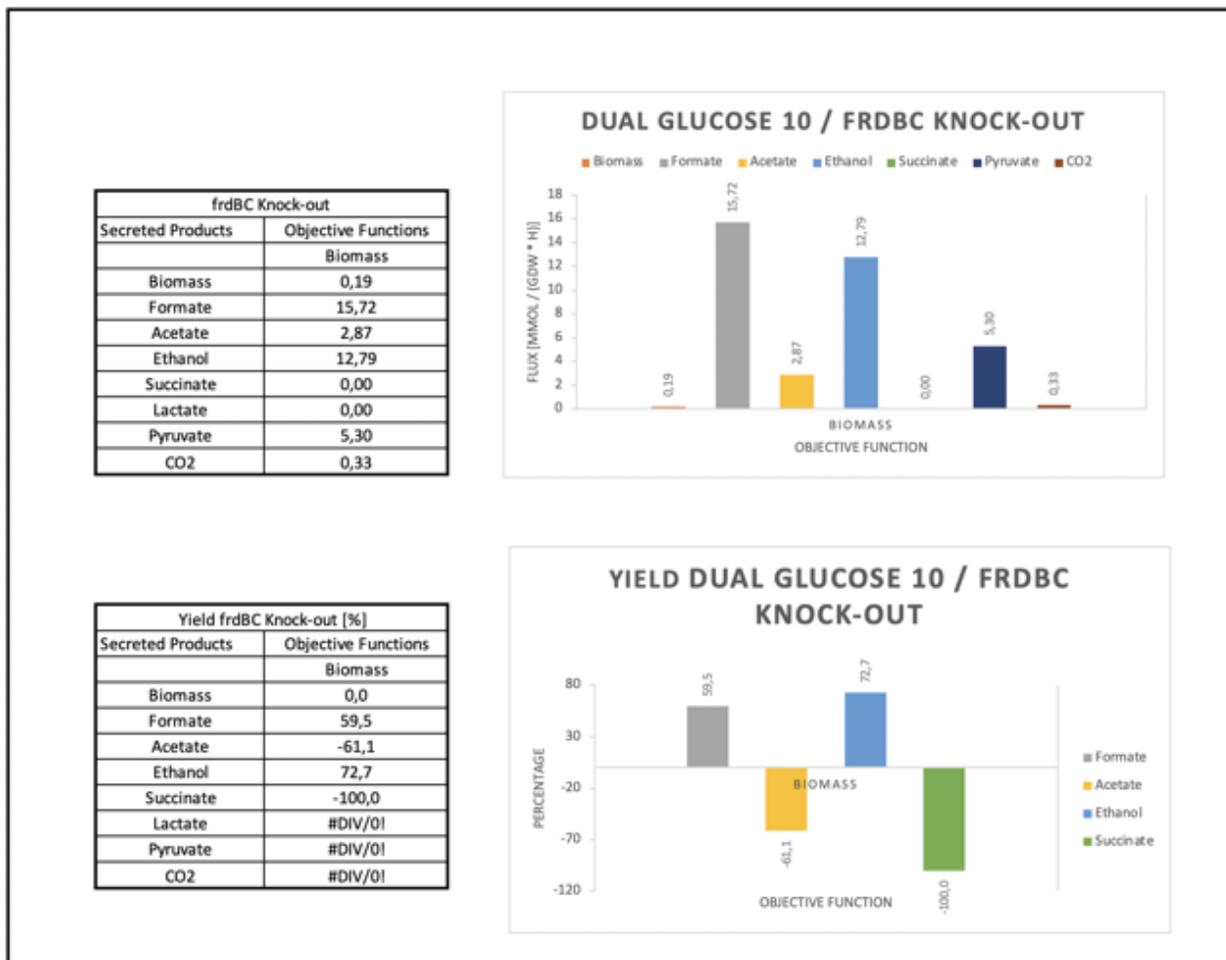


Figura C.15: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *i*ML1515\_NADH, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

