



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

**OPTIMIZACIÓN DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA
PRODUCCIÓN DE ISOBUTANOL COMO COMBUSTIBLE ALTERNATIVO,
A TRAVÉS DE ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS**

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

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

PAULINA ANDREA NECULPAN BUSTOS

PROFESOR GUÍA:

Juan Asenjo De Leuze De Lancizolle

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

Barbara Andrews Farrow

Irene Martínez Basterrechea

José Duguet Saez

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:
Centre for Biotechnology and Bioengineering (CeBiB)

SANTIAGO DE CHILE

2024

OPTIMIZACIÓN DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA PRODUCCIÓN DE ISOBUTANOL COMO COMBUSTIBLE ALTERNATIVO, A TRAVÉS DE ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS

El presente trabajo de título se enmarcó en un contexto de cambio climático y la necesidad mundial de transitar hacia nuevas tecnologías energéticas, particularmente, en el desarrollo de nuevos procesos industriales para producción de biocombustibles líquidos.

El objetivo general del trabajo es modificar genéticamente una cepa de *S.cerevisiae* en laboratorio para aumentar la producción de Isobutanol. Estos resultados serían empleados para validar una técnica de diseño genético *in Silico* a través de herramientas de modelamiento.

Para cumplir dicho objetivo, en laboratorio se realizó una integración genómica de genes para Alcohol deshidrogenasa (LIAdh^{are1}) y α -cetoácido descaboxilasa (SkAro10) con modificaciones para expresión mitocondrial. Por otro lado, en el trabajo de modelamiento se desarrollaron dos metodologías de implementación de dFBA adaptadas para último GEM publicado de *S.cerevisiae*: yETFL. Además, se desarrollaron técnicas de análisis mediante grafos y mapas de calor para un análisis detallado de los cambios metabólico.

A partir de la metodología implementada, se logra transformar *S.cerevisiae* mediante técnicas de integración genómica, pero es necesario re-caracterizar las transformantes con mejoras metodológicas. Respecto a la parte de modelamiento, con éxito se logra aplicar por primera vez el modelo yETFL con un propósito práctico para el diseño de una estrategia con foco en el aumento de producción de Isobutanol. A partir de los análisis, se recomienda un sistema fedbatch de alta densidad celular, con alimentación constante de aminoácidos para aumentar la producción incluso con mínimas modificaciones genéticas.

Esta investigación espera haber contribuido en el desarrollo de conocimiento para potenciar la producción sostenible de biocombustibles, buscando reemplazar el consumo de combustibles fósiles y transitar hacia un modelo productivo alternativo.

OPTIMIZATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FOR PRODUCTION OF ISOBUTANOL AS AN ALTERNATIVE FUEL, THROUGH METABOLIC FLOW ANALYSIS

This thesis is framed within the context of climate change and the global need to transition to new energy technologies, particularly in the development of new industrial processes for the production of liquid biofuels. The general objective of the work is to genetically modify a strain of *S. cerevisiae* in the laboratory to increase isobutanol production. These results would be used to validate an *in silico* genetic design technique through modeling tools.

To achieve this objective, the laboratory work involved the genomic integration of genes for Alcohol Dehydrogenase (LlAdh^{are1}) and α -Ketoacid Decarboxylase (SkAro10) with modifications for mitochondrial expression. On the modeling side, two methodologies for implementing dynamic Flux Balance Analysis (dFBA) were developed, adapted to the latest published GEM of *S. cerevisiae*: yETFL. Additionally, graph and heatmap analysis techniques were developed for detailed analysis of metabolic changes.

Using the implemented methodology, *S. cerevisiae* was successfully transformed using genomic integration techniques, although re-characterization of the transformants with methodological improvements is necessary. Regarding the modeling part, the yETFL model was successfully applied for the first time with a practical purpose to design a strategy focused on increasing isobutanol production. From the analyses, a high cell density fed-batch system with amino acid feeding is recommended to increase production even with minimal genetic modifications.

This research aims to contribute to the development of knowledge to enhance the sustainable production of biofuels, seeking to replace the consumption of fossil fuels and transition to an alternative productive model.

*A Mufasa, Kenai y Koda,
por su paciencia, apoyo y amor infinito.*

Saludos

Agradecimientos

Que proceso más eterno, dinámico, complejo y desafiante, contradictorio pero espero que una vez se lea esto, haya concluido con ser gratificante. No cabe duda que a quienes les debo el principal agradecimiento es a mi familia, mi equipo, a mi papá (mejor conocido como kenai), mi mamá (mejor conocida como mufasa), y a mi kodita (gymsis 4ever). Gracias familia por toda la contención, por el amor eterno, por todas las risas y la paciencia en este proceso, que para todos fue más largo de lo que se esperaba, pero aún así, jamás fue razón de desaire o complicación. Estaré eternamente agradecida de todos los días que kenai me fue a buscar y dejar a la u para poder dormir un poco más, y todas los almuerzos y cenas que me preparó mi madre para llegar a comer cuando llegaba cansada, definitivamente, parte de este logro no es solo mío, sino que se los debo a ambos.

Me siento profundamente agradecida y contenta de contar con un núcleo de amigos maravillosos, con quienes hemos pasado demasiados años (casi 10 a estas alturas) apañándonos, riendo y sobretodo bebiendo. Al niko, a la cami y valerio, por todas las risas, las conversaciones, las cervecitas y sobre todo el roncito, que hemos compartido y no puedo tener mayor convicción, de que continuaremos compartiendo. Gracias chiquillos por ser tan honestos, transparentes y ustedes mismos, porque no importa la hora, el lugar, o si habían lucas o no, vaya que hemos construido recuerdos geniales en todos los escenarios posibles (nuestra mejor versión: Papudo 2024).

Hacen faltan conectores para continuar el hilo de agradecimiento en estos párrafos, sin embargo, no queda sino seguir agradeciendo, esta vez a mi compañero, mi pareja, que de manera inesperada para ambos y una sorpresa increíble que dio la historia, nos juntamos, y mutuamente nos hemos apoyado y acompañado en este alocado período. Muchas gracias Migue por toda la paciencia que me tuviste (que vaya que fue arta), por acompañarme en todas las crisis de ansiedad y frustración que vinieron de la mano de este proyecto, pero sobretodo, por ayudarme siempre a recordar mi objetivo final, a mantener visión a futuro, y no abandonarme ni a mi ni mis sueños en el intrincado y agotar desgaste emocional que significó esta tesis.

No puedo finalizar, sin por supuesto mencionar a mis bellas amigas Naro y Cata, que maravilla haberlas conocido durante la universidad y llamarlas hoy reales amigas. Aunque estemos lejitos o cerca, siento su cariño, sus risas, y sus consejos que tanta paz y buena guía me han dado. Las quiero mucho bellas, y confío que para la próxima vez que nos reunamos las 3, nos lograremos tomar esa foto que siempre se nos olvida (ojalá en una visita por las europas).

Si bien el apoyo emocional es crucial en este proceso, también lo es tener la infraestructura y recursos necesarios para poder realizar una investigación innovadora. Por esto, correspon-

de hacer la siguiente mencion: Powered@NLHPC: Esta investigación/tesis fue parcialmente apoyada por la infraestructura de supercómputo del NLHPC (CCSS210001). Sin esta infraestructura en territorio nacional, no exagero cuando digo que el desarrollo del presente trabajo de título hubiese sido imposible. Muchas gracias.

Gracias, totales.

Tabla de Contenido

1. Antecedentes	1
1.1. Problemática	1
1.2. Soluciones actuales en el mercado	5
1.2.1. Bioetanol	7
1.2.2. Biodiesel	11
2. Solución propuesta	13
2.1. Alcoholes de fusel: Isobutanol	13
2.2. Métodos de producción de Isobutanol	15
2.3. Microorganismo fermentativo: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.4. Producción de Isobutanol en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.5. Herramientas <i>in silico</i> para Ingeniería Metabólica	24
2.6. Ingeniería Metabólica en <i>S.cerevisiae</i> para producción de Isobutanol	25
3. Antecedentes de investigación	27
3.1. Contexto de investigación	27
4. Objetivos	31
4.1. Objetivo General	31
4.2. Objetivo Específicos	31
5. Metodología	32
5.1. Metodología Laboratorio	32
5.2. Metodología Modelamiento	36
6. Resultados	43
6.1. Resultados experimentales	43
6.1.1. Diagnósticos molecular	43
6.1.2. Transformación de <i>S.cerevisiae</i>	49
6.2. Resultados Modelamiento	57
6.2.1. Identificación de ruta de producción de Isobutanol	57
6.2.2. Validación del modelo y análisis de sensibilidad	59
6.2.2.1. Análisis sensibilidad Tolerancia Gurobi	59
6.2.2.2. Análisis sensibilidad Tolerancia de restricciones en Estructura de optimización	59
6.2.2.3. Ajuste 1: Producción de D-glucosa-6-fosfato	61
6.2.2.4. Ajuste 2: Transportador α -cetoisovalerato	62
6.2.2.5. Modelo final	64

6.2.3.	Análisis Implementación 1 dFBA	64
6.2.4.	Análisis Implementación 2 dFBA	66
6.2.5.	Modelamiento casos de estudio	67
6.2.5.1.	Medio de cultivo definido	68
6.2.5.2.	Medio de cultivo definido con enzimas ILV expresadas en citosol	69
6.2.6.	Comparativa casos de estudio	70
6.2.6.1.	Caso Base v/s Caso Medio Definido	70
6.2.6.2.	Caso Medio Definido con v/s sin expresión citosólica de enzimas ILV	71
7.	Discusión	74
7.1.	Trabajo en laboratorio	74
7.1.1.	Diagnóstico cepas y plásmidos	74
7.1.2.	Transformación <i>S.cerevisiae</i>	75
7.2.	Trabajo de modelamiento	77
7.2.1.	Validación del modelo y análisis de sensibilidad	77
7.2.2.	Implementación 1 dFBA	78
7.2.3.	Implementación 2 dFBA	79
7.2.4.	Caso de estudio: Medio sin definir v/s Medio definido	80
7.2.5.	Caso de estudio: Medio definido con y sin expresión citosólica de enzimas ILV	82
8.	Conclusiones	84
	Bibliografía	86
	Anexos	95
A.	Resultados PCR colonia	96
B.	Rutas del metabolismo central en <i>S.cerevisiae 288c</i>	98
C.	Validación modelo yETFL	102
D.	Gráficos de casos generados a través de Dynamic Flux Balance Analysis	108
E.	Clusters - Caso Base v/s Caso Medio Definido	111
F.	Clusters - Casos Medio definido con v/s sin expresión citosólica de enzimas ILV	118
G.	Cambio metabolismo PE	125

Índice de Tablas

2.1.	Propiedades de algunos alcoholes y combustible	14
2.2.	Características de combustión y emisiones de mezclas diesel/alcoholes de fusel (Rajesh Kumar et al., 2016)	14
2.3.	Técnicas de edición genómica aleatoria (Siyang et al., 2020).	18
2.4.	Técnicas de edición genómica racional (Shao et al., 2009; Barbieri et al., 2017; Rainha et al., 2021)	18
2.5.	Modificaciones sobre <i>S.cerevisiae</i> para incrementar producción de Isobutanol .	23
3.1.	Promotores, terminadores y genes utilizados en la construcción de pBS-Cluster (Méndez Román, 2018)	29
3.2.	Cepas y plasmidos disponibles en CeBiB	30
5.1.	Partidores y Temperaturas de annealing para PCR	33
5.2.	Parámetros utilizados en dFBA	38
5.3.	Condiciones iniciales de simulación	38
6.1.	Nomenclatura cepas reanimadas desde trabajos anteriores	43
6.2.	Resultado diseño partidores ADH	46
6.3.	Resultado diseño partidores SkAro	47
6.4.	OD cultivos <i>E.coli</i>	49
6.5.	Resultado extracción DNAp	49
6.6.	Síntesis resultados <i>screening</i> mediante PCR colonia	52
6.7.	Reacciones con mayor discrepancia entre modelo original y realidad	61
6.8.	Reacciones con mayor discrepancia entre modelo con reacción r_{4235} bloqueada y realidad	62
6.9.	Reacciones con mayor diferencia entre Ajuste 1 y Ajuste 2	63
6.10.	Composición suplementos de medio sintético modelado	68
7.1.	Cambios en el flux de ATP syntase (r_{0226})	81
C.1.	Validación original modelo yETFL	102
E.1.	Reacciones del Cluster 0 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido .	111
E.2.	Reacciones del Cluster 1 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido .	111
E.3.	Reacciones del Cluster 2 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido .	112
E.4.	Reacciones del Cluster 3 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido .	113
E.5.	Reacciones del Cluster 4 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido .	113
E.6.	Reacciones del Cluster 5 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido .	114
E.7.	Reacciones del Cluster 6 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido .	114
E.8.	Reacciones del Cluster 7 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido .	115
F.1.	Reacciones del Cluster 0 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	118
F.2.	Reacciones del Cluster 1 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	119

F.3.	Reacciones del Cluster 2 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	119
F.4.	Reacciones del Cluster 3 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	120
F.5.	Reacciones del Cluster 4 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	120
F.6.	Reacciones del Cluster 5 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	121
F.7.	Reacciones del Cluster 6 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	121
F.8.	Reacciones del Cluster 7 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	122
F.9.	Reacciones del Cluster 8 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	122
F.10.	Reacciones del Cluster 9 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	123
F.11.	Reacciones del Cluster 10 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	123
F.12.	Reacciones del Cluster 11 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	123
F.13.	Reacciones del Cluster 12 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc	124
G.1.	Conjunto de metabolitos PE con sus principales reacciones alteradas	125

Índice de Ilustraciones

1.1.	Demanda Global de energía por combustible 1925-2019 (IEA, 2020)	1
1.2.	Precios históricos del barril de petróleo. Imagen editada desde (Economics, 2023)	3
1.3.	Consumo final de energía por tipo de combustible (Company, 2022)	3
1.4.	Aumento de capacidad energética provista por distintos tipos de energías renovables, medido en Exajoules (EJ). Imagen construida a partir del "World Energy Outlook 2023 Free Dataset"(IEA, 2023)	4
1.5.	Cambio de temperatura en la superficie terrestre (IPCC, 2021)	5
1.6.	Producción de Etanol a partir de Maíz a través del método de Molienda en seco. Imagen extraída de (Zabed et al., 2017)	8
1.7.	Producción de Etanol a partir de azúcar. Imagen extraída de (Zabed et al., 2017)	9
1.8.	Producción de Etanol a partir de lignocelulosa. Imagen extraída de (Zabed et al., 2017)	10
1.9.	Producción de Biodiesel. Imagen inspirada desde (Apostolakou et al., 2009; Barnwal y Sharma, 2005)	12
2.1.	Ruta química de Oxosíntesis	15
2.2.	Sistema producción de Isobutanol por GEVO®(GEVO, s.f.)	16
2.3.	Ruta metabólica nativa para producción de Isobutanol (Avalos et al., 2013) . .	20
2.4.	Genes de rutas metabólicas competitivas con Isobutanol estudiados por Matsuda (Matsuda et al., 2013)	21
2.5.	Rutas metabólicas competitivas con Isobutanol por Wess (Wess et al., 2019). Flechas negras (→) representan la ruta directa de producción de Isobutanol, las flechas azules (→) indican metabolitos competitivos directos e indirectos . . .	22
2.6.	Construcción de modelo a escala genómica (Fang et al., 2020)	24
2.7.	Desarrollo de GEMs para <i>S.cerevisiae</i> (Y. Chen et al., 2022)	25
3.1.	Estructura pBS-Cluster	27
5.1.	Espectro bandas 1kb Ladder	34
5.2.	Flujo de trabajo para la primera implementación de dFBA	39
5.3.	Flujo de trabajo para la segunda implementación de dFBA	40
6.1.	Resultado de PCR para diagnóstico cepas trabajos anteriores: Parte 1	44
6.2.	Resultado de PCR para diagnóstico cepas trabajos anteriores: Parte 2	44
6.3.	Resultado de PCR para diagnóstico de plasmidos	45
6.4.	Diagnóstico presencia genes en constructos perpetuados	46
6.5.	Diagnóstico identificación gen KAN	48
6.6.	Diagnóstico identificación gen Adh	48
6.7.	Diagnóstico identificación gen Aro	49
6.8.	Resultado digestión pBS-Cluster con enzima EcoRI	50
6.9.	Selección de transformantes con 100µg/mL de G418	51
6.10.	Selección de transformantes con 200µg/mL de G418	51

6.11.	Selección de transformantes con 300 μ g/mL y 400 μ g/mL de G418	52
6.12.	Identificación sección flanqueada por sitios UP/DOWN	53
6.13.	Resultado PCR para sección de genoma franqueada por regiones UP/DOWN .	54
6.14.	Resultado PCR para gen de resistencia y ubicación en el genoma de transformantes	55
6.15.	Resultado PCR para genes Adh y SkAro de colonias transformadas	56
6.16.	Metabolismo general s288c utilizando yEFL	57
6.17.	Ruta de Isobutanol	58
6.18.	Análisis de sensibilidad para tolerancia de Solver Gurobi sobre SSR	59
6.19.	Análisis de sensibilidad para tolerancia de Solver Gurobi sobre tiempo	59
6.20.	Análisis de sensibilidad para tolerancia de restricciones sobre SSR	60
6.21.	Análisis de sensibilidad para tolerancia de restricciones sobre tiempo	60
6.22.	Transportador α -cetoisovalerato en diagrama Escher	63
6.23.	Gráficos variación de la desviación estándar en el tiempo versus la cantidad de casos evaluados: Parte 1	64
6.24.	Gráficos variación de la desviación estándar en el tiempo versus la cantidad de casos evaluados: Parte 2	65
6.25.	Gráficos conglomerados para dinámica: Parte 1	66
6.26.	Gráficos conglomerados para dinámica: Parte 2	66
6.27.	Gráficos dinámica de sistemas en modelos de caso base	67
6.28.	Gráficos comparativo de SSR respecto a las dos metodologías implementadas .	67
6.29.	Dinámica en el tiempo de Caso Medio definido	69
6.30.	Esquema de expresión citosólica de enzimas ILV2, ILV3 e ILV 5 (Imagen modificada desde (Wess et al., 2019))	69
6.31.	Dinámica en el tiempo de Caso Medio definido con expresión citosólica de enzimas ILV	70
6.32.	Grafo de principales cambios entre Caso Base y Caso Medio definido	71
6.33.	Grafo de principales cambios en Casos Medio definido con y sin expresión citosólica de enzimas ILV	73
7.1.	Ilustración problema metodológico partidores originales Adh y SkAro10	75
7.2.	Mecanismo recombinación homóloga esperado - Detalle módulo KAN	77
7.3.	Rendimiento de biomasa	79
7.4.	Comparación en la producción de distintos tipos de PE entre Mitocondria y Golgi+Vacuola, por caso de estudio	81
7.5.	Comparación en la producción Total entre los diferentes tipos de PE, por caso de estudio	82
7.6.	Comparación de las reacciones de 2-metil 2 -oxobutanoato citosólico (s_0232_c)	83
A.1.	PCR Colonia para identificación de KAN en transformantes 300 μ g/mL	96
A.2.	PCR Colonia para identificación de LIADH ^{ARE1} en transformantes 300 μ g/mL	97
A.3.	PCR Colonia para identificación de SkAro10_b en transformantes 300 μ g/mL .	97
B.1.	Rutas metabolismo central de glucosa y las pentosas-fosfato	98
B.2.	Ruta de glicerol	99
B.3.	Ruta de etanol	100
B.4.	Ruta de TCA	101
D.1.	Casos 1 al 6 obtenidos con Implementación 1 de dFBA	108
D.2.	Casos 7 al 12 obtenidos con Implementación 1 de dFBA	109
D.3.	Casos 13 al 16 obtenidos con Implementación 1 de dFBA	110
G.1.	Comparación de las reacciones del metabolito s_3130	126

G.2.	Comparación de las reacciones del metabolito s_3132	126
G.3.	Comparación de las reacciones del metabolito s_3134	127
G.4.	Comparación de las reacciones del metabolito s_3138	127
G.5.	Comparación de las reacciones del metabolito s_3140	128
G.6.	Comparación de las reacciones del metabolito s_3142	128

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Problemática

Desde la época de la Revolución industrial, los combustibles de todo tipo han cubierto un rol central en la vida humana y su progreso constante en mejorar las condiciones de hábitat y desarrollo, de esta manera es que están presentes en todas las aristas que implica vivir en un mundo globalizado: el transporte de productos, bienes o personas, la calefacción, generación de energía, para uso doméstico, herramientas de trabajo como maquinarias, entre muchos otros ejemplos. La Figura 1.1 plasma el cambio en el consumo a lo largo de la historia de estos materiales, donde inicialmente la utilización de combustibles minerales como el carbón era predominante, para ir paulatinamente dando paso al petróleo, hecho que viene asociado a la variedad de subproductos generados a partir de su refinamiento como son el Diesel y la Gasolina. A medida que estos productos expandían sus aplicaciones a lo largo del mundo y en variados aspectos del diario vivir de la población, el consumo no ha dejado sino de incrementar pasando de 1.420 millones de Toneladas equivalentes de petróleo (Mtoe) consumidas a nivel global hace un siglo, a prácticamente 10 veces esta cantidad en el año 2019 (IEA, 2020).

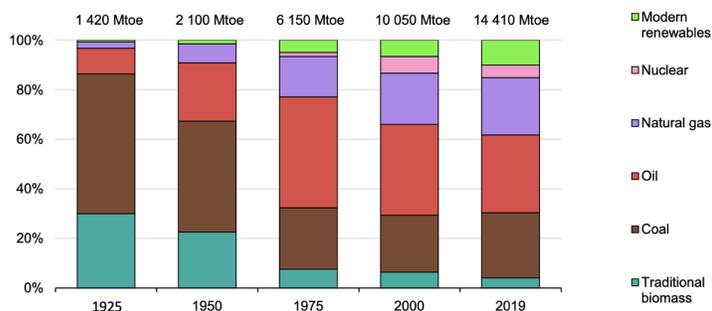


Figura 1.1: Demanda Global de energía por combustible 1925-2019 (IEA, 2020)

Si bien el constante crecimiento de este mercado es innegable, las más recientes proyecciones prevén un cambio sin igual en la tendencia de los próximos años. La *International Energy Agency* estimó que en los 19 años plazo entre el 2000 y 2019 la demanda de combustibles aumentó en un 43,4 %, en contraste, los estudios de la consultora internacional McKinsey & Company para este mismo intervalo hacia el futuro proyectan un crecimiento de solo un 14 %.

Aún más, se llegaría a un estancamiento del consumo en el año 2033 aproximadamente. Este hecho puede resultar paradójico para los lectores dado que la población mundial se estima aumente en 3 billones de habitantes a 2050 (Roser y Rodés-Guirao, 2013), sin embargo hay un factor clave que pudo tener mayor influencia de lo esperado en las dinámicas del mercado a futuro: la pandemia de COVID-19. Este suceso que dejó una marca en la historia del Siglo XXI, recordó al mundo lo vulnerable de su sistema y lo interconectado (o dependientes) que se encuentran todos los países. Los encierros constantes, problemas de movilidad para trabajadores, bajo uso de medios de transporte y la digitalización de muchas actividades, llevó a que las tecnologías y las políticas de gobierno se comiencen a adaptar, pero aún más importante, a que la sociedad nuevamente se involucre y colabore en resolver problemas comunes o mejor dicho que vuelva a surgir con más fuerza un “Compromiso ciudadano” (Bank, 2022). Así, innovaciones sociales van posicionándose con más fuerza, ejemplo de esto son las cooperativas energéticas, las tecnologías para auto-producción de energía en casa, y potenciamiento del transporte público o bicicletas (on Sustainable Energy, 2020). A todo lo anterior aún hay que sumar los avances en eficiencia energética y la electrificación de sectores como el transporte terrestre (Company, 2022); todos hechos que en su conjunto generarán una disminución del consumo per capita de combustibles y como consecuencia generando el estancamiento del consumo neto mundial.

Los valores de la energía están generalmente asociados a la volatilidad del precio de algunos productos como el petróleo. Forex, uno de los grandes mercados mundiales, define la volatilidad como “...la tasa a la que el precio de un activo aumenta o disminuye durante un período de tiempo.” (Forex, 2022); y en el mercado energético existen diversos factores que influyen en sus precios (Min, 2022), hecho que convierte una alta volatilidad en una amenaza para la estabilidad económica de millones de personas. El principal factor que tiene injerencia sobre los precios es la inestabilidad política o guerras en países con activa participación en la cadena de suministro energética, ya sean productores o distribuidores. Una forma de ejemplificar esto con mayor claridad es revisando los precios históricos del petróleo en la Figura 1.2, en donde se destacan tres picos de considerable cambio: i) en 1990 ocurrió la Guerra del Golfo que involucró a dos grandes productores de petróleo, ii) en 2008 el mundo se encontraba en una de las peores recesiones económicas, y iii) en 2022 se suman los efectos económicos producto del COVID-19 más la invasión de Rusia a Ucrania, que gatilló penalizaciones mundiales al petróleo y gas ruso (tercer productor mundial). Adicionalmente, desastres naturales y el cambio climático son otro factor que puede alterar los precios, así como sucedió cuando el huracán Katrina forzó el cierre de plantas de refinamiento de petróleo en EE.UU (Guardian, 2005). Pareciera que el último tiempo los dos factores antes mencionados pasaron a ser más probables de ocurrir, dado la tensión entre las grandes potencias económicas y los efectos del cambio climático que cada vez se dejan ver con más fuerza. Por tanto, no es de sorprender que la volatilidad de los precios desde el 2002 siga siendo norma en el mercado oferente, y no se vuelva a ver una estabilidad similar a la de finales del siglo pasado.



Figura 1.2: Precios históricos del barril de petróleo. Imagen editada desde (Economics, 2023)

Paralelo al comportamiento inestable de los precios del petróleo, las proyecciones de consumo de este combustible a los próximos 30 años solo vislumbran una disminución en su consumo, en cambio, la demanda de energía a partir de fuentes distintas al crudo y gas natural van en un constante aumento. Desde la Figura 1.1 es posible identificar un incipiente aumento y posicionamiento de las Energías Renovables como tecnologías necesarias para suplir las exigencias del mercado. Para revisar este hecho en más detalle, la Figura 1.3 desglosa estas energías, transparentando el aumento en el consumo de electricidad, producto (entre otros factores) de la digitalización de actividades laborales y la electromovilidad; la novedad e importancia que la industria del Hidrógeno verde esta obteniendo en corto tiempo, y finalmente la necesidad por fuentes Bioenergéticas que si bien su aumento no es tan notorio como la electricidad, cubren una cantidad no menor de la energía distribuida.

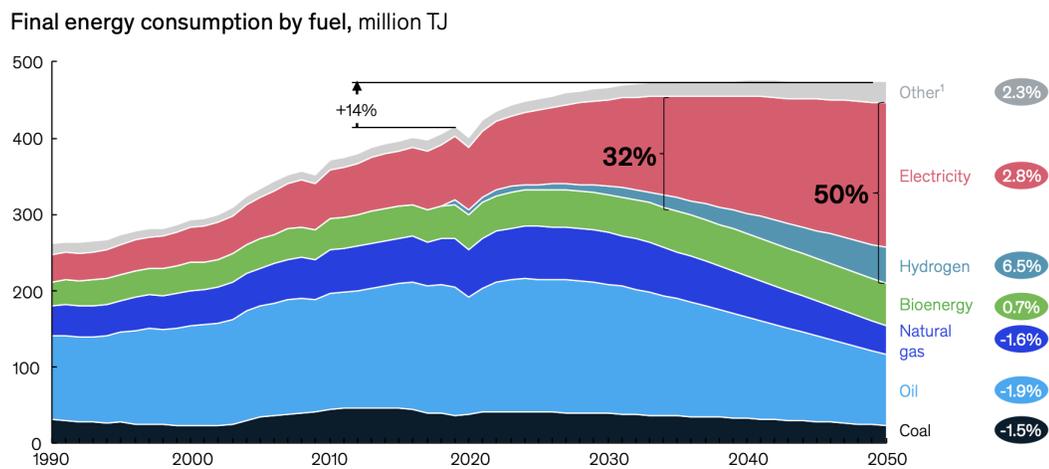


Figura 1.3: Consumo final de energía por tipo de combustible (Company, 2022)

Las energías renovables, macro-categoría donde se incluye el hidrógeno verde y las fuentes de bioenergía, se pueden definir como “...cualquier forma de energía proveniente de fuente solar, geofísica o biológica que se repone mediante procesos naturales a un ritmo igual o mayor al que es consumido” (IPCC, 2011). A través de un análisis de la información pública (gratuita) publicada por la última versión del “Net Zero to 2050 - Road Map” (IEA, 2023), en 2022 las energías renovables contribuyeron con 75 exajoules (EJ), equivalentes a un 12 % del mercado mundial. Se proyecta que las energías renovables crezcan entre un 59 % (si se mantienen tal cual están las políticas actuales) y un 120 % (si los gobiernos cumplen los compromisos propuestos dentro del “Net Zero to 2050 - Road Map” para el año 2030. Y ya en 2050 comprendan entre el 31 %-71 % de la energía producida a nivel mundial, dependiendo de los mismos escenarios de evaluación mencionados anteriormente.

Utilizando esta misma fuente de información, se resumieron en la Figura 1.4 los aumentos esperados en energía previstas para distintos tipos de fuentes renovables. Estos valores corresponden a las proyecciones para el escenario con políticas actuales, y aclara que es necesario lograr un aumento de 10 veces la capacidad instalada de energía solar a nivel mundial, 6 veces la energía eólica existente, 3 veces la producción de líquidos bioenergéticos modernos que incluyen Biogasolina, Biodiesel, Biojet Kerosene, y otros biocombustibles líquidos; para satisfacer los mercados futuros.

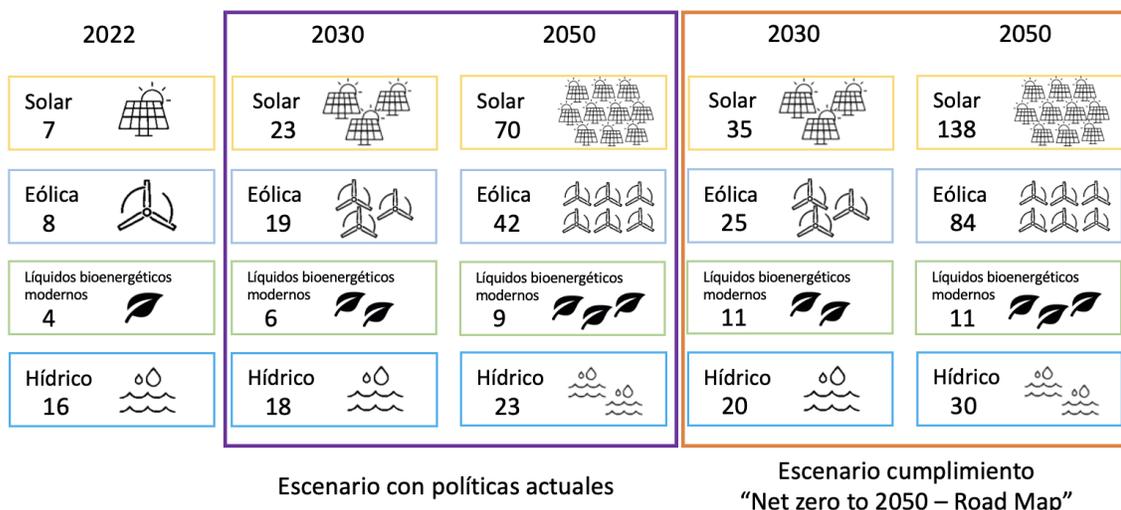


Figura 1.4: Aumento de capacidad energética provista por distintos tipos de energías renovables, medido en Exajoules (EJ). Imagen construida a partir del "World Energy Outlook 2023 Free Dataset" (IEA, 2023)

Si bien hasta este punto se ha defendido la importancia técnico-económica del posicionamiento y necesidad de transitar hacia energía renovables, no se debe dejar de lado la urgencia que hoy en día, año 2024, se tiene por aminorar los efectos del cambio climático. Tal como se mencionó en la primera línea de este trabajo de título, la Revolución industrial marcó un hito en el progreso de la humanidad, pero a la vez, definió el inicio del ininterrumpido aumento de las emisiones anuales de Dióxido de carbono a la atmósfera, precisamente producto del uso de combustibles fósiles (Ritchie et al., 2020). Se estima que alrededor de un 64 % de las emisiones de efecto invernadero a nivel mundial corresponden a CO_2 provenientes de combustible fósiles, un 18 % a emisiones de Metano, y un 11 % al cambio de uso de tierras y

la industrial forestal (IPCC, 2022).

Acorde al “*Reporte para las bases científicas del cambio climático*” (IPCC, 2021), en el mismo período de tiempo que inició el aumento de las emisiones de CO_2 a la atmósfera, se observa un aumento de más de $1^\circ C$ en la temperatura de la superficie terrestre, tal como muestra la Figura 1.5. El mismo conglomerado científico afirma que si el aumento de la temperatura no se logra frenar en $1,5^\circ C$ los efectos no tardarán en hacerse notar. Particularmente para América del Sur pueden ir desde el riesgo para asegurar agua a la población y desastres naturales como aluviones, deslizamientos de tierra, hasta un aumento de enfermedades epidémicas. A nivel mundial ya se comienzan a observar problemas de aseguramiento de la producción de alimentos tanto vegetales como animales, además de malnutrición, y desplazamiento humano producto de catástrofes, eventos que mantendrán un aumento en su frecuencia si no se realizan cambios sustanciales. No queda duda entonces, que se deben dirigir esfuerzos transversales para el desarrollo de nuevas tecnologías, así como la adopción de procesos/productos actualmente operativos, con propósito de una operación más sostenible y con fuentes energéticas alternativas que nos permitan disminuir las emisiones de Dióxido de carbono, y así contribuir al control de los efectos del cambio climático.

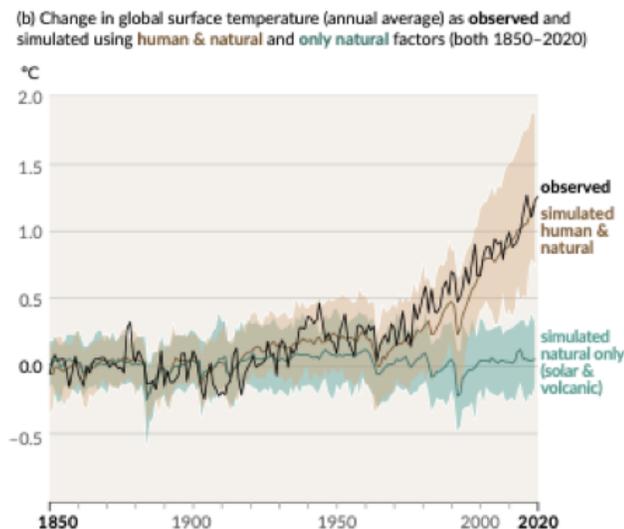


Figura 1.5: Cambio de temperatura en la superficie terrestre (IPCC, 2021)

1.2. Soluciones actuales en el mercado

Anteriormente se expusieron los argumentos para respaldar que la industria energética tiene gran cantidad de aristas en las cuales generar investigación y desarrollo para lograr evolucionar a una industria más sostenible de la mano del trabajo mancomunado entre distintas áreas de expertis, los gobiernos y la población. En particular, el presente trabajo de tesis aspira a colaborar con la meta de ampliar en tres(3) veces la capacidad de producción de líquidos bioenergéticos.

La bioenergía se entiende como “*La energía contenida en productos sólidos, líquidos o gaseosos derivados a partir de biomasa o biogas como materias primas.*”(IEA, 2021). Estos biocombustibles pueden ser clasificados en tres generaciones dependiendo de la fuente de

materia primera:

- i La primera generación, también conocidos como biocombustibles tradicionales, son aquellos producidos a partir de cultivos alimenticios. Los principales productos que clasifican usualmente en esta categoría son el bioetanol producido a partir de alimentos con alto contenido de azúcar como la caña o el maíz, y el biodiesel producido a partir de cultivos con alto contenido de aceites como la palma o la soja. Lo que favoreció el desarrollo de estos productos es el nivel de desarrollo y conocimiento que se tiene de los procesos necesarios para generarlos, que comprendían fermentaciones, destilaciones o transesterificaciones; mientras que su principal desventaja radica en la competencia por el uso de la materia prima entre alimento o combustible.
- ii Los biocombustibles de segunda generación en adelante son usualmente referidos como “biocombustibles avanzados”, y particularmente esta categoría son producidos a partir de residuos de la industria agrícola o forestal. Esta categoría si bien incluye la quema de derivados de la industria forestal como madera, pellet o astillas que no necesariamente conllevan una reducción de las emisiones de CO_2 , también contempla productos con mayor procesamiento como el Bioetanol lignocelulósico que dependiendo de su materia prima puede llevar a una reducción de más del doble del Potencial de Calentamiento Global (GWP), en el caso de residuos de la industria forestal. La principal desventaja de estos combustibles es el alto costo operacional asociado a la etapa de rotura de las cadenas de celulosa o hemicelulosa, dada la necesidad de enzimas como materia prima del proceso (el material enzimático tiene altos costos de adquisición)
- iii Finalmente, la tercera generación de biocombustibles son producidos a partir de recursos marinos como algas o cianobacterias, y corresponde a la tecnología con menor nivel de desarrollo en la actualidad, pero que genera gran interés en la comunidad científica dado el aprovechamiento de un recurso capaz de captar 2g de CO_2 por cada gramo de biomasa generado, que no necesariamente requiere de agua pura para crecer pues es capaz de hacerlo en aguas residuales, no compite por tierras de cultivo, y es capaz de crecer entre 20-30 veces más rápido que cultivos alimenticios. La principal desventaja hasta ahora, son los altos costos del proceso que pueden variar dependiendo de si la biomasa será cultivada de manera artificial o en el mar, y la tecnología a través de la cual se producirá el biocombustible, ya sea por transesterificación o fermentación (Ziolkowska, 2019; Jeswani et al., 2020; Mu et al., 2019).

En 2021 un 55,8 % de la energía generada a partir de biocombustibles líquidos correspondía a Bioetanol de primera generación, en contraste solo un 4,6 % fue generada a partir de etanol proveniente de materias primas no competitivas con la industria alimenticia. Esta diferencia también existe en productos como el Biodisel, que cubre un 37,2 % de la energía generada versus solo un 2,3 % desde Biodisel de segunda generación (IEA, 2022). Compañías como ADM (EE.UU) y POET (EE.UU) con una capacidad de 5 y 6 millones de toneladas por año respectivamente, producen Bioetanol a partir de fermentación de maíz (ADM, 2023; POET, 2023), a su vez empresas de menor tamaño como Raízen (Brasil) producen Bioetanol a partir de caña de azúcar. En el caso del Biodisel las materias primas son un poco más diversas, REGI produce a partir de aceites vegetales (no especifica su origen), grasas animales o aceites reciclados (Group, 2023), mientras que NESTE declara utilizar aceites reciclados o desechos de grasas animales (NESTE, 2023), cada una de estas compañías posee una capacidad de producción de 3.2 y 2.2 millones de toneladas respectivamente, en contra parte WILMAR

genera sus 1.3 millones de toneladas únicamente a partir de aceite de palma (Wilmar, 2023).

1.2.1. Bioetanol

El etanol como combustible se remonta al año 1876, donde Nicolaus Otto, el inventor del motor moderno de combustión interna hizo pruebas con este alcohol como fuente de energía. Su uso no fue masivo dado que sufrió de impuestos al ser asociado como un licor en la época de guerra civil estadounidense y no fue hasta 1908 que volvió a tomar relevancia, al desarrollarse el “primer vehículo flex-fuel” por Henry Ford capaz de utilizar mezcla de gasolina con etanol (Gustafson, s.f.). En la década de 1970, cuando la producción norteamericana de petróleo caía, y se inició el embargo de petróleo por parte de la OPEC, asociaciones de agricultores e interesados en la industria del etanol, generaron presiones para crear leyes o regulaciones que formaran, afianzaran y potenciaran un mercado para el etanol. De esta manera en 1978 se quita de los impuestos al combustible la mezcla E10 (gasolina con 10 % de etanol), y se inicia una serie de medidas que llevan a un crecimiento exponencial de la industria de etanol en los EE.UU. Algunas de estas fueron:

- Triplicó la compensación económica que pueden recibir empresas de etanol en casos de discriminación por parte de compañías petroleras.
- Se expandió la liberación de impuesto a todas las mezclas de etanol menores a 10 %.
- Se aprobó un presupuesto de 1 billón de dolares para la construcción de instalaciones asociadas a la producción de etanol.

Respecto a áreas más técnicas, los combustibles como la gasolina históricamente se han utilizado en conjunto con un mejorador de octanaje (o *octane booster*) lo que permite aumentar la presión que se ejerce sobre el combustible antes de que este combustione, de esta manera se puede aumentar la potencia y capacidad de los motores. Por razones de salud pública y medioambientales las alternativas que existían en el mercado para este propósito: tetraetilo de plomo o terc-butil metil ester; tuvieron que ser retirados. Esto llevó al etanol con sus buenos resultados como mejorador de octanaje a incluirse en nuevo mercado prácticamente sin competidores (Johnson et al., 2015). Incluso con el amplio mercado en que este producto se posicionó, han existido intentos de potenciar mezclas de combustibles como el E85 (gasolina con 85 % de etanol) con intención de disminuir los efectos del cambio climático y la independización energética del país. Sin embargo, esta mezcla no es compatible con los vehículos regulares de gasolina o los sistemas de distribución actuales pues el etanol es un alcohol miscible en agua a diferencia de la gasolina o diesel que son totalmente inmiscibles (Alasfour, 1997), por lo tanto, altos porcentajes de mezcla pueden ocasionar una separación de fases en los fluidos o absorción de agua durante las instancias de distribución y carga, esto llevaría a una disminución de la capacidad calorífica del combustible y un riesgo de oxidación en las partes construidas de cobre o aluminio (Yüksel y Yüksel, 2004). Incluso aquellos vehículos capaces de utilizar mezclas con alto porcentaje como E85, disminuyen el rendimiento en aproximadamente un 23 %, considerando que los precios solo rondan en un 11 %-17 % más económicos que los combustibles fósiles, tiene un mayor costo para el conductor recorrer la misma distancia con un producto de estas características (Johnson et al., 2015).

En los Estados Unidos la producción de Bioetanol domina el mercado de los combustibles alternativos, siendo el mayor exportador mundial de este producto con 15 billones de galones

aportados al mercado mundial solo el 2015. De esta producción se estima que entre un 70-86 % es generado en plantas mediante la técnica de “Molienda en Seco” (o *dry-grind* por su nombre en inglés) (Zabed et al., 2017). El diagrama de bloques de este proceso se encuentra en la Figura 1.6, que en términos generales describe las etapas a seguir comenzando por moler el maíz limpio proveniente de los cultivos, para mezclarlo con agua, enzimas y ser cocido transformando el almidón (polisacárido compuesto por distintos polímeros de glucosa) en azúcares fermentables por levaduras. Posteriormente, el etanol producido es destilado entre 2 a 3 veces y deshidratado para obtener un producto final con pureza entre 95-100 % dependiendo de las repeticiones en la última etapa (Bothast y Schlicher, 2005).