### C.4.2.2. *In silico* Electrosynthesis Glucose and Free CO<sub>2</sub> Simulation

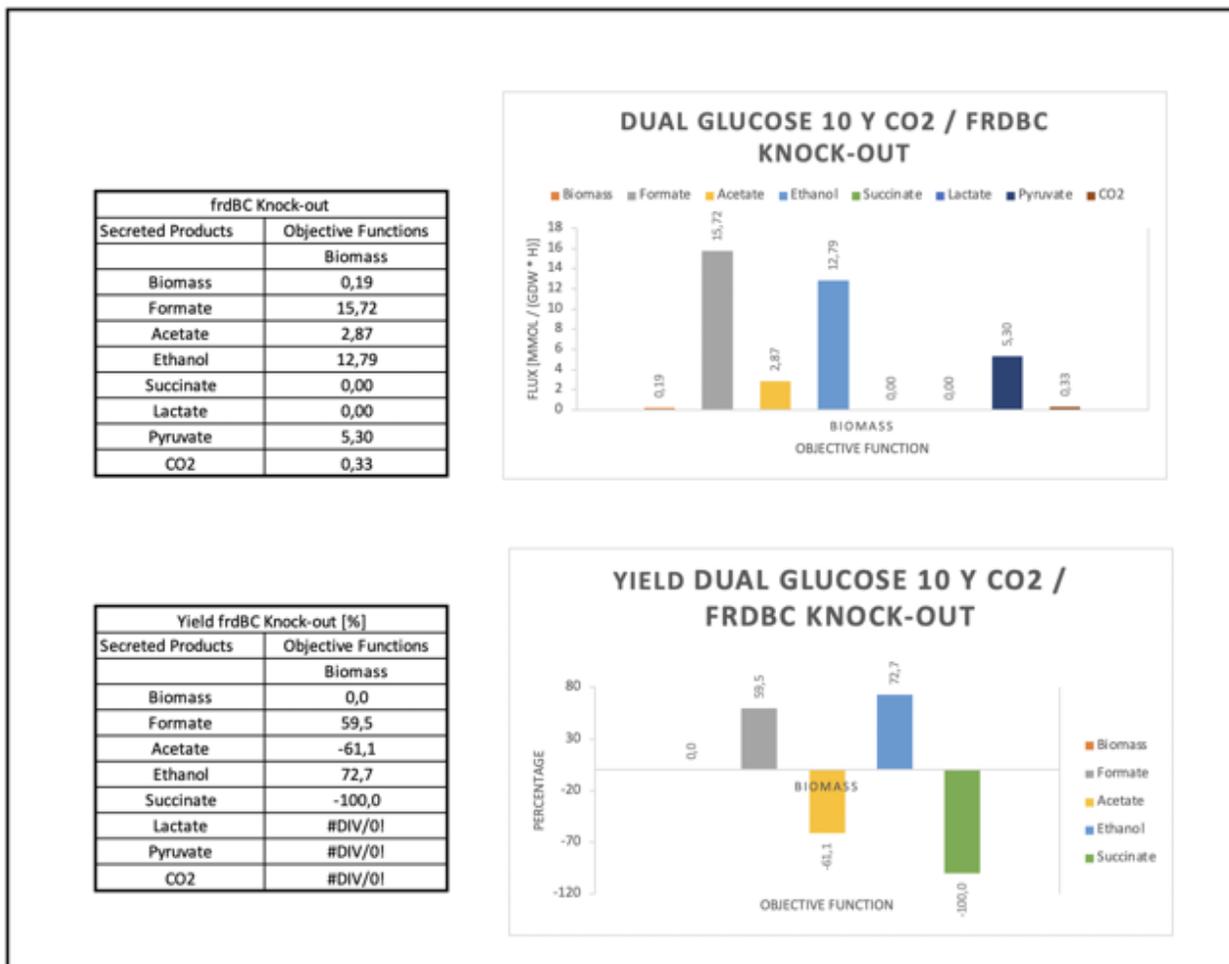


Figura C.16: Perfil *in silico* de secreción de productos de *E. coli*, modelo *iML1515\_NADH*, bajo un proceso de electrosíntesis anaerobia con *uptakes* máximos de 10 [mmol/(gDW · h)] de glucosa, 30 [mmol/(gDW · h)] de electrones y CO<sub>2</sub> libre.

# Anexo D

## GPR del set de reacciones involucradas en el *knockout* de los genes *ldhA*, *pflA* y *frdBC*

### D.1. Gen *pflA*

#### D.1.1. Piruvato Formiato Liasa - PFL

**GPR** (b0902 and b0903) or (b0902 and b3114) or (b3951 and b3952) or ((b0902 and b0903) and b2579)

Figura D.1: Relaciones booleanas (GPR) de la reacción PFL afectada por el *knockout* del gen *pflA*.

#### D.1.2. 2-Oxobutanoato Formiato Liasa - OBTFLL

**GPR** ((b0902 and b0903) and b2579) or (b0902 and b0903) or (b0902 and b3114)

Figura D.2: Relaciones booleanas (GPR) de la reacción OBTFLL afectada por el *knockout* del gen *pflA*.

### D.2. Gen *ldhA*

#### D.2.1. D-lactato Deshidrogenasa - LDH<sub>D</sub>

**GPR** b1380

Figura D.3: Relaciones booleanas (GPR) de la reacción LDH<sub>D</sub> afectada por el *knockout* del gen *ldhA*.

## D.3. Gen frdBC

### D.3.1. Fumarato Reductasa - FRD2

**GPR**

b4152 and b4151 and b4153 and b4154

Figura D.4: Relaciones booleanas (GPR) de la reacción FRD2 afectada por el *knockout* del gen frdBC.

### D.3.2. Fumarato Reductasa - FRD3

**GPR**

b4152 and b4151 and b4153 and b4154

Figura D.5: Relaciones booleanas (GPR) de la reacción FRD3 afectada por el *knockout* del gen frdBC.

# Anexo E

## Código: creación modelos *i*ML1515\_NADPH, NADH y Dual

### E.1. Configuración medio de cultivo, condiciones anaeróbicas e incorporación de electrones

Código E.1: Desarrollo en Python y COBRApy a partir del modelo *i*ML1515 descargado del repositorio de modelos metabólicos de BiGG Models.

```
1 import os
2 import cobra
3 import copy
4 from os.path import join
5 from cobra import Model, Reaction, Metabolite
6 from cobra.medium import minimal_medium
7
8 cwd = os.getcwd()
9 # Modelo original
10 raw_model = cobra.io.load_json_model(join(cwd, "iML1515.json"))
11
12 # Condiciones de alimentación y fermentación E coli MW = 39,583.26 [g/mol]
13 # LB medium
14 Fermentative_raw_model = raw_model.copy()
15 medium = Fermentative_raw_model.medium
16 medium["EX_ala__L_e"] = 1000
17 medium["EX_asp__L_e"] = 1000
18 medium["EX_asn__L_e"] = 1000
19 medium["EX_glu__L_e"] = 1000
20 medium["EX_gln__L_e"] = 1000
21 medium["EX_gly_e"] = 1000
22 medium["EX_his__L_e"] = 1000
23 medium["EX_ile__L_e"] = 1000
24 medium["EX_leu__L_e"] = 1000
25 medium["EX_lys__L_e"] = 1000
26 medium["EX_met__L_e"] = 1000
27 medium["EX_phe__L_e"] = 1000
28 medium["EX_pro__L_e"] = 1000
```

```

29 medium["EX_ser__L_e"] = 1000
30 medium["EX_thr__L_e"] = 1000
31 medium["EX_trp__L_e"] = 1000
32 medium["EX_tyr__L_e"] = 1000
33 medium["EX_val__L_e"] = 1000
34 medium["EX_arg__L_e"] = 1000
35 medium["EX_cys__L_e"] = 1000
36 medium["EX_cd2_e"] = 1000
37 medium["EX_cu_e"] = 1000
38 medium["EX_ade_e"] = 1000
39 medium["EX_csn_e"] = 1000
40 medium["EX_ura_e"] = 1000
41 medium["EX_man_e"] = 1000
42 medium["EX_pnto__R_e"] = 1000
43 medium["EX_btn_e"] = 1000
44 medium["EX_ascb__L_e"] = 1000
45 medium["EX_thm_e"] = 1000
46 medium["EX_nac_e"] = 1000
47 medium["EX_pydx_e"] = 1000
48 medium["EX_chol_e"] = 1000
49 medium["EX_adocbl_e"] = 1000
50 medium["EX_o2_e"] = 0.0
51 Fermentative_raw_model.medium = medium
52
53 # Ajuste de flujos de acuerdo a un crecimiento de biomasa máximo de 0.19 en condiciones
    ↪ anaerobias
54 medium = Fermentative_raw_model.medium = minimal_medium(Fermentative_raw_model
    ↪ , 0.19)
55 medium["EX_co2_e"] = 0.0 # Cambia a 1000 cuando se da la ingesta permisiva hacia el
    ↪ CO2
56 medium["EX_glc__D_e"] = 10
57 Fermentative_raw_model.medium = medium
58
59 # Knockout de la reacción citrato sintetasa a modo de abrir el ciclo de Krebs según
    ↪ bibliografía
60 Fermentative_raw_model.reactions.CS.knock_out() # Reacción de oxaloacetato a citrato
61
62 cobra.io.save_json_model(Fermentative_raw_model, "Fermentative_raw_model.json")
63
64 # Incorporación de electrones como reacción de exchange al modelo original
65 Fermentative_raw_model_with_electrons = Fermentative_raw_model.copy()
66
67 Fermentative_raw_model_with_electrons.add_metabolites(
68     Metabolite(
69         'electron_e',
70         name='electron',
71         compartment='e'
72     ))
73
74 Fermentative_raw_model_with_electrons.add_boundary(
    ↪ Fermentative_raw_model_with_electrons.metabolites.get_by_id("electron_e"), type
    ↪ ="exchange", lb = -30, ub = 0);