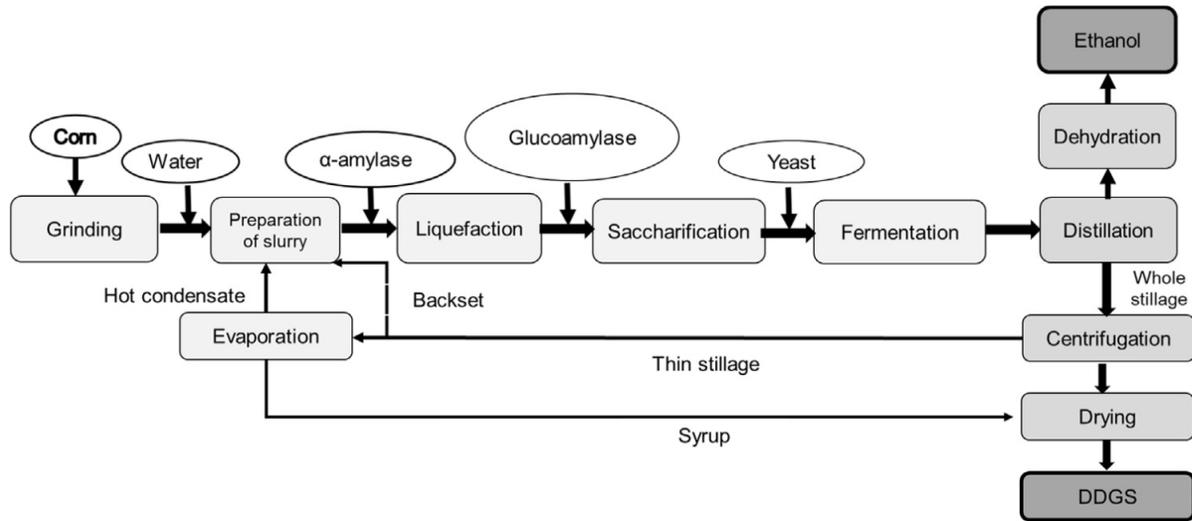


Figura 1.6: Producción de Etanol a partir de Maíz a través del método de Molienda en seco. Imagen extraída de (Zabed et al., 2017)

Si bien este proceso se encuentra bien establecido no está exento de poseer algunos problemas o desventajas. La primera de ellas es respecto al balance neto de energía para la producción de Bioetanol, pues si bien algunos estudios como el de Canter (Canter et al., 2016) muestran que se requiere menor energía de la que contiene un litro de etanol para producir la cantidad equivalente, las líneas bases para evaluar cuanto de este recurso se necesita solo considera la energía que el proceso exige desde la molienda de grano hasta la obtención de Bioetanol, faltando incorporar toda la energía necesaria para distribución e incluso para la producción misma de maíz en los campos, lo cual cambia radicalmente el resultado, pudiendo llevar hasta un balance neto de energía negativo (Pimentel y Patzek, 2005).

La materia prima no deja de ser uno de los mayores conflictos de este tipo de industria, pues ya es claro para la mayoría la susceptibilidad de los cultivos producto del cambio climático. Incluso si no se considera una perspectiva humanitaria como los crecientes niveles de hambruna o lo ilógico que sería derivar alimentos ricos en nutrientes a la industria energética, en términos prácticos los cultivos cada vez irán decreciendo sus rendimientos producto de sequías, altas temperaturas o plagas, tal como reporta el IPCC en su reporte para “*Cambio climático y Tierras*”, ejemplificando que el año 2012 EE.UU sufrió de una sequía que disminuyó el rendimiento de cultivo en un 16 % comparado con el año anterior (IPCC, 2019). Dado que las desventajas expuestas no refieren a aspectos técnicos o económicos de este producto,

es que su expansión fue considerable y hoy comprende más de un 50% de la energía generada por biocombustibles líquidos, puesto que es económicamente viable y técnicamente fácil de operar, sin embargo, los dos argumentos anteriormente expuestos dejan clara la necesidad de transitar a nuevas opciones.

Otra parte del mercado de Bioetanol se encuentra localizado en Brasil, donde se destacan sus grandes cultivos de caña de azúcar favorecidos por su clima tropical y húmedo. Es a partir de esta materia que se producen 1.9 millones de toneladas de Bioetanol por parte de Raízen (Raízen, 2023b). En la Figura 1.7 se identifica que la forma de producción difiere del maíz al ingreso de la materia prima, en este caso la caña de azúcar es presionada para extraer sus jugos, que luego son purificados agregando cal (hidróxido de sodio o calcium saccharate). El jugo purificado pasa por una filtración para eliminar material precipitado y otras impurezas que puedan existir, este fluido es suplementado con fuentes de nitrógeno, estabilizado en pH y esterilizado para servir como medio de cultivo en una fermentación idealmente llevada a cabo por levaduras.

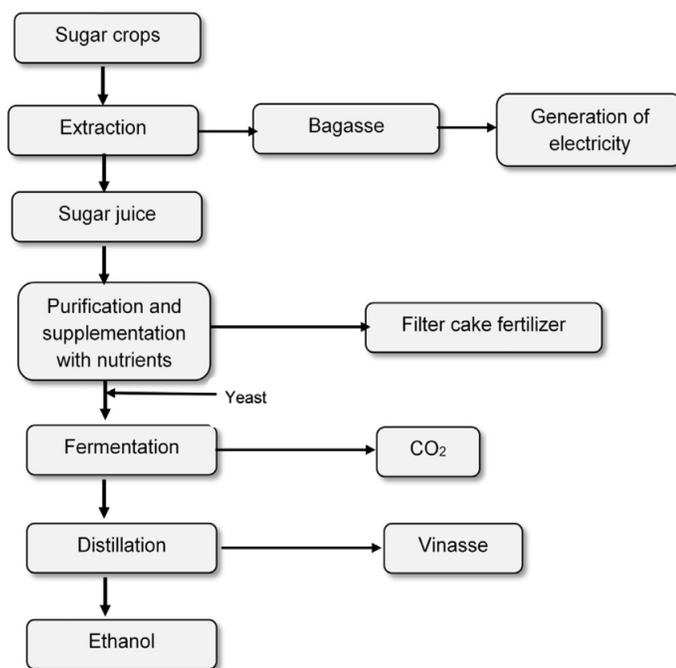


Figura 1.7: Producción de Etanol a partir de azúcar. Imagen extraída de (Zabed et al., 2017)

El bagazo (o *bagasse* por su nombre en inglés), es el residuo de materia que queda luego de extraer los jugos de una fruta o verdura. Recientemente Raízen implementó la primera producción de Bioetanol de segunda generación a nivel industrial, a partir del bagazo obtenido como residuo de su propia producción. Si bien su proceso no es posible encontrarlo en detalles, pues probablemente recae en secreto industrial, en términos generales declaran utilizar un proceso de hidrólisis y doble fermentación (Raízen, 2023a). La producción de Bioetanol de segunda generación a partir de residuos de biomasa también se le suele denominar como Bioetanol lignocelulósico, dado que los azúcares utilizados para su producción esta vez provienen de la estructura celulósica que posee la biomasa vegetal; y se encuentra bien investigada en la comunidad científica. En la Figura 1.8 se describe el proceso, donde el pretratamiento tiene

como objetivo la remoción de la lignina y hemicelulosa de la red lignocelulósica y disminuir el grado de asociación de la celulosa. La etapa de detoxificación es necesaria dependiendo del pretratamiento utilizado, pues opciones como la termo-química pueden llevar a la formación de diversos ácidos o compuestos fenólicos que inhiben la fermentación más adelante. La etapa de hidrólisis es una de las más críticas, pues debe reducir la mayor cantidad de polímeros en azúcares fermentables por levaduras. Esta etapa suele requerir un alto porcentaje del costo de operación dado lo caro que resulta la compra de enzimas.

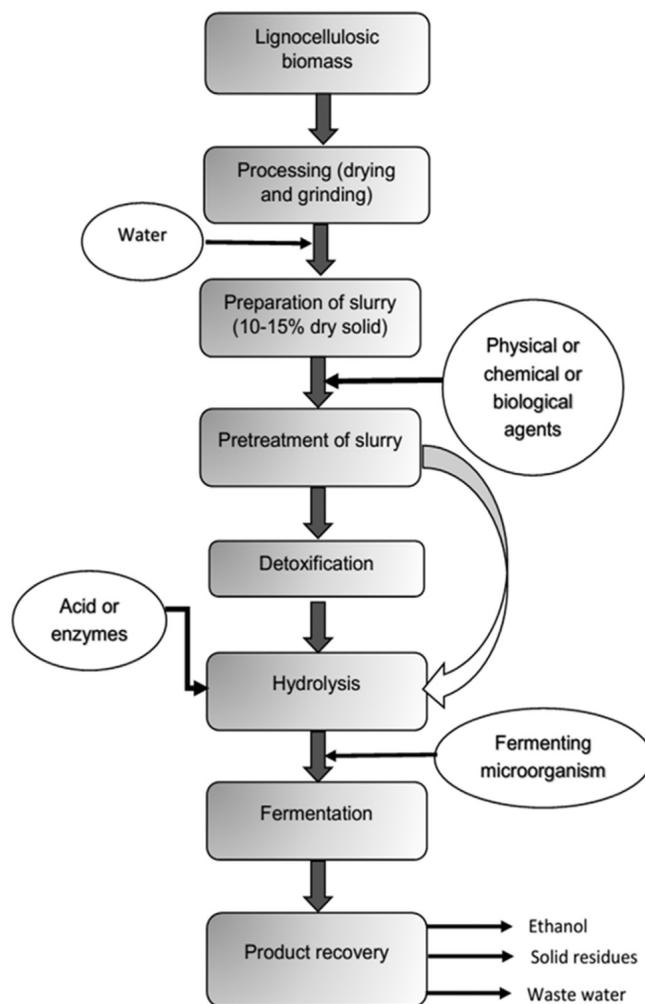


Figura 1.8: Producción de Etanol a partir de lignocelulosa. Imagen extraída de (Zabed et al., 2017)

En un sistema de producción de Bioetanol de segunda generación no acoplado, es decir, no se produce a la par Bioetanol de primera generación; suele ser económicamente poco atractivo pues el precio mínimo de venta del Bioetanol es de lo más altos, estimándose entorno a 0.97 US\$/L en estudios del año 2012 (MacRelli et al., 2012), lo cual a valor actual considerando la inflación de los últimos 10 años equivale a 1.29 US\$/L (este valor fue obtenido utilizando *CPI Inflation Calculator* del *U.S Bureau of labor statistics*). Para considerar como referencia, el valor de la gasolina al día 1 de Mayo del 2023 es de 1.026 US\$/L, por lo tanto la implementación de este tipo de plantas no es económicamente viable sin subsidios gubernamentales.

Distinto es el escenario para plantas acopladas con producción simultánea de Bioetanol de primera y segunda generación o 1G2G (como es la de Reízen en Brasil). En este tipo de plantas el bagazo que sale en la etapa de extracción de la Figura 1.7 es incorporado como materia prima en un proceso análogo al de la Figura 1.8. Un diseño optimizado de estas plantas utilizan un modelo circular en donde los residuos separados en la producción de Bioetanol de segunda generación previo a la fermentación son combustiónados para generar energía hacia el mismo proceso, y a veces incluso un porcentaje del bagazo también es utilizado con este propósito. Los valores mínimos de venta del Bioetanol de plantas 1G2G rondan entre 0.41-0.62 US\$/L (para el año de publicación del estudio) (Macrelli et al., 2014), con una disminución de costos determinada (entre otros factores) por un aumento en el rendimiento y productividad de las instalaciones dado que en estos diseños la fermentación, destilación y deshidratación contarían con dos entradas de materia (Ayodele et al., 2020). En contra parte a su buena propuesta económica, el Bioetanol producido en instalaciones 1G2G genera mayores emisiones de CO_2 equivalente por litro en comparación con Bioetanol de primera generación, pasando de 0.42 a 0.6 kg CO_2 -eq/L etanol (Maga et al., 2019). Este aumento se identifica en un Análisis de ciclo de vida del proceso, donde es establecido que para producir un litro de Bioetanol 1G2G es necesaria una menor cantidad de caña de azúcar, por transitividad la disponibilidad de desechos de cultivo y bagazo disponible para la generación de energía que alimenta al proceso es menor, teniendo que suplir esto con fuentes fósiles. Este análisis puede variar si las plantas adicionalmente cuentan con otras fuentes de energía renovable como solares, sin embargo esto implicaría realizar una inversión adicional que puede disminuir la competitividad económica.

1.2.2. Biodiesel

Como su nombre lo sugiere, el Biodiesel es una alternativa renovable para mezclas con Diesel en vez de Gasolina. Es definido por la *American Society for Testing and Materials* (ASTM) como un "...combustible conformado por mono-alquil ester de cadenas largas de ácidos grasos provenientes desde aceites vegetales o grasas animales." (ASTM, 2023). Históricamente los primeros atisbos de este combustible se remontan al año 1912 con el creador de los motores a compresión Rudolf Diesel, quien puso a prueba su diseño utilizando aceites vegetales. Durante la Segunda Guerra Mundial el uso de aceites vegetales para vehículos fue bastante popular debido a los desabastecimientos, sin embargo su aplicación directa tenía un principal problema, y era la alta viscosidad de estos aceites, lo que producía problemas en los inyectores, estanque de combustible y válvulas (Raj et al., 2022). Cercano al año 1937 se definió formalmente y se hizo público a través de patente el proceso de transesterificación, el cual consiste en dividir las extensas estructuras de ácidos grasos en unidades de menor tamaño, entre ellas glicerol y alquil ester de (o popularmente llamado Biodiesel). Este proceso no posee muchas variaciones como el de Bioetanol previamente revisados, sus principales cambios radican en los catalizadores a utilizar para acelerar la reacción. La Figura 1.9 esquematiza la producción de Biodiesel a partir de aceites vegetales (de las materias primas más comunes junto con las grasas animales), dando inicio al proceso con la adición de un catalizador que corresponde a una mezcla del alcohol, necesario para reemplazar un ión alcóxido de los triglicéridos, junto con una base, un ácido o enzimas (Meher et al., 2006).

Diversos estudios existen respecto al comportamiento del Biodiesel y sus mezclas en distintas conformaciones de motores, bajo ciertas condiciones de potencia o velocidad, y diferenciando la materia prima desde la que fue producido. Debido a los múltiples factores

que deben ser evaluados, es complejo predecir de manera inequívoca las características del funcionamiento de este combustible. Palani (Palani et al., 2020) condensa algunos de los estudios publicados en esta materia, exponiendo que existen investigaciones en donde incluso las emisiones de monóxido de carbono aumentan con ciertas mezclas, y donde no es posible encontrar una consistencia respecto a si las emisiones de compuestos NOx aumentan o disminuyen. Por otro lado, Wu (Wu et al., 2020) realiza una compilación similar con estudios que aparentemente poseen resultados similares entre ellos, donde concluye que diferentes mezclas de combustibles fósiles con Biodiesel disminuirán las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos, pero aumentará las emisiones de NOx. Por lo anterior, el Biodiesel continúa siendo un combustible que permite bajos porcentajes de mezcla, requiere la presencia de un aditivo para mejorar su funcionamiento y presenta alta incertidumbre tecnológica para su aplicación y distribución masiva (Morales Bayetero et al., 2022).

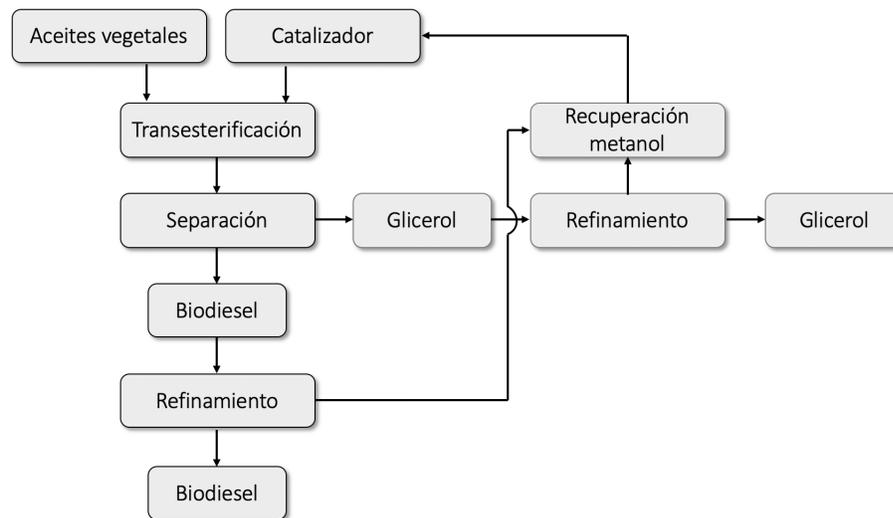


Figura 1.9: Producción de Biodiesel. Imagen inspirada desde (Apostolakou et al., 2009; Barnwal y Sharma, 2005)

Capítulo 2

Solución propuesta

2.1. Alcoholes de fusel: Isobutanol

Alcoholes de fusel se denomina a aquellos compuestos alcohólicos con más de dos o tres carbonos en su estructura, característica que genera cambios en sus propiedades fisicoquímica importantes respecto a aquellos compuestos de menor tamaño como el metanol o etanol. Generalmente han sido utilizados como mejoradores de octanaje en combustibles líquidos, pero con el tiempo se ha evaluado que al poseer mayor cantidad de oxígeno en su composición, realizan un proceso de combustión más completo que disminuye la generación de contaminantes y aumenta la eficiencia del combustible (Surisetty et al., 2011). Si bien los alcoholes poseen una menor capacidad calorífica respecto a los combustibles fósiles, dada la menor cantidad necesaria de aire para combustionar completamente (ver Razón aire/combustible en Tabla 2.1), mezclas de alcohol y combustible permiten la generación de un estado de “enriquecimiento” de aire dentro del estanque, llevando al proceso final a alcanzar, o acercarse, al punto máximo de generación de poder (Fallah, 2014), el cual sólo se consigue ante un exceso estequiométrico de aire para la reacción.

Como fue revisado en el capítulo anterior, el etanol es el principal biocombustible líquido utilizado en mezclas con gasolina, pero su mayor problema para aumentar su porcentaje de mezcla sobre el 10-15 %, es su total solubilidad en agua, dado que aumenta la corrosión de partes metálicas del motor y provoca una separación de fases con el combustible que decanta en el estanque (Surisetty et al., 2011). En contraste, el butanol y el iso-butanol son considerablemente menos solubles (ver Tabla 2.1), posicionándolos como mejores candidatos para mezclas de mayor porcentaje con gasolina sin generar modificaciones en los motores.

Una desventaja operacional del etanol corresponde a su alta volatilidad, dado el bajo punto de ebullición que lo caracteriza (ver Tabla 2.1), en contraste los alcoholes de fusel son menos volátiles. Si además se considera que la temperatura para iniciar una combustión (o *Flash point*) es más alta en estos último, se posicionan como un compuesto más seguro de manejar y trasladar que incluso la gasolina misma (Trindade y Santos, 2017).

Tabla 2.1: Propiedades de algunos alcoholes y combustible

Propiedad/Combustible	Diesel	Gasolina	Etanol	Butanol	Iso-butanol
Capacidad calorífica [MJ/Kg]	43 ⁽²⁾	43.4 ⁽²⁾	26.8 ⁽³⁾	33 ⁽¹⁾	33 ⁽¹⁾
Número cetano	40 a 55 ⁽²⁾		8 a 11 ⁽²⁾	12 ⁽¹⁾	8.5 ⁽¹⁾
Número octano	30 ⁽³⁾	90 ⁽³⁾	100 ⁽³⁾	94 ⁽¹⁾	113 ⁽¹⁾
Razón aire/combustible	14.3 ⁽⁵⁾	14.7 ⁽⁵⁾	9 ⁽⁴⁾	11.2 ⁽⁴⁾	11.2 ⁽⁴⁾
Solubilidad en agua a 25°C [g/L]	0.03 ⁽¹⁾	0.05 ⁽¹⁾	∞ ⁽¹⁾	73 ⁽¹⁾	89.4 ⁽¹⁾
Punto de ebullición (°C)	250 ⁽⁵⁾	150 ⁽⁵⁾	78.4 ⁽⁵⁾	117.7 ⁽⁵⁾	107.8 ⁽¹⁾
Flash Point (°C)	75 ⁽⁵⁾	-40 ⁽⁵⁾	8 ⁽⁵⁾	35 ⁽⁵⁾	24 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ (Obergruber et al., 2021)

⁽²⁾ (M et al., 2017)

⁽³⁾ (Safieddin Ardebili et al., 2020)

⁽⁴⁾ (Surisetty et al., 2011)

⁽⁵⁾ (Trindade y Santos, 2017)

Zeng (Zheng et al., 2015) comparó el comportamiento de la adición de isómeros de butanol con mezclas de Diesel hasta 40 % en un motor de un cilindro, reportando una disminución de 84,5 % de las emisiones producto de combustiones incompletas por parte de la mezcla con Isobutanol, la disminución más alta comparado con el n-butanol, terc-butanol o sec-butanol. Esta característica positiva viene dada por el mayor tiempo de desfase para la ignición que presenta la mezcla de Isobutanol/Diesel, que permite una mezcla más efectiva de aire/combustible dentro del estanque. Sin embargo, a partir de este estudio no se visualiza un cambio considerable en las emisiones reguladas como NOx o CO. En paralelo, Rajesh Kumar (Rajesh Kumar et al., 2016) encuentra diversas ventajas del Isobutanol respecto a alcoholes de fusel de mayor tamaño como Pentanol (PEN), Hexanol (HEX) y Octanol (OCT). En la Tabla 2.2, sintetiza los resultados, donde se destaca la disminución de emisiones NOx y CO, y un mayor peak de presión junto con la velocidad de liberación de calor; todos atributos que en su conjunto posicionan al Isobutanol como la mejor alternativa dentro de los alcoholes de fusel para ser utilizado como biocombustible líquido en vehículos.

Tabla 2.2: Características de combustión y emisiones de mezclas diesel/alcoholes de fusel (Rajesh Kumar et al., 2016)

Características	Parámetro	Orden
Combustión	Retardo de Ignición (más largo a más corto)	ISB30 >PEN30 >HEX30 >OCT30 >ULSD
	Máximo de Presión (mayor a menor)	ISB30 >PEN30 >HEX30 >OCT30 >ULSD
	Máximo HRR (mayor a menor)	ISB30 >PEN30 >HEX30 >OCT30 >ULSD
	Duración Combustión (más largo a más corto)	ULSD >OCT30 >HEX30 >PEN30 >ISB30
	Opacidad del humo (mayor a menor)	ULSD >OCT30 >HEX30 >PEN30 >ISB30
Emisiones	Emisiones NOx en alta carga (mayor a menor)	PEN30 >HEX30 >ULSD >OCT30 >ISB30
	Emisiones NOx en baja carga (mayor a menor)	ULSD >OCT30 >HEX30 >PEN30 >ISB30
	Emisiones HC (mayor a menor)	ISB30 >PEN30 >ULSD >HEX30 >OCT30
	Emisiones CO (mayor a menor)	ULSD >OCT30 >HEX30 >PEN30 >ISB30

2.2. Métodos de producción de Isobutanol

Respecto a las formas de producción de Isobutanol, usualmente se encuentra asociado a la generación de alguno de sus isómeros de cuatro carbonos como el 1-butanol. En la actualidad, el método más utilizado proviene de la industria petroquímica y se denomina Oxo-síntesis, en la Figura 2.1 se encuentra descrito el proceso químico, que comienza con una reacción catalítica sobre una molécula de propeno para incorporar carbono e hidrógeno al doble enlace generando una mezcla isomérica de 1-butanal y 2-metilpropanal, que seguido por la hidrogenación del extremo aldehído se obtiene el respectivo alcohol.

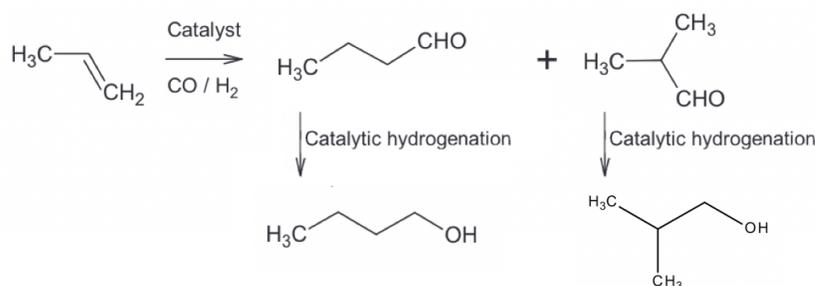


Figura 2.1: Ruta química de Oxosíntesis

Este proceso se lleva a cabo a altas presiones entre $20\text{-}30 \times 10^6$ [Pa] y $100\text{-}180^\circ\text{C}$, en presencia de un catalizador con monóxido de carbono (CO) e hidrógeno molecular (H_2) (Uyttbroek et al., 2015). Si bien esta tecnología es aplicada a escala industrial por diversas empresas como BASF SE (Alemania), The Dow Chemical Company (U.S), Plastics Corporation (Taiwan), entre otras (Trindade y Santos, 2017); sus precios tienen una dependencia directa con la fluctuación del petróleo (Uyttbroek et al., 2015), y no permitiría la independización y disminución del uso de este recurso natural no renovable que genera a través de su refinamiento y combustión la mayor parte de los gases de efecto invernadero.

En paralelo a la Oxo-síntesis, existe un método biotecnológico de producción de isobutanol que llegó a generar hasta dos tercios del abastecimiento mundial entre 1950 y 1980 (Veza et al., 2021) denominado Fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol). Esta fermentación se realiza con microorganismos del género *Clostridia*, bacteria estrictamente anaeróbica, espulantes y gram-positiva, que hace uso del maíz o caña de azúcar como fuente de glucosa para sus procesos metabólicos. Esta técnica dejó de ser ampliamente usada dado el aumento de precios en sus materias primas y al bajo precio del barril de petróleo alrededor del mundo, lo que posicionó el método petroquímico de síntesis como la alternativa más favorable económicamente. Las desventajas del método biológico son los subproductos que se generan (Acetona y Etanol) que a la vez encarecen los costos de separación, tanto que esta etapa del proceso llega a requerir entre el 20-50 % de la inversión total (Avalos et al., 2013). A su vez, bacterias del género *Clostridia* poseen una naturaleza complicada para realizar modificaciones genéticas y aumentar los rendimientos de butanol o su tolerancia a la toxicidad generada por la presencia de alcoholes en sus medios de cultivo. En contraste, la levadura *S.cerevisiae* se ha posicionado como una alternativa interesante para los investigadores dado su amplio uso en la industria, siendo por ejemplo el principal microorganismo utilizado en Brasil para la producción de bioetanol (Beato et al., 2016), también por el vasto conocimiento existente de su estructura genética y las técnicas necesarias para realizar manipulaciones de ella.

La empresa estadounidense GEVO[®] tiene como foco la comercialización de una nueva generación de gasolina, jet-fuel y diesel, enmarcado en el enfoque cero emisiones que define a la compañía. En este contexto, GEVO[®] adquirió e implementó su tecnología en una planta productora de bioetanol ubicada en Luverne, Minnesota; con una capacidad de producción estimada entre 14-16 millones de galones por año (Johnston, 2017). En estas instalaciones producen tanto Isobutanol como Etanol, donde para la producción del primero emplean como catalizador biológico una cepa de levadura *S.cerevisiae* modificada genéticamente en 19 rutas metabólicas de importancia, que agrupa la mayor cantidad de patentes registradas por la empresa (Hawkins et al., 2016). El proceso se encuentra resumido en la Figura 2.2 , y desprende algunos aspectos importantes en la producción biológica de este compuesto orgánico.

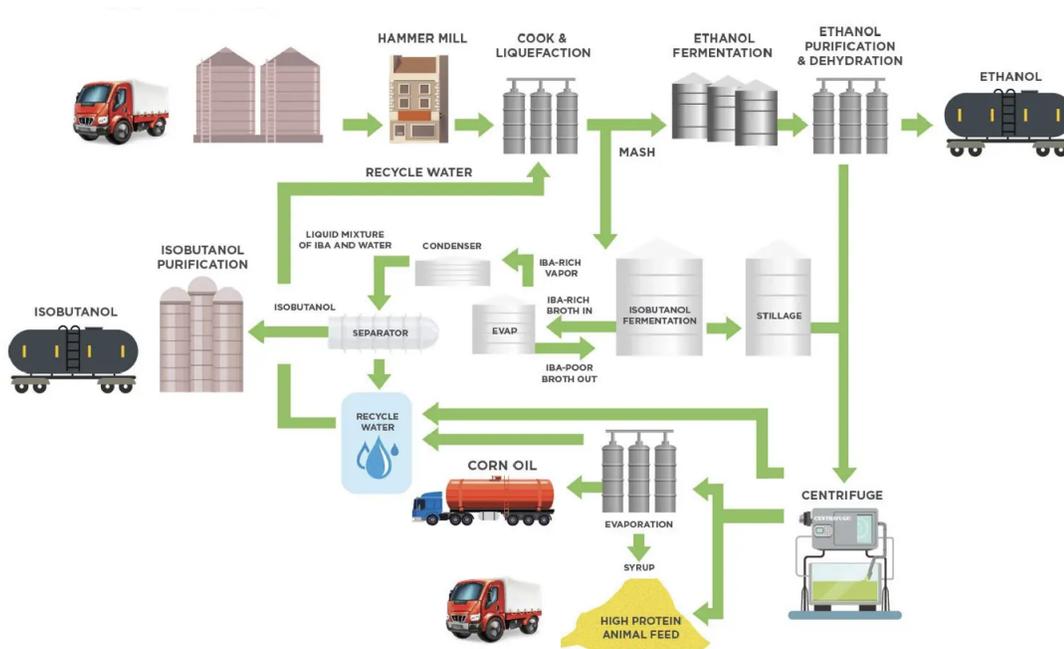


Figura 2.2: Sistema producción de Isobutanol por GEVO[®](GEVO, s.f.)

El primero punto a considerar es que el acoplamiento de la producción con otros productos disminuye los costos de inversión y operación, para efectos de la planta en Luverne son tres los productos de alto valor: etanol, isobutanol y proteína para alimento animal. El segundo punto es la necesidad de una constante extracción del producto desde el medio de fermentación rico en isobutanol, pues la presencia de este genera una condición de estrés o toxicidad que inhibe el crecimiento del organismo. El retorno del medio de cultivo al fermentador economiza la operación de este.

2.3. Microorganismo fermentativo: *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo eucariota del reino Fungi, particularmente se define como un hongo unicelular poseedor de un DNA genómico de 12068 kilobases secuenciado completamente en 1996 (Parapouli et al., 2020), siendo el primer genoma eucariota secuenciado por completo. Ha sido un organismo modelo por ya varias décadas dada su compartimentalización que permitió el inicio de investigaciones asociadas a fenómenos de células en organismos más complejos, y también por sus características regulatorias que resultan de interés sobre todo industrial. Sus principales aplicaciones vienen asociadas a su capacidad fermentativa, donde algunas cepas de *S.cerevisiae* poseen en su metabolismo mecanismos de regulación diferenciadores para la incorporación de azúcares: el Efecto Crabtree; este fenómeno permite la realización de fermentación alcohólica en condiciones aeróbicas de alta velocidad de crecimiento, independiente del exceso o limitancia de glucosa en el medio de cultivo. Ante un exceso de piruvato en el medio intracelular, existe el sustrato suficiente para que tanto la enzima piruvato deshidrogenasa (produce Acetil Co-A) como la piruvato descarboxilasa (produce Acetaldehído) catalicen las rutas de respiración oxidativa y fermentación, respectivamente (Pronk et al., 1996).

S.cerevisiae fue el primer microorganismo eucarionte en ser completamente secuenciado, lo cual lo ha convertido en una de las herramientas más estudiadas y utilizadas por la biotecnología moderna al igual que la bacteria modelo *Escherichia coli*. Por lo mismo, existe un amplio espectro de técnicas de biología molecular e ingeniería genética que se han desarrollado y utilizado en este organismo. La edición de genoma en levadura tiene muchas aplicaciones, desde el diseño de biofactorías celulares para la producción de productos de alto valor agregado, hasta la selección fenotípica sobresaliente de alguna cepa mutante sobre otras, bajo condiciones de estrés metabólico como lo son procesos industriales a gran escala. En general, hay dos caminos para realizar edición genética: de manera aleatoria o no aleatoria (racional). Los métodos de evolución aleatoria son ampliamente adoptados debido a su simplicidad y la eficiencia obtenida del trabajo, algunas de estas técnicas se encuentran resumidas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Técnicas de edición genómica aleatoria (Siyang et al., 2020).

	Mecanismo
Mutagénesis química/física	Se expone las células a una cantidad determinada de mutágeno, provocando alteraciones en el DNA. Utilizando un método de selección apropiado, se aísla aquella con fenotipo favorable.
Mezcla de genoma	Utiliza la fusión de protoplastos (levaduras sin pared celular) y la recombinación sexual para lograr una recombinación homóloga entre genomas. Esta técnica explota la maquinaria de la meiosis para crear una biblioteca genéticamente diversa para la incorporación de mutaciones favorables.
Mutagénesis por inversión de transposones	Se basa en la inserción de un elemento genético móvil (transposon) donde su inserción de forma aleatoria permite determinar la función de genes.

La edición racional del genoma ha llegado a considerarse la última de las revoluciones biotecnológicas más relevantes, la cual abre puertas para finalmente vislumbrar la complejidad de los organismos vivos a través de experimentos y alteraciones estrictamente diseñadas para alterar puntos claves del genoma y así evaluar sus efectos posteriores. Algunas técnicas relevantes para estos propósitos son mencionadas en la Tabla 2.4

Tabla 2.4: Técnicas de edición genómica racional (Shao et al., 2009; Barbieri et al., 2017; Rainha et al., 2021)

	Mecanismo
Recombinación homóloga dirigida	Se basa en la construcción de fragmentos de DNA flanqueados por regiones de homología en el genoma de levadura, para aprovechar la maquinaria propia del organismo
Múltiple edición genética automatizada	Permite modificar múltiples sitios de genoma con alto nivel de precisión, mediante la incorporación de ssDNA en la horquilla de replicación.
CRISPR-Cas9	Permite la inserción o eliminación de genes sitio dirigido gracias al diseño inteligente de un RNA guía y la enzima Cas9 RNA-guiada.

Una de las aplicaciones más antiguas de la levadura *S. cerevisiae* es la fermentación de bebidas alcohólicas, especialmente vino. Esta bebida alcohólica se caracteriza por su particular sabor que viene definido por la mezcla de una serie de moléculas químicas como alcoholes de fusel, ésteres, aldehídos y terpenos; *Saccharomyces* es particularmente capaz de producir los primeros tres de estos, al mismo tiempo que presenta una alta resistencia al estrés de fermentación. Muchos estudios de modificaciones genéticas se han realizado para mejorar alguna característica particular del vino, una lista de alguno de estos se puede encontrar en Schuller y Casal (Schuller y Casal, 2005). Aún más, al año 2021 existen al menos dos casos de éxito correspondiente a cepas editadas que fueron aceptadas para uso comercial por la FDA otorgándoles el estatus de “*Generally Regarded as Safe*” (GRAS) (Vilela, 2021).

Otra aplicación es en la producción de biocombustibles líquidos como bioetanol y bioisobutanol. Para la producción de bioetanol hay patentes registradas donde se genera una cepa capaz de digerir pentosas y hexosas a partir de la planta de arroz (código: CN112375694-A), o bien cepas que incluyen enzimas celulósicas y hemicelulósicas exógenas a *Saccharomyces* (código: WO2014035458- A1), también se patentó una cepa capaz de fermentar xilosa gracias a la inserción de una enzima xilosa reductasa, xilitol deshidrogenasa y xilulokinasa (código: WO2012067571- A1) (Karp et al., 2022). Cabe destacar que una de las mayores ventajas para este tipo de procesos es la tolerancia que tiene *S.cerevisiae* al alcohol, habiendo cepas nativas capaces de crecer en 2% Bioisobutanol (Lakshmi et al., 2021).

2.4. Producción de Isobutanol en *Saccharomyces cerevisiae*

Existen diversas herramientas moleculares para mejorar y utilizar *S.cerevisiae* en procesos de fermentación para generar productos de alto valor agregado. Estas prácticas unidas al historial de aplicaciones industriales que posee la levadura, dan un punto de partida sólido para pensar en su incorporación al desarrollo de biocombustibles líquidos.

Respecto al contexto del trabajo del presente trabajo de tesis, el Isobutanol se produce de forma nativa en *S.cerevisiae* a través de la Ruta de Ehrlich y la Ruta para degradación de la Valina o bien utilizando rutas metabólicas asociadas al metabolismo de piruvato (ver Figura 2.3). El proceso se encuentra compartimentalizado entre el espacio mitocondrial y citosol. La primera etapa ocurre en citosol y comprende la generación de piruvato mediante Glicólisis de la levadura, este es transportado a mitocondria y es utilizado por una enzima Acetolactato sintaza (ILV2) que una vez produzca 2-Acetolactato, este reduce uno de sus grupo hidroxilos a través de la enzima Ceto-ácido reducto isomerasa (ILV5). El mecanismo de reacción anterior se repite, esta vez catalizado por una Dehidroxiácido deshidratasa (ILV3) formando α -cetoisovalerato. Este intermediario puede seguir dos rutas, ser exportado de vuelta a citosol o ser utilizado en mitocondria para la producción de Valina. El α -cetoisovalerato citosólico es transformado en Isobutiraldehído mediante una α -cetoácido decarboxilasa (KDC), para finalmente ser utilizado por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y obtener Isobutanol.

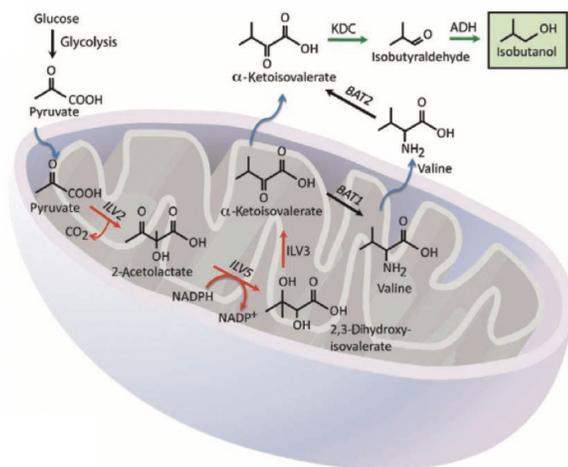


Figura 2.3: Ruta metabólica nativa para producción de Isobutanol (Avalos et al., 2013)

Algunos de los principales problemas con la producción biológica de Isobutanol en *S. cerevisiae* son los bajos rendimientos que las cepas nativas obtienen, por lo cual en los intentos por incrementar la producción se han propuesto las estrategias de compartimentalización de la ruta metabólica, tal de eliminar los cuellos de botella en el movimiento de metabolitos entre compartimentos celulares, y aumentar la disponibilidad de piruvato. Avalos (Avalos et al., 2013) expresa por completo la Ruta de Ehrlich en mitocondria para evitar la formación de “cuellos de botella” y aumentar, lo que su equipo de investigación especula es una de las complicaciones, la disponibilidad de α -cetoisovalerato. Adicionalmente, hay investigaciones que solo estudiaron el efecto de bloquear o sobre-expresar genes de la ruta en los compartimentos naturales para cada uno. En esta línea se destaca la investigación de Park (Park et al., 2014), donde se incluye la sobreexpresión del factor de transcripción LEU3 que tiene efectos sobre los genes ILV2, ILV5, entre otros (ver Tabla 2.5).

La mayor parte de las investigaciones asociadas al tema se enfocan en las enzimas propias de la ruta de degradación de Valina o la Ruta de Ehrlich, sin embargo Matsuda (Matsuda et al., 2013) estudió los efectos de eliminar las rutas metabólicas competitivas a la producción de Isobutanol. En la Figura 2.4 se indican con claridad los genes que fueron estudiados. Fue concluido que los genes IRC15, PDC5, PDC6, MAE1, PYC2 no generan ningún cambio en la producción de Isobutanol. Por otro lado, los genes DLD1 y PYC1 influyeron levemente en un aumento, en contraste de los genes PDA1, PDB1, LPD1, y LAT1, que por si solos significaron una aumento de casi 5 veces la producción. Esto indica que una disminución en la actividad del ciclo del TCA, aumenta la biodisponibilidad de piruvato.

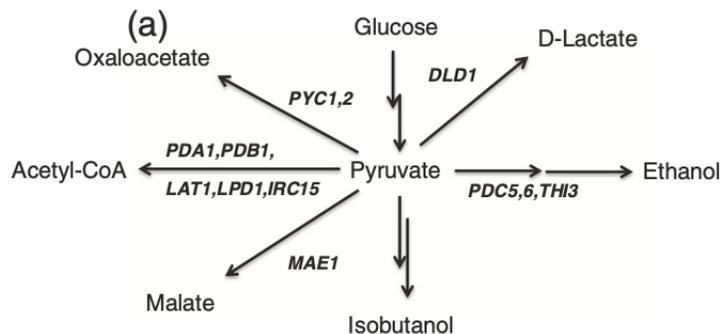


Figura 2.4: Genes de rutas metabólicas competitivas con Isobutanol estudiados por Matsuda (Matsuda et al., 2013)

El enfoque de Matsuda se destaca por basarse en los estudios de Kondo (Kondo et al., 2012), que a diferencia de la hipótesis de Brat respecto a ADH2 siendo la enzima con mayor efectividad para producción de Isobutanol (Brat et al., 2012), identifica que la sobreexpresión por sí sola de una α -cetoácido decarboxilasa (*kivd*) de *Lactococcus lactis* junto con la enzima ADH6-NADPH dependiente aumentan la producción de Isobutanol más que las enzimas KDC endógenas de *S.cerevisiae* o ADH homólogas. La teoría de una ruta metabólica que utilice ADH6 además de la ILV5 (representada en el estudio de Avalos), implica la generación de un desbalance redox en la levadura con una abundancia de NADH y escasez de NADPH. El grupo de investigación de Matsuda postula que la constante transformación de Piruvato a Oxalacetato (Piruvato carboxilasa - PYC), Malato (Malato deshidrogenasa - MDH) y nuevamente Piruvato (Enzima malaza - MAE) genera la semi-reacción (2.1), reestableciéndose el potencial redox.



A partir de la revisión bibliográfica realizada para este proyecto de tesis, se detecta un “vacío” de publicaciones en el área luego del año 2014, siendo la siguiente investigación encontrada de alta importancia la llevada a cabo por Wess y colaboradores (Wess et al., 2019) quienes expresaron la ruta de producción de Isobutanol en Citosol basándose en la investigación de Brat (Brat et al., 2012), junto con la eliminación de rutas competitivas tal de aumentar el flujo metabólico. Fueron silenciados genes asociados a la producción de 2,3-butanodiol, pentanoato, leucina, ácido butírico, isoleucina, entre otros (ver Figura 2.5). Desde el trabajo publicado por Wess, algunas conclusiones de relevancia han sido extraídas: i) El silenciamiento únicamente del gen ILV2 aumenta la producción de isobutanol considerablemente, pero aún no se comprende el mecanismo; ii) La eliminación de Valina en el medio de cultivo aumenta la producción de isobutanol por mecanismos aún desconocidos; iii) silenciamiento de los genes LEU4/9 generan un incremento del 178% en la producción de isobutanol, en una cepa mutante con genes ILV2, BDH1 y BDH2 eliminados; iv) el silenciamiento de Pdc1/5 paralelo al silenciamiento de Cetoácido reducto isomerasa 2 (ILV2) pudiese generar efectos negativos en el metabolismo general al bloquear dos rutas relevantes para el consumo de piruvato, teniendo efectos sobre la disminución notoria en el consumo de glucosa. v) el silenciamiento de ADH1 disminuye la producción de etanol, prácticamente no afecta la de isobutanol, pero aumenta casi cinco veces la producción de glicerol, posiblemente causado por la necesidad de re-establecer el balance redox de NADH sin embargo no se explica

por completo su mecanismo ya que su producción se detiene incluso con glucosa disponible. Frente a estas y futuras preguntas de investigación que buscan responder la complejidad de la interconexión en el metabolismo completo de *S. cerevisiae*, el método experimental se ve desafiado dado las múltiples variables que deben ser revisadas, que implican extensos tiempos de preparación metodológica y análisis. Por esto, los métodos *in silico* se sustentan como una alternativa para realizar primeros análisis que logren direccionar y enfocar una estrategia metodológica con mayor planificación y claridad en el hilo conductor que la guiará.