```

## E.2. Modelo *i*ML1515\_NADPH

Código E.2: Desarrollo en Python y COBRApy de la incorporación de la reacción de asimilación del *input* de electrones a través de la molécula NADPH.

```

1 # iML1515 modelo incluyendo únicamente la regeneración de NADPH
2 iML1515_NADPH = Fermentative_raw_model_with_electrons.copy()
3
4 NADPHELEC = Reaction('NADPHELEC')
5 NADPHELEC.name = 'NADPH regeneration'
6 NADPHELEC.subsystem = 'Extracellular Electron Transfer'
7 NADPHELEC.lower_bound = 0 # This is the default
8 NADPHELEC.upper_bound = 1000 # This is the default
9
10 h_c = iML1515_NADPH.metabolites.get_by_id('h_c')
11 nadp_c = iML1515_NADPH.metabolites.get_by_id('nadp_c')
12 nadph_c = iML1515_NADPH.metabolites.get_by_id('nadph_c')
13 electron_c = iML1515_NADPH.metabolites.get_by_id('electron_e')
14
15 NADPHELEC.add_metabolites({
16     nadp_c: -1.0,
17     electron_c: -2.0,
18     h_c: -1.0,
19     nadph_c: 1.0
20 })
21
22 iML1515_NADPH.add_reactions([NADPHELEC])
23 cobra.io.save_json_model(iML1515_NADPH, "iML1515_NADPH.json")
24

```

## E.3. Modelo *i*ML1515\_NADH

Código E.3: Desarrollo en Python y COBRApy de la incorporación de la reacción de asimilación del *input* de electrones a través de la molécula NADH.

```

1 # iML1515 modelo incluyendo únicamente la regeneración de NADH
2 iML1515_NADH = Fermentative_raw_model_with_electrons.copy()
3
4 NADHELEC = Reaction('NADHELEC')
5 NADHELEC.name = 'NADH regeneration'
6 NADHELEC.subsystem = 'Extracellular Electron Transfer'
7 NADHELEC.lower_bound = 0 # This is the default
8 NADHELEC.upper_bound = 1000 # This is the default
9
10 nad_c = iML1515_NADH.metabolites.get_by_id('nad_c')
11 nadh_c = iML1515_NADH.metabolites.get_by_id('nadh_c')
12

```

```

13
14 NADHELEC.add_metabolites({
15     nad_c: -1.0,
16     electron_c: -2.0,
17     h_c: -1.0,
18     nadh_c: 1.0
19 })
20
21 iML1515_NADH.add_reactions([NADHELEC])
22 cobra.io.save_json_model(iML1515_NADH, "iML1515_NADH.json")
23

```

## E.4. Modelo *iML1515\_Dual*

Código E.4: Desarrollo en Python y COBRApy de la incorporación de la reacción de asimilación del *input* de electrones a través de las moléculas de NADPH y NADH.

```

1 # iML1515 modelo incluyendo ambos tipos de regeneración de cofactores redox: NADPH &
   ↔ NADH
2 iML1515_NADPH_NADH = Fermentative_raw_model_with_electrons.copy()
3
4 iML1515_NADPH_NADH.add_reactions([NADPHELEC])
5 iML1515_NADPH_NADH.add_reactions([NADHELEC])
6 cobra.io.save_json_model(iML1515_NADPH_NADH, "iML1515_NADPH_NADH.json")
7

```

# Anexo F

## Código: simulaciones *in silico*

### F.1. Carga del modelo, funciones de visualización y configuración de funciones objetivo

Código F.1: Desarrollo en Python y COBRApy de las simulaciones y las distintas funciones de optimización: *Min\_Redox\_Potential*, *Max\_Redox\_Potential*, *Min\_ATP\_Production* y *Max\_ATP\_Production*.

```
1 import os
2 import cobra
3 import copy
4 import escher
5 from escher import Builder
6 from os.path import join
7 from cobra import Model, Reaction, Metabolite
8
9 cwd = os.getcwd()
10
11 # Cargando Modelo:
12 base_case_model = cobra.io.load_json_model(join(cwd, "iML1515_NADH.json")).copy()
13 # Funciones Objetivo
14
15 # Min Redox Potential
16 # (GAPD [b1779][i], PDH [b0115/b0114][i], ME1 [b1479][i], AKGDH [b0726/b0727][i], MDH
17   ↔ [b3236][i], NADTRHD [b3962][i],
18 # LDH_D [b1380][i], ACALD [b0351][R], ALCD2x [b1478][R], ME2 [b2463][i], G6PDH2r [
19   ↔ b1852][i], GND [b2029][i],
20 # ICDHyr [b1136][i], THD2pp [b1602/b1603][i])
21 Min_Redox_Potential = base_case_model.problem.Objective(base_case_model.reactions.
22   ↔ GAPD.forward_variable + base_case_model.reactions.PDH.forward_variable +
23   ↔ base_case_model.reactions.ME1.forward_variable + base_case_model.
24   ↔ reactions.AKGDH.forward_variable +
25   ↔ base_case_model.reactions.MDH.forward_variable + base_case_model.
26   ↔ reactions.NADTRHD.forward_variable +
27   ↔ base_case_model.reactions.LDH_D.forward_variable + base_case_model.
28   ↔ reactions.ACALD.forward_variable +
29   ↔ base_case_model.reactions.ALCD2x.forward_variable + base_case_model.
```

```

24     ↪ reactions.ME2.forward_variable +
        base_case_model.reactions.G6PDH2r.forward_variable + base_case_model.
25     ↪ reactions.GND.forward_variable +
        base_case_model.reactions.ICDHyr.forward_variable + base_case_model.
26     ↪ reactions.TH2pp.forward_variable,
        direction = 'min')
27
28 Max_Redox_Potential = base_case_model.problem.Objective(base_case_model.reactions.
29     ↪ GAPD.forward_variable + base_case_model.reactions.PDH.forward_variable +
        base_case_model.reactions.ME1.forward_variable + base_case_model.
30     ↪ reactions.AKGDH.forward_variable +
        base_case_model.reactions.MDH.forward_variable + base_case_model.
31     ↪ reactions.NADTRHD.forward_variable +
        base_case_model.reactions.LDH_D.forward_variable + base_case_model.
32     ↪ reactions.ACALD.forward_variable +
        base_case_model.reactions.ALCD2x.forward_variable + base_case_model.
33     ↪ reactions.ME2.forward_variable +
        base_case_model.reactions.G6PDH2r.forward_variable + base_case_model.
34     ↪ reactions.GND.forward_variable +
        base_case_model.reactions.ICDHyr.forward_variable + base_case_model.
35     ↪ reactions.TH2pp.forward_variable,
        direction = 'max')
36
37 # Min/Max ATP Production (Todas estaban, solo que algunas estaban repetidas)
38 # (PGK [b2926][R], PYK [b1854][i], SUCOAS [b0728/b0729][R], ATPS4rpp [b3734][not
    ↪ found], ACKr [b2296][R], )
39 Min_ATP_Production = base_case_model.problem.Objective(base_case_model.reactions.
40     ↪ PGK.reverse_variable + base_case_model.reactions.PYK.forward_variable +
        base_case_model.reactions.SUCOAS.reverse_variable +
41     ↪ base_case_model.reactions.ATPS4rpp.forward_variable +
        base_case_model.reactions.ACKr.reverse_variable, direction = 'min')
42
43 Max_ATP_Production = base_case_model.problem.Objective(base_case_model.reactions.
44     ↪ PGK.reverse_variable + base_case_model.reactions.PYK.forward_variable +
        base_case_model.reactions.SUCOAS.reverse_variable +
45     ↪ base_case_model.reactions.ATPS4rpp.forward_variable +
        base_case_model.reactions.ACKr.reverse_variable, direction = 'max')
46