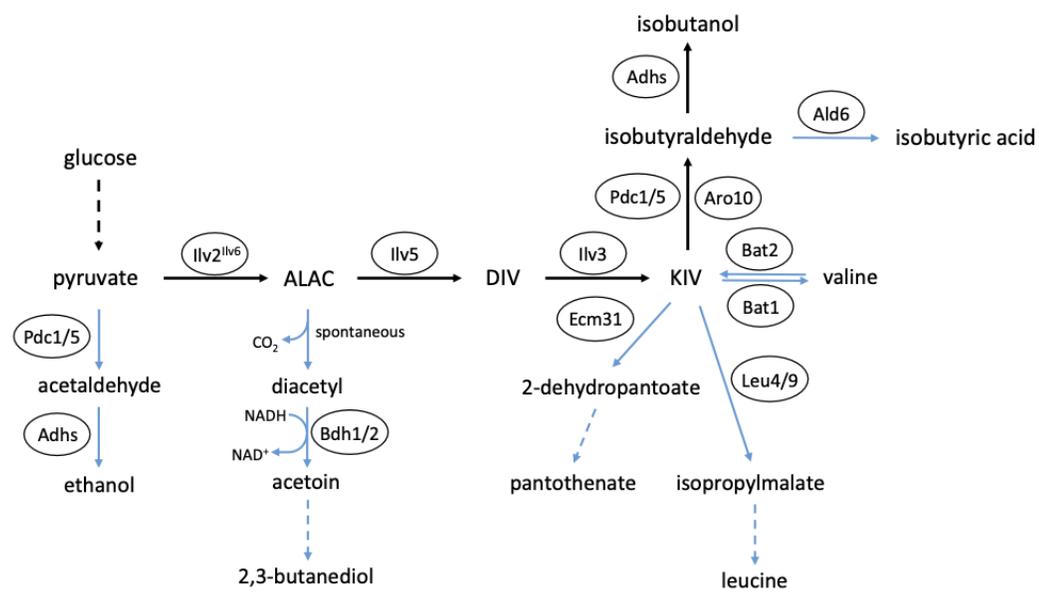


Figura 2.5: Rutas metabólicas competitivas con Isobutanol por Wess (Wess et al., 2019). Flechas negras (\rightarrow) representan la ruta directa de producción de Isobutanol, las flechas azules (\rightarrow) indican metabolitos competitivos directos e indirectos

Tabla 2.5: Modificaciones sobre *S. cerevisiae* para incrementar producción de Isobutanol

Modificaciones	Concentración de Isobutanol mg/L	Rendimiento mg/g Glucosa	Oxígeno	Medio de cultivo	Referencia
Sobreexpresión ILV2, ILV3, ILV5, BAT2	-	4.12	Aeróbico	Medio mineral	(X. Chen et al., 2011)
Expresión citosólica de ILV2, ILV5, ILV3	630	15	Aeróbico	Medio selectivo	(Brat et al., 2012)
Sobreexpresión ADH2, Aro10, y ILV2Δmitocondria					
Expresión citosólica de ILV2, ILV5, ILV3	151	3.78	Micro-Aeróbico	Medio complejo	(Lee et al., 2012)
Sobreexpresión LiKIVD					
Expresión mitocondrial de LiAdhARE1, ScAro10					
Sobreexpresión ILV2, ILV3, ILV5	635	6.4	no declarado	Medio completo	(Avalos et al., 2013)
Expresión citosólica de ILV2, ILV3, ILV5					
Sobreexpresión LiKivd, ADH6, ILV2, MAE1, pld1Δ	230	16.2	Aeróbico	Medio mínimo SD	(Matsuda et al., 2013)
ald6Δbat1Δ,					
Sobreexpresión Leu3Δ601, ILV2, ILV3, ILV5, ARO10, ADH2	376.9	3.76	no declarado	Medio completo	(Park et al., 2014)
Δilv2, Δbdh1, Δbdh2					
Δleu4 Δleu9, Δecm31, Δilv1, Δadh1, Δgpd1, Δgpd2, Δald6	2090	59.55	Aeróbico	Medio SCD sin valina	(Wess et al., 2019)

2.5. Herramientas *in silico* para Ingeniería Metabólica

El término *in silico* se originó en analogía con los términos biológicos *in vivo* (en el organismo vivo) y *in vitro* (en el vidrio, es decir, en un entorno controlado fuera de un organismo vivo). *In silico* se refiere a aquel trabajo realizado en computador a través de modelos numéricos o bien llamados matemáticos.

En biotecnología existen diversos tipos de modelos matemáticos que intentan de explicar una vasta inmensidad de fenómenos, como la diferenciación celular, el crecimiento de cultivo en reactores, la cinética de reacciones enzimáticas, etc. Al modelo que representa los flujos de materia al interior de una unidad celular, se le denomina Modelo a Escala Genómica (GEM, por sus siglas en inglés) y permite describir cuantitativamente la relación genotipo-fenotipo de una célula. Al año 2019 GEMs de 6239 organismos habían sido reconstruidos (5897 bacteria, 127 arquea, 215 eucariotes) (Gu et al., 2019) donde la mayor disponibilidad de información y entendimiento del organismo ha permitido una mayor cantidad de desarrollo en aquellos unicelulares sin compartimentalización o mecanismos regulatorios mayores.

El desarrollo de este tipo de modelos se basa en establecer asociaciones gen-proteína-reacción a partir de información experimental o datos derivados, para posteriormente unificarlas en una red que estructurará la ruta metabólica, siendo finalmente traducido en su forma matemática correspondiente a una matriz estequiométrica (matriz S) donde las columnas representan las reacciones y las filas los metabolitos, con cada valor en su interior expresando la cantidad estequiométrica de cada metabolitos que participe en una reacción determinada (ver Figura 2.6).

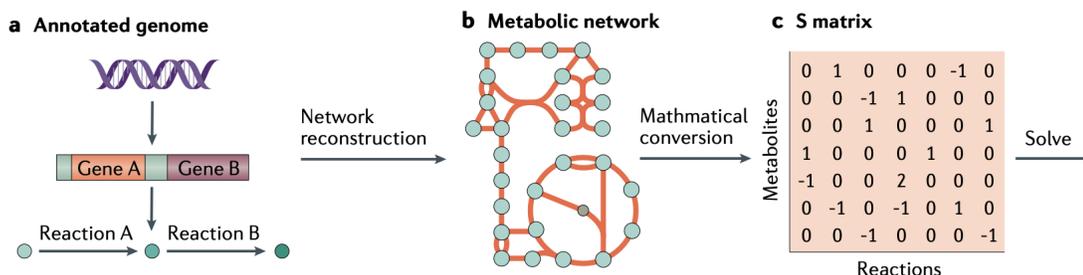


Figura 2.6: Construcción de modelo a escala genómica (Fang et al., 2020)

Mientras que la matriz S forma la base para la definición del metabolismo y restringe las entradas y salidas de reacciones a través de su estequiometría, la adición de restricciones matemáticas que imponen límites dentro del sistema depuran y acercan el resultado de un GEM a la fisiología real observada, mediante la definición matemática de mecanismos regulatorios positivos y negativos, señalizaciones, limitaciones cinéticas para reacciones o capacidad de consumo de nutrientes.

La técnica de optimización más común empleada para evaluar estos modelos es *Flux Balance Analysis* (o FBA), el cual se basa en la definición de una función objetivo a maximizar o minimizar (generalmente se maximiza biomasa) sujeta a restricciones metabólicas representadas por la matriz S, junto con las restricciones adicionales que el investigador considere

necesarias. FBA calcula el flujo de metabolitos a través de la red metabólica asumiendo como supuesto una condición de estado estacionario en ella, es decir que todo compuesto producido debe ser igualmente consumido. A medida que los modelos crecen en tamaño, el espacio de soluciones o la cantidad de distribuciones de flujos que cumplen con las restricciones impuestas, aumentan también en número.

Investigaciones que han aplicado estas técnica han sido por ejemplo la de Gold (Gold et al., 2015) donde se buscaba optimizar la producción de L-tirosina en *S.cerevisiae* pues corresponde a un metabolito secundario de alto valor para la síntesis de alcaloides y poliketonas. Utilizando el modelo iMM904 y el algoritmo *Genetic Design by Local Search* (GDLS) en una optimización de dos pasos lograron obtener 10 sugerencias de silenciamiento en el metabolismo central de glucosa para aumentar la producción de tirosina. Cabe destacar que este modelo no tenía un alto grado de precisión respecto a los efectos que el silenciamiento de algunos de estos genes causarían en la levadura, como auxotrofias que requerirían suplemento adicional en el medio de cultivo. Sin perjuicio de lo anterior, la eliminación del gen ZWF1 (parte del metabolismo paralelo a síntesis de tirosina) sugerido por el modelo permitió duplicar los rendimiento a través del balance redox NADPH/NADP+ al interior del citosol.

2.6. Ingeniería Metabólica en *S.cerevisiae* para producción de Isobutanol

S.cerevisiae al ser un organismo modelo de la industria e investigación generaba alto interés poseer un GEM que lo describiera con rigurosidad, sin embargo los modelos que inicialmente fueron desarrollados contaban con inconsistencias entre ellos (Gu et al., 2019). Para resolver este problema el año 2008 a través de una colaboración internacional se logró unificar y depurar los modelos existente, obteniéndose el modelo “Yeast 1” (Herrgård et al., 2008) desde entonces al menos 8 versiones han sido publicadas, siendo la más actual “Yeast 8” (Lu et al., 2019)(ver Figura 2.7). Esta última versión llena los vacíos de sus predecesores, agregando transporte de metabolitos entre compartimentos y re-formula la ecuación de biomasa al introducir co-factor e iones de metales como requisitos.

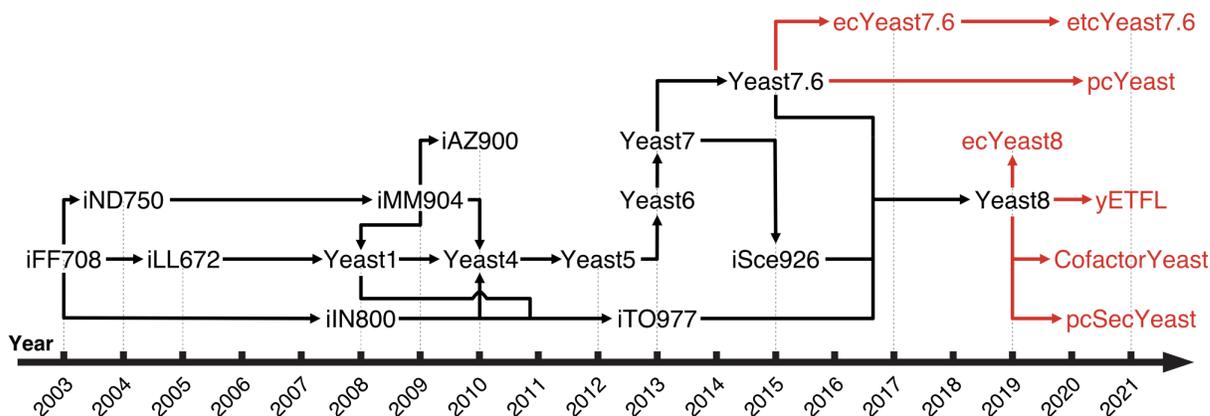


Figura 2.7: Desarrollo de GEMs para *S.cereivisiae* (Y. Chen et al., 2022)

El primero modelo que intentó implementar restricciones enzimáticas fue ecYeast7.6 y lo

hacía mediante la definición de límites máximos y mínimos en los flujos metabólicos, calculados con base en la abundancia de la enzima necesaria para catalizar la reacción y su constante catalítica (k_{cat}), sin embargo este método es considerado ser poco detallado, en contraste pcYeast y yETFL son modelos que cuentan con rutas de síntesis de proteínas junto con sus respectivas reacciones de degradación. yETFL adicionalmente cuenta con restricciones termodinámicas que permiten la obtención de flujos metabólicos consistentes para este parámetro (Y. Chen et al., 2022).

Capítulo 3

Antecedentes de investigación

3.1. Contexto de investigación

En el Centro para Bioingeniería y Biotecnología (CeBiB) de la Universidad de Chile, se cuenta con trabajos enfocados en el desarrollo de cepas con capacidad aumentada de producción de Isobutanol. La línea de investigación escogió como estrategia la expresión heteróloga en mitocondria de enzimas claves para la ruta metabólica, a través de la construcción de cluster de expresión con el gen de selección al antibiótico Geneticina (G418), la enzima alcohol deshidrogenasa $ADHA^{RE1}$ de *L.lactis*, y la enzima cetoácido descarboxilasa ARO10 de *S.kudriavzevii* (ver Figura 3.1). La secuencia codificante para la enzima $LADHA^{RE1}$ fue obtenida mediante mutagénesis dirigida con una eficiencia catalítica con isobutiraldehído 160 veces mayor a la enzima original (Liu et al., 2012), y comprobada su efectividad en el aumento de la producción de Isobutanol por Avalos (Avalos et al., 2013), adicionalmente la enzima SkARO10 se identifica que posee un 30 % de mayor afinidad por cetoisovalerato respecto a la enzima nativa ARO10 de *S.cerevisiae* (Stribny et al., 2016), razón por la cual fue escogida en el trabajo de título de Mendez (Méndez Román, 2018) para ser evaluado su rendimiento.

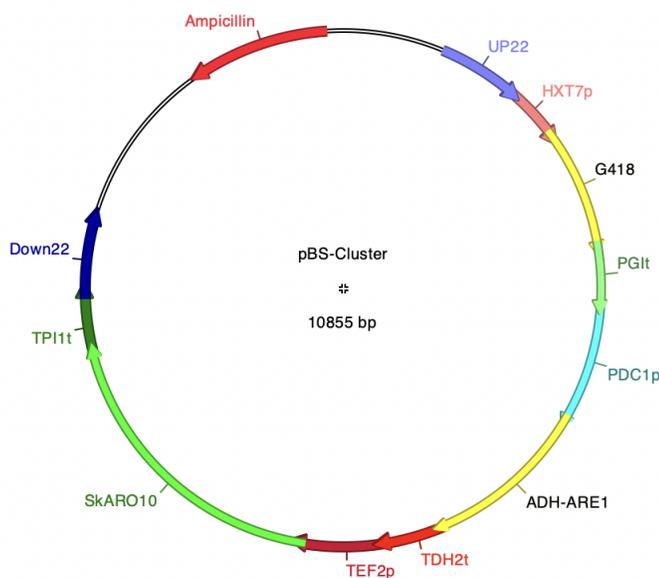


Figura 3.1: Estructura pBS-Cluster

Los investigadores al escoger una estrategia de compartimentalización mitocondrial basada en las investigaciones expuestas en la sección 2.4, diseñaron los genes de *LIADHA^{RE1}* y *SkARO10* de tal manera que se encuentran fusionados a un péptido señal de la subunidad gamma del citocromo oxidasa C. Todos los promotores escogidos son constitutivamente expresados por *S.cerevisiae* (ver Tabla 3.1).

Además, dado el interés por escalar estos procesos una vez obtenida las cepas, se establece como necesaria no solo una expresión a partir de plasmidos, sino que la integración en genoma de las secuencias exógenas, garantizando de esta manera una mayor estabilidad al momento de replicación y desarrollo de cultivos de alta densidad celular. Es por esto, que pBS-Cluster cuenta con regiones UP-DOWN que son homólogas a las secuencias que flanquean el gen para *URA3* en el cromosoma V de *S.cerevisiae*, la selección de estas secuencias fue derivada de la investigación respecto a integración genómica realizada por Flagfeldt (Bai Flagfeldt et al., 2009).

Tabla 3.1: Promotores, terminadores y genes utilizados en la construcción de pBS-Cluster (Méndez Román, 2018)

Módulo de expresión	Nombre	Largo	Fuente	Referencia
Secuencia de homología para la Integración	UP	500 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Bai Flagfeldt et al., 2009)
Kan	Promotor trucado del transportador de hexosa 7 (tHXT7p)	395 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
	Gen <i>kan</i>	816 pb	pPIC9K	Thermo Fisher Scientific
	Terminador de la fosfoglucoisomerasa (PGIt)	400 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
LIAdhA	Promotor de la piruvato descarboxilasa (PDC1p)	800 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
	Gen alcohol deshidrogenasa (<i>LIADHA^{RE1}</i>)	1119 pb	<i>L. lactis</i>	(Liu et al., 2012)
	Terminador de la triosa-fosfato deshidrogenasa (TDH2t)	400 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
SkAro10	Promotor del factor de elongación de la traducción (TEF2p)	560 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
	Gen α -cetoácido descarboxilasa (<i>SkARO10</i>)	1902 pb	<i>S. kudriavzevii</i>	(Stribny et al., 2016)
	Terminador de la Triosa fosfato isomerasa (TPI1t)	400 pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
Secuencia de homología para la Integración	DOWN	500pb	<i>S. cerevisiae</i>	(Bai Flagfeldt et al., 2009)

Producto de las investigaciones previas realizadas en CeBiB, para el inicio del presente proyecto de título las siguientes cepas se encontraban disponibles:

Tabla 3.2: Cepas y plasmidos disponibles en CeBiB

Cepas y plásmidos	Descripción	Referencia
69 MIR	Cepa <i>S.cerevisiae</i> Auxótrofa, resistente a G418 Genotipo:MAT α , SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6, Δ ura3::kan	(Méndez Román, 2018)
15cc	Cepa <i>S.cerevisiae</i> Protótrofa Resistente a G418 Genotipo:MAT α , SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6, kan, skaro10	(Méndez Román, 2018)
C6	Cepa <i>S.cerevisiae</i> Resistente a G418 Genotipo: MAT α , SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6, kan, skaro10, AdhAre1	(Méndez Román, 2018)
pBS-ADH	Vector clonación en <i>E. coli</i> , pBlueScript-II-SK (+) que contiene secuencias para la recombinación homologa in vivo en el cromosoma V de <i>S. cerevisiae</i> S288c, que contiene la secuencia codificante para AdhARE1	(Méndez Román, 2018)
pBS-Cluster	Vector clonación en <i>E. coli</i> , pBlueScript-II-SK (+) que contiene secuencias para la recombinación homologa in vivo en el cromosoma V de <i>S. cerevisiae</i> S288c, la inserción de la resistencia a G418 y las secuencias codificantes para SKARO10 y AdhARE1	(Méndez Román, 2018)

Capítulo 4

Objetivos

Habiendo establecido todos los antecedentes necesarios para el presente trabajo, los objetivos de la investigación son:

4.1. Objetivo General

Evaluar la optimización de la producción de isobutanol en cepas recombinantes de *S.cerevisiae* S288c mediante herramientas de Ingeniería metabólica.

4.2. Objetivo Específicos

- Evaluar el genotipo de cepas recombinantes de *S.cerevisiae* S288c productoras de isobutanol disponibles en CeBIB.
- Construir un modelo metabólico de *S.cerevisiae* S288c que considere ruta sintética para Isobutanol.
- Generar un diseño metabólico para la optimización de la producción de isobutanol en *S.cerevisiae* S288c mediante Balance de Flujos metabólicos (BFM o FBA) y herramientas asociadas.
- Diseñar modificaciones en una cepa recombinante de *S.cerevisiae* S288c productora de isobutanol en base a las potenciales mejoras propuestas a partir del FBA realizado.

Capítulo 5

Metodología

5.1. Metodología Laboratorio

Cultivo líquido

E.coli

Los cultivos líquidos de *E.coli* son realizados con medio LB en 5 mL de volumen en tubo Falcon de 15 mL. Si el inóculo corresponde a glicerol stock no se utiliza antibiótico, en caso de ser crecimiento desde colonia aislada en cultivo sólido se añade 100 [ug/mL] de Ampicilina. Estos cultivos se mantienen a 37°C con 250 rpm de agitación.

S.cerevisiae

Los cultivos líquidos de *S.cerevisiae* son realizados en medio YPD en 15mL de volumen en tubo Falcon de 50mL. Aquellos inóculos iniciados a partir de glicerol stock una vez re-activada la cepa se emplean 200 a 400 [ug/mL] de G418, dependiendo de la cepa y su resistencia expuesta. Estos cultivos se mantienen a 28°C con 180 rpm de agitación.

Cultivo sólido

E.coli

Para cultivo y selección de *E.coli* que contenga pBS-Cluster, las placas se preparan con LB-Agar y 100 [ug/mL] de Ampicilina, y se siembran 50 μ L de dilución 1:100 del cultivo líquido. El crecimiento de *E.coli* es durante 16 horas a 37°C.

S.cerevisiae

Para *S.cerevisiae* se preparan placas con YPD-Agar y antibiótico G418 entre 100 a 400 [ug/mL]. El crecimiento de *S.cerevisiae* es entre 3 a 4 días a 28°C. La nomenclatura de esta selección corresponde al nombre de la cepa seguido de punto y dígito correlativo, refiriendo a la cantidad de colonias aisladas desde la placa respectiva, ejemplo s88c.1 y s288c.2.

Diseño partidores

Los partidores para la identificación del gen KAN fueron extraídos del trabajo de Méndez (Méndez Román, 2018), eliminando las secuencias incorporadas para realizar Gibson

Assembly que requirió aquel proyecto. Para el diseño de partidores de ADH y SkARO10 se consideraron los parámetros básicos a evaluar: porcentaje Guanina-Citosina, temperatura de annealing (Ta) similares entre Forward y Reverse, largo no mayor a 25 pares de bases (bp), complementariedad, y self annealing. Adicionalmente, se consideró apropiado que los partidores sirvieran para identificar los genes al ser utilizados en plasmido como en DNA genómico, por lo tanto se realizó un análisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra la secuencia de *S.cerevisiae* s288c y contra la secuencia de pBS-Cluster.

PCR

Fueron utilizados dos mix de reacción, descritos a continuación:

- Taq polimerasa: El coctel para una(1) reacción de PCR utilizado fue: 6.1 μ L Agua MiliQ Esteril, 4 μ L Buffer Green 5x, 3.2 μ L MgCl₂, 2 μ L dNTP, 2 μ L Primer Forward a 5 μ M, 2 μ L Primer Reverse a 5 μ M, 0.6 μ L de templado (DNAg o plasmidial), 0.1 μ L de enzima GoTaq.
- Phusion polimerasa: El coctel para una (1) reacción de PCR utilizado fue: 84.6 μ L Agua MiliQ Esteril, 36 μ L 5x Phusion Buffer, 18 μ L Primer Forward a 5 μ M, 18 μ L Primer Reverse a 5 μ M, 3.6 μ L 10mmM dNTP, 2 μ L de templado, 1.8 μ L Phusion polimerasa.

Estas cantidades fueron multiplicadas por la cantidad de reacciones necesarias para cada PCR. El programa utilizado en el Termociclador fue: Denaturación a 95°C por 1 minuto, durante 30 ciclos se realiza una Denaturación a 95°C por 30 segundos, un Annealing a la temperatura respectiva especificada en la Tabla 5.1 por 30 segundos, una Extensión a 72°C durante 1 minuto, una vez terminado los ciclos un proceso de Extensión final a 72°C por 5 minutos.

Tabla 5.1: Partidores y Temperaturas de annealing para PCR

ORF	Partidores	Secuencia	Ta	Referencia
Kan	G418_FW	<u>TTTAAATCAAAAA</u> ATGAGCCATATTCAACGGG	55,0°C	(Méndez Román, 2018)
	G418_RV	<u>GAGCGATTTGTTT</u> AGAAAACTCATCGAGCATC	54,3°C	(Méndez Román, 2018)
	KAN290822_FW	ATGAGCCATATTCAACGGG	55,0°C	Este trabajo
	KAN290822_RV	AGAAAACTCATCGAGCATC	54,3°C	Este trabajo
ADH	rnADH_FW	<u>AAATCAATCAAAA</u> ATGCTTAGTCTACGTCAATC	54,3°C	(Méndez Román, 2018)
	rnADH_RV	<u>AAGGAGTTAAATTT</u> TAGTGATGATGATGATGGTG	55,4°C	(Méndez Román, 2018)
	ADH290822_FW	TCGTCCGTCACAATCCCGAT	60,5°C	Este trabajo
	ADH290822_RV	CCAGCTTAGTAAAGTCTATGACC	60,9°C	Este trabajo
ARO10	KDC_FW	<u>ATTAACATAAAC</u> ATGCTTAGTCTACGTCAATCC	57,5°C	(Méndez Román, 2018)
	KDC_RV	<u>ATTATATTAATCTT</u> TAGTGATGATGATGATGGTGT	57,6°C	(Méndez Román, 2018)
	SKARO290822a_FW	CCGTGACTATAAACACCTTCG	59,5°C	Este trabajo
	SKARO290822a_RV	TCTTCGATTAGGCTTGTAGG	59,5°C	Este trabajo
	SKARO290822b_FW	GTTCCACCCGAATTATATAAGG	58,4°C	Este trabajo
	SKARO290822b_RV	TTGTTTCTCTTTAGAGCGGCGG	62,1°C	Este trabajo
tHXT7p	tHXT7p_FW	<u>TCCTAGTCCACTT</u> TCTCGTAGGAACAATTTTC	55,4°C	(Méndez Román, 2018)
	tHXT7p_RV	<u>ATATGGCTCATTTT</u> TTTGATTAAAAATAAAAAACTTTTTGT	55,7°C	(Méndez Román, 2018)

* Las secuencias subrayadas con rojo corresponden a nucleótidos (colas) para acoplamiento por Gibson Assembly. Las temperaturas de annealing de estos casos corresponden a la secuencia sin considerar estas colas, y fueron calculadas con la página: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.

PCR Colonia

A partir de una placa con antibiótico se selecciona un colonia aislada utilizando puntas para pipeta previamente esterilizadas, y se resuspende en tubo Eppendorf de 1mL con 200 μ L de Agua MiliQ Esteril. Con dos tubos Eppendorf adicionales se hacen diluciones seriadas 10⁻¹ y 10⁻² con una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) a 20mM. Al encontrarse con debris celular la mezcla de DNA, se recomienda utilizar volumen de 180 μ L de NaOH y 20 μ L de la suspensión con material celular. Finalmente se incuban las soluciones a 100°C por 10 minutos con agitación, y se realiza el PCR como fue explicado en la sección anterior salvo que utilizando la solución incubada como templado.

Electroforesis en gel de agarosa

Requiere de una solución con 1gr de Agarosa y 100mL de Buffer TAE(1x) completamente homogeneizado, una vez mezclada la solución se agrega 1 μ L de RedGel. Se deposita en el sistema desmontable para formar el gel, dejando secar por 20 minutos. Finalmente, para visualizar los resultados de PCR se realiza la electroforesis a 80V por 50 minutos, cargando 1 μ L de producto PCR obtenido desde DNAg o 2 μ L de una dilución 1:10 del producto PCR obtenido desde pBS-Cluster. Para visualizar el tamaño de bandas se utiliza 1kb ladder de *New England BioLabs* (ver Figura 5.1). El análisis y digitalización del gel se realiza en el *Fotodocumentador Gel Doc EZ Imager BIORAD* con la bandeja de UV para coloración de DNA compatible con Bromuro de etidio.

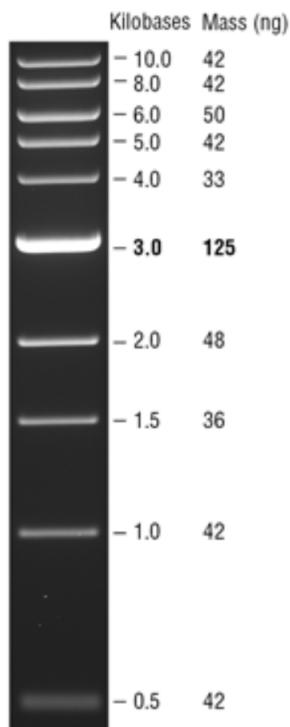


Figura 5.1: Espectro bandas 1kb Ladder

Preparación Electrocompetentes

Se prepara un pre-inoculo a partir de placa fresca o glicerol stock con 5mL de medio YPD de *S.cerevisiae* s288c en matraz estéril de 250mL dejándolo crecer a 28°C over-night. Al día siguiente se extrae bajo esterilidad 500 μ L de cultivo y se incorporan en 50mL de medio YPD fresco, se mide la densidad óptica (OD) inicial a 600nm de tal manera que el cultivo comience con OD de 0.3, se incorpora mayor cantidad de inóculo en caso de ser necesario. El cultivo se monitorea durante el día hasta que alcance una OD entre 1.3-1.5, lo cual puede tomar entre 4 a 6 horas. Una vez alcance este valor se centrifugan las células a 8000 g por 5 minutos a 4°C (todos los procesos de centrifugado de esta etapa se realizaron bajo las mismas condiciones). Se extrae el sobrenadante, se resuspende el pellet con 25 mL de agua estéril previamente enfriada a 4°C y se centrifugan las células, este etapa de lavado con agua se repite una vez más. Una vez repetido el segundo lavado con agua, se resuspenden las células con 12 mL de sorbitol 1M previamente enfriado a 4°C, se centrifuga y resuspende el pellet en 400 μ L de sorbitol 1M para alcanzar un volumen final de 1 mL aproximadamente. Se mantuvieron las células en hielo durante todo el proceso. Una vez finalizado, el concentrado de células en sorbitol se alicuotó en tubos de 0.6mL con 80 μ L cada uno para ser almacenados a -80°C.

Extracción DNA plasmidial

Se preparó un pre-inóculo en Cultivo líquido (sección 5.1) a partir de placa fresca o glicerol stock de *E.coli* perpetuada con pBS-Cluster, luego se selecciona mediante un Cultivo sólido (sección 5.1), para crecer nuevamente en cultivo líquido con antibiótico. Desde este cultivo se utilizó el Kit GeneJet Miniprep (Thermo Scientific) para realizar las extracciones de DNA plasmidial, a este producto se midió su concentración y pureza utilizando el Espectrofotómetro MaestroNano MN-913, cargando 2 μ L de muestra en el lente.

Digestión DNA para transformación

El material genético para transformar debe estar linealizado, por lo cual se utilizó un mix de reacción con capacidad para digerir hasta 1 μ g de DNA, el cual contiene: 5 μ L NEB-Buffer(10x), 1 μ L enzima de restricción EcoRI, el volumen necesario de DNA plasmidial, y se completó con agua MiliQ estéril hasta alcanzar 50 μ L de volumen final de reacción. La digestión se lleva a cabo ON a 37°C.

Transformación

Se incorporó 10 μ L de DNA preparado para transformación con una concentración de 0.25 μ g/ μ L a una alícuota con 80 μ L de *S.cerevisiae* electrocompetente. La mezcla homogénea se transfirió a una cubeta de electroporación de 2mm previamente enfriada. Se aplicó el curso de corriente acorde al equipos de electroporación. Las células fueron recuperadas agregando 1mL de sorbitol 1M previamente enfriado, y depositándolas en un tubo Falcon de 15mL. Se incubó el tubo a 30°C por 1 a 2 horas. Una vez cumplido este tiempo se agrega 1mL de medio YPD para incubar nuevamente a 30°C por 1 a 2 horas. Finalmente, bajo condiciones de esterilidad se extraen 100 μ L y se sembraron en cultivo sólido con 100 μ g/ μ L de G418, estas placas fueron incubadas a 30°C por 2 a 3 días.

Selección de transformantes

Para colonias recién transformadas, o activación de cultivos desde glicerol stock o placas antiguas, se extrajeron colonias aisladas y fueron disueltas en tubo Eppendorf de 0.6mL con 50 μ L de agua MiliQ estéril, para luego este volumen ser sembrado mediante el método de extensión en placas con cantidad de antibiótico mayor. Esto se realizó para hacer selección de cepas hasta una concentración de 400 μ g/ μ L de G418. La incubación en cada una de las concentraciones de antibiótico fue progresiva y duran entre 3 a 4 días a 28°C.

5.2. Metodología Modelamiento

Se caracterizó la producción de Isobutanol utilizando el modelo yETFL en lo que se denominará modelo “WildType”, es decir en el modelo base sin ninguna modificación de silenciamiento o sobre-expresión de genes. Para esto se realizaron los siguientes trabajos.

Identificación de ruta de producción de Isobutanol

Accediendo al material disponible publicado por el equipo desarrollador del modelo yETFL (Oftadeh et al., 2021) se compiló el modelo a escala genómica con el archivo https://github.com/EPFL-LCSB/yetfl/blob/main/code/helper_gen_models_yeast.py, estableciendo composición de biomasa constante y con restricciones termodinámicas (yETFL_cb). Utilizando la herramienta Escher (King et al., 2015) se construyó el metabolismo central de *S.cerevisiae*, junto con rutas para producción de Isobutanol, Etanol, Valina.

Estructura de optimización

Se hicieron modificaciones sobre la metodología de optimización empleada por (Oftadeh et al., 2021), desarrollando la optimización metabólica bajo los siguientes pasos:

1. Optimización 1: Crecimiento/biomasa (μ)
2. Restricción de la ecuación de biomasa, igualando limite superior e inferior al resultado de la optimización 1.
3. Optimización 2: Metabolismo - En esta optimización se minimiza que la suma todos los flujos (reversibles e irreversibles) dentro del metabolismo, incluyendo los de consumo.
4. Restricción de flujos metabólicos, donde el resultado de la optimización 2 es incorporado como nueva restricción dentro del modelo, definiendo los límites superiores e inferiores como el valor óptimo sumado/restado con el mismo valor óptimo multiplicado por un factor de tolerancia.
5. Optimización 3: Consumos - En esta optimización se minimiza la suma de todos los flujos correspondiente a “**uptakes**” como glucosa, oxígeno, minerales, etc.
6. Restricción de flujos de consumo, donde el resultado de la optimización 3 es incorporado como nueva restricción dentro del modelo, definiendo los límites superiores e inferiores como el valor óptimo sumado/restado con el mismo valor óptimo multiplicado por un factor de tolerancia.

7. Optimización 4: Isobutanol - En esta optimización se maximiza la suma de flujos en reacciones con la capacidad de producir isobutanol, estas reacciones fueron definidas al momento de identificar la ruta de producción de Isobutanol dentro de yETFL.

dFBA: Producción de Isobutanol en modelo WildType

Se analizó el modelo a través de la herramienta dFBA, la implementación de este algoritmo requirió establecer como variables la Concentración de Biomasa (X_g), Concentración de glucosa (G), Concentración de Etanol (E), Concentración de oxígeno (O), Concentración de Isobutanol (I); la variación de concentración de biomasa depende directamente de la velocidad específica de crecimiento μ_g , el consumo de metabolitos como glucosa y oxígeno dependen de su velocidad de consumo respectiva ν_g y ν_o , para finalmente el aumento en el tiempo de metabolitos secundarios venir definido por los flux obtenidos a partir del dFBA ν_e y ν_I .

$$\frac{dX_g}{dt} = \mu_g X_g \quad (5.1)$$

$$\frac{dG}{dt} = -\nu_g X_g \quad (5.2)$$

$$\frac{dO}{dt} = -\nu_o X_g \quad (5.3)$$

$$\frac{dE}{dt} = \nu_e X_g \quad (5.4)$$

$$\frac{dI}{dt} = \nu_I X_g \quad (5.5)$$

Las velocidades de consumo o “uptake” de glucosa y oxígeno fueron definidas por las ecuaciones a continuación. La velocidad de consumo de glucosa se definió por una cinética de Monod con inhibición por producto (Hanly y Henson, 2011), mientras que la velocidad de consumo de oxígeno requirió un trabajo adicional. Primero se usó como supuesto que en todo tiempo (t) siempre habrá la máxima cantidad posible de oxígeno disuelto en el medio, aproximadamente 7[mg/L] (considerando el medio de cultivo conserve propiedades del agua pura) a condiciones de 30°C. Segundo, dado que las velocidades de consumo fueron utilizadas como limite de flux para el modelo, y estos están en unidades de [mmol/gDW*h], por simplicidad se utilizó 1 [gDW] y se dividió por el peso molecular del oxígeno 0.032[gr/mmol], obteniendo un valor de 0.22[mmol/L*h]. Finalmente, para acercar el modelo a la realidad, se impone que en un ε al inicio de cada tiempo t, el oxígeno máximo que habrá disponible corresponde a la cantidad disuelta repartida equitativamente en cada unidad celular formada en el tiempo anterior (que corresponde a la cantidad de biomasa existente en el instante ε).

$$\nu_g = \nu_{g,max} \frac{G_{(t-1)}}{K_g + G_{(t-1)}} \frac{1}{1 + \frac{E_{(t-1)}}{K_{iE}}} \frac{1}{1 + \frac{I_{(t-1)}}{K_{iI}}} \quad (5.6)$$

$$\nu_o = \frac{0.22}{X_{g(t-1)}} \quad (5.7)$$

Como parámetros para las velocidades antes definidas se utilizaron los valores expuestos en la Tabla 5.2, y para la condición inicial de modelo las concentraciones resumidas en la Tabla 5.3.

Tabla 5.2: Parámetros utilizados en dFBA

Nombre	Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Velocidad máxima consumo de Glucosa	$V_{g,max}$	22.4	mmol/g/h	(Hanly y Henson, 2011)
Constante de saturación de Glucosa	K_g	0.8	g/L	(Hanly y Henson, 2011)
Constante inhibición por Glucosa	$K_{i,g}$	0.5	g/L	(Hanly y Henson, 2011)
Constante inhibición por Etanol	$K_{i,e}$	10	g/L	(Hanly y Henson, 2011)
Constante inhibición por Isobutanol	$K_{i,iso}$	12.832	g/L	(Hanly y Henson, 2011)
Velocidad específica de muerte celular	K_d	0.0021	1/h	(Sultana et al., 2017)

Tabla 5.3: Condiciones iniciales de simulación

Nombre	Parámetro	Valor	Unidad
Concentración inicial de Glucosa	G_o	45	gr/L
Concentración inicial de Biomasa	X_{go}	0.1	gr/L
Concentración inicial de Oxígeno	O_o	0.007	gr/L
Concentración inicial de Etanol	E_o	0	gr/L
Concentración inicial de Isobutanol	I_o	0	gr/L

Una vez establecidos los parámetros y condiciones iniciales para el modelo, se implementaron las soluciones a las ecuaciones diferenciales como se muestra a continuación. Los pesos moleculares expresados en esta parte están en unidad de [gr/mmol].

$$X_g[i] = X_g[i - 1] * \left(e^{(\mu_g - K_d)(t_i - t_{i-1})} \right) \quad (5.8)$$

$$G[i] = -\frac{X_g[i - 1]}{\mu_g - K_d} * (v_g * PM^{Gluc}) * \left(e^{-t_i(\mu_g - K_d)} - e^{-t_{i-1}(\mu_g - K_d)} \right) + G[i - 1] \quad (5.9)$$

$$O[i] = -\frac{X_g[i - 1]}{\mu_g - K_d} * (v_g * PM^{Oxi}) * \left(e^{-t_i(\mu_g - K_d)} - e^{-t_{i-1}(\mu_g - K_d)} \right) \quad (5.10)$$

$$E[i] = -\frac{X_g[i - 1]}{\mu_g - K_d} * (v_e * PM^{Et}) * \left(e^{-t_i(\mu_g - K_d)} - e^{-t_{i-1}(\mu_g - K_d)} \right) + E[i - 1] \quad (5.11)$$

$$I[i] = -\frac{X_g[i - 1]}{\mu_g - K_d} * (v_I * PM^{Ibut}) * \left(e^{-t_i(\mu_g - K_d)} - e^{-t_{i-1}(\mu_g - K_d)} \right) + I[i - 1] \quad (5.12)$$

Herramienta ejecución de modelos: NLHPC

Para la ejecución de los algoritmos diseñados se utilizaron las instalaciones del *National Laboratory for High Performance Computing Chile* (NLHPC) (NLHPC, 2022), el cual tiene disponibles 5236 CPU cores, 22 TB RAM, y asignó 100.000 horas de computo para el período del presente trabajo de tesis .

Implementación 1 dFBA

La primera implementación de dFBA fue basada en la metodología clásica de esta técnica de modelamiento, y particularmente se encuentra diseñado como flujo de trabajo en la figura 5.2. El trabajo considera la definición de límites de consumo de nutrientes definidos como sus respectivas velocidad de consumo, siguiendo las ecuaciones (5.6) y (5.7). A continuación se optimiza el problema acorde a la Estructura de optimización definida con anterioridad, y los fluxes de resultado son utilizados para calcular las concentraciones en el siguiente punto de tiempo, siguiendo las ecuaciones (5.8) a (5.12). Si aún queda glucosa disponible el loop se repite, teniendo como punto de finalización el agotamiento de esta.

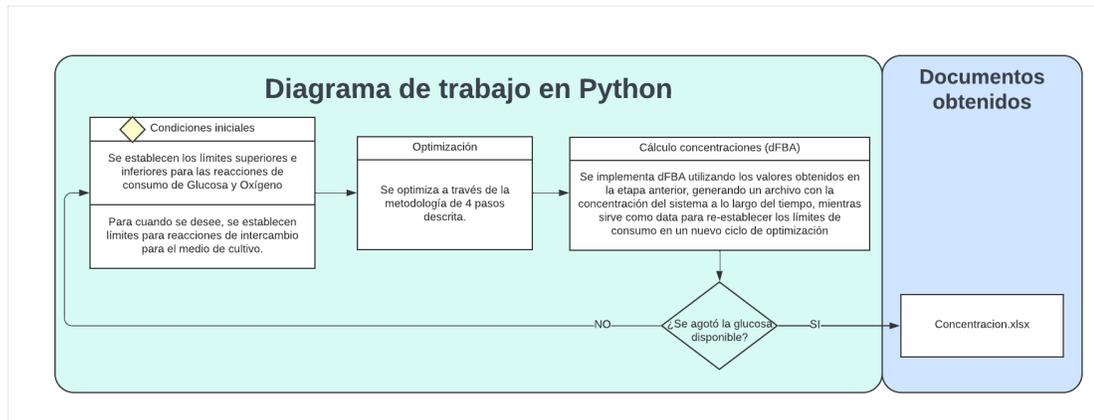


Figura 5.2: Flujo de trabajo para la primera implementación de dFBA

Estabilidad de optimización

La estabilidad o nivel de desviación de las distintas ejecuciones de la metodología dFBA 1 se evaluaron utilizando la librería *numpy* de python, específicamente la función *std* para el cálculo de desviación estándar, y con el set de datos obtenidos para cada variable de estado, durante las 16 iteraciones evaluadas.

Implementación 2 dFBA

A diferencia de la primera metodología de implementación, la presente considera 3 pasos intermedios representados en la figura 5.3. Haciendo uso de los recursos disponibles en el NLHPC se realizaron las ejecuciones necesarias del algoritmo que modela la Estructura de optimización, la cantidad de veces necesarias tal de obtener al menos 15 sets de resultados. En cada una de estas optimizaciones se calcula el SSR de cada set. La segunda etapa contempla filtrar los 5 sets de resultados que posean el menor SSR. Con estos sets los valores de cada reacción son promediados, y este resultado es considerado como final con valores representativos del espacio de soluciones para las condiciones iniciales empleadas. Finalmente, al igual que en la Implementación 1, se calculan los valores de concentraciones y da inicio a una nueva iteración temporal.