```

## F.2. Optimización: *Biomass Growth* y Diagrama Escher

Código F.2: Desarrollo en Python y COBRAPy del código para el cálculo de las soluciones de modelo metabólico en función de la biomasa y la generación de un diagrama de representación visual a través del *software* Escher.

```

1 # Calculo de soluciones
2 solutions_base_case = base_case_model.optimize()
3 base_case_model.summary(solution = solutions_base_case)
4 # Diagrama soluciones

```

```
5 builder = Builder()
6 builder.map_json = 'mapa_completo.json'
7 builder.reaction_data = solutions_base_case.fluxes
8 builder
9
```

### F.3. Optimización: *Max ATP Production*

Código F.3: Desarrollo en Python y COBRApy del código para el cálculo de las soluciones de modelo metabólico en función de la máxima producción de ATP.

```
1 # Max ATP Production
2 base_case_model.objective = Max_ATP_Production
3 solutions_base_case_3 = base_case_model.optimize()
4 base_case_model.summary(solution = solutions_base_case_3)
5
```

# Anexo G

## Código: *knockouts* pflA, ldhA y frdBC

### G.1. Establecimiento de modelos y *knockouts*

Código G.1: Desarrollo en Python y COBRApy de los diferentes modelos para la generación de los *knockouts* de los genes pflA, ldhA y frdBC.

```
1 import os
2 import cobra
3 import copy
4 import escher
5 from escher import Builder
6 from os.path import join
7 from cobra import Model, Reaction, Metabolite
8
9 cwd = os.getcwd()
10
11 # Cargando Modelo: según los diferentes knock-out (pflA /b0902, ldhA /b1380 y frdBC /
    ↪ b4152, b4153)
12 base_case_model_pflA = cobra.io.load_json_model(join(cwd, "iML1515_NADPH.json")).
    ↪ copy()
13 base_case_model_ldhA = cobra.io.load_json_model(join(cwd, "iML1515_NADPH.json")).
    ↪ copy()
14 base_case_model_frdBC = cobra.io.load_json_model(join(cwd, "iML1515_NADPH.json")).
    ↪ copy()
15 base_case_model_ldhA_pflA = cobra.io.load_json_model(join(cwd, "iML1515_NADPH.
    ↪ json")).copy()
16
17 # Knock-outs
18 # pflA /b0902
19 base_case_model_pflA.genes.b0902.knock_out()
20 # ldhA /b1380
21 base_case_model_ldhA.genes.b1380.knock_out()
22 # pflA /b0902, ldhA /b1380
23 base_case_model_ldhA_pflA.genes.b0902.knock_out()
24 base_case_model_ldhA_pflA.genes.b1380.knock_out()
25 # frdBC /b4152, b4153
26 base_case_model_frdBC.genes.b4152.knock_out()
27 base_case_model_frdBC.genes.b4153.knock_out()
```

```
28
29 # Optimizacion y summary
30 solutions_base_case_pflA = base_case_model_pflA.optimize()
31 base_case_model_pflA.summary(solution = solutions_base_case_pflA)
32
```

## G.2. Optimización y *summary*

Código G.2: Desarrollo en Python y COBRApy del cálculo para la resolución y optimización de los diferentes *knockouts* establecidos.

```
1 # Optimizacion y summary
2 solutions_base_case_pflA = base_case_model_pflA.optimize()
3 base_case_model_pflA.summary(solution = solutions_base_case_pflA)
4
5 solutions_base_case_ldhA = base_case_model_ldhA.optimize()
6 base_case_model_ldhA.summary(solution = solutions_base_case_ldhA)
7
8 solutions_base_case_ldhA_pflA = base_case_model_ldhA_pflA.optimize()
9 base_case_model_ldhA_pflA.summary(solution = solutions_base_case_ldhA_pflA)
10
11 solutions_base_case_frdBC = base_case_model_frdBC.optimize()
12 base_case_model_frdBC.summary(solution = solutions_base_case_frdBC)
13
```

# Anexo H

## Composición medio LB

Tabla H.1: Composición medio LB propuesta por Marinos, Kaleta y Waschina (2020) [83]. Las *sources* pueden corresponder a BD Bionutrients Technical Manual - Advanced Bioprocessing 4th Edition, PMID: 13949853, PMID: 17905994, Bionumbers 114108, FoodData Central/Yeast (Survey (FNDDS), 343391), <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13400.x> (SARWAR et al.)

LB <i>Broth</i>	
Medio; <i>Source</i>	Compuesto Molecular por Medio
Yeast Extract;BD	Sodium
Yeast Extract;BD	Chloride
Yeast Extract;BD	Calcium
Yeast Extract;BNID:114108	Iron
Yeast Extract;BD	Sulfate
Yeast Extract;BD	Phosphate
Yeast Extract;BNID:114108	Magnesium
Yeast Extract;BD	Potassium
Yeast Extract;BD	Alanine
Yeast Extract;BD	Aspartic
Yeast Extract;BD	Asparagine
Yeast Extract;BD	Glutamic
Yeast Extract;BD	Glutamine
Yeast Extract;BD	Glycine
Yeast Extract;BD	Histidine
Yeast Extract;BD	Isoleucine
Yeast Extract;BD	Leucine
Yeast Extract;BD	Lysine
Yeast Extract;BD	Methionine
Yeast Extract;BD	Phenylalanine
Yeast Extract;BD	Proline

Yeast Extract;BD	Serine
Yeast Extract;BD	Threonine
Yeast Extract;BD	Tryptophan
Yeast Extract;BD	Tyrosine
Yeast Extract;BD	Valine
Yeast Extract;BD	Arginine
Yeast Extract;BD	Cysteine
Yeast Extract;BD	Aluminum
Yeast Extract;BD	Barium
Yeast Extract;BD	Cadmium
Yeast Extract;PMID:13949853	Cobalt
Yeast Extract;BNID:114108	Chromium
Yeast Extract;PMID:13949853	Gallium
Yeast Extract;BNID:114108	Cooper
Yeast Extract;BNID:114108	Manganese
Yeast Extract;BNID:114108	Nickel
Yeast Extract;BNID:114108	Lead
Yeast Extract;PMID:13949853	Srontium
Yeast Extract;PMID:13949853	Vanadium
Yeast Extract;PMID:13949853	Tin
Yeast Extract;BNID:114108	Zinc
Yeast Extract;PMID:13949853	Titanium
Yeast Extract;PMID:13949853	Molybdenum
Yeast Extract;SARWAR et al.	Adenine
Yeast Extract;SARWAR et al.	Guanine
Yeast Extract;SARWAR et al.	Cytosine
Yeast Extract;SARWAR et al.	Uracil
Yeast Extract;SARWAR et al.	Ammonia
Yeast Extract;SARWAR et al.	Cellulose
Yeast Extract;SARWAR et al.	Mannose
Yeast Extract;SARWAR et al.	Folate
Yeast Extract;SARWAR et al.	Pantothenate
Yeast Extract;SARWAR et al.	Biotin
Yeast Extract;SARWAR et al.	Selenium
Yeast Extract;FoodData	Vitamin C, total ascorbic acid
Yeast Extract;FoodData	Thiamin
Yeast Extract;FoodData	Riboflavin
Yeast Extract;FoodData	Niacin
Yeast Extract;FoodData	Vitamin B-6