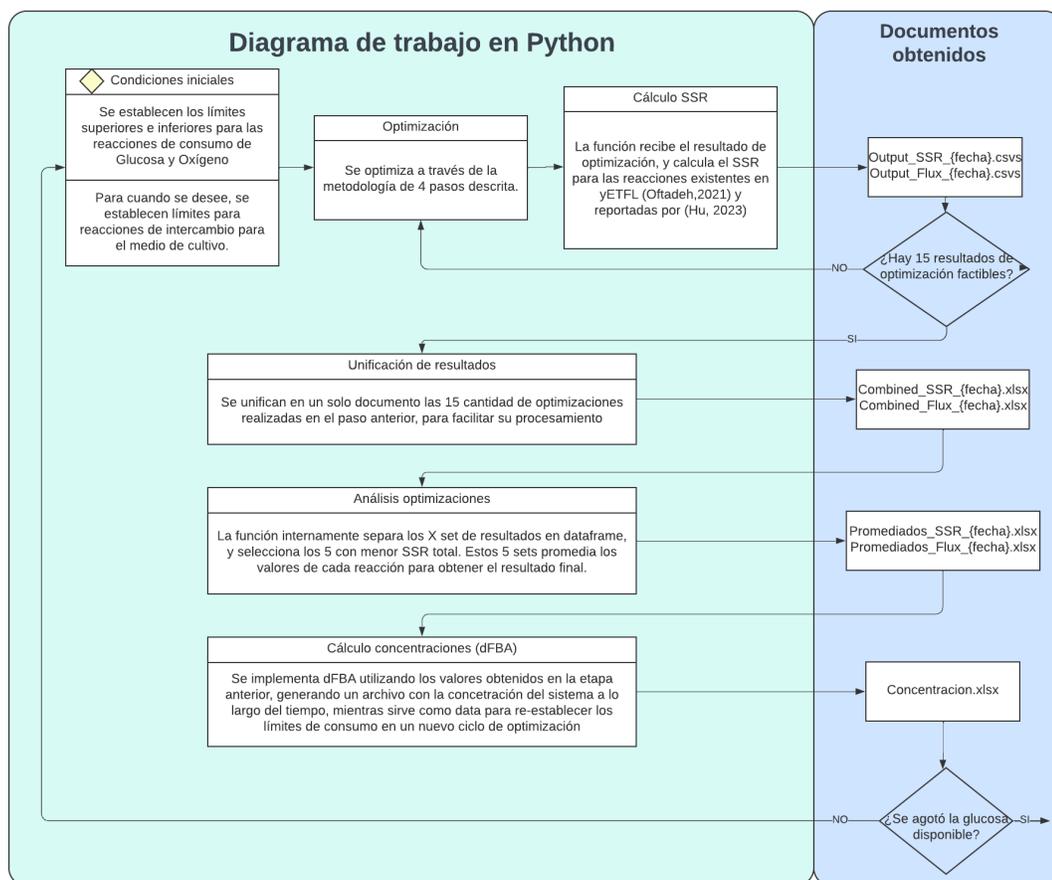


Figura 5.3: Flujo de trabajo para la segunda implementación de dFBA

Validación modelo metabólico.

A partir del material suplementario publicado por Hu (Hu et al., 2023) , se utilizan los flujos metabólicos medidos experimentalmente en la cepa de *S.cerevisiae* s288c, para evaluar el desempeño de yETFL. Se determinó utilizar como parámetro estadístico la Suma de errores cuadrático (SSR), donde y_i corresponde al valor medido experimentalmente, y $f(x_i)$ al valor calculado a través del modelo .

$$SSR = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2 \quad (5.13)$$

Cabe destacar, que sólo fueron considerados los valores de aquellas reacciones existentes en ambos sets de datos, estas contemplan 221 reacciones.

Para validar el modelo también se realizó un análisis de sensibilidad previo, para evaluar cómo influyen la tolerancia del solver Gurobi utilizado, y el valor de la tolerancia empleado para restringir la Estructura de optimización definida anteriormente. Con respecto a la validación numérica, se fija la reacción de consumo de glucosa igual a $19.8 \text{ mmol gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$, correspondiente al consumo experimental reportado por Hu (Hu et al., 2023) . En función de los resultados, se deben revisar las reacciones con mayor diferencia en sus valores.

Modelamiento medio de cultivo definido

yETFL permite acceso directo a todas las reacciones de intercambio a través del comando `model.medium`. Revisando el listado de reacciones que entrega se obtiene la ID para modificar los límites de flux con propósito de modelar un medio de cultivo definido.

Análisis mediante grafos de los efectos provocados por condiciones de modelamiento distintas

Dada la gran envergadura del modelo con que se está trabajando, se debió idear una metodología que permitiera visualizar y acotar los principales cambios ocurridos en el metabolismo celular producto de variaciones en el medio de cultivo o eliminación de genes. Para esto, primero se determinó emplear como parámetro de medición del cambio de un flujo la Diferencia Normalizada con un valor de epsilon(ϵ) suficientemente pequeño tal que permita aplicar el cálculo a flujos originalmente nulos. La expresión para cuantificar la variación del Flux a entre los Casos 1 y 2, queda de la siguiente manera:

$$\text{Dif Normalizada } Flux_a = \frac{(Flux_a^{Caso2} + \epsilon) - ((Flux_a^{Caso1} + \epsilon))}{\frac{((Flux_a^{Caso1} + (Flux_a^{Caso2}))}{2} + \epsilon)}; \epsilon = 1 * 10^{-6} \quad (5.14)$$

Dado que esta ecuación permite medir la variación del cambio en una sola unidad de tiempo, se utiliza la sumatoria durante todo el horizonte de tiempo para poder visualizar aquellas reacciones que mayor impacto tuvieron sobre el modelo a lo largo del tiempo:

$$\sum_{t=0}^t \text{Dif Normalizada } Flux_a = \frac{(Flux_{a,t}^{Caso2} + \epsilon) - (Flux_{a,t}^{Caso1} + \epsilon)}{\frac{(Flux_{a,t}^{Caso1} + (Flux_{a,t}^{Caso2}))}{2} + \epsilon}; \epsilon = 1 * 10^{-6} \quad (5.15)$$

Se determinó arbitrariamente que se emplearán las 200 reacciones con mayor error para ser

estudiadas. Una vez ordenadas en modo descendente los valores absolutos de error acumulado, se eliminaron de la lista aquellas reacciones de Transcripción, Traducción y Degradación; dado que serán repetitivas para una enzima producida. Qué quiere decir esto, por ejemplo la enzima FMN reductasa asociada al gen YLR011W puede sufrir un aumento de síntesis en los casos estudiados, por lo cual, esta enzima aumentará el flux de las reacciones dependientes de ella r_0441 y/o r_0442 , pero naturalmente también (y en magnitud muy similar) aumentarán las reacciones *YLR011W_enzyme_degradation* (degradación), *YLR011W_translation* (traducción), etc; por lo cual resultará redundante para el análisis considerarlos, dado que existe una implicación directa entre la variación de la reacción catalizada y las reacciones de síntesis/degradación de la enzima. Finalmente, utilizando las librerías *networkx* y *community* se construye el grafo no direccionado que asocia en cluster las reacciones de la lista con mayores errores.

Capítulo 6

Resultados

6.1. Resultados experimentales

6.1.1. Diagnósticos molecular

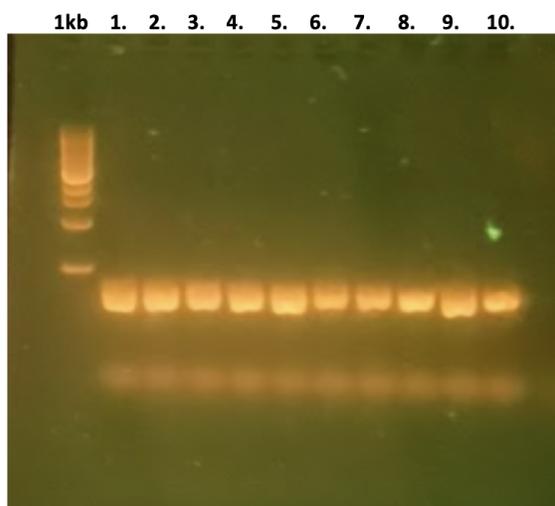
Las cepas 69MIR (dos stocks disponibles), 15cc (un stock disponible) y C6 (cuatro stocks disponibles) fueron reanimadas desde -80°C acorde a la metodología de Cultivo Líquido (sección 5.1) y seleccionados con $150[\mu\text{g}/\text{mL}]$ de G418 acorde a Cultivos sólidos (sección 5.1); dada la cantidad de material disponible se utilizó la nomenclatura de la Tabla 6.1. Se realizó PCR para identificación del promotor tHXT7 y gen KAN, con los partidores tHXT7p_FW/RV y G418_FW/RV, respectivamente.

Tabla 6.1: Nomenclatura cepas reanimadas desde trabajos anteriores

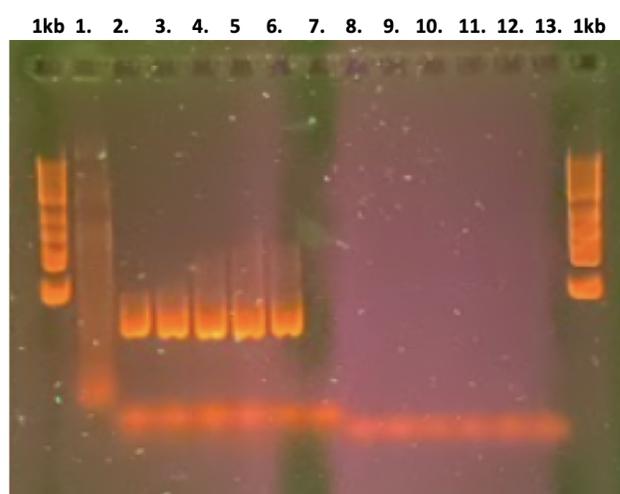
Nomenclatura	Cepa	Colonias aisladas
C1	69 MIR	2
C2	69 MIR	0
C3	C6	3
C4	C6	3
C5	C6	3
C6	C6	2
C7	15cc	2

Durante esta actividad se encontró que el stock C2 no tenía viabilidad, por lo mismo no hay resultados de PCR asociados. Además, se obtuvieron bandas de tamaño aproximado 400bp para la amplifican el promotor constitutivo tHXT7 , sin embargo, ninguna de las cepas amplifica el gen a resistencia contra G418 (ver Figura 6.1 y 6.2).

Además, se realizó un diagnóstico de integridad de los constructos pBS-ADH y pBS-Cluster perpetuados en *E. coli* (ver Figura 6.3). Para esto se crecieron los stock de *E. coli* y se seleccionaron 8 colonias aisladas para extraer el material plasmidial con la metodología descrita en la Sección 5.1 de Metodología, finalmente se evalúa el tamaño completo e integridad del plasmido.



(a) Identificación de promotor tHXT7: 1)C6.2, 2)C5.3, 3)C5.2, 4)C4.3, 5)C4.2, 6)C3.3, 7)C3.2, 8)C3.1, 9)C1.2, 10)C1.1



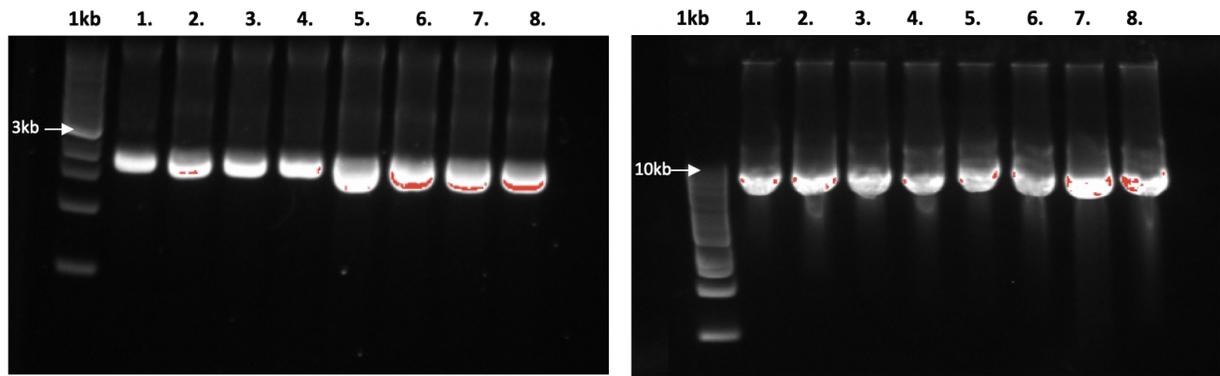
(b) Identificación de promotor tHXT7: 1)MC, 2)s288c, 3)C4.1, 4)C5.1, 5)C6.1, 6)C7.1, 7)Control(-); Identificación de gen KAN: 8)s288c, 9)C4.1, 10)C5.1, 11)C6.1, 12)C7.1, 13)Control(-)

Figura 6.1: Resultado de PCR para diagnóstico cepas trabajos anteriores: Parte 1



(a) Identificación de promotor tHXT7: 1)C6.3, 2)C7.2, 3)Control(-); Identificación de gen KAN 4)C1.1, 5)C1.2, 6)C3.1, 7)C3.2, 8)C4.3, 9)C5.2, 10)C5.3, 11)6.2, 12)C6.3, 13)Control(-)

Figura 6.2: Resultado de PCR para diagnóstico cepas trabajos anteriores: Parte 2



(a) Integridad pBS-ADH

(b) Integridad pBS-Cluster

Figura 6.3: Resultado de PCR para diagnóstico de plásmidos

La evaluación de integridad para pBS-ADH resultó en tamaños homogéneos para todas las colonias seleccionadas a partir del stock utilizado. Ahora bien, el tamaño esperado de este constructo es de 5280 pb (considera módulo ADH y backbone del vector). Para pBS-Cluster las muestras son homogéneas en tamaño, y a priori se visualiza una estructura conservada concordante con los 10853 pb esperados para este vector.

Se escogieron la muestra 6 de la Figura 6.3.a y la muestra 7 de la Figura 6.3.b para evaluar con precisión los genes en su estructura. Respecto a la identificación mediante PCR, se utilizaron los partidores *rnADH*, *G418* y *KDC*; para los dos primeros se utilizó una temperatura de annealing de 54.9°C, mientras que para *KDC* la T_a fue de 57.4°C. En la Figura 6.4 el carril 1 usa como templado pBS-ADH (muestra 6), los carriles 2,4,5 utilizan pBS-Cluster (muestra 7), el carril 3 utiliza una alícuota encontrada de pBS-MIR que se deseaba evaluar su composición. Los carriles 6, 7 y 8 son controles negativos para ADH, KAN y SkARO10, respectivamente.

Tabla 6.3: Resultado diseño partidores SkAro

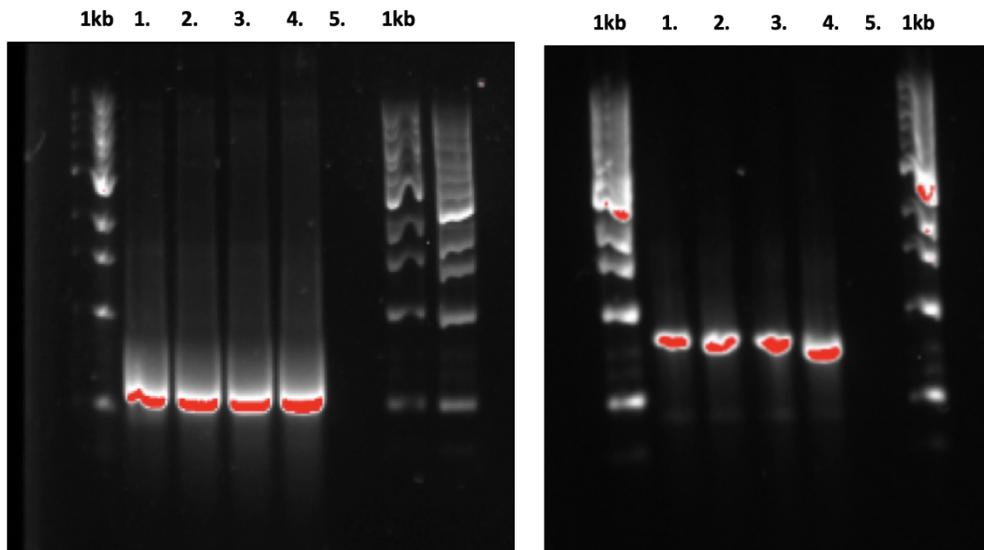
	Secuencia (5'->3')	Propiedades partidior						Análisis vs Genómico (BLAST)		Análisis vs Cluster (Secuencia APE)	
		%GC	Ta (°C)	Largo (pb)	Potencial hairpin formation (min 4 pb)	Complementarity (min 5pb)	Self annealing sites	máx. % de match (max. 75 %)	Nº de veces complemento del tamaño	Number of mismatches allows (min 4)	Complementarities found
FW	ACTCCCGTGACTATAACACC	48	59,5	21	None	None	None	81%(17 de 21 pb)	2	X	X
FW (A)	CCGTGACTATAACACCTTCG	48	59,5	21	None	None	None	62%(13 de 21 pb)	8	6	1(AdhARE1)
RV (A)	TCTTCGCATTAGGCTGTAGG	48	59,5	21	None	None	None	57%(12 de 21 pb)	9	8	5
FW (B)	TCCACCCGAATTATATAAGG	40	54,3	20	None	None	None	65%(13 de 20 pb)	7	7	6 (2 SkARO10, Down23, backbonnd, G418,TDH2t)
RV (B)	CCGCTCTAAAGAGAAACAAGAA	41	58,4	21	None	None	None	71,4%(15 de 21 pb)	2	7	1(Down23)
FW (B)	GTTCCACCCGAATTATATAAGG	41	58,4	22	None	None	None	59%(13 de 22 pb)	7	8	4 (SkAro10, Down23,G418,)
RV (B)	TTGTTTCTCTTTAGAGCGGCGG	50	62,1	22	None	None	None	68,1%(15 de 22 pb)	2	7	1

Los partidores escogidos se encuentran destacados en color verde y su nombre es acompañado por la fecha de diseño como se visualiza en la Tabla 5.1 se la sección Metodología.

Utilizando estos partidores se repitió el diagnóstico para identificación de genes presentes en constructos disponibles en CeBiB. Se utilizaron colonias derivadas de la muestra 7 para pBS-Cluster, se utilizó una alícuota con el módulo de KAN (69MIR), y una muestra pBS-C-ADH encontrada posterior a los primeros diagnósticos. La Figura 6.5 muestra los resultados del producto PCR con partidores KAN290822 (idénticos a los originales pero sin la cola para Gibson Assembly) a Ta=57°C.

Para el diagnóstico de la Figura 6.5 se hace notoria la diferencia en los resultados que genera un cambio en la concentración de DNA cargada en cada carril del gel de agarosa. En la Figura 6.5.b se visualizan fragmentos de aproximadamente 800bp tal como el tamaño teórico esperado.

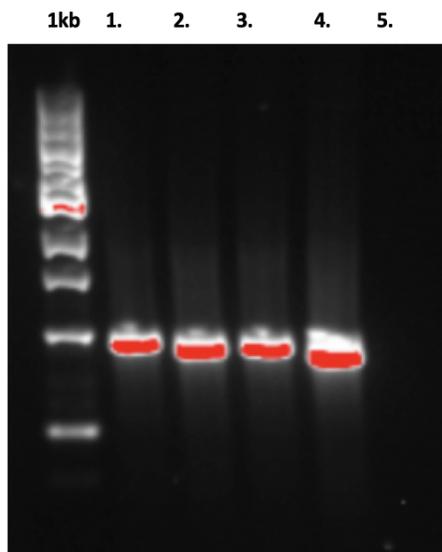
Respecto al gen de alcohol deshidrogenasa, ADH, en la Figura 6.6 se exponen los resultados de PCR utilizando partidores ADH290822 a Ta=60°C obteniendo fragmentos de tamaño cercano a 1000bp, y cargando gel de electroforesis con dilución 1:10. Finalmente, la identificación del gen de SkAro10 se encuentra en la Figura 6.7 y se realizó con los partidores SKAROA(B)290822 con Ta=60°C bajo las mismas condiciones de ADH. Cabe destacar que los 5 carriles de la izquierda corresponden a los partidores SKARO_A y aquellos en el lado derecho a SKARO_B; dado el tamaño del gen su identificación se hace en dos partes para evitar errores de procesamiento por parte de la enzima polimerasa.



(a) Sin diluir:
 1)69MIR, 2)pBS-
 C-ADH, 3)pBS-
 Cluster Col#1,
 4)pBS-Cluster
 Col#5, 5)(-)

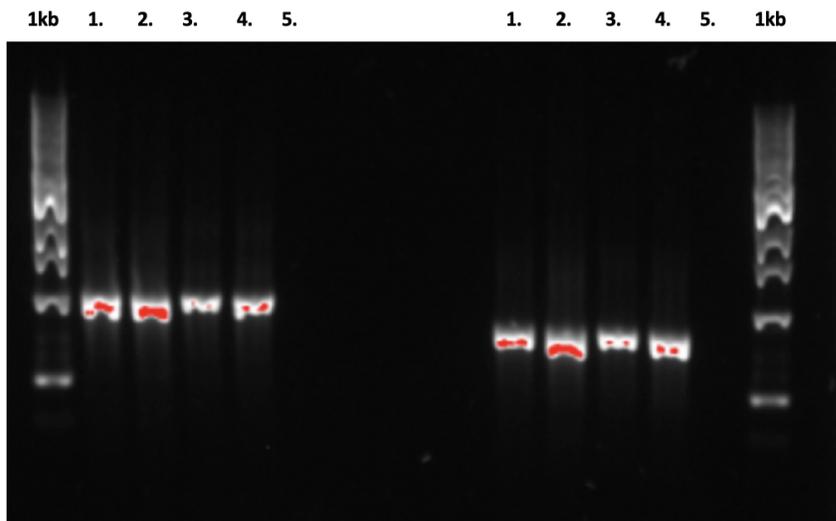
(b) Dilución
 1:10: 1)69MIR,
 2)pBS-C-ADH,
 3)pBS-Cluster
 Col#1, 4)pBS-
 Cluster Col#5,
 5)(-)

Figura 6.5: Diagnóstico identificación gen KAN



(a) 1)69MIR,
 2)pBS-C-ADH,
 3)pBS-Cluster
 Col#1, 4)pBS-
 Cluster Col#5,
 5)(-)

Figura 6.6: Diagnóstico identificación gen Adh



(a) 1)69MIR, 2)pBS-C-ADH, 3)pBS-Cluster Col#1, 4)pBS-Cluster Col#5, 5)(-)

Figura 6.7: Diagnóstico identificación gen Aro

6.1.2. Transformación de *S.cerevisiae*

Habiendo logrado estandarizar la técnica para la identificación de genes mediante PCR en la sección anterior, se procedió a iniciar la obtención de DNA para transformar con las cuatro cepas positivas: 69MIR, pBS-C-ADH, pBS-Cluster Col#1, pBS-Cluster Col#5; ya que todas cuentan con los tres genes de interés (probablemente 69MIR fue un error de rotulación por el investigador anterior). Los cultivos líquidos de *E.coli* respectivos se monitorearon y las OD a 600nm alcanzadas se resumen en la Tabla 6.4

Tabla 6.4: OD cultivos *E.coli*

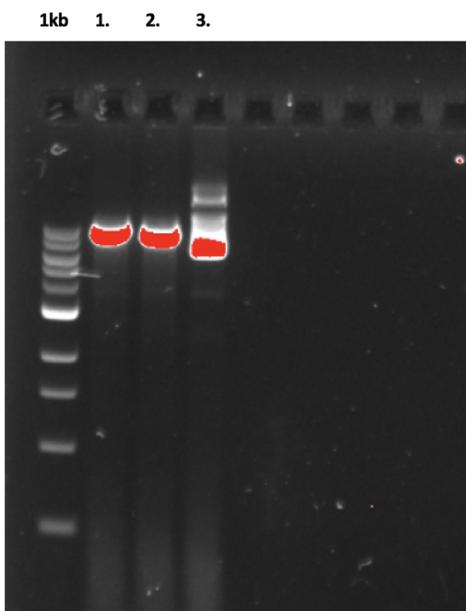
Constructo	OD(600nm)
69 MiR	0,260
pBS-C-ADH	0,202
pBS-Cluster Col#1	0,238
pBS-Cluster Col#5	0,099

Se seleccionaron pBS-C-ADH y pBS-Cluster#1 y se extrajo el DNA plasmidial como se describe en la Sección 5.1 obteniendo las concentraciones y purezas expuestas en la Tabla 6.5 a continuación:

Tabla 6.5: Resultado extracción DNAp

Constructo	Concentración [ng/uL]	Pureza (A260/280)
pBS-C-ADH	88,09	1,1
pBS-Cluster Col#1	31,64	2,2

Dada la baja pureza obtenida desde el cultivo de pBS-C-ADH (se considera apropiado entre 1,8 y 2,2) la digestión del material genético se realizó únicamente con lo obtenido desde pBS-Cluster Col#1 acorde a la metodología previamente descrita. Dada la concentración de 31,64[ng/ μ L] del DNAp se necesitan 79 μ L para obtener un total de 2,5 μ g. Al ser este volumen mayor al total de 50 μ L establecido por el protocolo para la reacción, la digestión se lleva a cabo en 2 reacciones con 39,5 μ L de DNAp cada una. El resultado del protocolo de digestión realizado se encuentra en la Figura 6.8



(a) 1)Digestión,
2)Digestión,
3)Sin digerir

Figura 6.8: Resultado digestión pBS-Cluster con enzima EcoRI

Luego de realizar la transformación e incubar durante 2 días, los resultados obtenidos se observan en la Figura 6.9, donde no se identifica una selección en los controles de agua y pBS-Cluster vacío frente los 100[μ g/mL] de antibiótico utilizado. Dado este fenómeno, se determina que esta concentración es lo suficientemente baja para que *S.cerevisiae* pueda contrarrestarla de manera natural, y por ende se decide seleccionar con el doble de concentración.

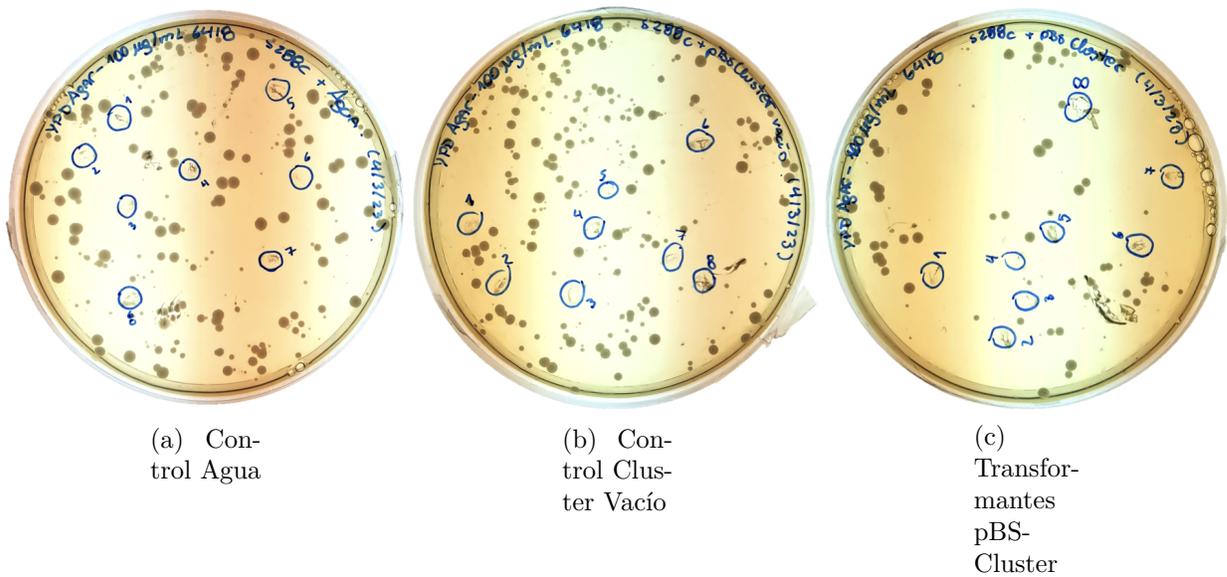


Figura 6.9: Selección de transformantes con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418

Se resuspende las colonias marcadas en cada una de las placas anterior en agua estéril, y se incuban en medio sólido con 200[$\mu\text{g}/\text{mL}$] de G418. Los resultados de este proceso se encuentran en la Figura 6.11, y en esta ocasión sí es posible observar la selección mediante antibiótico que distingue los controles negativos con las transformantes que poseen el inserto de resistencia.

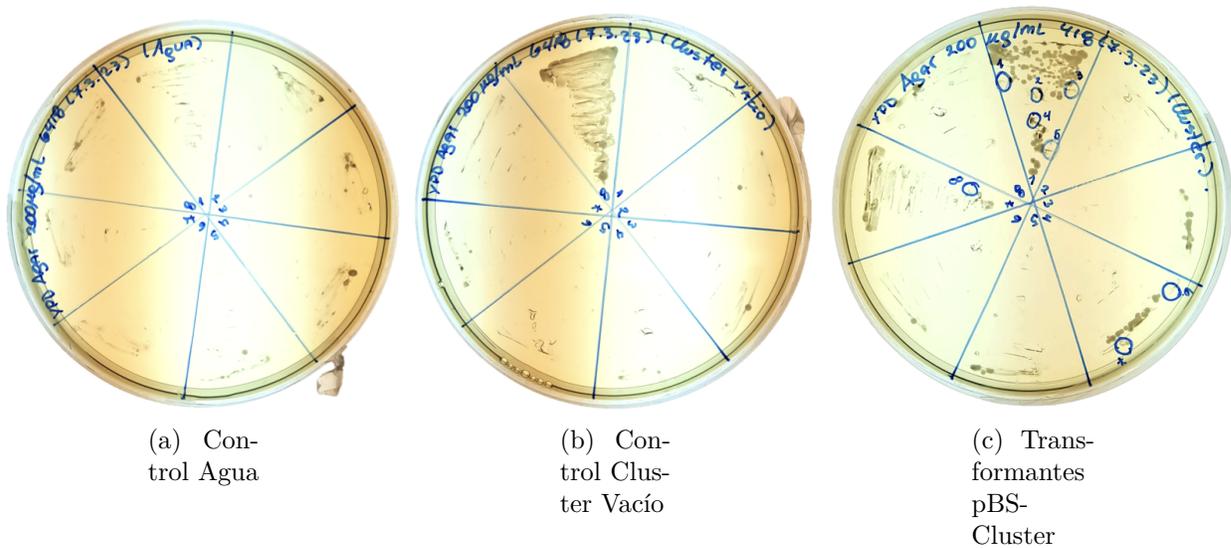
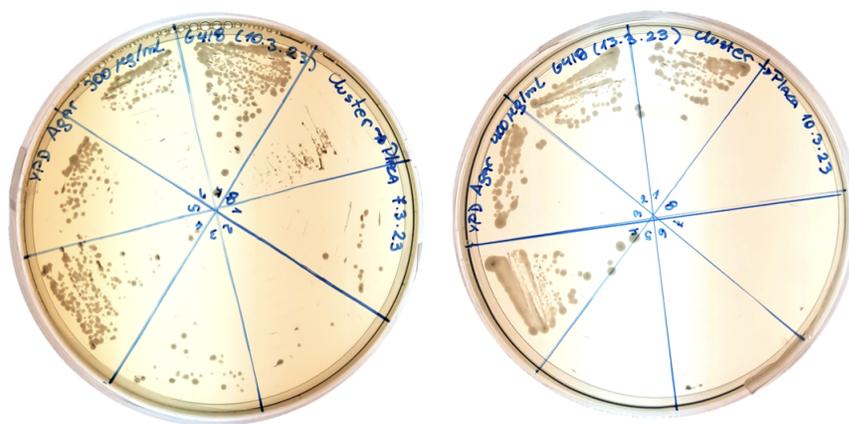


Figura 6.10: Selección de transformantes con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418

Un tercer y cuarto proceso de selección fueron llevado a cabo aumentando a 300[$\mu\text{g}/\text{mL}$] y 400[$\mu\text{g}/\text{mL}$] de antibiótico, donde ocho colonias aisladas fueron seleccionadas. Para esta etapa, dado que ya se corroboró mediante los controles la presencia de un mecanismo de selección, no se continua con su evaluación.



(a) Transformantes
300µg/mL

(b) Transformantes
400µg/mL

Figura 6.11: Selección de transformantes con 300µg/mL y 400µg/mL de G418

A partir de las transformantes seleccionadas a 300[µg/mL] se realizó un PCR colonia para cada una de las transformantes, evaluando la presencia de los tres genes de interés KAN, ADH y ARO. Los resultados de estos PCR se encuentran adjuntos en el Anexo A, y los resultados sintetizados de estos se resumen en la Tabla 6.6, donde se identifica que como era de esperar todas las transformantes presentan el marco de lectura para el gen de resistencia, en contraste solo dos colonias (1 y 8) se observa levemente una franja en el tamaño esperado para el gen de alcohol deshidrogenasa (ver imágenes en Anexo A), finalmente se estudió solo el fragmento b del gen SkARO10 y se visualiza el tamaño esperado en 5 colonias.

Tabla 6.6: Síntesis resultados *screening* mediante PCR colonia

	KAN	LIADH ^{ARE1}	SkAro10
Colonia 1	✓	✓	✓
Colonia 2	✓		✓
Colonia 3	✓		
Colonia 4	✓		✓
Colonia 5	✓		✓
Colonia 6	✓		✓
Colonia 7	✓		
Colonia 8	✓	✓	

En el PCR de la Figura 6.12.a se buscó comprobar la inserción correcta de la sección de homología. Para lograrlo, primero se comprobó que fuese posible amplificar el fragmento WT flanqueado por UO/DOWN. Este protocolo fue realizado con coctel PCR para Taq polimeraza, donde se visualizada que incluso con un gradiente de temperatura desde 58°C hasta 68°C, la enzima no es capaz de amplificar el fragmento completo desde WT esperado, de aproximadamente 1723bp. En cambio, amplifica un fragmento claramente visible al rededor

de 1000bp y un segundo que se puede estimar de entre 700-800 bp. Ante estos resultados inconclusos, se establece la necesidad de encontrar una metodología alternativa para la amplificación de fragmento de gran tamaño. En la Figura 6.12.b se realiza el PCR utilizando Phusion Polimeraza con temperatura de annealing de 65°C para aumentar la estrictez de reacción. Este resultado si bien muestra un exceso de DNA cargado en la celda, sí reporta el segmento completo esperado de tamaño esperado a 1723bp.

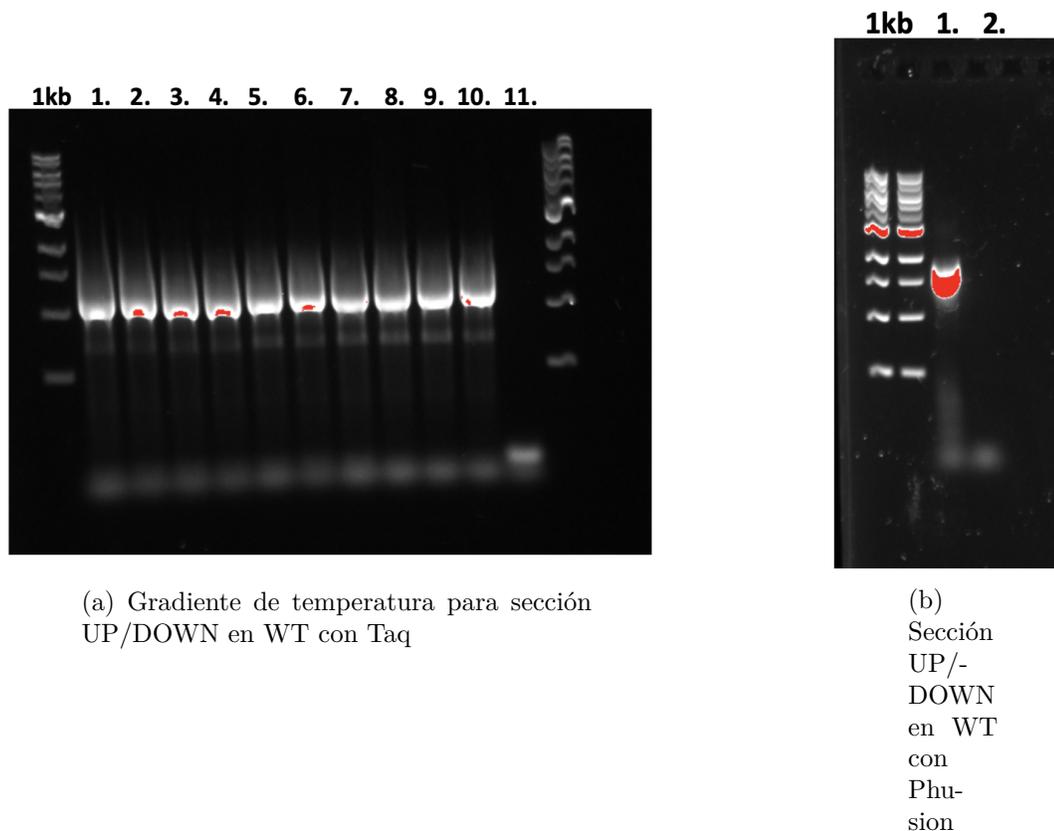
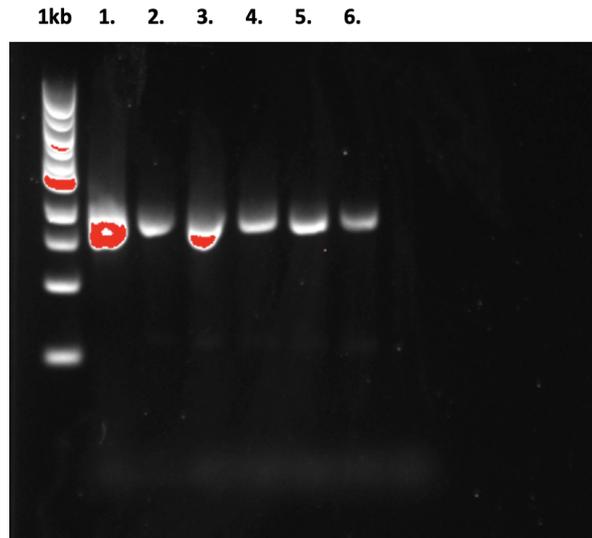


Figura 6.12: Identificación sección flanqueada por sitios UP/DOWN

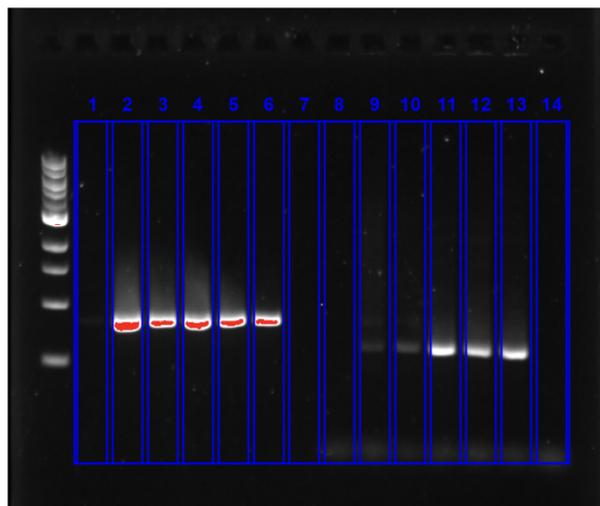
Habiendo obtenido el control del WT, se procedió a evaluar la integridad del inserto en las transformantes. Esta revisión fue realizada con Phusion Polimerasa, y tiempo de extensión de 2 minutos. El resultado esperado para esta evaluación son tamaños de 1723 bp correspondiente al WT o al rededor de los 7000 bp correspondiente a pBS-Cluster. La Figura 6.13 indica que todas las transformantes contienen un segmento equivalente en tamaño a WT.



(a) 1)WT, 2)T1, 3)T2,
4)T3, 5)T4, 6)T5, 7)Agua

Figura 6.13: Resultado PCR para sección de genoma franqueada por regiones UP/DOWN

Dado el resultado negativo para la integración genómica de pBS-Cluster, se volvió a evaluar la presencia de KAN y también de la sección UP/KAN, para evaluar si KAN fue integrado en el sitio de homología o no. El protocolo se realizó con DNA genómico y el PCR con Phusion Polimerasa a temperatura de annealing de 60°C y 28 ciclos. En la Figura 6.14 se corrobora la presencia del gen de resistencia, pero una banda poco específica para la amplificación de la sección UP/KAN que debía tener un tamaño esperado de 1700 bp aprox (sección UP + tHXT7p + KAN)

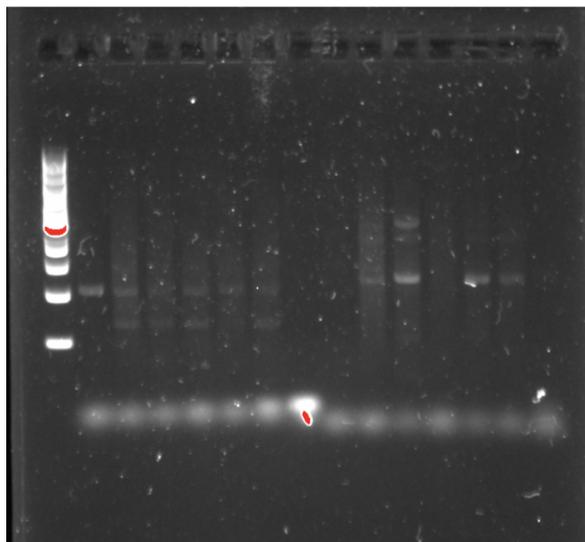


(a) KAN: 1)WT, 2)T1, 3)T2, 4)T3, 5)T4, 6)T5, 7)Agua; UP/KAN: 8)WT, 9)T1, 10)T2, 11)T3, 12)T4, 13)T5, 14)Agua

Figura 6.14: Resultado PCR para gen de resistencia y ubicación en el genoma de transformantes

La identificación de los genes de alcohol deshidrogenasa y α -cetoácido descarboxilasa se realizó en PCR a 61°C siguiendo la metodología para PCR utilizando Phusion polimerasa. El resultado de la Figura 6.15 muestra amplificaciones inespecíficas para ADH con bandas de menor tamaño, para SkAro bandas levemente marcadas de menor tamaño al esperado, y en ambos casos, un exceso de nucleótido en la parte inferior.

1kb 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15.



(a) ADH: 1)WT, 2)T1,
3)T2, 4)T3, 5)T4, 6)T5,
7)Agua; SkAro10: 9)WT,
10)T1, 11)T2, 12)T3,
13)T4, 14)T5, 15)Agua

Figura 6.15: Resultado PCR para genes Adh y SkAro de colonias transformadas

6.2. Resultados Modelamiento

6.2.1. Identificación de ruta de producción de Isobutanol

Se construyó el metabolismo central de *S.cerevisiae* utilizando el programa Escher, incluyendo las rutas de: Glicólisis, Pentosas, Etanol, TCA. En la Figura 6.16 se visualiza el metabolismo general construido y la segmentación respectiva, las rutas metabólicas demarcadas por cuadros rojos se pueden visualizar con mayor detalle en el Anexo B. En la Figura 6.17 se encuentra la ruta metabólica equivalente a la expuesta en la Figura 2.3 de Avalos (Avalos et al., 2013), donde no se encontró un mecanismo de transporte de 3-metil-2-oxobutanoato (α -cetoisovalerato) desde mitocondria hacia citosol.