Yeast Extract;FoodData	Choline, total
Yeast Extract;FoodData	Vitamin B-12
Tryptone;BD	Sodium
Tryptone;BD	Chloride
Tryptone;BD	Calcium
Tryptone;BD	Iron
Tryptone;BD	Sulfate
Tryptone;BD	Phosphate
Tryptone;BD	Magnesium
Tryptone;BD	Potassium
Tryptone;BD	Alanine
Tryptone;BD	Aspartic
Tryptone;BD	Asparagine
Tryptone;BD	Glutamic
Tryptone;BD	Glutamine
Tryptone;BD	Glycine
Tryptone;BD	Histidine
Tryptone;BD	Isoleucine
Tryptone;BD	Leucine
Tryptone;BD	Lysine
Tryptone;BD	Methionine
Tryptone;BD	Phenylalanine
Tryptone;BD	Proline
Tryptone;BD	Serine
Tryptone;BD	Threonine
Tryptone;BD	Tryptophan
Tryptone;BD	Tyrosine
Tryptone;BD	Valine
Tryptone;BD	Arginine
Tryptone;BD	Cystine
Tryptone; BNID:114108	Chromium
Tryptone; BNID:114108	Cooper
Tryptone; BNID:114108	Manganese
Tryptone; BNID:114108	Nickel
Tryptone; BNID:114108	Lead
Tryptone; BNID:114108	Zinc
NaCl	Sodium
NaCl	Chloride

# Anexo I

## Magnitudes de los flujos del medio de cultivo a través de la función *minimal\_medium*

```
EX_pi_e': 0.18327513999998005,  
EX_met__L_e': 0.029242709999999995,  
EX_fe3_e': 0.00148352,  
EX_gln__L_e': 0.09857998000000001,  
EX_pro__L_e': 0.042000449999999995,  
EX_ade_e': 0.085080479999999989,  
EX_mn2_e': 0.00013129,  
EX_arg__L_e': 0.05620048,  
EX_asp__L_e': 0.272457719999999596,  
EX_tyr__L_e': 0.026200239999999996,  
EX_glu__L_e': 0.007505569999999921,  
EX_btn_e': 3.8000000000000007e-07,  
EX_fe2_e': 0.00156807,  
EX_glc__D_e': 10.93335465145831,  
EX_lys__L_e': 0.06520059,  
EX_ser__L_e': 0.07255681999999998,  
EX_thm_e': 4.237e-05,  
EX_trp__L_e': 0.010800170000000001,  
EX_zn2_e': 6.478999999999998e-05,  
EX_mg2_e': 0.001648250000000002,  
EX_nac_e': 0.00043281999999578255,
```

(a) Metabolitos  
parte 1

```
EX_ca2_e': 0.00098895,  
EX_ni2_e': 6.137e-05,  
EX_cu2_e': 0.0001347100000000002,  
EX_cobalt2_e': 4.75000000000001e-06,  
EX_pnto__R_e': 0.0001280599999999075,  
EX_asn__L_e': 0.04580044999999999,  
EX_mobd_e': 1.3300000000000002e-06,  
EX_so4_e': 0.00082422,  
EX_phe__L_e': 0.035200350000000005,  
EX_thr__L_e': 0.21478835,  
EX_csn_e': 0.06285105000000002,  
EX_his__L_e': 0.018000220000000004,  
EX_k_e': 0.037086669999999995,  
EX_cys__L_e': 0.017735739999999993,  
EX_cl_e': 0.000988950000000002,  
EX_pydx_e': 4.236999999999996e-05}
```

(b) Metabolitos  
continuación

Figura I.1: Flujos de metabolitos bajo unidades de  $[mmol/(gDW \cdot h)]$  calculados a través del código E.1 para un crecimiento de biomasa de  $0.19 [mmol/(gDW \cdot h)]$ .