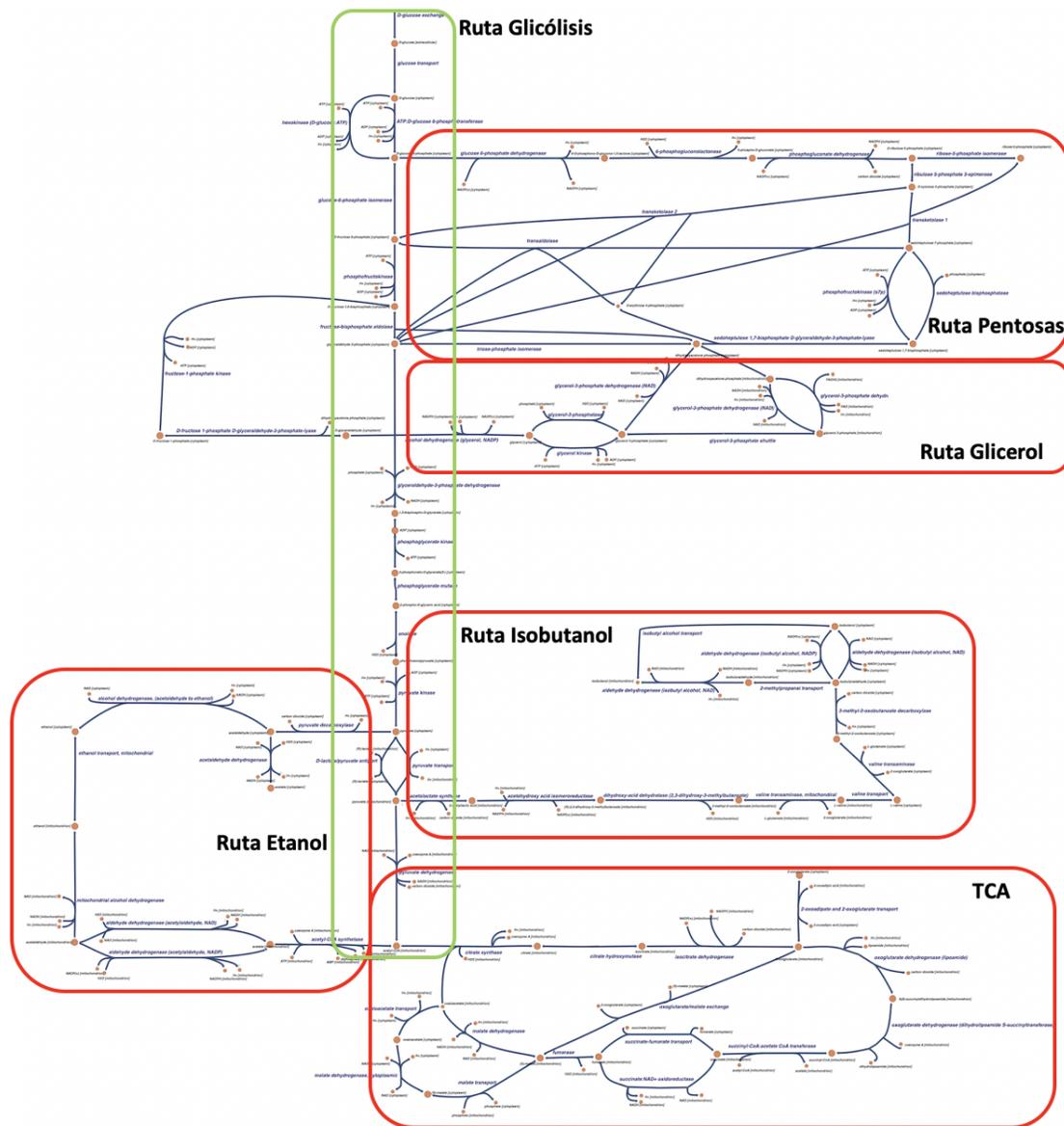


Figura 6.16: Metabolismo general s288c utilizando yEFL

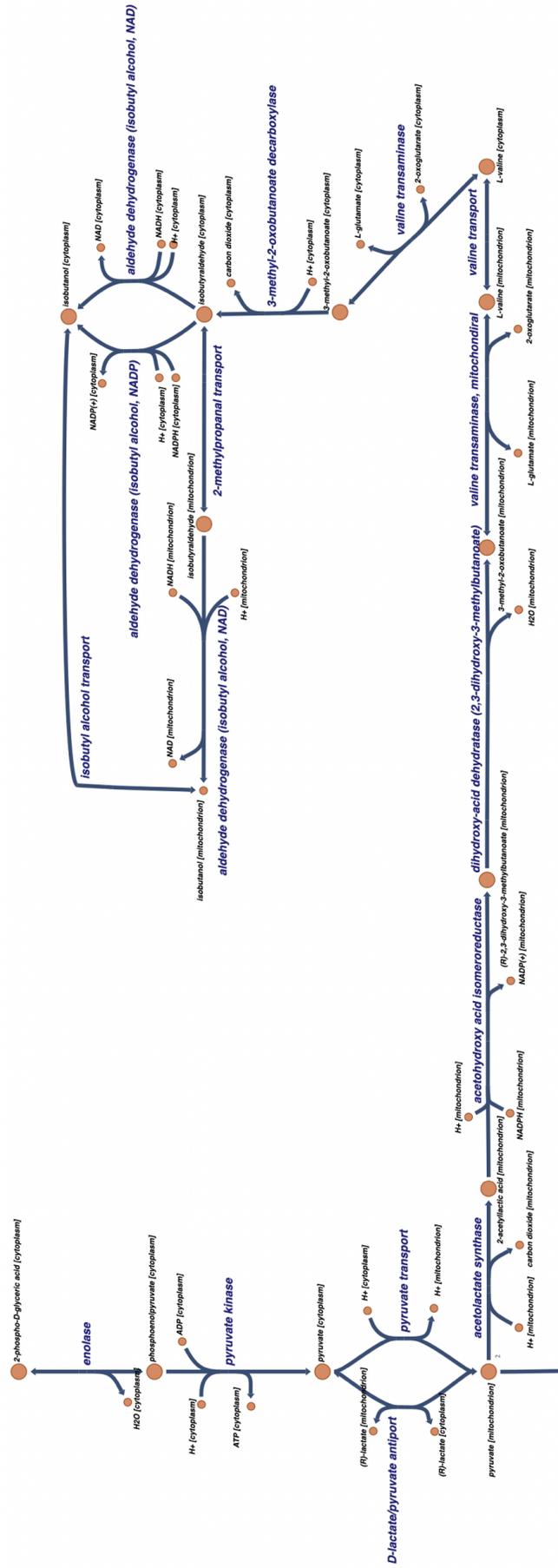


Figura 6.17: Ruta de Isobutanol

6.2.2. Validación del modelo y análisis de sensibilidad

6.2.2.1. Análisis sensibilidad Tolerancia Gurobi

El análisis de sensibilidad fue realizado con el modelo completo incorporando las restricciones termodinámicas, yETFL. Para el valor de tolerancia del Solver Gurobi, consideró los 4 casos de evaluación expuestos en los gráficos. A partir de la Figura 6.18, se observa que la menor variación en el SSR se obtiene con una tolerancia de $1e-08$, mientras que valores $1e-07$ y $1e-09$ muestran variaciones similares. Considerando cómo afecta al tiempo de ejecución, la tolerancia de $1e-07$ presenta el menor valor promedio y una desviación similar a los casos $1e-06$ y $1e-08$.

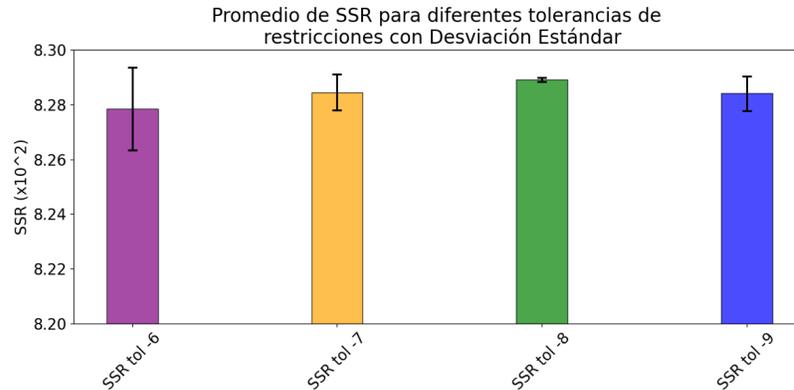


Figura 6.18: Análisis de sensibilidad para tolerancia de Solver Gurobi sobre SSR

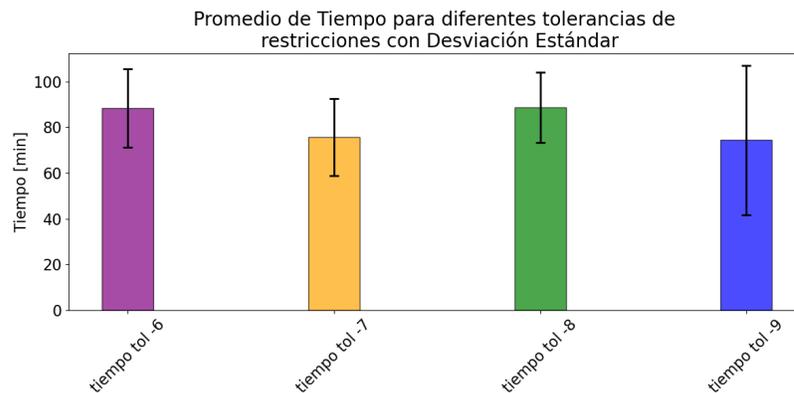


Figura 6.19: Análisis de sensibilidad para tolerancia de Solver Gurobi sobre tiempo

6.2.2.2. Análisis sensibilidad Tolerancia de restricciones en Estructura de optimización

A la vez, el análisis de sensibilidad realizado para el valor de tolerancia aplicado en la Estructura de optimización sobre los pasos 2 y 3, se realizó utilizando un valor de tolerancia de solver igual a $1e-07$, valor obtenido a partir de los resultados anteriores. Este análisis se realizó evaluando 6 ejecuciones idénticas, siendo importante destacar que con una tolerancia

de 0.01 un caso resultó infactible en su solución. Los resultados de este análisis de sensibilidad, muestran una diferencia mínima en el SSR para los 3 valores de tolerancia probados de la Figura 6.20, sin embargo, reflejan una diferencia en la variación del tiempo requerido para ejecutar el proceso. Con estos antecedentes, se determina emplear una tolerancia de 0.02 dada la menor desviación que presenta en el tiempo de ejecución.

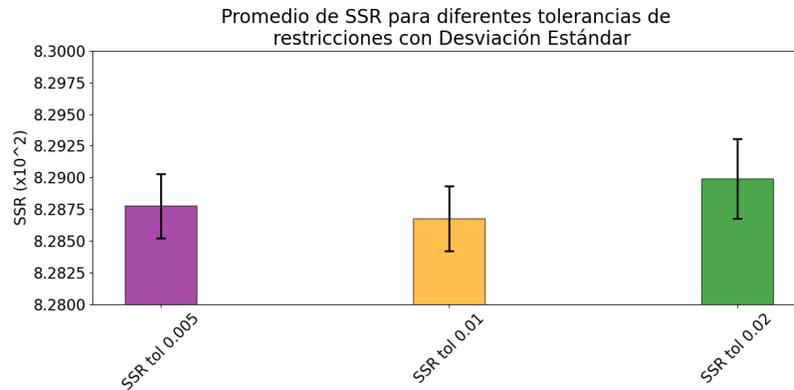


Figura 6.20: Análisis de sensibilidad para tolerancia de restricciones sobre SSR

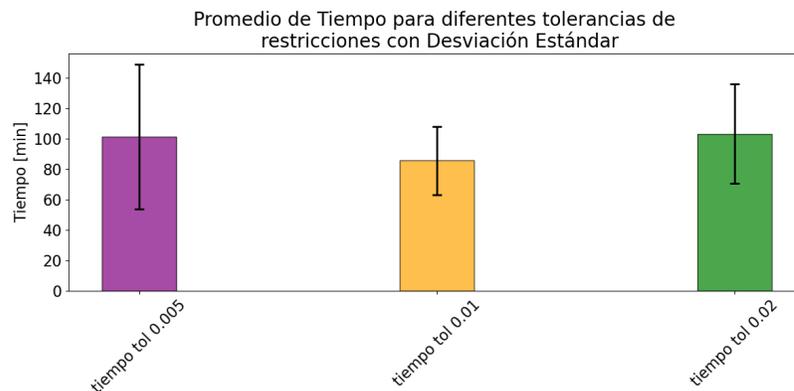


Figura 6.21: Análisis de sensibilidad para tolerancia de restricciones sobre tiempo

Una vez seleccionados los dos parámetros, se obtiene la comparativa entre modelo y datos experimental, los datos completos se pueden encontrar en el Anexo C. Para efectos de acercar aún más a la realidad el modelo, se evalúan aquellas reacciones que generan un mayor aporte al SSR total de 828,9, o en otras palabras, aquellas donde la diferencia entre realidad y modelo es mayor. En la Tabla 6.7 se resumen las 9 reacciones consideradas y sus respectivos datos.

Tabla 6.7: Reacciones con mayor discrepancia entre modelo original y realidad

Resumen mayores SSR				
Nombre reacción	ID reacción	SSR	Data experi	Data modelo
hexokinase (D-glucose:ATP)	r_0534	392,040	19,800	0,000
fructose-bisphosphate aldolase	r_0450	108,039	19,093	8,699
sedoheptulose 1,7-bisphosphate D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase	r_0990	76,185	-0,029	8,699
transaldolase	r_1048	69,421	0,181	-8,151
glutamine synthetase	r_0476	31,693	6,107	0,478
glutamate synthase (NADH2)	r_0472	29,668	5,447	0,000
glutamate dehydrogenase (NAD)	r_0470	26,105	5,109	0,000
nucleoside diphosphate kinase	r_0800	21,643	0,127	4,780
adenylate kinase	r_0148	16,022	0,001	4,004

6.2.2.3. Ajuste 1: Producción de D-glucosa-6-fosfato

Basándose en la Figura B.1 para el metabolismo central de glucosa, se visualiza que hay reacciones análogas entre *Hexokinase (D-glucose:ATP)* (r_{0534}) y *ATP:D-glucose 6-phosphotransferase* (r_{4235}). Si bien ambas reacciones requieren los mismos metabolitos secundarios (ATP) en estequiometría idéntica, el modelo determina que el flujo de glucosa debe dirigirse por la reacción r_{4235} . Para efectos de evaluación se estudia si forzar el flujo de glucosa hacia r_{0534} generará cambios en la distribución.

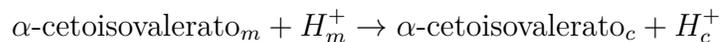
Estableciendo los límites superior e inferior de la reacción r_{4235} en 0, se obtuvo un SSR global de 432,17, logrando una reducción del 52% en el error del modelo. La Tabla 6.8 expone las reacciones con mayor error, a partir de donde se identifica que la modificación realizada no genera un cambio en el resto del metabolismo modelado dado que se mantienen las principales diferencias observadas en el modelo original (Tabla 6.7).

Tabla 6.8: Reacciones con mayor discrepancia entre modelo con reacción r_{4235} bloqueada y realidad

Resumen mayores SSR				
Nombre reacción	ID reacción	SSR	Data experi	Data modelo
fructose-bisphosphate aldolase	r_0450	102,148	19,093	8,987
sedoheptulose 1,7-bisphosphate D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase	r_0990	81,284	-0,029	8,987
transaldolase	r_1048	73,133	0,181	-8,371
glutamine synthetase	r_0476	31,854	6,107	0,463
glutamate synthase (NADH2)	r_0472	29,668	5,447	0,000
glutamate dehydrogenase (NAD)	r_0470	26,105	5,109	0,000
nucleoside diphosphate kinase	r_0800	20,784	0,127	4,686
adenylate kinase	r_0148	14,817	0,001	3,850

6.2.2.4. Ajuste 2: Transportador α -cetoisovalerato

En los resultados de la Sección 6.2.1 se identificó la ausencia de un transportador de 3-metil-2-oxobutanoato (α -cetoisovalerato) desde mitocondria hacia citosol. El rol de este mecanismo de transporte ha sido estudiado hace años por Hutson (S. M. Hutson et al., 1988; S. Hutson y Hall, 1993), quien analizó el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada como Leucina, Isoleucina y Valina en tejido de Ratón, y caracterizó el transportador basado en análisis de pH, como una proteína con mecanismo acoplado al simporte de protones para la extracción de cadenas ramificadas de α -cetoácidos desde mitocondria hacia citosol. Sin embargo, Hammer (Hammer et al., 2020) trabajando en conjunto con Avalos en la producción de alcoholes con cadena ramificada como el Isobutanol e Isopentanol, declaran que el transportador de α -cetoisovalerato no ha sido identificado o caracterizado en *S.cerevisiae*, pero se trabaja conociendo su aporte en el transporte de cadenas ramificadas de α -cetoácidos. Con propósito de verificar esta afirmación se realizó una búsqueda bibliográfica, que si bien a priori no encuentra una caracterización detallada, se da con la investigación de Generoso (Generoso et al., 2017) quienes accidentalmente identifican el gen JEN 1 como un posible transportador de α -cetoisovalerato. Este gen codifica proteína de simporte protón/monocarboxilato ubicada en el plasma de membrana (SGD, s.f.). Finalmente, a partir de la investigación bibliográfica realizada, se determina incorporar la reacción de transporte dentro del modelo acorde a la siguiente estequiometría; los subíndices c y m referencian los compartimentos celulares citosol y mitocondria, respectivamente:



En la Ruta de Isobutanol diseñada en Escher queda incorporado acorde a la Figura 6.22:

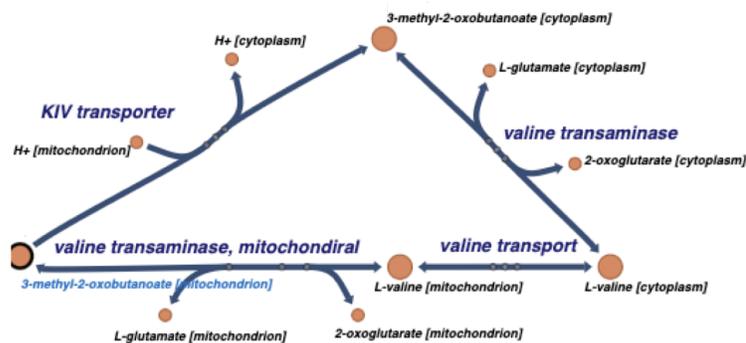


Figura 6.22: Transportador α -cetoisovalerato en diagrama Escher

Una vez realizado el ajuste, se verifica un leve cambio en el error de modelo, obteniendo un SSR de 432,71 equivalente a un aumento del 0,12 %. Ahondando en la localización de las principales variaciones generadas, se verifican cambios considerables en las reacciones expuestas en la Tabla 6.9. El transporte de piruvato desde Citosol hacia Mitocondria aumenta un 13,88 % (reacción dependiente de protones), disminuye en un 16,69 % el intercambio oxoglutarato/malato entre Citosol y Mitocondria, la reducción de oxalacetato a malato en citosol disminuye un 29,14 %. El transporte de L-Glutamato desde citosol hacia Mitocondria disminuye un 55,39 %. La transferencia de un grupo fosfato desde dATP hacia una molécula de GMP intermediada por H^+ disminuye un 66,67 %. Finalmente, los mayores cambios se dan en las reacciones de Valina, donde en el Ajuste 1 se consumía α -cetoisovalerato mitocondrial para producir Valina, mientras que una vez incorporado el transportador de α -cetoisovalerato, la reacción cambia de dirección consumiendo Valina (esta reacción es intermediada por L-Glutamato/2-oxoglutarato) y presenta una disminución del flujo neto de 119,7 %. En paralelo en Ajuste 1 la Valina es exportada desde mitocondria hacia citosol, mientras que en Ajuste 2 la dirección es inversa pero el flujo neto disminuye un 119,7 %.

Tabla 6.9: Reacciones con mayor diferencia entre Ajuste 1 y Ajuste 2

ID reacción	Nombre	Variación respecto al Ajuste 1
r_2034	pyruvate transport	13,88 %
r_2132	oxoglutarate/malate exchange	-16,69 %
r_0714	malate dehydrogenase, cytoplasmic	-29,14 %
r_1194	L-glutamate transport	-55,39 %
r_0529	guanylate kinase (GMP:dATP)	-66,67 %
r_1088	valine transaminase, mitochondrial	-119,70 %
r_2093	valine transport	-119,70 %

6.2.2.5. Modelo final

La incorporación del transportador de α -cetoisovalerato no cambia las reacciones con mayor discrepancia respecto a los datos experimentales (resultados de Tabla 6.8). Los metabolismos con conflictos son la Ruta de Pentosas-fosfato y del aminoácido L-Glutamina.

6.2.3. Análisis Implementación 1 dFBA

Se ejecutó el modelo dFBA_EFL en dos ocasiones y se encontró que exactamente el mismo código genera soluciones distintas, por lo cual se decidió evaluar la baja estabilidad del problema de optimización planteado. Como variable de decisión se optó por estudiar la desviación estándar del conjunto de soluciones hasta que el valor de la desviación se estabilice, en las variables temporales definidas en el dFBA: Concentración de Glucosa, Biomasa, Oxígeno consumido, Etanol e Isobutanol. Un total de 16 casos fueron evaluados hasta que se alcanza la estabilidad deseada, y sus dinámicas de comportamiento individuales se encuentran adjuntas en el Anexo D.

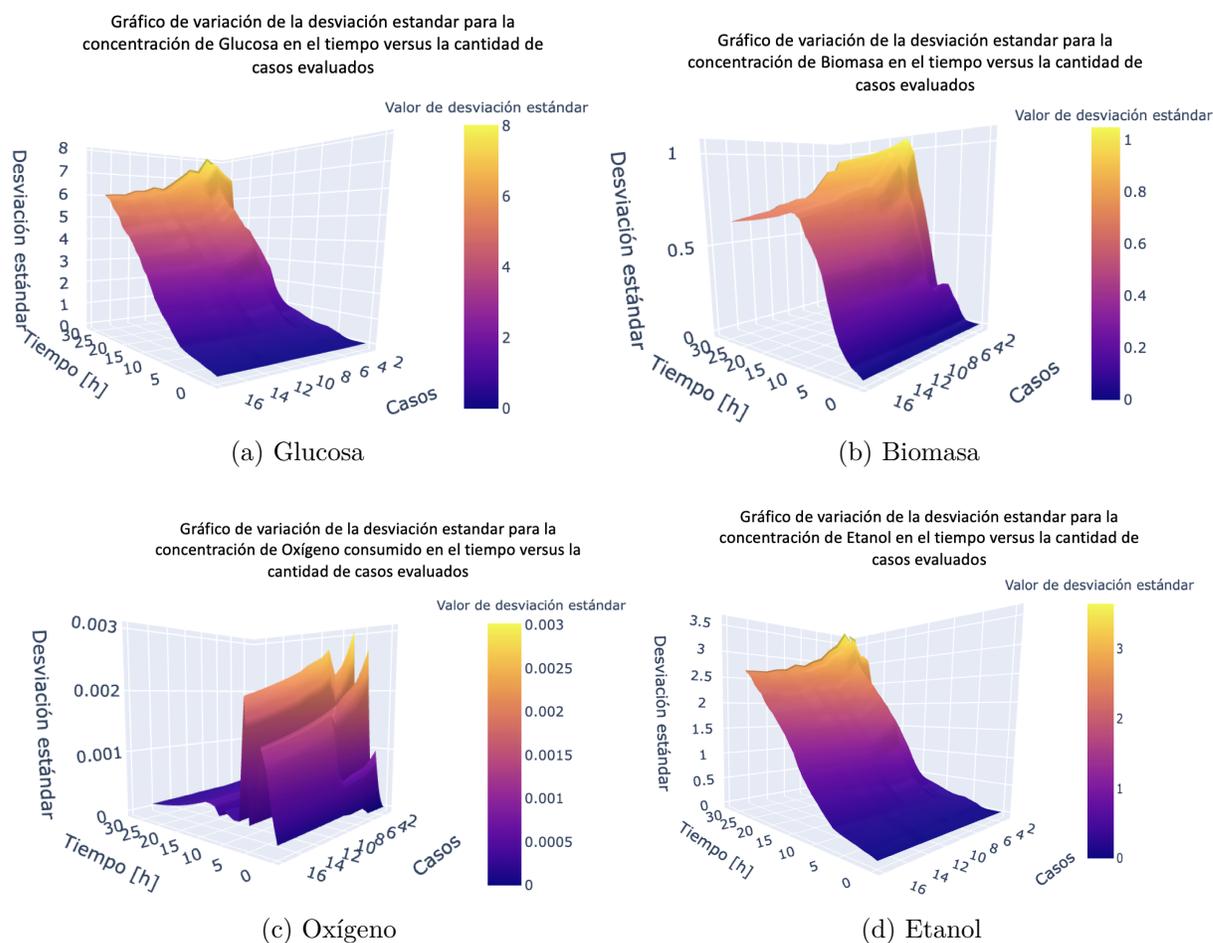
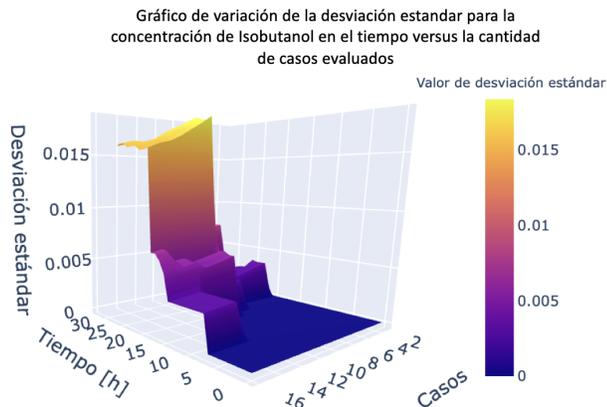


Figura 6.23: Gráficos variación de la desviación estándar en el tiempo versus la cantidad de casos evaluados: Parte 1

A partir de las Figuras 6.23.a,b,d se visualiza una estabilidad de la desviación estándar para cada unidad de tiempo considerada como conjunto, a partir de los 13 casos evaluados. A diferencia de estos, en la Figura 6.23.c no hay un comportamiento paulatino hacia el aumento

de la desviación a medida que se avanza en la simulación, sino que destaca peaks máximos a las 3 y 6 horas. El resultado para Isobutanol en la Figura 6.24.a no provee de resultados interpretables, por lo cual es necesario analizar en detalle el fenómeno de producción de este metabolito.



(a) Isobutanol

Figura 6.24: Gráficos variación de la desviación estándar en el tiempo versus la cantidad de casos evaluados: Parte 2

En las Figuras 6.25 y 6.26 se visualiza la comparativa de las ejecuciones obtenidas, separadas por tipo de variable. A partir de este resultado se visualiza los problemas de reproducibilidad asociados al método, principalmente para el parámetro de Isobutanol en la Figura 6.26.

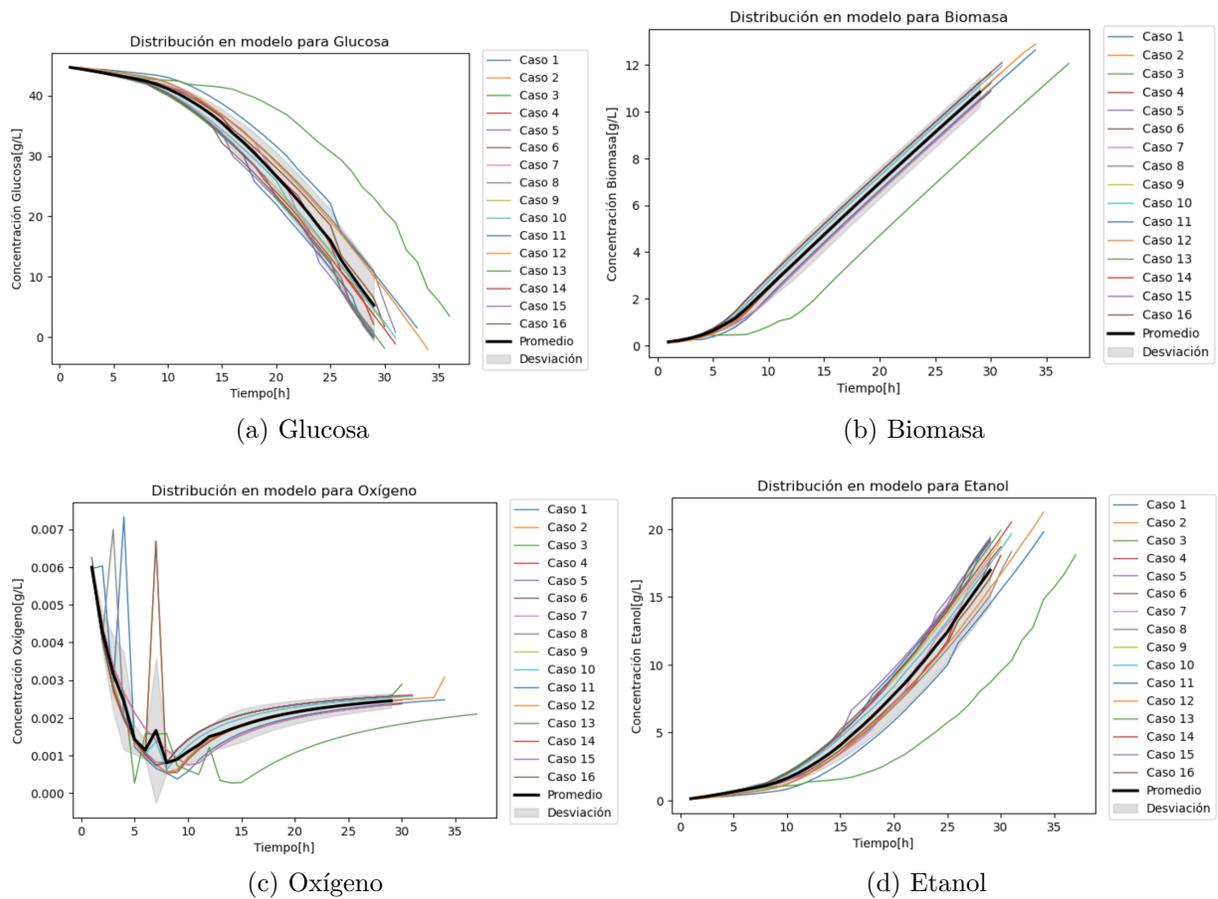
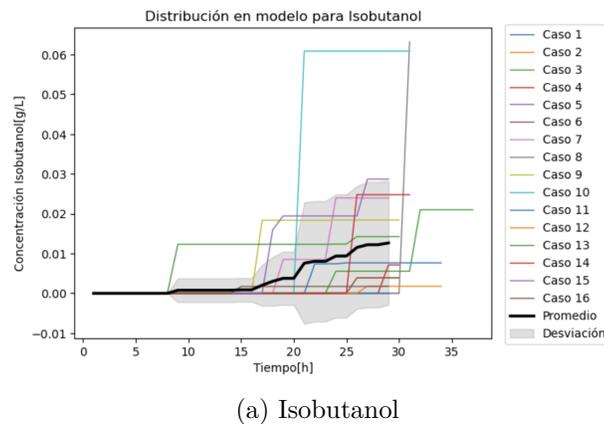


Figura 6.25: Gráficos conglomerados para dinámica: Parte 1



(a) Isobutanol

Figura 6.26: Gráficos conglomerados para dinámica: Parte 2

6.2.4. Análisis Implementación 2 dFBA

Dada la alta dispersión de los resultados obtenidos y la baja replicabilidad de estos, el diseño de la metodología para realizar la Implementación 2 de dFBA tomó posición. El primer resultado generado es determinar la línea base del modelo, en otras palabras, se modela con un medio de cultivo no específico y sin reacciones o genes eliminados. Para

efectos de investigación, se generó resultados con función de minimización y maximización de Isobutanol.

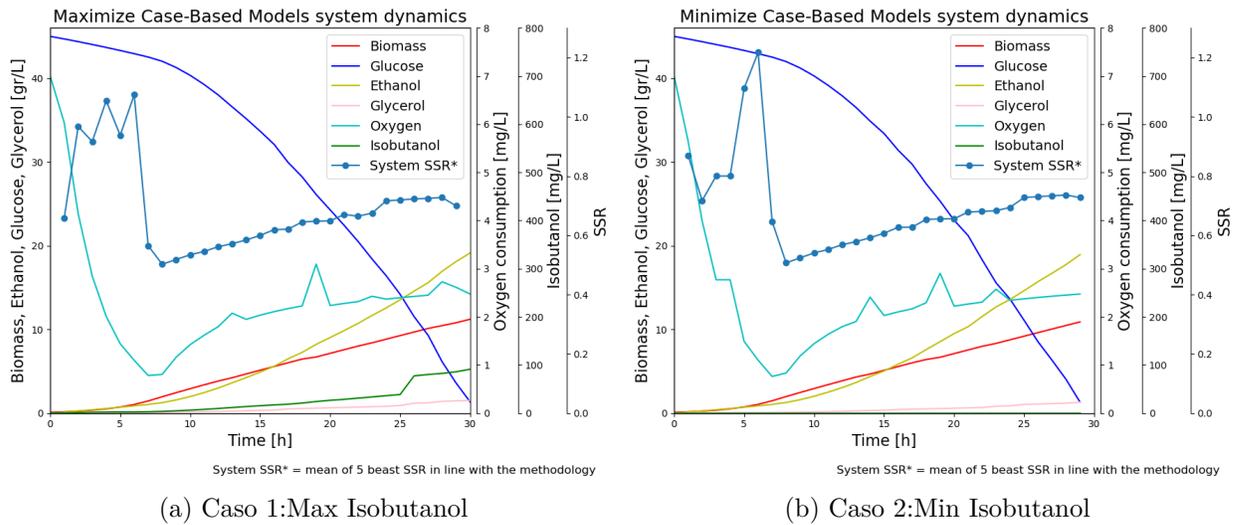


Figura 6.27: Gráficos dinámica de sistemas en modelos de caso base

La comparativa del cambio del SSR por caso de minimización y maximización, entre la primera y segunda metodología de dFBA implementado se encuentran graficadas en la Figura 6.28

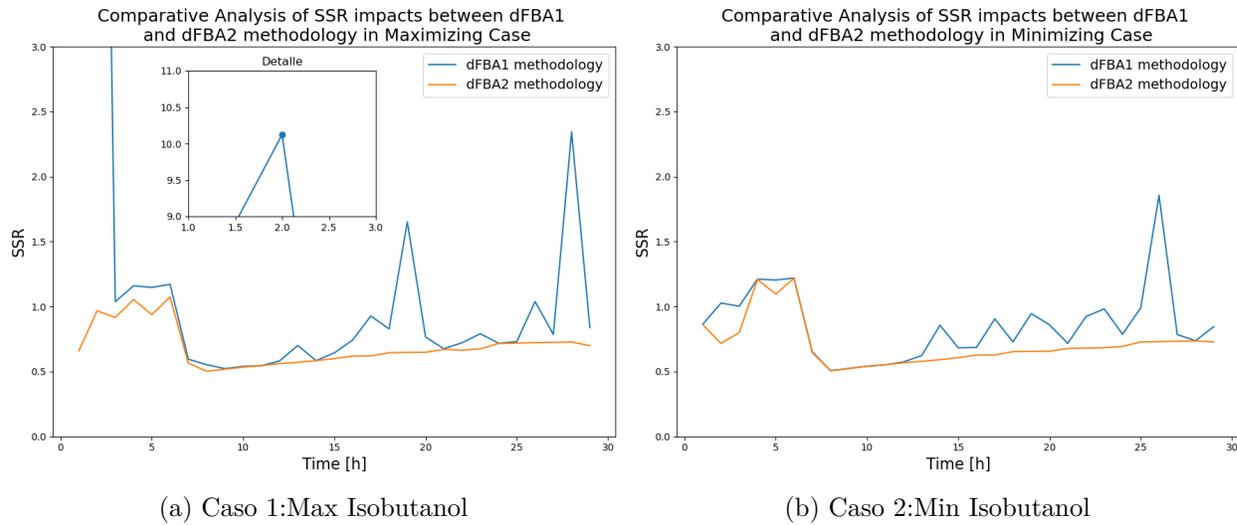


Figura 6.28: Gráficos comparativo de SSR respecto a las dos metodologías implementadas

6.2.5. Modelamiento casos de estudio

Para verificar la aplicabilidad del modelo, se ejecutaron casos de estudios duplicados a los publicados en bibliografía, tal de poder contar con datos empíricos con los cuales comparar los resultados. Para esta sección del trabajo se utilizó la publicación realizada por Wess (Wess

et al., 2019) como referencia de los casos de estudio. Todos los modelos fueron realizados con condiciones iniciales:

- Concentración Glucosa = 40[gr/L]
- Concentración Oxígeno = 0,007[gr/L]
- Concentración Biomasa = 1,5[gr/L]
- Concentración Isobutanol = 0[gr/L]
- Concentración Etanol = 0[gr/L]

Wess señala en su metodología un inicio de cultivo fermentativo con OD menor a 3. Considerando un estimado de 1 OD = 0,62[gr/L] (BioNumbers, s.f.), se establece el valor de 1,5[gr/L] como concentración de biomasa inicial. La concentración de glucosa es directa desde la publicación.

6.2.5.1. Medio de cultivo definido

El primer caso modelo fue definir el medio de cultivo empleado. Realizando un estudio de la bibliografía en que fue basado el trabajo, se determina que el medio de cultivo fue construido con base a lo publicado por Zimmermann (Zimmermann, 1975), que empleó un medio sintético suplementado con: Adenine Sulfate 10[mg/L], L-Arginine 10[mg/L], L-Histidine 10[mg/L], L-Isoleucine 60[mg/L], L-Leucine 60[mg/L], L-Lysine 10[mg/L], L-Methionine 10[mg/L] y Uracil 10[mg/L]. Si bien el medio original contiene L-Valine, esta corresponde a un mecanismo de selección auxótrofo para la cepa de Wess, por lo que no es incluida en el medio de cultivo. Los flux considerados como límites máximos de cada suplemento se encuentran resumidos en la Tabla 6.10. Se consideró como supuesto fuerte, que estos suplementos contarán con una alimentación constante durante todo el período de fermentación.

Tabla 6.10: Composición suplementos de medio sintético modelado

	Conc. Medio	PM	Flux máximo
	mg/L	gr/mol	mmol/[gDW*h]
Adenine Sulfate	10	184,17	0,036
L-Arginine	10	174,2	0,038
L-Histidine	10	155,15	0,043
L-Isoleucine	60	131,17	0,305
L-Leucine	60	131,17	0,305
L-Lysine	10	146,19	0,046
L-Methionine	10	149,21	0,045
Uracil	10	112,08	0,059

Este caso de estudio produce 201[mg/L] de Isobutanol, 712 [mg/L] de Glicerol, y 7,87 [gr/L] de Biomasa durante un período de fermentación de 14 horas en los cuales consume la totalidad de los 40[gr/L] de Glucosa iniciales. La definición del medio de cultivo muestra un cambio en la tasa de consumo de oxígeno por unidad celular, respecto al caso base. La dinámica de este caso de estudio se grafica en la Figura 6.29.

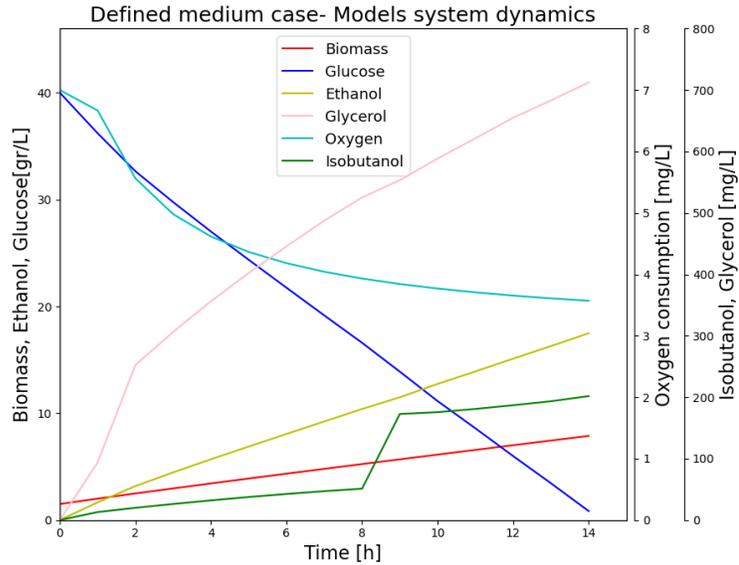


Figura 6.29: Dinámica en el tiempo de Caso Medio definido

6.2.5.2. Medio de cultivo definido con enzimas ILV expresadas en citosol

Para efectos de un análisis completo de las consecuencias de cada una de las modificaciones sobre la cepa, se modeló el caso con Medio de cultivo definido junto con la expresión de las enzimas ILV2, ILV3 e ILV5 en citosol (ver Figura 6.30). Esta es la cepa "base" sobre la cual Wess realizaría los siguientes Knock-outs de su investigación.

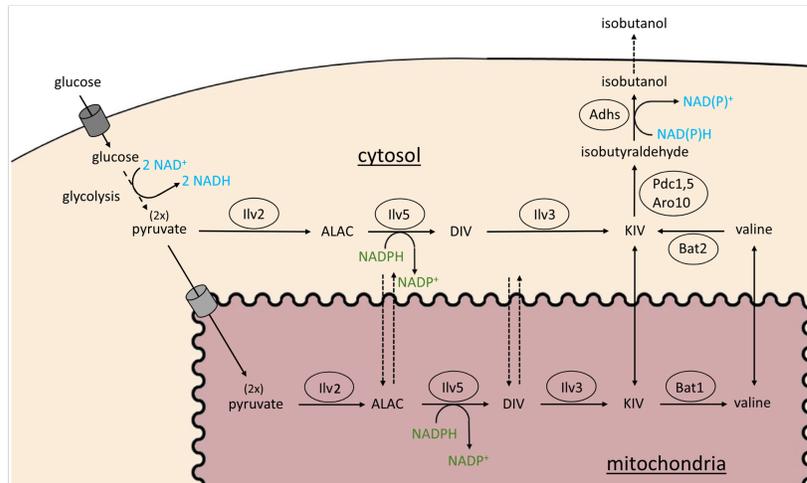


Figura 6.30: Esquema de expresión citosólica de enzimas ILV2, ILV3 e ILV 5 (Imagen modificada desde (Wess et al., 2019))

La dinámica de este caso de estudio se grafica en la Figura 6.31, donde alcanza una producción de 522[mg/L] de Isobutanol, lo que equivale a un aumento en 322[mg/L]. Adicionalmente, la producción de Glicerol ver un leve estancamiento alcanzando una producción de 698[mg/L]. La cantidad de Etanol y Biomasa producida son de 16,8[gr/L] y 7,52[gr/L], respectivamente.

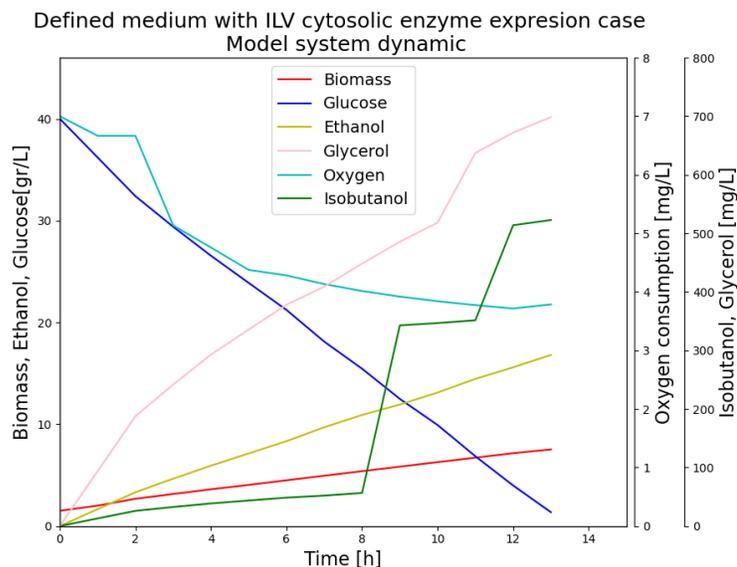


Figura 6.31: Dinámica en el tiempo de Caso Medio definido con expresión citosólica de enzimas ILV

6.2.6. Comparativa casos de estudio

Para estudiar los cambios metabólicos que generarían las modificaciones realizadas entre un caso y otro, se emplea la metodología descrita en la Sección 5.2 para construir una visualización de los mayores cambios experimentados en formato de grafo sin dirección.

6.2.6.1. Caso Base v/s Caso Medio Definido

El estudio del cambio en el metabolismo entre el Caso Base y el Caso con Medio definido reporta 7 clusters o grupos de principales variaciones (para detalles de cada cluster ver Anexo E). Respecto a cada uno de estos grupos, se destacan los siguientes resultados:

- El Cluster 0 muestra una disminución en la actividad del metabolismo asociado a los aminoácidos de Cisteína y Metionina.
- El Cluster 1 con 21 reacciones, se relaciona con una disminución de actividad en el metabolismo de producción de aminoácidos de cadenas ramificadas como Valina y Leucina.
- El Cluster 2 demuestra nuevamente disminución en el metabolismo de aminoácidos como Histidina y Arginina, pero también en la producción de nucleótidos de pirimidina.
- El Cluster 3 expone un cambio en el funcionamiento del metabolismo para Pentosas fosfato.
- El Cluster 4 muestra una disminución en el intercambio de Glicina, Alanina y Protones, desde Citoplasma hacia Vacuola.
- El Cluster 5 demuestra una disminución en la biosíntesis de aminoácidos como histidina y lisina, así como en el metabolismo de asimilación de nitrógeno y la biosíntesis de purinas. A la vez que aumenta la descomposición de aminoácidos de cadenas ramificadas como leucina e isoleucina.

síntesis de fosfatidilinositol en citosol y de fosfatidiletanolamina en membrana de Retículo, a la vez de un aumento en el transporte de fosfatidilinositol desde citosol hacia Retículo.

- El Cluster 2 muestra un aumento en la síntesis de ácidos grasos de 18 carbonos en las posiciones 1 y 2 del glicerol, a la par que experimenta una disminución en la síntesis de lípidos con ácido palmítico (16:0), palmitoleico (16:1) y oleico (18:1). Hay una disminución en el transporte de Malonyl-CoA desde citoplasma a membrana de retículo que disminuye de igual manera toda su ruta metabólica (esto afecta el intercambio neto entre NADP⁺/NADPH), se aprecia una significativa reducción en la producción de ácidos grasos (con AMP de producto) a la par de un aumento en el transporte de AMP desde citosol hacia retículo.
- El Cluster 3 conglojera una disminución en la síntesis y transporte de fosfolípido entre las membranas de Retículo endoplasmático y Vacuola.
- El Cluster 4 muestra un cambio en el mecanismo de producción de (R)-mevalonato desde un mecanismo mediado por kinasas (disminuye), a la producción mediante reductasas dependientes de NADP(+) que utilizan por sustrato 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA interconvertido entre mitocondria y citosol (aumenta). A la par de un aumento en la secreción de mevalonato al medio extracelular (intermediario para biosíntesis de isoprenoides y esteroides). Aumento de difusión de agua hacia el Citoplasma desde diversos organelos, y aumento en la secreción hacia extracelular. Desintoxicación de 2-phenylethanol. Una disminución en la producción de L-Glutamato a partir de L-glutamic 5-semialdehyde.
- El Cluster 5 muestra una disminución en la producción de 2-methylbutanol a la par de un aumento en el proceso de desintoxicación celular.
- El Cluster 6 expresa un aumento de actividad en mecanismos asociados a la homeostasis del pH y la síntesis de fosfolípidos.
- El Cluster 7 muestra una disminución en la actividad de síntesis y transporte de fosfolípidos entre las membranas de Retículo y Golgi.
- Respecto al Cluster 8 hay un aumento en la producción, degradación y secreción de Isobutanol, una disminución considerable en el transporte de CO₂ entre citoplasma y mitocondria. Además una disminución en la síntesis y transporte de fosfolípido entre retículo y mitocondria
- En el Cluster 9 se nota un aumento en la producción de glycerol 3-phosphate a partir de glicerona, en paralelo a una disminución en la actividad del metabolismo de las pentosas fosfato (ambos procesos consumen como intermediario dihydroxyacetone phosphate)
- El Cluster 10 consiste en una disminución del transporte de fosfatidatos y diglicéridos entre Retículo y Golgi, mientras que hay una disminución en la producción diglicéridos en Golgi y un aumento en Retículo.
- El Cluster 11 expresa un aumento en la desintoxicación de ion amonia.
- Finalmente, el Cluster 12 muestra un aumento en la actividad del succinyl dentro del TCA, y una disminución en el equilibrio de ácidos grasos mediados por carnitina.

Capítulo 7

Discusión

7.1. Trabajo en laboratorio

7.1.1. Diagnóstico cepas y plásmidos

El diagnóstico de las cepas que se encontraban almacenadas a -80°C desde los trabajos desarrollados anteriormente en CeBiB, entregan resultados negativos para la presencia del gen de resistencia a G418 en las 15 colonias estudiadas. Dado que los controles negativos se encontraban limpios, y la amplificación al promotor constitutivo tHXT7 demuestra que el DNAg se encuentra en buen estado, se descartan estas cepas para la continuación del trabajo dado que la definición genómica declarada por anteriores autores no se condice con el material rescatado. Resultados en las Figuras 6.1 y 6.2.

Paralelo a la reanimación de cepas, se realizó diagnóstico del estado de clusters de integración pBS-ADH y pBS-Cluster perpetuados en *E.coli* que también se encontraban a -80°C . Los resultados para pBS-ADH sugiere la presencia de otro material plasmidial en la alícuota dado que el tamaño del vector obtenido fue de 2000pb, mientras que el tamaño del vector pBS-ADH se estima en 5280pb (módulo ADH y backbone del vector). Por otro lado, los resultados para el vector pBS-Cluster son positivos, al corroborarse su tamaño esperado de 10853pb con el gel de agarosa preparado (ver Figura 6.3.b).

A partir de la Figura 6.4, se verifica la presencia del gen para resistencia a G418 de tamaño 818pb en el carril 4, que además se corrobora con el control positivo de pBS-MIR en el carril 3. Respecto a los genes de ADH (carril 2) y SkAro10 (carril 5) se visualiza que la PCR amplifica dos secuencias de ADN claras en los 1000 y 2000 pb. Como hipótesis de interpretación a este resultado, se plantea que el fenómeno tiene su origen en el diseño de los partidores disponibles desde trabajos previos. Los partidores rnADH_FW/RV y KDC_FW/RV fueron diseñados con propósito de construir los módulos ADH y SkARO 10, por lo cual su secuencia es complementaria al final de cada promotor y el inicio de la secuencia de gen, sin embargo, tal como se explicó en el Capítulo 3.1, los genes para alcohol deshidrogenasa y α -cetoácido descarboxilasa se diseñaron con objetivo de una expresión mitocondrial de la ruta metabólica, por lo cual antes de su secuencia cuentan con nucleótidos para el Péptido señal CoxIV. Llevando a que ambos promotores son complementarios a ambos genes, pues la secuencia del péptido señal es idéntica. Esta hipótesis se encuentra ilustrada en la Figura 7.1, y respondería al fenómeno, pues las amplificaciones resultan en tamaños cercanos a los 1119pb de AdhARE1

y 1902pb de SkAro10. Dado este problema metodológico se diseñaron nuevos partidores para identificar cada gen de manera independiente. Los resultados están expuestos en las Tablas 6.2 y 6.3

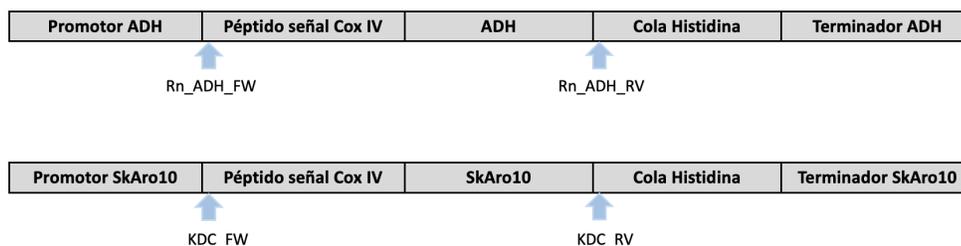


Figura 7.1: Ilustración problema metodológico partidores originales Adh y SkAro10

Una vez se recepcionaron los nuevos partidores, se hizo un diagnóstico final para verificar la presencia de cada gen, y ajustar las temperaturas de annealing de cada PCR. En la Figura 6.5.a se encuentran los resultados para la identificación del gen de resistencia a G418 con los nuevos partidores de KAN. Como se puede ver en la Tabla 5.1 la diferencia de los partidores G418 de trabajos anteriores y KAN290822 es la eliminación de los nucleótidos para acoplamiento por Gibson Assembly. Realizar PCR con los fragmentos de complementariedad exactos elimina del gel de agarosa los residuos de nucleótidos que se identificaban en la base de la imagen, esto debido a que la precisión en la complementariedad de la hebra y el partidor es mayor. Pese a esto, a priori el resultado indicó bandas con un tamaño de 500pb con una intensa coloración roja en cada una. Dada la coloración con redGel realizada, la alta intensidad de color rojo indica una alta emisión UV en la muestra, y por consiguiente un exceso de DNA cargado, lo cual también explica una posible incapacidad del gel para separar el material genético producto de una sobrecarga de este (Biotium, 2021). Por esta razón, se vuelve a realizar una electroforesis, esta vez con el resultado de PCR diluido a razón 1:10. Este resultado muestra bandas con menor intensidad y además de tamaño aproximado a los 800pb, precisamente el tamaño esperado para el gen de resistencia a G418. La metodología de dilución se mantiene para la electroforesis de ADH y SkARo. Tanto en las Figuras 6.6 y 6.7 se obtienen bandas con los resultados esperados, concluyendo con éxito el diagnóstico de los clusters disponibles en CeBiB.

Si bien las cepas de *S.cerevisiae* transformadas no se encontraban con las modificaciones declaradas, los vectores perpetuados en *E.coli* sí contienen el constructo necesario para obtenerlas, razón por la cual se decide realizar un nuevo protocolo de transformación con *S.cerevisiae*.

7.1.2. Transformación *S.cerevisiae*

Durante el proceso de transformación, se observa una capacidad natural de *S.cerevisiae* para contrarrestar los efectos del antibiótico en concentraciones de 100 μ g/mL, este fenómeno ha sido reportado anteriormente por otros autores en distintas cepas de *S.cerevisiae* y en concentraciones de hasta 150 μ g/mL de G418 (Jimenez y Davies, 1980; Lang-Hinrichs, Berndorff, Seefeldt, y Stahl, 1989). La existencia de antecedentes corrobora que el duplicar la concentración de antibiótico fue un paso necesario para re-evaluar el éxito de la transforma-

ción realizada.

La selección con $200\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 es exitosa en demostrar pureza en el control con agua y establecer como control negativo la transformación con el vector vacío. Respecto a la transformantes se identifican colonias viables en 3 de las 8 colonias inicialmente resuspendidas. Un tercer y cuarto proceso de selección fueron llevados a cabo, obteniendo transformantes resistentes hasta $400\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418.

Si bien el PCR colonia mostró presencia de los tres genes en al menos 1 colonia aislada, se consideró que puede existir problemas de complementariedad de los partidores con las hebras dado que este protocolo trabaja sobre todo el material genético de la levadura, pudiendo llevar a una mayor probabilidad de complementariedad inespecífica, y por ende la existencia de falsos negativos. Por este motivo, se estimó que el mecanismo más eficiente para comenzar a analizar las transformantes era primero evaluar si el inserto completo se encontraba en el sitio de inserción deseado. Por esta razón, se procedió a realizar primero un PCR en el WT para la sección UP/DOWN que enmarcan al sitio de inserción y que son homólogas a aquellas que flanquean al inserto. La determinación del control negativo se hizo con un gradiente de temperaturas y amplificó dos bandas de 1000pb y 800b en todo el rango (ver Figura 6.12.a), pero ninguna del tamaño esperado de 1723pb para WT. A partir de este resultado, se determinó que la enzima Taq polimerasa no tiene la procesividad necesaria para amplificar un fragmento de este tamaño, razón por la cual se repitió el protocolo pero esta vez con la enzima Phusion polimerasa (ver Figura 6.12.b), dando un resultado exitoso entorno al tamaño esperado.

Con el protocolo establecido para Phusion, se realizó el PCR para las secciones UP/DOWN del WT y transformantes. Los resultados en la Figura 6.13 indican una amplificación idéntica entre el WT y las transformantes. Sin embargo, revisando el protocolo empleado se identificó un problema metodológico al haber utilizado un tiempo de extensión de solo 2 minutos para el PCR. Este tiempo fue calculado como suficiente para una extensión del fragmento WT de 1723pb, pero puede no haber sido suficiente para el fragmento correspondiente al inserto de 7792pb (considerando que la procesividad de Phusion Polymerase de ThermoFisher es de 2000pb por minuto, se habrían requerido al menos 4 minutos para la amplificación). Como además, las transformantes amplificaron el fragmento aparentemente análogo a WT, se considera como hipótesis una posible inserción heterocigota.

Para obtener mayor información respecto a lo sucedido se amplificaron los tres genes con el protocolo para Phusion, y además se estudió la amplificación que enmarca la zona UP de recombinación y el término del marco de lectura del gen KAN. La amplificación del gen KAN es positiva para las 5 transformantes evaluadas (ver Figura 6.14, carriles 2 al 6), resultado esperable dada la resistencia a $400\mu\text{g}/\text{mL}$ observada en cultivo sólido. Sin embargo, la revisión de la correcta inserción del gen KAN continuo a su promotor en la zona siguiente a la sección de homología UP, ofrece resultados abiertos para discusión.

Los carriles 9 a 13 de la Figura 6.14 muestran un fragmentos de aproximadamente 600pb, cuando teóricamente se esperaba un fragmento de 1711pb correspondientes a la sección señalada por partidores en la ilustración de la Figura 7.2. Al ser este resultado inconsistente con lo esperado, se hizo una revisión del protocolo y nuevamente se identifica un error me-

todoológico, al utilizar T_a de 60°C. Si bien esta temperatura es apropiada para el partidor de KAN, el valor de T_a para el partidores UP22_FW es de 68°C, razón por la cual se discute un posible apareamiento no-específico del partidor dentro del fragmento de DNA, resultando en la amplificación inespecífica obtenida.



Figura 7.2: Mecanismo recombinación homóloga esperado - Detalle módulo KAN

Finalmente, respecto a la Figura 6.15 se observan patrones diferenciadores entre WT y transformantes tanto para ADH como SkAro10. No obstante, para ADH se encuentra una amplificación presente en todas las cepas, que invita a evaluar un nuevo diseño de partidores para esta enzima, o bien un ajuste de las condiciones de PCR para aumentar su especificidad de amplificación. En el caso de SkAro10 la identificación de las bandas no es nítida, pero sí es posible suponer un cambio en el genoma respecto al WT.

7.2. Trabajo de modelamiento

7.2.1. Validación del modelo y análisis de sensibilidad

El trabajo de modelamiento dio inicio con un análisis de sensibilidad de los parámetros de tolerancia que afectarían en la convergencia del proceso de optimización, y una revisión de la estructura metabólica completa de *S.cerevisiae*.

Respecto al análisis de sensibilidad se discute que los resultados de optimización, si bien se ven influenciados por los parámetros de tolerancia de optimizador y de restricciones, el impacto de esta influencia es 1 a 2 ordenes de magnitud menor, por lo tanto no poseen relevancia sobre el resultado numérico. Sin embargo, el tiempo de convergencia necesario puede verse afectado considerablemente por ambos parámetros, con desviaciones promedio de 20 minutos, y máximas de hasta 80 minutos. Por lo tanto, resulta crítico realizar un estudio de sensibilidad respecto al tiempo previo a la aplicación del modelo yETFL (o modelos de similar complejidad) en otras metodologías de análisis metabólico. Esto se debe a que, en cada optimización, el tiempo mínimo requerido para alcanzar la convergencia será de al menos 70 minutos, tiempo considerable por cada iteración que puede conllevar la pérdida de horas de trabajo por cada caso de estudio a realizar.

Los dos ajustes realizados dentro del modelo para mejorar la precisión de desviación respecto a los datos experimentales usados de referencia desde la investigación de Hu (Hu et al., 2023), son cambios que no comprometen la validación del modelo, dado que: i) las reacciones de fosforilación de glucosa son idénticas, probablemente un error desde el modelo Yeast8 original, y ii) el α -cetoisovalerato al ser una molécula de gran tamaño es altamente probable que su transporte sea mediado por un mecanismo activo o de co-transporte, por ello, la investigación realizada construye fundamentos sólidos sobre los cuales modelar la reacción de co-transporte con protones como supuesto. En ambos casos, los valores de SSR obtenidos

respaldan las decisiones tomadas, con una reducción del 52% y un leve aumento del 0,12% del SSR, respectivamente. Como es reportado por Takpho (Takpho et al., 2018), *S.cerevisiae* posee la capacidad metabólica gracias a sus enzimas BAT 1 y 2 de suplir tanto los mecanismos de anabolismo como catabolismo de aminoácidos de cadenas ramificadas como la Valina, por lo cual el cambio en la dirección de flujos solo responde a una adecuación factible por parte del sistema.

7.2.2. Implementación 1 dFBA

La metodología para dFBA 1 fue implementada 16 veces, generando casos de estudio (ver Anexo D) y data suficiente para analizar la estabilidad del modelo y capacidad de simulación de ciertas condiciones fenomenológicas. Los resultados de la Figura 6.23 exponen un aumento constante en la desviación estándar en función del tiempo durante la simulación, y de manera inversa, una disminución de la desviación estándar a medida que se evalúa una mayor cantidad de casos. Respecto al primer fenómeno, se estudia un cambio o *shift* en la tendencia de crecimiento de los valores de desviación en el tiempo 6 de modelo, precisamente el punto donde donde hay un claro cambio en la tendencia de comportamiento del oxígeno (ver pick más alto en las Figuras 6.23.c y 6.25.c). En el tiempo 6 de modelo, el consumo de oxígeno por unidad de biomasa cambia desde una tendencia decreciente a un aumento leve hasta alcanzar un valor estacionario.

La explicación de este fenómeno observado en el modelo viene dado por la ocurrencia del efecto Crabtree dentro del metabolismo de *S.cerevisiae*. Este efecto se define como un "Proceso de degradación de compuestos de fermentación por una célula que presenta un metabolismo respirofermentativo que viene acompañado por una disminución del régimen respiratorio"(Thierie y Penninckx, 2010). Para comprobar la correcta descripción de este fenómeno dentro del modelo, se revisaron que efectivamente sucedieran las dos condiciones claves dadas por la definición:

1. La degradación de compuestos fermentativos trae como consecuencia una disminución en el rendimiento de biomasa producto de la pérdida de glucosa en dichos metabolitos secundarios. Lo anterior se corrobora en la tendencia hasta el tiempo 6 de la Figura 7.3.

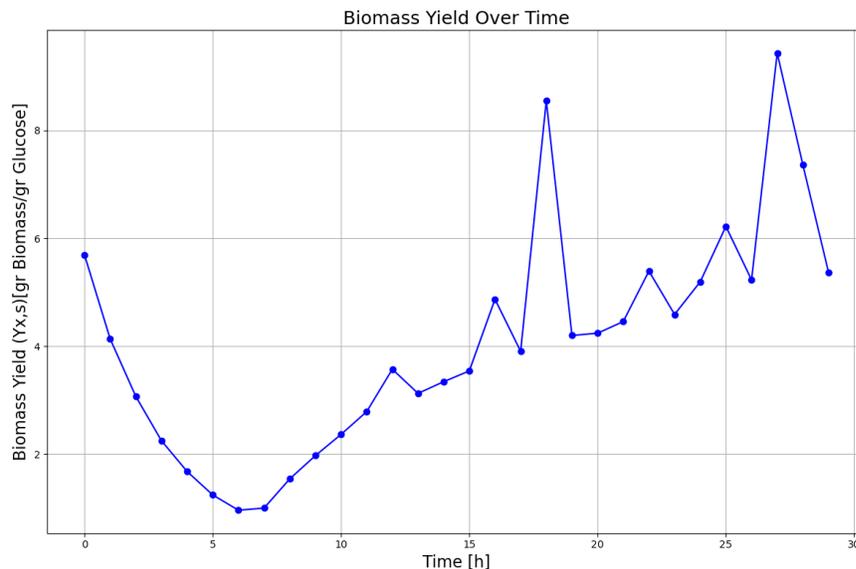


Figura 7.3: Rendimiento de biomasa

- Finalmente, la disminución del régimen fermentativo se puede evidenciar directamente desde los resultados, en las Figuras 6.23.c y 6.25.c.

A partir del análisis anterior, se desprende que el modelo no logra ajustarse de manera estable durante el cambio de metabolismo desde un régimen respirofermentativo a uno aeróbico, lo cual produce cambios o variaciones que se van acumulando a lo largo del tiempo, aumentando la desviación estándar al finalizar la optimización.

Durante la implementación de la primera metodología de dFBA diseñada, se verifica la existencia de un fenómeno que más de un autor a reportado en casos de estudio con otros modelos metabólicos o GEMs: la solución obtenida a partir de un proceso de optimización no corresponde a una única combinación de flujos óptimos, sino que es un espacio de soluciones dentro de las cuales el sistema encuentra optimalidad bajo las restricciones y funciones objetivos definidas por el investigador (Hu et al., 2023; Antoniewicz, 2021). Lo anterior constituye un problema principalmente tomando en cuenta el resultado de la Figura 6.24, pues comprueba que la metodología de implementación 1 para dFBA no es suficiente para ser empleada como mecanismo para la optimización de la producción de un metabolito de interés, ya que genera resultados con alta variabilidad y sin patrones posibles de interpretar (no es replicable). Es por esta razón, y dado que constituye el principal objetivo del presente trabajo de título, que se desarrolla una segunda metodología.

7.2.3. Implementación 2 dFBA

La segunda metodología implementada responde a dos problemas que deja abiertos la discusión anterior: i) La baja replicabilidad de los resultados y ii) la incerteza respecto a la veracidad de las soluciones obtenidas.

La definición de un modelo base que se obtiene a partir de la comparación permanente entre el metabolismo empírico de *S. cerevisiae* y los resultados de modelo, junto con la selección en cada unidad de tiempo de aquellas soluciones con mejor representatividad de la realidad

dentro del espacio de soluciones, responden directamente a las deficiencias de la metodología anterior. A modo de corroboración de esta segunda metodología, los resultados expuestos por la Figura 6.27 muestran una clara diferencia en el error del modelo antes y después del punto de inflexión dado por el cambio metabólico presumiblemente provocado por el Efecto Crabtree. Esta diferencia de comportamiento viene dada porque los datos experimentales obtenidos por Hu (Hu et al., 2023) fueron obtenidos durante un crecimiento fermentativo dentro de un sistema batch, razón por la cual, lógicamente el error del modelo respecto a dicho set de datos será mayor. Este hecho no necesariamente quiere decir que el modelo sea poco confiable durante dicho proceso respirofermentativo, sino que se requiere un set de datos adicionales obtenidos a partir de un crecimiento que evidencia el cambio de metabolismo.

A partir de la Figura 6.28 se evidencia la efectividad del cambio metodológico en obtener soluciones con menor cantidad de 'ruido' o errores, los cuales fueron amortiguados y resultan en un modelo predictivo más estable.

En general, los valores de producción de Isobutanol predichos por yETFL junto con la metodología implementada en el caso de expresión citosólica de las enzimas ILV, son superiores respecto a lo reportado en bibliografía. Lee (Lee et al., 2012) reporta 17[mg/L] de Isobutanol en una cepa análoga pero bajo condiciones micro aeróbicas de crecimiento, y Brat (Brat et al., 2012) reportó 19,4[mg/L] en un proceso aeróbico, en cambio el modelo predice valores de producción al rededor de los 500[mg/L]. Analizando en detalle los supuestos utilizados, se observó que el modelo ejecutado corresponde a un sistema fedbatch con alimentación constante de aminoácidos, tal que su concentración sea constante a través del tiempo. Además, dada la alta densidad celular del medio, el modelo se ejecuta siempre bajo condiciones micro aeróbicas. No se encuentra ninguna investigación que haya utilizado una técnica de alimentación y aereación con las características descritas, por lo tanto no es posible comparar el resultado de manera fidedigna.

7.2.4. Caso de estudio: Medio sin definir v/s Medio definido

Respecto a los casos de estudios modelados, la definición de un medio de cultivo sintético suplementado con aminoácidos permitió aumentar en un 200% la producción de Isobutanol, llegando a 201[mg/L], pero en contraste reduce la producción de Glicerol a la mitad generando solo 712[mg/L] y la Biomasa pasando de 11,2[gr/L] a 7,87[gr/L]. Es decir, aumenta el rendimiento de isobutanol respecto a la biomasa producida. Una menor producción de Biomasa bajo la presencia de Arginina, Isoleucina, Leucina, Metionina o Triptófano (todos parte del medio definido en el modelo) ha sido reportada en *S.cerevisiae* (Fairbairn et al., 2017), lo cual respalda la hipótesis de un decrecimiento producto de efectos metabólicos a raíz de los aminoácidos definidos en el medio de cultivo.

Gracias al análisis desglosado a partir del grafo de la Figura 6.32 es posible explicar de manera más detallada los cambios metabólicos ocurridos. En general, se analiza una disminución en la actividad metabólica asociada a la producción de aminoácidos (Cluster 0,1,2,5), hecho que parcialmente se ve explicado por que estos metabolitos ahora son provistos en el medio de cultivo. A la par, se deja ver un aumento en la producción de metabolitos asociados al almacenamiento energético dentro de la célula, como son el aumento en la producción de fosfolípidos del Cluster 7 (aumento de más del 2000% al final del proceso de fermentación).

Un análisis en profundidad al Cluster 7 permitió identificar que existe un cambio en el organelo de producción del phosphatidylethanolamine (PE), puesto que en el caso con Medio definido sin expresión de ILVc, es producido y transportado desde Vacuola y Golgi, en contraste con el medio sin definir que es principalmente producido en Mitocondria (ver Anexo G para resultado detallado). Este fenómeno corresponde a una acción compensatoria por parte de la célula puesto que la Mitocondria presenta una disminución de la cantidad de protones disponibles (co-factor metabólico para la síntesis de PE) producto de la adopción de un régimen fermentativo completo explicado por la casi nula actividad de la enzima ATP syntase, que constituye la principal fuente de protones en dicho organelo (ver Tabla 7.1). La capacidad conjunta de Vacuola y Golgi para la producción de PE no logran equiparar la capacidad mitocondrial para el mismo proceso, razón por la cual la biodisponibilidad de cadenas lipídicas para la generación de biomasa es menor (ver Figura 7.4 y 7.5).

Tabla 7.1: Cambios en el flux de ATP syntase (r_0226)

Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
r_0226 (case 1)	6,741	1,318	2,394	4,036	0	0,042	0	0	0,008	0	0,004	0	0	0
r_0226 (case 2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,33E-13	0	0	0

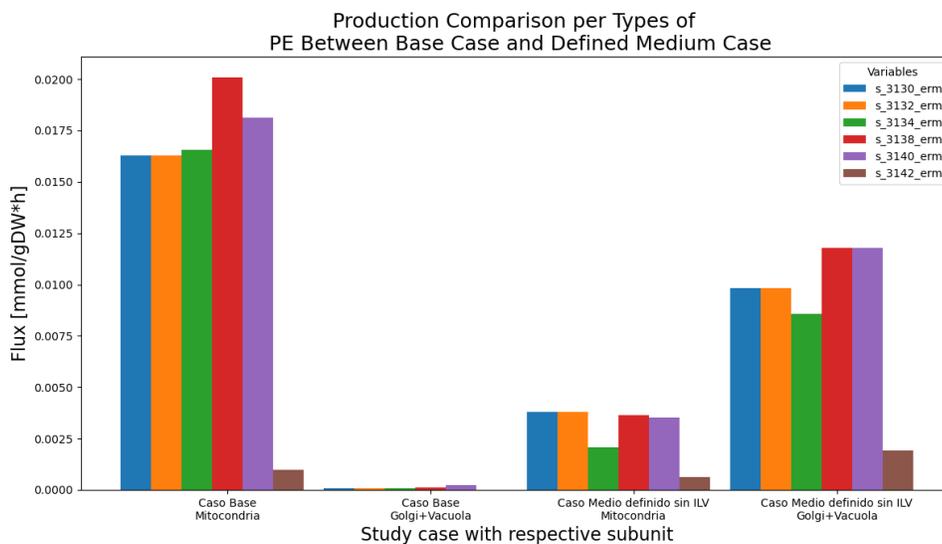


Figura 7.4: Comparación en la producción de distintos tipos de PE entre Mitocondria y Golgi+Vacuola, por caso de estudio

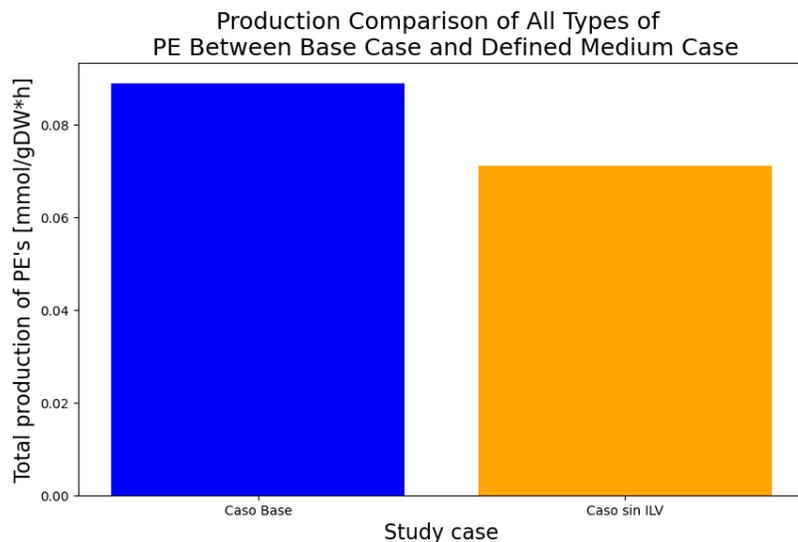


Figura 7.5: Comparación en la producción Total entre los diferentes tipos de PE, por caso de estudio

7.2.5. Caso de estudio: Medio definido con y sin expresión citosólica de enzimas ILV

El segundo caso de estudios se enfocó en evaluar los efectos metabólicos de la expresión citosólica de las enzimas ILV2, ILV3, e ILV5. Estas modificaciones genéticas teóricamente permiten la producción de 522[mg/L] de Isobutanol, aumentando en un 259 % la producción desde un medio suplementado con aminoácidos, y un 573 % desde un WT. La cantidad de biomasa producida se mantiene en un valor reducido de 7,52[gr/L].

En la Figura 7.6 se comprueba que el incremento en la producción de Isobutanol se produce por la actividad de la ruta citosólica expresada (ILV3_citosol). Además, pareciera que se deben cumplir condiciones particulares para la activación o preferencia por esta vía metabólica, y únicamente cuando se encuentra activa interfiere sobre el metabolismo de la Valina (reacciones r_1087 y transportador de KIV). Queda abierto el cuestionamiento si esta condición es una limitante del modelo, o bien experimentalmente la actividad de la ruta exógena está sujeta a una condición metabólica.

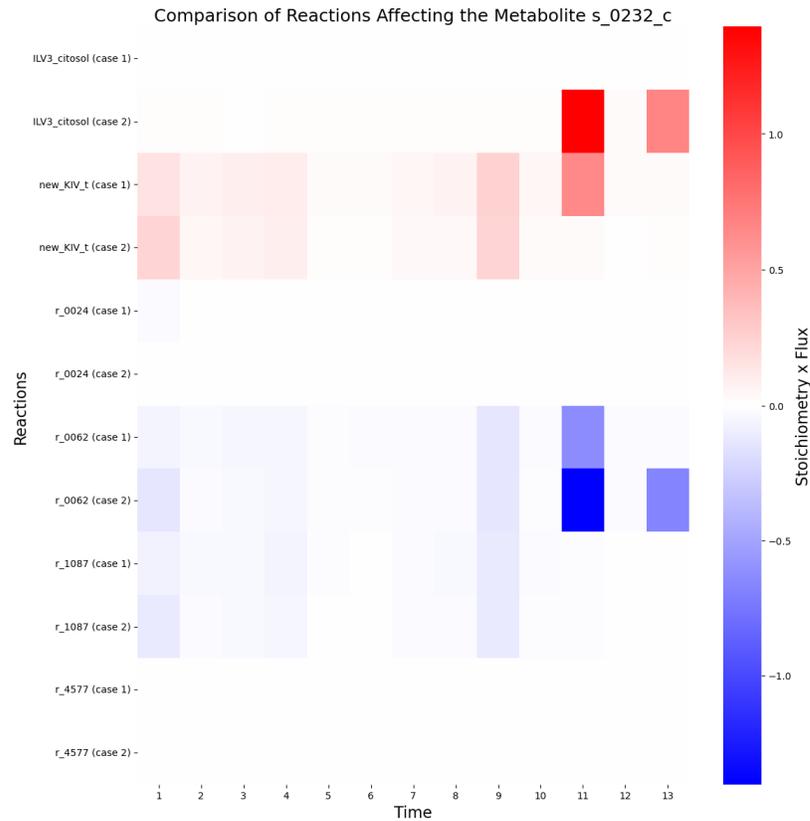


Figura 7.6: Comparación de las reacciones de 2-metil 2 -oxobutanoato citosólico (s_0232_c)

Desde el Cluster 0 es relevante notar la disminución en un 365 % del transporte de Piruvato desde Citoplasma a Mitocondria (r_2034), el cual se explica producto de la expresión de la enzima ILV2 en citosol, la cual posee como sustrato este metabolito. En paralelo se da una disminución en la actividad mitocondrial de las enzimas ILV2, ILV3 e ILV5. Pese a la disminución en la cantidad de Piruvato mitocondrial, la actividad de la piruvato deshidrogenasa (r_0961), productora de Acetil CoA, no se ve disminuida, no así fue el caso de la enzima mállica (r_0719) que ve disminuida su actividad en 1776 %; esta enzima produce (S)-malato (parte del TCA) desde Piruvato. Cabe destacar que se ve compensada por rutas citosólicas de producción de (S)-malato.

Capítulo 8

Conclusiones

En el presente trabajo de título se buscó evaluar la optimización de la producción de Isobutanol en cepas recombinantes de *S. cerevisiae* mediante herramientas de Ingeniería metabólica. Para esto se buscó implementar modificaciones en el genoma (específicamente integraciones) para luego validarlas mediante modelamiento *in silico*, que permitiría generar un diseño metabólico para continuar la investigación en el área.

Respecto al trabajo de laboratorio realizado se puede concluir que:

- En CeBiB se encuentran correctamente perpetuados en *E. coli* los vectores de pBS-Cluster con el constructo completo para los 3 genes a integrar (KAN, LIAdh^{are1} y SkAro10)
- Los protocolos de PCR estandarizados con sus respectivos partidores son válidos para estudios únicamente en el vector, pero aún inespecíficos para el estudio de la presencia de genes exógenos desde el genoma.
- Es necesario re-caracterizar las transformantes obtenidas considerando mejoras como: correcto tiempo de extensión para fragmento heterólogo, estudio de inserción heterocigota dentro del genoma, altas diferencias de Ta entre partidores de genes y de secciones de integración, y finalmente, aumento de la estrictez en los controles genómicos.

Asociado al trabajo de modelamiento realizado se puede concluir que:

- El modelo yETFL es una herramienta precisa y detallada para el modelamiento y estudio matemático de la dinámica metabólica de *S. cerevisiae*, aunque por sí mismo no es suficiente para realizar estudios detallados. Es necesaria la complementariedad con una metodología de medición de errores a partir de datos empíricos, tal de poder especificar o acotar el espacio de soluciones.
- Un sistema fedbatch con alimentación constante de aminoácidos, de alta densidad celular y con aeración permanente, aunque en régimen fermentativo, se postula como un sistema de producción de Isobutanol que maximiza la producción del metabolito sin modificaciones dentro de su genoma.
- No es posible comparar los resultados obtenidos en el modelo con la literatura, producto del diseño de medio de cultivo y reactor modelado.

- La metodología mediante grafos no dirigidos permite acotar y ahondar en el estudio de los efectos metabólicos que generan modificaciones genómicas, como por ejemplo, expresión de enzimas en compartimentos distintos al natural.
- Un aumento en la biodisponibilidad de protones en mitocondria, y/o el aumento de la capacidad de producción de fosfolípidos por Golgi y Vacuola, se proponen como metodologías para recuperar el rendimiento de biomasa en regímenes completamente fermentativos de crecimiento.

Finalmente, se espera que el presente trabajo logre contribuir en la generación de conocimiento científico para conseguir triplicar la producción de biocombustibles al rededor del mundo, y transicionar de esta manera, a una industria y sociedad más sostenibles.

Bibliografía

- ADM. (2023). *Ehanol*. Descargado 4 Mayo 2023, de <https://www.adm.com/en-us/products-services/industrial-biosolutions/products/ethanol/>
- Alasfour, F. N. (1997). *No x emission from a spark ignition engine using 30 % iso-butanol±gasoline blend: Part 1D preheating inlet air*.
- Antoniewicz, M. R. (2021, enero). A guide to metabolic flux analysis in metabolic engineering: Methods, tools and applications. *Metabolic Engineering*, 63, 2–12. Descargado 2024-06-06, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717620301683> doi: 10.1016/j.ymben.2020.11.002
- Apostolakou, A. A., Kookos, I. K., Marazioti, C., y Angelopoulos, K. C. (2009, 7). Techno-economic analysis of a biodiesel production process from vegetable oils. *Fuel Processing Technology*, 90, 1023-1031. doi: 10.1016/j.fuproc.2009.04.017
- ASTM, I. (2023). *Designation: D 6751-08 standard specification for biodiesel fuel blend stock (b100) for middle distillate fuels 1*. Descargado de www.astm.org
- Avalos, J. L., Fink, G. R., y Stephanopoulos, G. (2013, abril). Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves production of branched chain alcohols. *Nature biotechnology*, 31(4), 335–341. Descargado 2023-06-08, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3659820/> doi: 10.1038/nbt.2509
- Ayodele, B. V., Alsaffar, M. A., y Mustapa, S. I. (2020, 2). *An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks* (Vol. 245). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.jclepro.2019.118857
- Bai Flagfeldt, D., Siewers, V., Huang, L., y Nielsen, J. (2009). Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 26(10), 545–551. Descargado 2023-06-23, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/yea.1705> (_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/yea.1705>) doi: 10.1002/yea.1705
- Bank, T. W. (2022). *Citizen engagement*. Descargado 8 Marzo 2023, de <https://www.worldbank.org/en/topic/citizen-engagement>
- Barbieri, E. M., Muir, P., Akhuetie-Oni, B. O., Yellman, C. M., y Isaacs, F. J. (2017, noviembre). Precise Editing at DNA Replication Forks Enables Multiplex Genome Engineering in Eukaryotes. *Cell*, 171(6), 1453–1467.e13. Descargado 2023-06-12, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5995112/> doi: 10.1016/j.cell.2017.10.034
- Barnwal, B. K., y Sharma, M. P. (2005). *Prospects of biodiesel production from vegetable oils in india* (Vol. 9). Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.rser.2004.05.007

- Beato, F. B., Bergdahl, B., Rosa, C. A., Forster, J., y Gombert, A. K. (2016, noviembre). Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. *FEMS Yeast Research*, 16(7), fow076. Descargado 2023-06-09, de <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1093/femsyr/fow076> doi: 10.1093/femsyr/fow076
- BioNumbers. (s.f.). *Correlation relating the od600 to dry weight*. <https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?s=n&v=0&id=111182>. (Accesed: 2024-03-16)
- Biotium. (2021). Descargado de <https://biotium.com/wp-content/uploads/2015/02/PI-41002-41003.pdf>
- Bothast, R. J., y Schlicher, M. A. (2005, 4). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 19-25. doi: 10.1007/s00253-004-1819-8
- Brat, D., Weber, C., Lorenzen, W., Bode, H. B., y Boles, E. (2012, septiembre). Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 65. Descargado 2023-06-14, de <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-65> doi: 10.1186/1754-6834-5-65
- Canter, C. E., Dunn, J. B., Han, J., Wang, Z., y Wang, M. (2016, 3). Policy implications of allocation methods in the life cycle analysis of integrated corn and corn stover ethanol production. *Bioenergy Research*, 9, 77-87. doi: 10.1007/s12155-015-9664-4
- Chen, X., Nielsen, K. F., Borodina, I., Kielland-Brandt, M. C., y Karhumaa, K. (2011, julio). Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnology for Biofuels*, 4, 21. doi: 10.1186/1754-6834-4-21
- Chen, Y., Li, F., y Nielsen, J. (2022, enero). Genome-scale modeling of yeast metabolism: retrospectives and perspectives. *FEMS Yeast Research*, 22(1), foac003. Descargado 2023-06-22, de <https://doi.org/10.1093/femsyr/foac003> doi: 10.1093/femsyr/foac003
- Company, M. . (2022). *Global energy perspective 2022 - executive summary*. Descargado 7 Marzo 2023, de <https://www.mckinsey.com/industries/oil-and-gas/our-insights/global-energy-perspective-2022>
- Economics, T. (2023). *Oil prices*. Descargado 15 Marzo 2023, de <https://tradingeconomics.com/commodity/crude-oil>
- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H. T., Ferreira, A. C., y Bauer, F. F. (2017, diciembre). The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 8. Descargado 2024-06-11, de <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.02554/full> (Publisher: Frontiers) doi: 10.3389/fmicb.2017.02554
- Fallah, S. (2014). *Electric and Hybrid Vehicles - Technologies, Modeling and Control: A Mechatronic Approach*.
- Fang, X., Lloyd, C. J., y Palsson, B. O. (2020, diciembre). Reconstructing organisms in silico: genome-scale models and their emerging applications. *Nature Reviews Microbiology*, 18(12), 731-743. Descargado de <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00440-4> doi: 10.1038/s41579-020-00440-4

- Forex. (2022). *Volatilidad en mercados financieros*. Descargado 15 Marzo 2023, de <https://www.forex.com/es-latam/news-and-analysis/volatilidad-en-mercados-financieros/>
- Generoso, W. C., Brinek, M., Dietz, H., Oreb, M., y Boles, E. (2017, mayo). Secretion of 2,3-dihydroxyisovalerate as a limiting factor for isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 17(3), fox029. Descargado 2023-08-25, de <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox029> doi: 10.1093/femsyr/fox029
- GEVO. (s.f.). *Isobutanol Is a Building Block for Renewable Fuels and Chemicals*. Descargado 2023-06-09, de <https://gevo.com/product/isobutanol/>
- Gold, N. D., Gowen, C. M., Lussier, F.-X., Cautha, S. C., Mahadevan, R., y Martin, V. J. J. (2015, mayo). Metabolic engineering of a tyrosine-overproducing yeast platform using targeted metabolomics. *Microbial Cell Factories*, 14, 73. Descargado 2023-06-22, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4458059/> doi: 10.1186/s12934-015-0252-2
- Group, C. R. E. (2023). *Fuels*. Descargado 4 Mayo 2023, de <https://www.regi.com/products/endura-fuels/infinid>
- Gu, C., Kim, G. B., Kim, W. J., Kim, H. U., y Lee, S. Y. (2019, junio). Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome Biology*, 20(1), 121. Descargado 2023-06-22, de <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1730-3> doi: 10.1186/s13059-019-1730-3
- Guardian, T. (2005). *Oil prices close to record as katrina shuts down production*. Descargado 15 Marzo 2023, de <https://www.theguardian.com/business/2005/aug/30/oilandpetrol.politics>
- Gustafson, C. (s.f.). *History of ethanol production and policy*. Descargado 9 Mayo 2022, de <https://www.ag.ndsu.edu/energy/biofuels/energy-briefs/history-of-ethanol-production-and-policy>
- Hammer, S. K., Zhang, Y., y Avalos, J. L. (2020, marzo). Mitochondrial Compartmentalization Confers Specificity to the 2-Ketoacid Recursive Pathway: Increasing Isopentanol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 9(3), 546–555. Descargado 2023-08-25, de <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00420> (Publisher: American Chemical Society) doi: 10.1021/acssynbio.9b00420
- Hanly, T. J., y Henson, M. A. (2011, febrero). Dynamic flux balance modeling of microbial co-cultures for efficient batch fermentation of glucose and xylose mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(2), 376–385. doi: 10.1002/bit.22954
- Hawkins, A. C., Johnston, G., y Ley, J. (2016, mayo). *Fermentative Isobutanol Production from Woody Biomass and Conversion to IPK*. Descargado 2023-06-09, de <https://wsuwp-uploads.s3.amazonaws.com/uploads/sites/1520/2016/11/HawkinsNWBCC2016.pdf>
- Herrgård, M. J., Swainston, N., Dobson, P., Dunn, W. B., Arga, K. Y., Arvas, M., ... Kell, D. B. (2008, octubre). A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1155–1160. Descargado 2023-06-22, de <https://www.nature.com/articles/nbt1492> (Number: 10 Publisher: Nature Publishing Group) doi: 10.1038/nbt1492

- Hu, M., Dinh, H. V., Shen, Y., Suthers, P. F., Foster, C. J., Call, C. M., ... Maranas, C. D. (2023, marzo). Comparative study of two *Saccharomyces cerevisiae* strains with kinetic models at genome-scale. *Metabolic Engineering*, *76*, 1–17. Descargado 2023-08-17, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717623000010> doi: 10.1016/j.ymben.2023.01.001
- Hutson, S., y Hall, T. (1993, febrero). Identification of the mitochondrial branched chain aminotransferase as a branched chain alpha-keto acid transport protein. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(5), 3084–3091. Descargado 2023-08-25, de <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818536620> doi: 10.1016/S0021-9258(18)53662-0
- Hutson, S. M., Fenstermacher, D., y Mahar, C. (1988, marzo). Role of mitochondrial transamination in branched chain amino acid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(8), 3618–3625.
- IEA. (2020). *Global primary energy demand by fuel, 1925-2019*. Descargado 7 Marzo 2023, de <https://www.iea.org/data-and-statistics/charts/global-primary-energy-demand-by-fuel-1925-2019>
- IEA. (2021). *Net zero by 2050*. Descargado 10 Marzo 2023, de <https://www.iea.org/reports/net-zero-by-2050>
- IEA. (2022). *Biofuels*. Descargado 19 Abril 2023, de <https://www.iea.org/reports/biofuels>
- IEA. (2023). *World energy outlook 2023 free dataset*. Descargado 27 Septiembre 2024, de <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-product/world-energy-outlook-2023-free-dataset-2#data-files>
- IPCC. (2011). *Renewable energy sources and climate change mitigation*. Descargado 8 Marzo 2023, de <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/Chapter-1-Renewable-Energy-and-Climate-Change-1.pdf>
- IPCC. (2019). *Chapter 5 - special report: Climate change and land*. Descargado 5 Mayo 2023, de <https://www.ipcc.ch/srccl/chapter/chapter-5/>
- IPCC. (2021). *2021: Summary for policymakers. in: Climate change 2021: The physical science basis*. Descargado 26 Marzo 2023, de <https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/chapter/summary-for-policymakers/>
- IPCC. (2022). *2022: Summary for policymakers. in: Climate change 2022: Mitigation of climate change*. Descargado 26 Marzo 2023, de https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg3/downloads/report/IPCC_AR6_WGIII_SummaryForPolicymakers.pdf
- Jeswani, H. K., Chilvers, A., y Azapagic, A. (2020). Environmental sustainability of biofuels: A review: Environmental sustainability of biofuels. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *476*. doi: 10.1098/rspa.2020.0351
- Jimenez, A., y Davies, J. (1980, octubre). Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, *287*(5785), 869–871. Descargado 2024-03-20, de <https://www.nature.com/articles/287869a0> (Publisher: Nature Publishing Group) doi: 10.1038/287869a0
- Johnson, C., Moriarty, K., Alleman, T., y Santini, D. (2015). *History of ethanol fuel adoption in the united states: Policy, economics, and logistics*. Descargado de www.nrel.gov/

publications.

- Johnston, G. (2017, febrero). *Alcohol to Jet - Isobutanol*. Descargado 2023-06-09, de <https://www.icao.int/Meetings/altfuels17/Documents/Glenn%20Johnston%20-%20Gevo.pdf>
- Karp, S. G., Murawski de Mello, A. F., Wedderhoff Herrmann, L., da Silva Vale, A., Martinez-Burgos, W. J., Mene Savian, C., y Soccol, C. R. (2022). New Technologies for Bioethanol Production: Patents and Innovation. En C. R. Soccol, G. Amarante Guimarães Pereira, C.-G. Dussap, y L. Porto de Souza Vandenberghe (Eds.), *Liquid Biofuels: Bioethanol* (pp. 489–515). Cham: Springer International Publishing. Descargado de https://doi.org/10.1007/978-3-031-01241-9_20 doi: 10.1007/978-3-031-01241-9_20
- King, Z. A., Dräger, A., Ebrahim, A., Sonnenschein, N., Lewis, N. E., y Palsson, B. O. (2015, agosto). Escher: A Web Application for Building, Sharing, and Embedding Data-Rich Visualizations of Biological Pathways. *PLOS Computational Biology*, 11(8), e1004321. Descargado 2023-06-27, de <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1004321> (Publisher: Public Library of Science) doi: 10.1371/journal.pcbi.1004321
- Kondo, T., Tezuka, H., Ishii, J., Matsuda, F., Ogino, C., y Kondo, A. (2012, mayo). Genetic engineering to enhance the Ehrlich pathway and alter carbon flux for increased isobutanol production from glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 159(1), 32–37. Descargado 2023-06-15, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165612000703> doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.01.022
- Lakshmi, N. M., Binod, P., Sindhu, R., Awasthi, M. K., y Pandey, A. (2021, diciembre). Microbial engineering for the production of isobutanol: current status and future directions. *Bioengineered*, 12(2), 12308–12321. doi: 10.1080/21655979.2021.1978189
- Lang-Hinrichs, C., Berndorff, D., Seefeldt, C., y Stahl, U. (1989, abril). G418 resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of the neomycin resistance genes from Tn5 and Tn903. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 388–394. Descargado 2024-03-20, de <http://link.springer.com/10.1007/BF00296629> doi: 10.1007/BF00296629
- Lee, W.-H., Seo, S.-O., Bae, Y.-H., Nan, H., Jin, Y.-S., y Seo, J.-H. (2012, noviembre). Isobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of 2-ketoisovalerate decarboxylase and valine biosynthetic enzymes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(9), 1467–1475. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0736-y> doi: 10.1007/s00449-012-0736-y
- Liu, X., Bastian, S., Snow, C. D., Brustad, E. M., Saleski, T. E., Xu, J.-H., ... Arnold, F. H. (2012, diciembre). Structure-Guided Engineering of *Lactococcus lactis* Alcohol Dehydrogenase LIAdhA for Improved Conversion of Isobutyraldehyde to Isobutanol. *Journal of biotechnology*, 164(2), 188–195. Descargado 2023-06-23, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3542407/> doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.008
- Lu, H., Li, F., Sánchez, B. J., Zhu, Z., Li, G., Domenzain, I., ... Nielsen, J. (2019, agosto). A consensus *S. cerevisiae* metabolic model Yeast8 and its ecosystem for comprehensively probing cellular metabolism. *Nature Communications*, 10(1), 3586. Descargado 2023-06-22, de <https://www.nature.com/articles/s41467-019-11581-3> (Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group) doi: 10.1038/s41467-019-11581-3
- M, V. B., K, M. M., y G, A. P. R. (2017, octubre). Butanol and pentanol: The promising

- biofuels for CI engines – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 1068–1088. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.038
- Macrelli, S., Galbe, M., y Wallberg, O. (2014, 2). Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. *Biotechnology for Biofuels*, 7. doi: 10.1186/1754-6834-7-26
- MacRelli, S., Mogensen, J., y Zacchi, G. (2012). Techno-economic evaluation of 2 nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. *Biotechnology for Biofuels*, 5. doi: 10.1186/1754-6834-5-22
- Maga, D., Thonemann, N., Hiebel, M., Sebastião, D., Lopes, T. F., Fonseca, C., y Gírio, F. (2019, 2). Comparative life cycle assessment of first- and second-generation ethanol from sugarcane in brazil. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 24, 266-280. doi: 10.1007/s11367-018-1505-1
- Matsuda, F., Ishii, J., Kondo, T., Ida, K., Tezuka, H., y Kondo, A. (2013, diciembre). Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by eliminating competing pathways and resolving cofactor imbalance. *Microbial Cell Factories*, 12, 119. Descargado 2023-06-14, de <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-119> doi: 10.1186/1475-2859-12-119
- Meher, L. C., Vidya Sagar, D., y Naik, S. N. (2006, junio). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10(3), 248–268. doi: 10.1016/j.rser.2004.09.002
- Min, H. (2022, 11). Examining the impact of energy price volatility on commodity prices from energy supply chain perspectives. *Energies*, 15. doi: 10.3390/en15217957
- Morales Bayetero, C., Mafla Yépez, C., Benavides Cevallos, I., y Hernández Rueda, E. (2022, enero). Effect of the use of additives in biodiesel blends on the performance and opacity of a diesel engine. *Materials Today: Proceedings*, 49, 93–99. Descargado 2024-10-01, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785321053499> doi: 10.1016/j.matpr.2021.07.478
- Mu, D., Xin, C., y Zhou, W. (2019). *Life cycle assessment and techno-economic analysis of algal biofuel production*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00018-7
- Méndez Román, G. E. (2018). Ingeniería metabólica en *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de isobutanol. Descargado 2023-06-23, de <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/152513> (Accepted: 2018-11-08T20:15:03Z Publisher: Universidad de Chile)
- NESTE. (2023). *Renewable diesel*. Descargado 4 Mayo 2023, de <https://www.neste.com/products/all-products/renewable-road-transport/neste-my-renewable-diesel#2d7dd708>
- NLHPC. (2022). Descargado de https://wiki.nlhpc.cl/index.php?title=Pol%C3%ADticas_de_Uso&oldid=72
- Obergruber, M., Hönig, V., Procházka, P., Kučerová, V., Kotek, M., Bouček, J., y Mařík, J. (2021, febrero). Physicochemical Properties of Biobutanol as an Advanced Biofuel. *Materials*, 14(4), 914. doi: 10.3390/ma14040914

- Oftadeh, O., Salvy, P., Masid, M., Curvat, M., Miskovic, L., y Hatzimanikatis, V. (2021, agosto). A genome-scale metabolic model of *Saccharomyces cerevisiae* that integrates expression constraints and reaction thermodynamics. *Nature Communications*, *12*(1), 4790. Descargado de <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25158-6> doi: 10.1038/s41467-021-25158-6
- on Sustainable Energy, G. F. (2020). *Gfse policy brief #11: Engaging citizens via social innovations for the energy transition*. Descargado 8 Marzo 2023, de <https://www.gfse.at/news/gfse-policy-brief-11-engaging-citizens-via-social-innovations-for-the-energy-transition>
- Palani, Y., Devarajan, C., Manickam, D., y Thanikodi, S. (2020, diciembre). Performance and emission characteristics of biodiesel-blend in diesel engine: A review. *Environmental Engineering Research*, *27*(1), 200338–0. doi: 10.4491/eer.2020.338
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., y Hatziloukas, E. (2020, febrero). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, *6*(1), 1–31. Descargado 2023-06-10, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7099199/> doi: 10.3934/microbiol.2020001
- Park, S.-H., Kim, S., y Hahn, J.-S. (2014, noviembre). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(21), 9139–9147. doi: 10.1007/s00253-014-6081-0
- Pimentel, D., y Patzek, T. W. (2005, 3). Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*, *14*, 65–76. doi: 10.1007/s11053-005-4679-8
- POET. (2023). *Zero-carbon bioproducts*. Descargado 4 Mayo 2023, de <https://poet.com/sustainability>
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H., y Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *12*(16). doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4
- Rainha, J., Rodrigues, J. L., y Rodrigues, L. R. (2021). CRISPR-Cas9: A Powerful Tool to Efficiently Engineer *Saccharomyces cerevisiae*. *Life*, *11*(1). Descargado de <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/1/13> doi: 10.3390/life11010013
- Raj, S. P., Solomon, P. R., y Thangaraj, B. (2022). *History of biodiesel*. Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-16-4775-8_2
- Rajesh Kumar, B., Saravanan, S., Rana, D., y Nagendran, A. (2016, julio). A comparative analysis on combustion and emissions of some next generation higher-alcohol/diesel blends in a direct-injection diesel engine. *Energy Conversion and Management*, *119*, 246–256. Descargado 2023-06-05, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019689041630303X> doi: 10.1016/j.enconman.2016.04.053
- Raízen. (2023a). *2nd generation ethanol*. Descargado 7 Mayo 2023, de <https://www.raizen.com.br/en/our-business/ethanol>
- Raízen. (2023b). *Numbers of the company*. Descargado 7 Mayo 2023, de <https://www.raizen.com.br/en/about-raizen/who-we-are/numbers>
- Ritchie, H., Roser, M., y Rosado, P. (2020). CO₂ and greenhouse gas emissions. *Our World in Data*. (<https://ourworldindata.org/co2-and-greenhouse-gas-emissions>)

- Roser, M., y Rodés-Guirao, L. (2013). Future population growth. *Our World in Data*. Descargado de <https://ourworldindata.org/future-population-growth>
- Safieddin Ardebili, S. M., Solmaz, H., İpci, D., Calam, A., y Mostafaei, M. (2020, noviembre). A review on higher alcohol of fusel oil as a renewable fuel for internal combustion engines: Applications, challenges, and global potential. *Fuel*, *279*, 118516. doi: 10.1016/j.fuel.2020.118516
- Schuller, D., y Casal, M. (2005, agosto). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(3), 292–304. Descargado 2023-06-10, de <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1994-2> doi: 10.1007/s00253-005-1994-2
- SGD. (s.f.). *Jen1 / ykl217w overview*. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000001700>. (Accessed: 2023-08-25)
- Shao, Z., Zhao, H., y Zhao, H. (2009, febrero). DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Research*, *37*(2), e16. doi: 10.1093/nar/gkn991
- Siyang, X., Lihong, J., Jin, C., Lei, H., Zhinan, X., y Jiazhang, L. (2020). Advances in genome evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Synthetic Biology Journal*, *1*(5), 556. Descargado de https://synbioj.cip.com.cn/EN/abstract/article_96.shtml (Publisher: Synthetic Biology Journal) doi: 10.12211/2096-8280.2020-044
- Stribny, J., Romagnoli, G., Pérez-Torrado, R., Daran, J.-M., y Querol, A. (2016, marzo). Characterisation of the broad substrate specificity 2-keto acid decarboxylase Aro10p of *Saccharomyces kudriavzevii* and its implication in aroma development. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 51. Descargado 2023-06-23, de <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0449-z> doi: 10.1186/s12934-016-0449-z
- Sultana, S., Jamil, N. M., Saleh, E. A. M., Yousuf, A., y Faizal, C. K. M. (2017, septiembre). A mathematical model for ethanol fermentation from oil palm trunk sap using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Physics: Conference Series*, *890*(1), 012050. Descargado 2023-06-29, de <https://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/890/1/012050> (Publisher: IOP Publishing) doi: 10.1088/1742-6596/890/1/012050
- Surisetty, V. R., Dalai, A. K., y Kozinski, J. (2011, septiembre). Alcohols as alternative fuels: An overview. *Applied Catalysis A: General*, *404*(1), 1–11. doi: 10.1016/j.apcata.2011.07.021
- Takpho, N., Watanabe, D., y Takagi, H. (2018). Valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase Bat1. *Microbial Cell*, *5*(6), 293–299. Descargado 2024-06-05, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5972033/> doi: 10.15698/mic2018.06.637
- Thierie, J., y Penninckx, M. (2010, marzo). Crabtree Effect. En (pp. 1774–1790). doi: 10.1002/9780470054581.eib243
- Trindade, W. R. d. S., y Santos, R. G. d. (2017, marzo). Review on the characteristics of butanol, its production and use as fuel in internal combustion engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *69*, 642–651.
- Uyttebroek, M., Van Hecke, W., y Vanbroekhoven, K. (2015, enero). Sustainability metrics of 1-butanol. *Catalysis Today*, *239*, 7–10. doi: 10.1016/j.cattod.2013.10.094

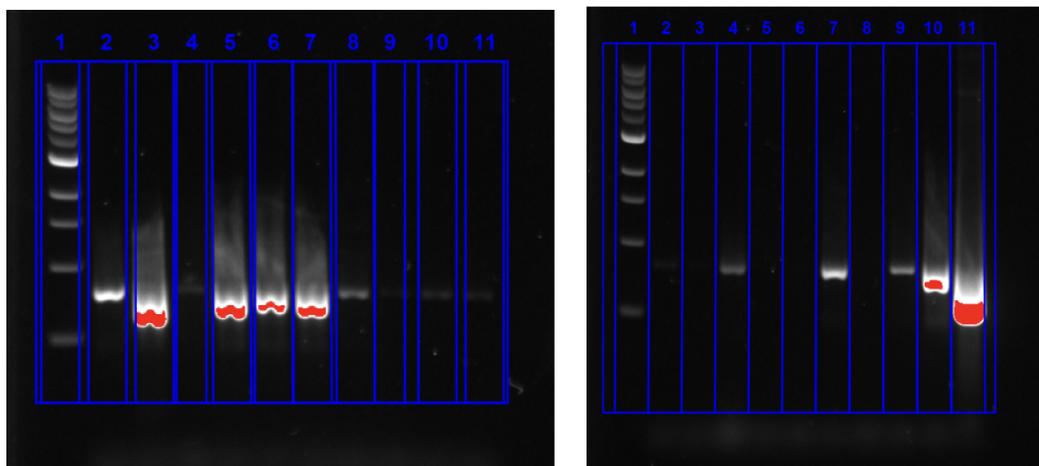
- Veza, I., Muhamad Said, M. F., y Latiff, Z. A. (2021, enero). Recent advances in butanol production by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 144, 105919. Descargado 2023-06-08, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953420304529> doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105919
- Vilela, A. (2021, marzo). An Overview of CRISPR-Based Technologies in Wine Yeasts to Improve Wine Flavor and Safety. *Fermentation*, 7(1), 5. Descargado 2023-06-10, de <https://www.mdpi.com/2311-5637/7/1/5> (Number: 1 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute) doi: 10.3390/fermentation7010005
- Wess, J., Brinek, M., y Boles, E. (2019, julio). Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 173. Descargado 2023-06-18, de <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1486-8> doi: 10.1186/s13068-019-1486-8
- Wilmar. (2023). *Biodiesel*. Descargado 4 Mayo 2023, de <https://www.wilmar-international.com/our-businesses/feed-and-industrial-products/tropical-oils>
- Wu, G., Ge, J. C., y Choi, N. J. (2020). A Comprehensive Review of the Application Characteristics of Biodiesel Blends in Diesel Engines. *Applied Sciences*, 10(22), 8015. doi: 10.3390/app10228015
- Yüksel, F., y Yüksel, B. (2004, 6). The use of ethanol-gasoline blend as a fuel in an si engine. *Renewable Energy*, 29, 1181-1191. doi: 10.1016/j.renene.2003.11.012
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., y Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501. doi: 10.1016/j.rser.2016.12.076
- Zheng, Z., Li, C., Liu, H., Zhang, Y., Zhong, X., y Yao, M. (2015, febrero). Experimental study on diesel conventional and low temperature combustion by fueling four isomers of butanol. *Fuel*, 141, 109–119. Descargado 2023-06-05, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236114010485> doi: 10.1016/j.fuel.2014.10.053
- Zimmermann, F. (1975, abril). Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(2), 71–86. Descargado 2024-03-16, de <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165116175900692> doi: 10.1016/0165-1161(75)90069-2
- Ziolkowska, J. R. (2019). *Biofuels technologies: An overview of feedstocks, processes, and technologies*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-815581-3.00001-4

Anexos

Anexo A. Resultados PCR colonia

En la presente sección de anexo se encuentran adjuntos los resultados de *screening* a través de PCR colonia realizados a los posibles transformantes de *S.cerevisiae*. Los geles de electroforesis para cada gen de interés se encuentran cargados en el orden expuesto a continuación, de manera secuencial pasando de las imágenes (a) hacia la (b):

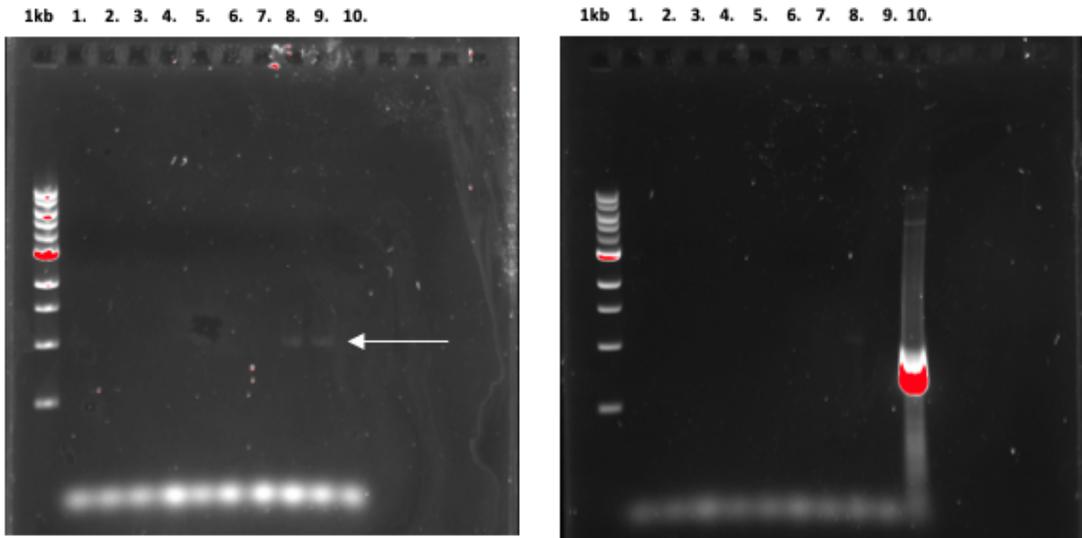
- T.Col 1 (Dil 10-1)
- T.Col 2 (Dil 10-1)
- T.Col 3 (Dil 10-1)
- T.Col 4 (Dil 10-1)
- T.Col 5 (Dil 10-1)
- T.Col 6 (Dil 10-1)
- T.Col 7 (Dil 10-1)
- T.Col 8 (Dil 10-1)
- T.Col 1 (Dil 10-2)
- T.Col 2 (Dil 10-2)
- T.Col 3 (Dil 10-2)
- T.Col 4 (Dil 10-2)
- T.Col 5 (Dil 10-2)
- T.Col 6 (Dil 10-2)
- T.Col 7 (Dil 10-2)
- T.Col 8 (Dil 10-2)
- Control (-) Agua
- s288c (Dil 10-1)
- s288c(Dil 10-2)
- pBsCluster



(a)

(b)

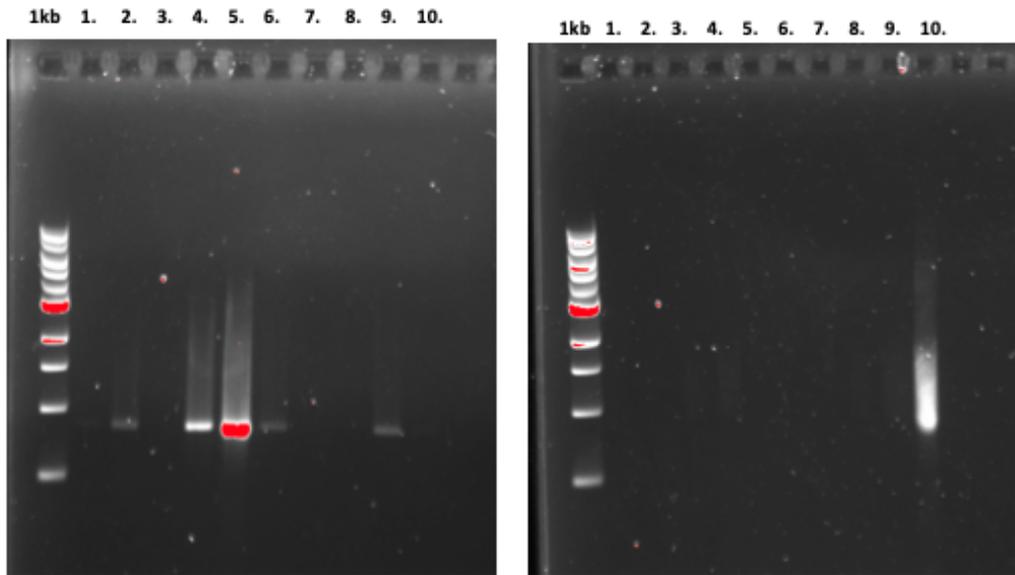
Figura A.1: PCR Colonia para identificación de KAN en transformantes $300\mu\text{g}/\text{mL}$



(a)

(b)

Figura A.2: PCR Colonia para identificación de $LADH^{ARE1}$ en transformantes $300\mu\text{g/mL}$



(a)

(b)

Figura A.3: PCR Colonia para identificación de SkAro10_b en transformantes $300\mu\text{g/mL}$

Anexo B. Rutas del metabolismo central en *S. cerevisiae* 288c

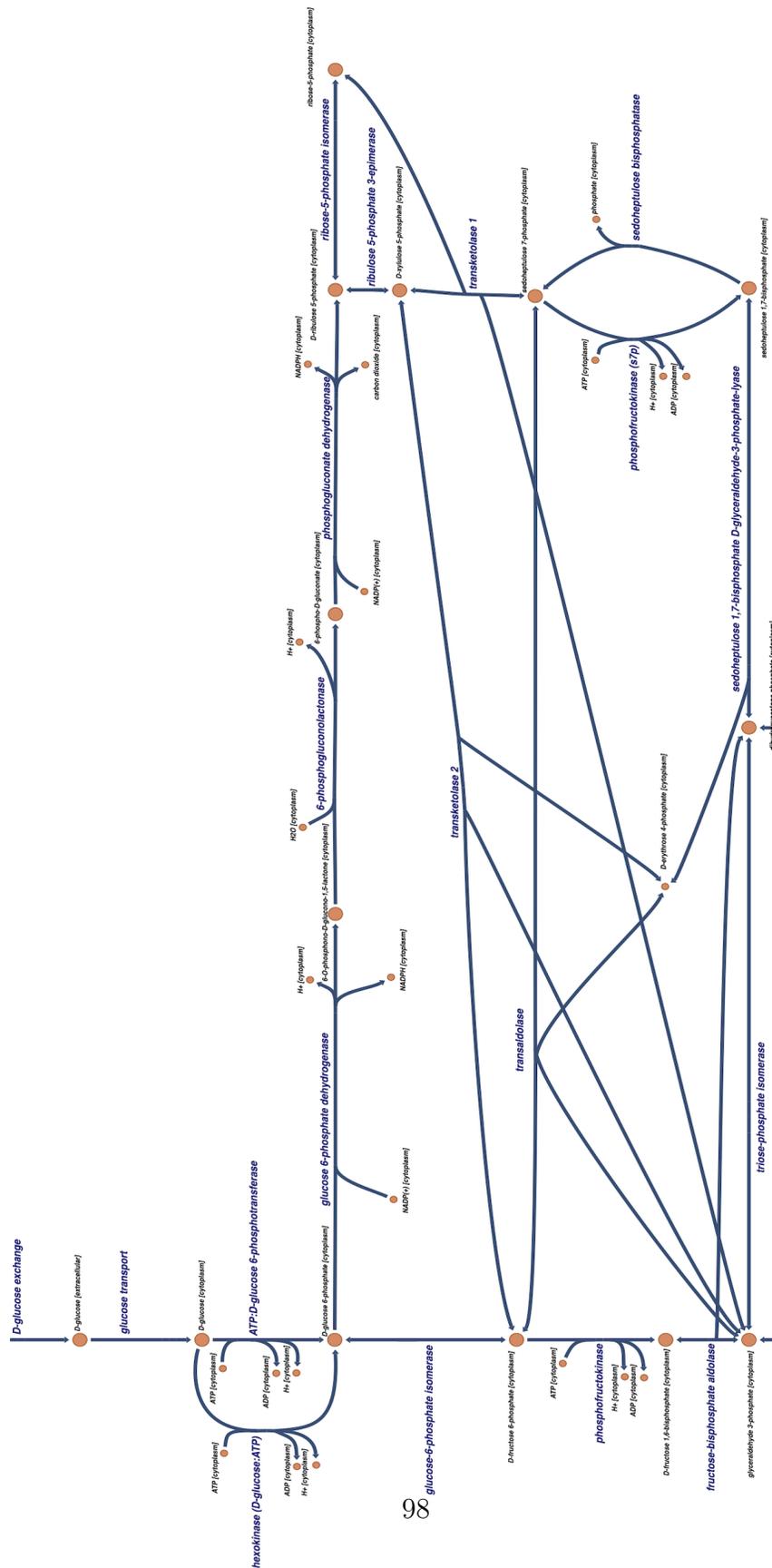


Figura B.1: Rutas metabolismo central de glucosa y las pentosas-fosfato

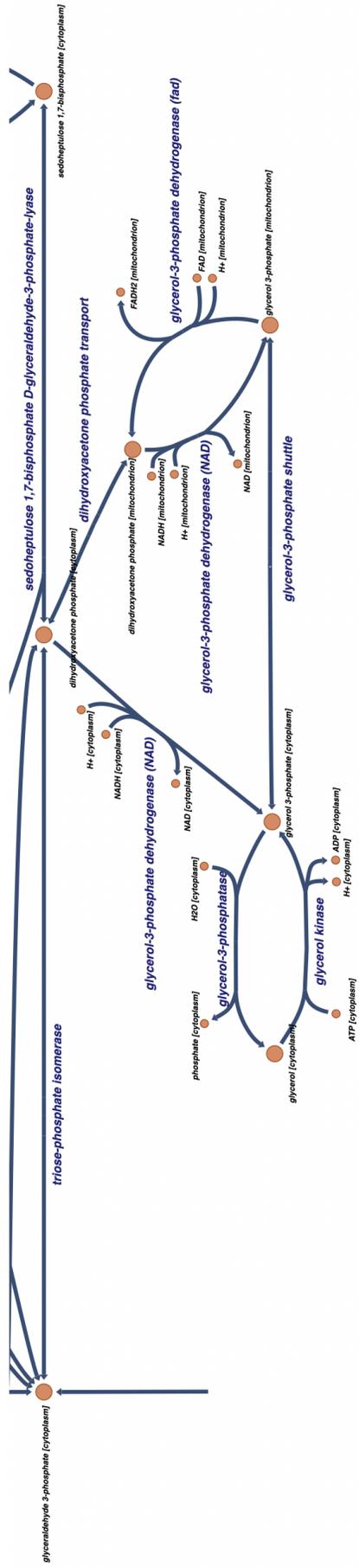


Figura B.2: Ruta de glicerol

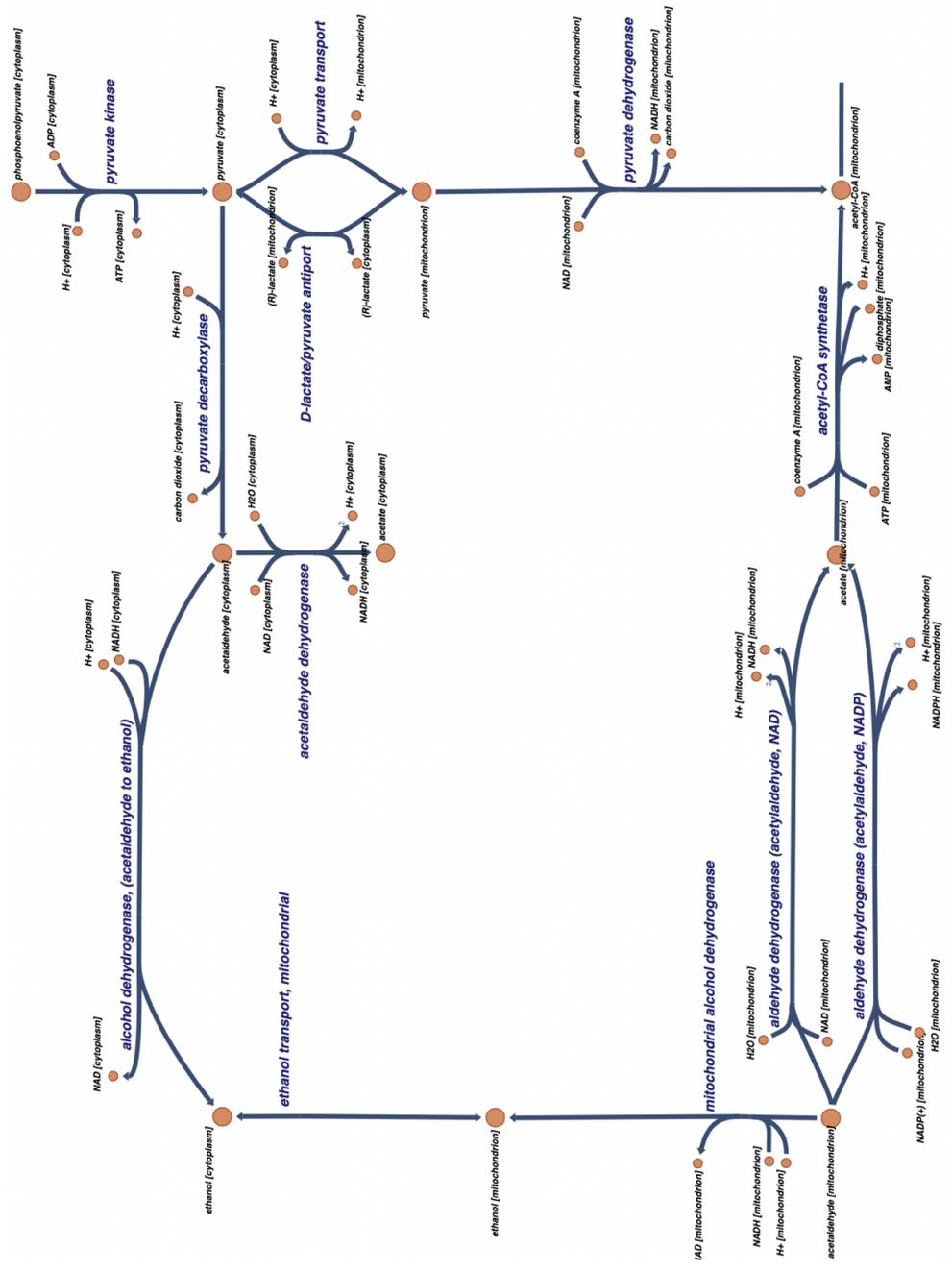


Figura B.3: Ruta de etanol

Anexo C. Validación modelo yETFL

En la Tabla C.1 se visualizan los resultados comparativos obtenidos a partir del promedio de 6 ejecuciones idénticas de yETFL con parámetros de tolerancia de Gurobi de $1e-07$ y tolerancia de restricciones de 0.02.

Tabla C.1: Validación original modelo yETFL

rxn	SSR_rxn	Data_experi	Data_modelo
r_0534	392,04000	19,80000	0,00000
r_0450	108,03742	19,09336	8,69926
r_0990	76,18658	-0,02923	8,69926
r_1048	69,42168	0,18072	-8,15125
r_0476	31,69211	6,10737	0,47780
r_0472	29,66769	5,44681	0,00000
r_0470	26,10473	5,10928	0,00000
r_0800	21,65019	0,12743	4,78041
r_0148	16,05502	0,00104	4,00791
r_0489	5,33412	2,30957	0,00000
r_1172	5,33412	2,30957	0,00000
r_1808	5,33412	2,30957	0,00000
r_0491	5,26508	2,32431	0,02973
r_0467	4,83988	18,94484	16,74487
r_2115	3,75369	31,90324	29,96579
r_1664	3,31296	1,82015	0,00000
r_1110	2,82099	8,25790	6,57832
r_0466	1,31044	0,57216	1,71691
r_0889	1,31044	0,57216	1,71691
r_0091	1,31044	0,57216	1,71691
r_0449	1,18870	1,09027	0,00000
r_1696	0,95323	-2,66541	-1,68907
r_0445	0,87711	0,93654	0,00000
r_0959	0,82940	32,91839	32,00767
r_1762	0,70477	31,90324	31,06373
r_1761	0,70477	31,90324	31,06373
r_1697	0,63678	35,47930	34,68132
r_1672	0,63678	35,47930	34,68132
r_0718	0,61748	0,78580	0,00000
r_0984	0,53985	0,22403	0,95877
r_1173	0,50367	0,70969	0,00000
r_0732	0,48949	0,86744	0,16780
r_0725	0,48949	0,86744	0,16780

Tabla C.1 – Continuación

rxn	SSR_rxn	Data_experi	Data_modelo
r_0486	0,48518	35,88435	35,18780
r_0892	0,48518	35,88435	35,18780
r_0446	0,42635	-0,63301	0,01994
r_0502	0,42518	0,91161	0,25955
r_0471	0,38923	1,94250	2,56638
r_1054	0,38350	16,73962	17,35889
r_1654	0,34395	-2,35621	-2,94269
r_1115	0,34395	2,35621	2,94269
r_1965	0,28026	0,51118	-0,01822
r_0811	0,27468	0,33949	0,86358
r_0501	0,26111	0,51098	0,00000
r_0962	0,25210	35,00552	34,50342
r_2132	0,24462	0,78140	0,28681
r_1106	0,20907	0,45724	0,00000
r_1634	0,20907	0,45724	0,00000
r_0112	0,19120	0,66014	1,09740
r_0302	0,17744	0,42123	0,00000
r_0280	0,17744	0,42123	0,00000
r_0658	0,17710	0,42084	0,00000
r_0982	0,16740	0,34814	0,75728
r_0723	0,16496	0,10103	-0,30512
r_0902	0,16496	0,10103	-0,30512
r_1088	0,15979	0,19012	-0,20962
r_2093	0,15979	0,19012	-0,20962
r_1126	0,15723	-0,00198	-0,39851
r_1049	0,15723	0,15149	0,54801
r_0891	0,15211	0,79988	0,40987
r_0918	0,15211	0,79988	0,40987
r_0917	0,15211	0,79988	0,40987
r_0888	0,13369	0,27740	0,64304
r_0714	0,11112	-0,78754	-0,45420
r_0733	0,09752	0,31227	0,00000
r_0447	0,09752	-0,31227	0,00000
r_1794	0,09752	0,31227	0,00000
r_0366	0,09397	35,08447	34,77793
r_0893	0,09397	35,08447	34,77793
r_2034	0,08490	0,29138	0,00000
r_1084	0,07695	0,27740	0,00000

Tabla C.1 – Continuación

rxn	SSR_rxn	Data_experi	Data_modelo
r_1021	0,06478	0,25452	0,00000
r_0023	0,06433	0,09927	-0,15436
r_0958	0,05028	1,71250	1,48827
r_0851	0,03390	0,04660	-0,13751
r_0503	0,03258	-0,19871	-0,01822
r_2045	0,03258	-0,19871	-0,01822
r_0961	0,02800	0,50266	0,67000
r_0005	0,02705	0,15677	0,32125
r_0349	0,01804	0,05942	-0,07491
r_0820	0,01804	0,05942	-0,07491
r_0674	0,01471	0,12128	0,00000
r_1183	0,01471	0,12128	0,00000
r_1063	0,01282	0,02429	0,13751
r_0713	0,01269	0,09647	0,20913
r_0795	0,01238	0,01223	0,12352
r_1992	0,01170	-2,76101	-2,86919
r_1979	0,01170	2,76101	2,86919
r_0451	0,01070	0,10344	0,00000
r_1022	0,01012	0,10059	0,00000
r_0097	0,00935	0,19012	0,28680
r_0096	0,00935	0,19012	0,28680
r_0514	0,00890	0,12813	0,03382
r_0565	0,00890	0,12813	0,03382
r_1239	0,00867	0,35110	0,25800
r_1703	0,00780	0,01219	0,10052
r_0173	0,00734	1,02959	0,94393
r_1887	0,00673	0,16302	0,08097
r_0957	0,00673	0,16302	0,08097
r_0473	0,00670	0,16282	0,08097
r_0468	0,00670	0,16282	0,08097
r_0543	0,00663	0,08143	0,00000
r_0510	0,00632	0,07558	0,15511
r_0796	0,00604	0,12917	0,05148
r_0152	0,00597	0,00104	0,07830
r_0153	0,00597	0,00104	0,07830
r_1265	0,00571	-0,00063	0,07491
r_0529	0,00564	0,12813	0,05302
r_0219	0,00540	0,16948	0,24298

Tabla C.1 – Continuación

rxn	SSR_rxn	Data_experi	Data_modelo
r_0215	0,00540	0,16948	0,24298
r_0546	0,00540	0,16948	0,24298
r_0311	0,00534	0,07305	0,00000
r_1202	0,00533	0,07300	0,00000
r_0310	0,00530	0,07280	0,00000
r_0006	0,00437	0,04126	0,10733
r_0040	0,00340	0,07895	0,13725
r_0195	0,00309	0,00379	0,05935
r_0549	0,00300	0,08693	0,14167
r_0469	0,00283	-0,05318	0,00000
r_0727	0,00222	0,04313	0,09021
r_0080	0,00222	0,04313	0,09021
r_0278	0,00218	0,07089	0,11760
r_0300	0,00211	0,42123	0,46713
r_0250	0,00199	0,10746	0,15210
r_1099	0,00196	0,08143	0,12568
r_0678	0,00196	0,08143	0,12568
r_0018	0,00196	0,08143	0,12568
r_0545	0,00196	0,08143	0,12568
r_0989	0,00196	0,08143	0,12568
r_0988	0,00196	0,08143	0,12568
r_0027	0,00196	0,08143	0,12568
r_0739	0,00191	0,05246	0,09614
r_0558	0,00191	0,05246	0,09614
r_0904	0,00191	0,05246	0,09614
r_0103	0,00191	0,05246	0,09614
r_0559	0,00191	0,05246	0,09614
r_1038	0,00185	0,00348	0,04650
r_1585	0,00155	0,07280	0,11219
r_0016	0,00154	0,07300	0,11219
r_0669	0,00154	0,07300	0,11219
r_1072	0,00151	0,05942	0,09825
r_0144	0,00099	0,02920	0,06065
r_0726	0,00099	0,02920	0,06065
r_0151	0,00088	0,10525	0,07562
r_0911	0,00088	0,10525	0,07562
r_0908	0,00088	0,10525	0,07562
r_0499	0,00088	0,10525	0,07562

Tabla C.1 – Continuación

rxn	SSR_rxn	Data_experi	Data_modelo
r_0915	0,00088	0,10525	0,07562
r_0914	0,00088	0,10525	0,07562
r_0855	0,00088	0,10525	0,07562
r_0079	0,00088	0,10525	0,07562
r_2126	0,00085	0,02923	0,00000
r_0115	0,00085	0,04804	0,07719
r_0118	0,00085	0,04804	0,07719
r_0759	0,00085	0,04804	0,07719
r_0207	0,00085	0,04804	0,07719
r_0208	0,00085	0,04804	0,07719
r_0816	0,00085	0,04804	0,07719
r_0818	0,00085	0,04804	0,07719
r_1237	0,00085	0,04804	0,07719
r_0735	0,00081	0,05246	0,02403
r_1118	0,00069	0,02634	0,00000
r_2060	0,00067	-0,02407	-0,04994
r_1266	0,00067	0,02407	0,04994
r_1027	0,00065	0,01586	0,04135
r_0306	0,00064	0,02535	0,00000
r_0938	0,00063	0,04660	0,07166
r_0024	0,00049	0,09927	0,07718
r_1087	0,00049	0,09927	0,07718
r_0939	0,00047	0,02429	0,04593
r_0548	0,00035	0,08255	0,10131
r_1041	0,00035	0,08255	0,10131
r_0912	0,00029	0,12917	0,11212
r_0570	0,00029	0,12917	0,11212
r_0214	0,00024	0,05942	0,07491
r_0453	0,00024	0,05942	0,07491
r_0821	0,00024	0,05942	0,07491
r_0812	0,00019	0,01388	0,00000
r_1040	0,00018	0,01332	0,00000
r_0916	0,00016	0,19665	0,20926
r_0225	0,00016	0,02392	0,03650
r_0536	0,00016	0,02392	0,03650
r_0563	0,00016	0,02392	0,03650
r_0564	0,00016	0,02392	0,03650
r_0909	0,00016	0,02392	0,03650

Tabla C.1 – Continuación

rxn	SSR_rxn	Data_experi	Data_modelo
r_0910	0,00016	0,02392	0,03650
r_0007	0,00016	0,02392	0,03650
r_0202	0,00013	0,00806	0,01963
r_0203	0,00013	0,00806	0,01963
r_1055	0,00013	0,00806	0,01963
r_0211	0,00013	0,05751	0,04620
r_0042	0,00011	0,07895	0,06863
r_0312	0,00010	0,00198	0,01180
r_0992	0,00010	0,00198	0,01180
r_1194	0,00003	0,36976	0,36400
r_0760	0,00001	0,00371	0,00000
r_0272	0,00001	0,00371	0,00000
r_0477	0,00001	0,00371	0,00000
r_1264	0,00001	0,00285	0,00000
r_0175	0,00000	-0,00112	0,00000
r_0363	0,00000	0,00104	0,00000
r_0799	0,00000	0,00104	0,00000
r_0803	0,00000	0,00104	0,00000
r_1978	0,00000	2,63102	2,63186
r_0804	0,00000	0,00075	0,00000
r_0798	0,00000	0,00070	0,00000
r_0797	0,00000	0,00070	0,00000
r_0344	0,00000	0,00104	0,00157
r_0364	0,00000	0,00104	0,00155
r_1045	0,00000	0,00104	0,00155
r_0662	0,00000	0,00040	0,00000
r_0309	0,00000	-0,00024	0,00000
r_0206	0,00000	0,00020	0,00000
r_0716	0,00000	0,00020	0,00000
r_0819	0,00000	0,00020	0,00000
r_0692	0,00000	0,00020	0,00000
r_2072	0,00000	0,00020	0,00000
r_1075	0,00000	0,00020	0,00000
r_0156	0,00000	0,00020	0,00000
r_1714	0,00000	-19,80000	-19,80000
r_1166	0,00000	19,80000	19,80000

Anexo D. Gráficos de casos generados a través de Dynamic Flux Balance Analysis

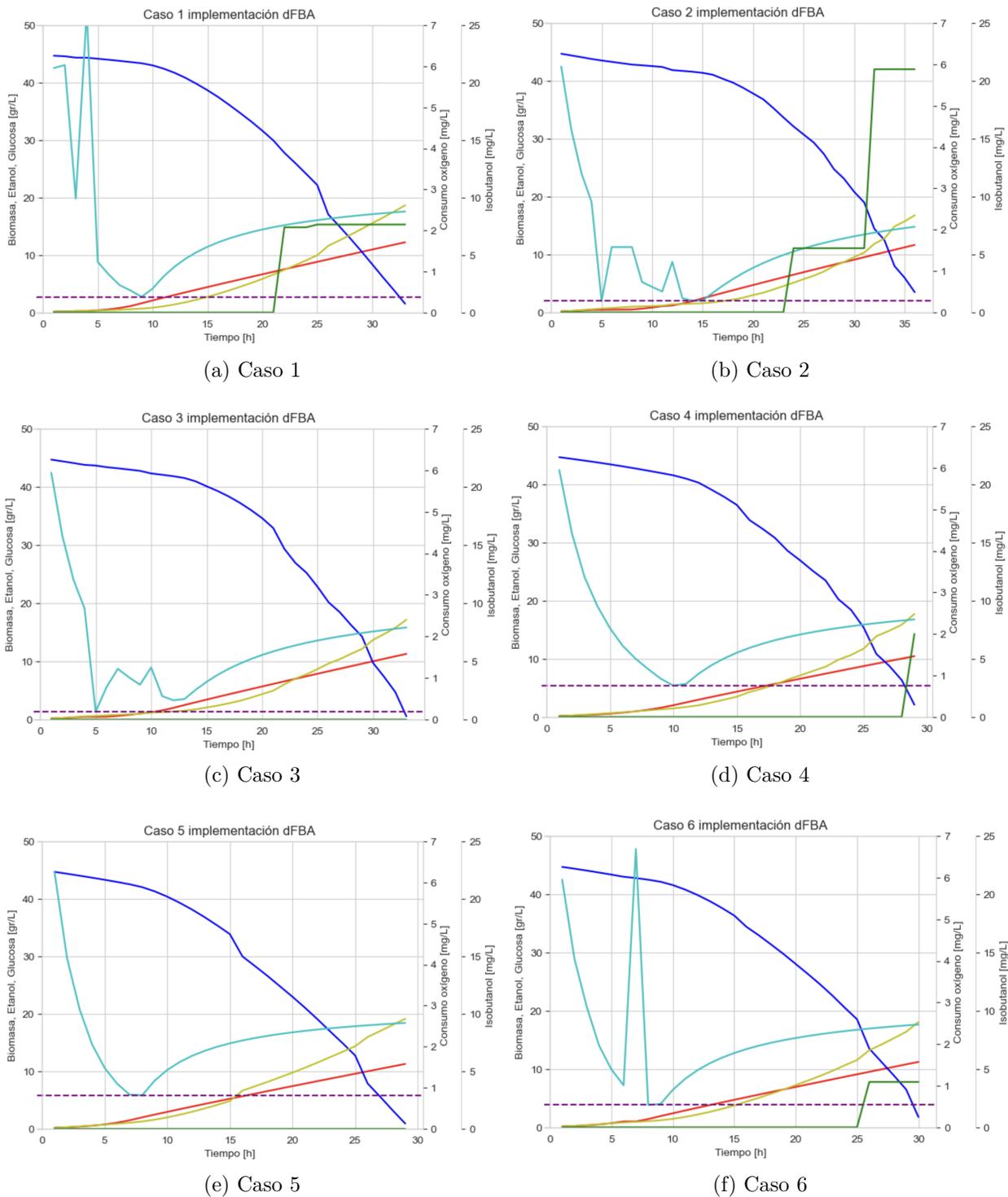


Figura D.1: Casos 1 al 6 obtenidos con Implementación 1 de dFBA

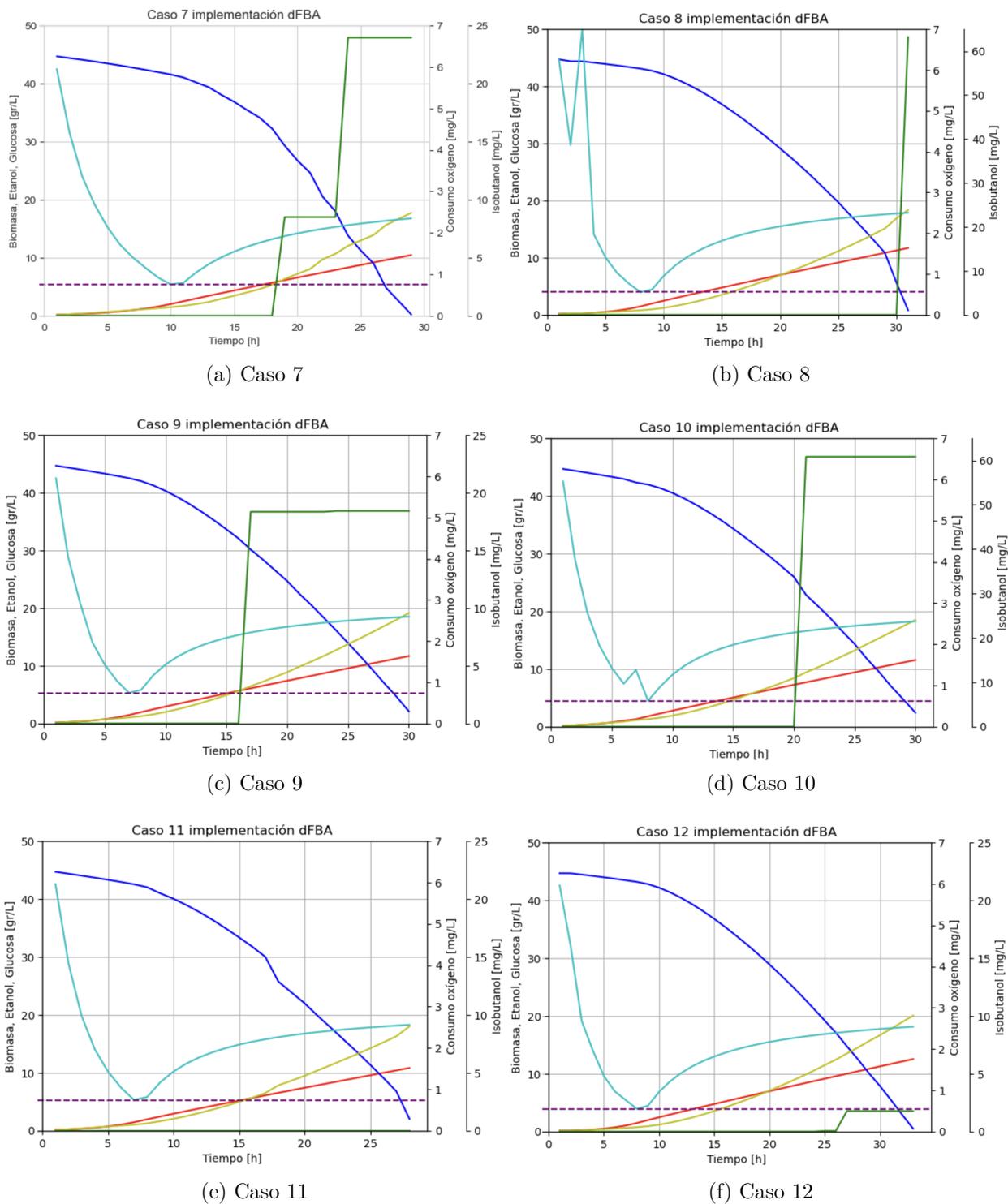
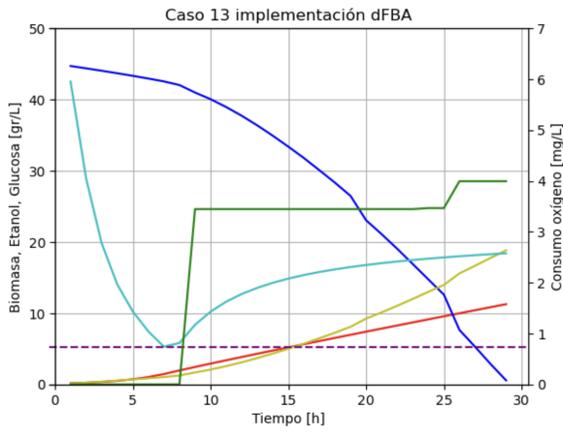
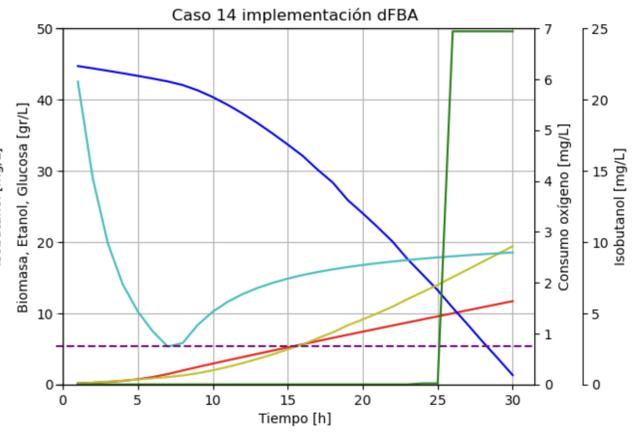


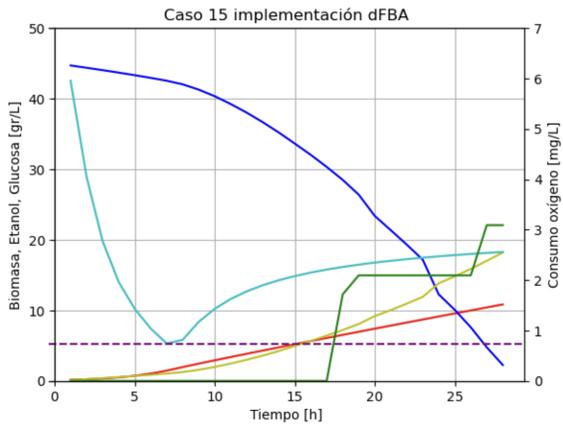
Figura D.2: Casos 7 al 12 obtenidos con Implementación 1 de dFBA



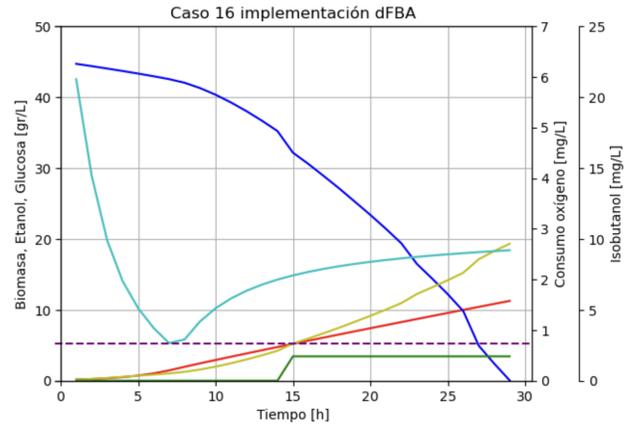
(a) Caso 13



(b) Caso 14



(c) Caso 15



(d) Caso 16

Figura D.3: Casos 13 al 16 obtenidos con Implementación 1 de dFBA

Anexo E. Clusters - Caso Base v/s Caso Medio Definido

El presente Anexo detalla las reacciones que componen cada cluster que define el cambio metabólico analizado para el microorganismo, en el caso de modelamiento comparativo entre un medio No definido a uno Definido.

En la Tabla E.1 se muestran las 6 reacciones del Cluster 0 asociadas al metabolismo de producción de Cisteína y Metionina:

Tabla E.1: Reacciones del Cluster 0 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido

Cluster 0		
ID	Nombre reacción	Error Acumulado
r_4484	O4-succinyl-L-homoserine:hydrogen sulfide S-(3-amino-3-carboxypropyl)transferase	-4820,96 %
r_0813	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	-2399,33 %
r_0815	O-succinylhomoserine lyase (L-cysteine)	-2314,53 %
r_0453	dihydroorotic acid dehydrogenase	-2399,68 %
r_1264	succinate transport	-2399,46 %
r_0549	homoserine O-trans-acetylase	-2399,25 %

En la Tabla E.2 se consolidan las 21 reacciones del Cluster 1 asociadas al metabolismo de producción de aminoácidos de cadenas ramificadas:

Tabla E.2: Reacciones del Cluster 1 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido

Cluster 1		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_0759	N-acetyl-g-glutamyl-phosphate reductase	-2327,81 %
r_1574	2-isopropylmalate transport	-2400,14 %
r_1088	valine transaminase, mitochondrial	-3083,74 %
r_0118	acetylornithine transaminase	-2327,81 %
r_1838	homocitrate synthase	-2208,99 %
r_1237	ornithine transport	-2327,81 %
r_0025	2-isopropylmalate synthase	-2399,86 %
r_0818	ornithine transacetylase	-2327,81 %
r_2093	valine transport	-3083,74 %
r_0664	isoleucine transaminase	-2289,97 %
r_0016	2-aceto-2-hydroxybutanoate synthase	-2226,31 %

Tabla E.2 – continuación

ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_0669	ketol-acid reductoisomerase (2-aceto-2-hydroxybutanoate)	-2226,31 %
r_0713	malate dehydrogenase	-2160,83 %
r_0545	homocitrate dehydrogenase	-2208,99 %
r_1110	ADP/ATP transporter	-2327,63 %
r_1596	3-methyl-2-oxopentanoate transport	-2146,29 %
r_0542	homocitrate hydratase	-2208,99 %
r_0115	acetylglutamate kinase	-2327,81 %
r_0027	2-methylcitrate dehydratase	-2208,99 %
r_0353	dihydroxy-acid dehydratase (2,3-dihydroxy-3-methylpentanoate)	-2226,31 %
r_0451	fumarase	-2399,41 %

En la Tabla E.3 se consolidan las 27 reacciones del Cluster 2 asociadas al metabolismo de producción de Histidina, Arginina y Nucleótidos de pirimidina:

Tabla E.3: Reacciones del Cluster 2 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido

Cluster 2		
ID	Nombre reacción	Error Acumulado
r_0537	histidinol-phosphatase	-2399,33 %
r_0536	histidinol dehydrogenase	-2399,33 %
r_0310	cystathionine g-lyase	2308,47 %
r_0060	3-isopropylmalate dehydratase	-2400,14 %
r_0909	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	-2399,33 %
r_0910	phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	-2399,33 %
r_0032	3',5'-bisphosphate nucleotidase	-2322,68 %
r_0564	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	-2399,33 %
r_2096	water diffusion	-2283,68 %
r_0208	argininosuccinate synthase	-2327,80 %
r_2031	pyrimidine-nucleoside phosphorylase (uracil)	2400,32 %
r_0214	aspartate carbamoyltransferase	-2399,68 %
r_0816	ornithine carbamoyltransferase	-2327,80 %
r_0820	orotate phosphoribosyltransferase	-2400,32 %
r_0225	ATP phosphoribosyltransferase	-2399,33 %
r_0023	2-isopropylmalate hydratase	-2400,14 %
r_1025	sulfate adenylyltransferase	-2322,88 %
r_0883	phosphoadenylyl-sulfate reductase (thioredoxin)	-2322,88 %
r_0154	adenylyl-sulfate kinase	-2322,88 %

Tabla E.3 – continuación

ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_0206	arginase	2199,55 %
r_0349	dihydroorotase	-2400,32 %
r_0678	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase (NADPH)	-2208,99 %
r_0989	saccharopine dehydrogenase (NADP, L-glutamate forming)	-2208,99 %
r_0250	carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolysing)	-2359,17 %
r_0988	saccharopine dehydrogenase (NAD, L-lysine forming)	-2208,99 %
r_1027	sulfite reductase (NADPH2)	-2378,04 %
r_2099	water diffusion	-2402,20 %

En la Tabla E.4 se consolidan las 2 reacciones del Cluster 3 asociadas al metabolismo de las Pentosas fosfato:

Tabla E.4: Reacciones del Cluster 3 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido

Cluster 3		
ID	Nombre Reacción	Error Acumulado
r_0907	phosphopentomutase	2400,32 %
r_1049	transketolase 1	3080,84 %

En la Tabla E.5 se consolidan las 5 reacciones del Cluster 4 asociadas al metabolismo de Alanina y Glicina en Vacuola:

Tabla E.5: Reacciones del Cluster 4 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido

Cluster 4		
ID	Nombre reacción	Error Acumulado
r_4203	Vacuolar aminopeptidase 1 (EC 3.4.11.22)	-2402,20 %
r_4482	L-alanine transport in via proton symport (from Cytoplasm to Vacuole)	-2397,81 %
r_4483	Glycine transport (from Cytoplasm to Vacuole)	-2397,81 %
r_1831	H+ diffusion (from Cytoplasm to Vacuole)	-2402,41 %
r_4474	L-alanylglycine transport via proton antiport (from Cytoplasm to Vacuole)	-2402,20 %

En la Tabla E.6 se consolidan las 9 reacciones del Cluster 5 asociadas a la biosíntesis de aminoácidos (histidina, leucina, isoleucina, lisina), el metabolismo de nitrógeno y la biosíntesis de purinas :

Tabla E.6: Reacciones del Cluster 5 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido

Cluster 5		
ID	Nombre reacción	Error Acumulado
r_0538	histidinol-phosphate transaminase	-2399,33 %
r_0699	leucine transaminase	3798,95 %
r_0663	isoleucine transaminase	4533,35 %
r_1099	2-oxoadipate and 2-oxoglutarate transport	-2208,99 %
r_0472	glutamate synthase (NADH2)	-2128,53 %
r_0563	Imidazole-glycerol-3-phosphate synthase	-2399,33 %
r_0007	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino) methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	-2399,33 %
r_4355	2-aminobutanoate:2-oxoglutarate aminotransferase	2398,86 %
r_0018	2-aminoadipate transaminase	-2208,99 %

En la Tabla E.7 se consolidan las 26 reacciones del Cluster 6 asociadas al intercambio de metabolitos entre compartimentos, principalmente la absorción desde el espacio extracelular:

Tabla E.7: Reacciones del Cluster 6 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido

Cluster 6		
ID	Nombre reacción	Error Acumulado
r_1211	L-leucine transport	2399,98 %
r_1173	glycine transport	-3000,00 %
r_4473	L-alanyl-glycine transport via proton antiport	-2402,20 %
r_4356	2-aminobutyrate transport	2401,14 %
r_1893	L-histidine exchange	2400,53 %
r_4520	2-aminobutanoate exchange	2398,86 %
r_4496	Ala-Gly exchange	-2397,81 %
r_1213	L-lysine transport	2399,92 %
r_1184	L-arginine transport	2399,92 %
r_1214	L-methionine transport	2399,73 %
r_0692	L-threonine deaminase	-2283,80 %
r_1585	2-oxobutanoate transporter	-2226,31 %
r_1272	uracil transport	2399,71 %
r_1201	L-histidine transport	2399,58 %
r_1040	threonine aldolase	2399,26 %
r_2091	urea exchange	2199,54 %
r_1205	L-isoleucine transport	2399,92 %
r_1898	L-isoleucine transport	-2289,49 %

Tabla E.7 – continuación

ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_1273	urea transport	2200,46 %
r_2090	uracil exchange	2400,29 %
r_1902	L-methionine exchange	2400,27 %
r_0207	argininosuccinate lyase	-2327,80 %
r_1900	L-lysine exchange	2400,19 %
r_1879	L-arginine exchange	2400,17 %
r_1899	L-leucine exchange	2400,02 %
r_1897	L-isoleucine exchange	2400,08 %

En la Tabla E.8 se consolidan las 49 reacciones del Cluster 7 asociadas al transporte y biosíntesis de fosfolípidos entre Retículo endoplasmático-Golgi-Vacuola, Producción y Secreción de alcoholes de fusel (Isoamyl alcohol y 2-methylbutanol), balance de protones y CO₂ entre Citoplasma-Golgi-Vacuola, Descarboxilación y oxidación de intermediarios en el metabolismo de aminoácidos ramificados y nucleótidos :

Tabla E.8: Reacciones del Cluster 7 para comparativo de Caso Base v/s Medio definido

Cluster 7		
ID	Nombre reacción	Error Acumulado
r_3845	phosphatidyl-L-serine (1-16:0, 2-16:1) transport, ER membrane-vacuolar membrane	2190,03 %
r_3826	phosphatidylethanolamine (1-16:1, 2-18:1) transport, Golgi membrane-ER membrane	2190,03 %
r_3825	phosphatidylethanolamine (1-16:0, 2-18:1) transport, Golgi membrane-ER membrane	2190,03 %
r_3853	phosphatidylethanolamine (1-16:0, 2-16:1) transport, vacuolar membrane-ER membrane	2190,03 %
r_3817	phosphatidyl-L-serine (1-16:0, 2-18:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	2190,03 %
r_3821	phosphatidylethanolamine (1-16:0, 2-16:1) transport, Golgi membrane-ER membrane	2190,03 %
r_3813	phosphatidyl-L-serine (1-16:0, 2-16:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	2190,03 %
r_3664	H+ transport, cytoplasm-Golgi membrane	2197,83 %
r_3818	phosphatidyl-L-serine (1-16:1, 2-18:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	2190,03 %
r_3849	phosphatidyl-L-serine (1-16:0, 2-18:1) transport, ER membrane-vacuolar membrane	2190,03 %
r_1865	isoamylol exchange	2399,97 %

Tabla E.8 – continuación

ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_3850	phosphatidyl-L-serine (1-16:1, 2-18:1) transport, ER membrane-vacuolar membrane	2190,03 %
r_3650	H+ transport, cytoplasm-vacuolar membrane	2197,88 %
r_3858	phosphatidylethanolamine (1-16:1, 2-18:1) transport, vacuolar membrane-ER membrane	2190,03 %
r_3846	phosphatidyl-L-serine (1-16:1, 2-16:1) transport, ER membrane-vacuolar membrane	2188,01 %
r_3854	phosphatidylethanolamine (1-16:1, 2-16:1) transport, vacuolar membrane-ER membrane	2188,01 %
r_3814	phosphatidyl-L-serine (1-16:1, 2-16:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	2187,26 %
r_3822	phosphatidylethanolamine (1-16:1, 2-16:1) transport, Golgi membrane-ER membrane	2187,26 %
r_3847	phosphatidyl-L-serine (1-18:0, 2-16:1) transport, ER membrane-vacuolar membrane	2186,52 %
r_3855	phosphatidylethanolamine (1-18:0, 2-16:1) transport, vacuolar membrane-ER membrane	2186,52 %
r_3815	phosphatidyl-L-serine (1-18:0, 2-16:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	2184,27 %
r_3823	phosphatidylethanolamine (1-18:0, 2-16:1) transport, Golgi membrane-ER membrane	2184,27 %
r_3857	phosphatidylethanolamine (1-16:0, 2-18:1) transport, vacuolar membrane-ER membrane	2190,03 %
r_0029	2-oxo-4-methyl-3-carboxypentanoate decarboxylation	-2399,86 %
r_2484	PS decarboxylase (1-16:0, 2-18:1), vacuolar membrane	2190,03 %
r_2481	PS decarboxylase (1-16:1, 2-16:1), vacuolar membrane	2188,01 %
r_1863	isoamyl alcohol transport	2399,97 %
r_3653	carbon dioxide transport, cytoplasm-vacuolar membrane	2202,12 %
r_3665	carbon dioxide transport, cytoplasm-Golgi membrane	2202,17 %
r_0179	aldehyde dehydrogenase (isoamyl alcohol, NAD)	2399,97 %
r_0061	3-isopropylmalate dehydrogenase	-2399,86 %
r_0166	aldehyde dehydrogenase (2-methylbutanol, NAD)	2399,68 %
r_1575	2-methyl-1-butanol transport	2399,79 %
r_1580	2-methylbutanol exchange	2399,79 %
r_0072	4-methyl-2-oxopentanoate decarboxylase	2399,97 %
r_0821	orotidine-5'-phosphate decarboxylase	-2399,68 %
r_0064	3-methyl-2-oxopentanoate decarboxylase	2399,79 %
r_1077	uridine kinase (ATP:uridine)	2399,68 %

Tabla E.8 – continuación

ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_3819	phosphatidyl-L-serine (1-18:0, 2-18:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	2120,65 %
r_2472	PS decarboxylase (1-16:0, 2-16:1), Golgi membrane	2190,03 %
r_2476	PS decarboxylase (1-16:0, 2-18:1), Golgi membrane	2190,03 %
r_2477	PS decarboxylase (1-16:1, 2-18:1), Golgi membrane	2190,03 %
r_2473	PS decarboxylase (1-16:1, 2-16:1), Golgi membrane	2187,26 %
r_2474	PS decarboxylase (1-18:0, 2-16:1), Golgi membrane	2184,27 %
r_2478	PS decarboxylase (1-18:0, 2-18:1), Golgi membrane	2120,65 %
r_2480	PS decarboxylase (1-16:0, 2-16:1), vacuolar membrane	2190,03 %
r_2485	PS decarboxylase (1-16:1, 2-18:1), vacuolar membrane	2190,03 %
r_2482	PS decarboxylase (1-18:0, 2-16:1), vacuolar membrane	2186,52 %
r_3827	phosphatidylethanolamine (1-18:0, 2-18:1) transport, Golgi membrane-ER membrane	2120,65 %

Anexo F. Clusters - Casos Medio definido con v/s sin expresión citosólica de enzimas ILV

El presente Anexo detalla las reacciones que componen cada cluster que define el cambio metabólico analizado para el microorganismo, en el caso de modelamiento comparativo entre un medio Definido con y sin expresión citosólica de enzimas ILV.

En la Tabla F.1 se muestran las 21 reacciones del Cluster 0 asociadas al Ciclo del ácido cítrico, Metabolismo de aminoácidos (Prolina, Valina y otros ramificados), Metabolismo de alcoholes y aldehídos, Transporte de metabolitos a través de membranas celulares y mitocondriales.

Tabla F.1: Reacciones del Cluster 0 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 0		
ID	Nombre reacción	Error Acumulado
r_0714	malate dehydrogenase, cytoplasmic	18055,73 %
r_0940	proline oxidase (NAD)	276,97 %
r_2093	valine transport	669,18 %
r_0352	dihydroxy-acid dehydratase (2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate)	-500,65 %
r_1088	valine transaminase, mitochondrial	669,18 %
r_1763	ethanol transport, mitochondrial	298,23 %
r_1905	L-proline transport	276,97 %
r_0719	malic enzyme (NADP)	-1776,92 %
r_0183	aldehyde dehydrogenase (isobutyl alcohol, NAD)	253,66 %
r_0012	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	276,97 %
r_1632	acetaldehyde transport	298,23 %
r_0165	mitochondrial alcohol dehydrogenase	298,21 %
r_2034	pyruvate transport	-364,50 %
r_1245	phosphate transport	-399,89 %
r_0454	fumarate reductase	482,40 %
r_1239	oxaloacetate transport	-2399,37 %
r_2129	proton leak	-1809,82 %
r_0713	malate dehydrogenase	767,91 %
r_0096	acetohydroxy acid isomeroreductase	-500,65 %
r_0167	aldehyde dehydrogenase (2-methylbutanol, NAD)	-288,05 %
r_0097	acetolactate synthase	-500,65 %

En la Tabla F.2 se muestran las 6 reacciones del Cluster 1 asociadas a la síntesis transporte y modificación de fosfolípidos.

Tabla F.2: Reacciones del Cluster 1 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 1		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_3783	phosphatidylcholine (1-18:0, 2-16:1) transport, ER membrane-mitochondrial membrane	-422,00 %
r_3990	phosphatidylcholine (1-18:0, 2-16:1) [endoplasmic reticulum membrane] SLIME rxn	-375,27 %
r_3963	1-phosphatidyl-1D-myo-inositol (1-16:0, 2-16:1) [cytoplasm] SLIME rxn	394,70 %
r_3997	phosphatidylethanolamine (1-16:0, 2-16:1) [endoplasmic reticulum membrane] SLIME rxn	395,16 %
r_4014	triglyceride (1-16:0, 2-16:1, 3-16:1) [endoplasmic reticulum membrane] SLIME rxn	-362,34 %
r_3562	1-phosphatidyl-1D-myo-inositol (1-16:0, 2-16:1) transport, cytoplasm-ER membrane	396,79 %

En la Tabla F.3 se muestran las 15 reacciones del Cluster 2 asociadas a la Síntesis y metabolismo de Fosfolípidos, activación, elongación y oxidación de ácidos grasos, transporte de nucleótidos y metabolitos entre citoplasma y retículo endoplasmático.

Tabla F.3: Reacciones del Cluster 2 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 2		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_2454	PI synthase (1-16:0, 2-16:1), ER membrane	394,70 %
r_2196	fatty-acid-CoA ligase (hexadecanoate), ER membrane	308,76 %
r_2177	trans-2-enoyl-CoA reductase (n-C18:0CoA)	-399,22 %
r_3544	AMP transport, cytoplasm-ER membrane	1250,36 %
r_3514	malonyl-CoA transport, cytoplasm-ER membrane	-399,22 %
r_3543	ATP transport, cytoplasm-ER membrane	1240,46 %
r_2156	elongase II (3-oxooctadecanoyl-CoA)	-399,22 %
r_2170	B-hydroxyacyl-CoA dehydratase (trans-octadec-2-enoyl-CoA)	-399,22 %
r_2339	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (1-18:1, 2-18:1), ER membrane	389,52 %
r_2333	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (1-16:0, 2-18:1), ER membrane	-296,91 %
r_2335	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (1-16:1, 2-18:1), ER membrane	-267,22 %
r_3525	H ⁺ transport, cytoplasm-ER membrane	410,44 %
r_2197	fatty-acid-CoA ligase (hexadecenoate), ER membrane	-1776,16 %

Tabla F.3 – continuación

ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_2163	B-ketoacyl-CoA reductase (3-hydroxyoctadecanoyl-CoA)	-399,22 %
r_2376	diacylglycerol acyltransferase (1-16:0, 2-16:1, 3-16:1), ER membrane	-362,34 %

En la Tabla F.4 se muestran las 6 reacciones del Cluster 3 asociadas a la síntesis y transporte de fosfolípidos particularmente entre las membranas de retículo endoplasmático y la vacuola.

Tabla F.4: Reacciones del Cluster 3 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 3		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_3847	phosphatidyl-L-serine (1-18:0, 2-16:1) transport, ER membrane-vacuolar membrane	-408,38 %
r_3846	phosphatidyl-L-serine (1-16:1, 2-16:1) transport, ER membrane-vacuolar membrane	-323,44 %
r_3854	phosphatidylethanolamine (1-16:1, 2-16:1) transport, vacuolar membrane-ER membrane	-323,44 %
r_2482	PS decarboxylase (1-18:0, 2-16:1), vacuolar membrane	-408,38 %
r_2481	PS decarboxylase (1-16:1, 2-16:1), vacuolar membrane	-323,44 %
r_3855	phosphatidylethanolamine (1-18:0, 2-16:1) transport, vacuolar membrane-ER membrane	-408,38 %

En la Tabla F.5 se muestran las 22 reacciones del Cluster 4 asociadas a la Vía del Mevalonato para la biosíntesis de isoprenoides y esteroides, transporte de ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial, producción y transporte de ésteres de alcoholes de fusel, transporte de fosfato y agua, así como en el metabolismo del glicerol y la vitamina B12.

Tabla F.5: Reacciones del Cluster 4 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 4		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_1840	hydroxymethylglutaryl-CoA transport	467,09 %
r_0103	acetyl-CoA C-acetyltransferase	261,86 %
r_0736	mevalonate kinase (ctp)	-399,25 %
r_0738	mevalonate kinase (UTP)	-399,25 %
r_1547	(R)-mevalonate exchange	399,99 %
r_0162	alcohol acetyltransferase (phenylethanol alcohol)	399,96 %
r_0252	carnitine O-acetyltransferase	-399,95 %
Continúa en la siguiente página		

Tabla F.5 – continuación

ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_1243	phenethyl acetate transport	399,96 %
r_2000	phenethyl acetate exchange	399,96 %
r_3663	phosphate transport, cytoplasm-Golgi membrane	-394,93 %
r_1096	(R)-mevalonate transport	400,01 %
r_0558	hydroxymethylglutaryl CoA reductase	261,85 %
r_0559	hydroxymethylglutaryl CoA synthase	261,86 %
r_0473	glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	-509,68 %
r_0487	glycerol dehydrogenase (NADP-dependent)	334,94 %
r_0974	ribonucleotide reductase	-555,10 %
r_3662	H2O transport, cytoplasm-Golgi membrane	-404,07 %
r_0489	glycerol-3-phosphatase	265,73 %
r_2100	water exchange	254,70 %
r_1277	water diffusion	254,69 %
r_4216	riboflavin-5-phosphate phosphohydrolase	250,83 %
r_0468	glutamate 5-kinase	-509,68 %

En la Tabla F.6 se muestran las 7 reacciones del Cluster 5 asociadas a la degradación y eliminación de alcoholes de fusel.

Tabla F.6: Reacciones del Cluster 5 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 5		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_0166	aldehyde dehydrogenase (2-methylbutanol, NAD)	-669,66 %
r_1578	2-methylbutanal transport (cytoplasm to extracellular)	399,99 %
r_1579	2-methylbutanal transport (cytoplasm to mitochondria)	-288,05 %
r_1576	2-methyl-1-butanol transport (cytoplasm to mitochondria)	-288,18 %
r_1577	2-methylbutanal exchange	399,99 %
r_1575	2-methyl-1-butanol transport (cytoplasm to extracellular)	-559,18 %
r_1580	2-methylbutanol exchange	-559,18 %

En la Tabla F.7 se muestran las 2 reacciones del Cluster 6 asociadas a la homeostasis del pH y síntesis de fosfolípidos.

Tabla F.7: Reacciones del Cluster 6 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 6		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_4332	Protein PNS1 (pH nine-sensitive protein 1)	396,20 %
r_1683	choline exchange	396,20 %

En la Tabla F.8 se muestran las 3 reacciones del Cluster 7 asociadas a la síntesis y transporte de fosfolípidos particularmente entre las membranas de retículo endoplasmático y Golgi.

Tabla F.8: Reacciones del Cluster 7 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 7		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_2478	PS decarboxylase (1-18:0, 2-18:1), Golgi membrane	-616,55 %
r_3827	phosphatidylethanolamine (1-18:0, 2-18:1) transport, Golgi membrane-ER membrane	-616,55 %
r_3819	phosphatidyl-L-serine (1-18:0, 2-18:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	-616,55 %

En la Tabla F.9 se muestran las 12 reacciones del Cluster 8 asociadas a la degradación y extracción de alcoholes de fusel, degradación de aminoácidos y manejo de intermediarios tóxicos, síntesis y transporte de fosfolípidos entre retículo endoplasmático y mitocondria.

Tabla F.9: Reacciones del Cluster 8 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 8		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_1696	CO2 transport	-383,07 %
r_1869	isobutyl alcohol transport	253,86 %
r_1583	2-methylpropanal transport	253,66 %
r_3769	phosphatidyl-L-serine (1-16:0, 2-18:1) transport, ER membrane-mitochondrial membrane	-335,56 %
r_0182	aldehyde dehydrogenase (isobutyl alcohol, NAD)	354,95 %
r_3777	phosphatidylethanolamine (1-16:0, 2-18:1) transport, mitochondrial membrane-ER membrane	-335,56 %
r_2468	PS decarboxylase (1-16:0, 2-18:1), mitochondrial membrane	-335,56 %
r_0062	3-methyl-2-oxobutanoate decarboxylase	259,04 %
r_3527	CO2 transport, cytoplasm-ER membrane	-400,78 %
r_3669	carbon dioxide transport, cytoplasm-mitochondrial membrane	-749,26 %
r_1866	isobutanol exchange	279,75 %
r_1868	isobutyl alcohol transport	279,75 %

En la Tabla F.10 se muestran las 7 reacciones del Cluster 9 asociadas a los metabolismos de glicólisis y pentosas fosfato, así como al proceso de transición entre glicólisis y fermentación.

Tabla F.10: Reacciones del Cluster 9 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 9		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_0887	phosphofructokinase (s7p)	-541,94 %
r_0984	ribulose 5-phosphate 3-epimerase	-290,31 %
r_0990	sedoheptulose 1,7-bisphosphate D-glyceraldehyde-3-phosphate-lyase	-561,97 %
r_1048	transaldolase	-443,59 %
r_0354	dihydroxyacetone kinase	334,94 %
r_1049	transketolase 1	-556,42 %
r_0491	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD)	263,15 %

En la Tabla F.11 se muestran las 4 reacciones del Cluster 10 asociadas a la síntesis y transporte de diglicéridos y fosfatidatos entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (metabolismo de lípidos).

Tabla F.11: Reacciones del Cluster 10 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 10		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_3790	diglyceride (1-16:1, 2-16:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	-405,60 %
r_2346	PA phosphatase (1-16:1, 2-16:1), ER membrane	310,24 %
r_2362	PA phosphatase (1-16:1, 2-16:1), Golgi membrane	-394,55 %
r_3798	phosphatidate (1-16:1, 2-16:1) transport, ER membrane-Golgi membrane	-394,55 %

En la Tabla F.12 se muestran las 2 reacciones del Cluster 11 asociadas al transporte de ion de amoniaco entre el microorganismo y el espacio extracelular.

Tabla F.12: Reacciones del Cluster 11 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 11		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_1115	ammonia transport	262,16 %
r_1654	ammonium exchange	262,18 %

En la Tabla F.13 se muestran las 2 reacciones del Cluster 12 asociadas al metabolismo de ácidos grasos durante el TCA y dentro de mitocondria.

Tabla F.13: Reacciones del Cluster 12 para comparativo de Caso Medio definido con v/s sin ILVc

Cluster 12		
ID	Nombre reacción	Error acumulado
r_4039	succinyl-CoA:acetate CoA transferase	331,52 %
r_0254	carnitine O-acetyltransferase	-399,95 %

Anexo G. Cambio metabolismo PE

A continuación se expone la evidencia del cambio de metabolismo de PE entre el Caso Base y Medio definido sin ILVc. Las imágenes comprueban el aumento de actividad en reacciones desde Golgi y Vacuola, y una disminución de aquellas desde Mitocondria.

Dado que phosphatidylethanolamine (PE) presenta diversas configuraciones, se revisaron las condiciones para cada una de ellas.

Tabla G.1: Conjunto de metabolitos PE con sus principales reacciones alteradas

ID metabolito	Nombre metabolito	Reacciones aumentan la producción desde Golgi y/o Vacuola	Reacciones disminuyen la producción desde Mitocondria
s_3130_erm	phosphatidylethanolamine (1-16:0, 2-16:1) [endoplasmic reticulum membrane]	r_3821, r_3853	r_3733
s_3132_erm	phosphatidylethanolamine (1-16:1, 2-16:1) [endoplasmic reticulum membrane]	r_3822, r_3854	r_3774
s_3134_erm	phosphatidylethanolamine (1-18:0, 2-16:1) [endoplasmic reticulum membrane]	r_3823, r_3855	r_3775
s_3138_erm	phosphatidylethanolamine (1-16:0, 2-18:1) [endoplasmic reticulum membrane]	r_3825, r_3857	r_3777
s_3140_erm	phosphatidylethanolamine (1-16:1, 2-18:1) [endoplasmic reticulum membrane]	r_3826, r_3658	r_3778
s_3142_erm	phosphatidylethanolamine (1-18:0, 2-18:1) [endoplasmic reticulum membrane]	r_3827, r_3859	r_3779

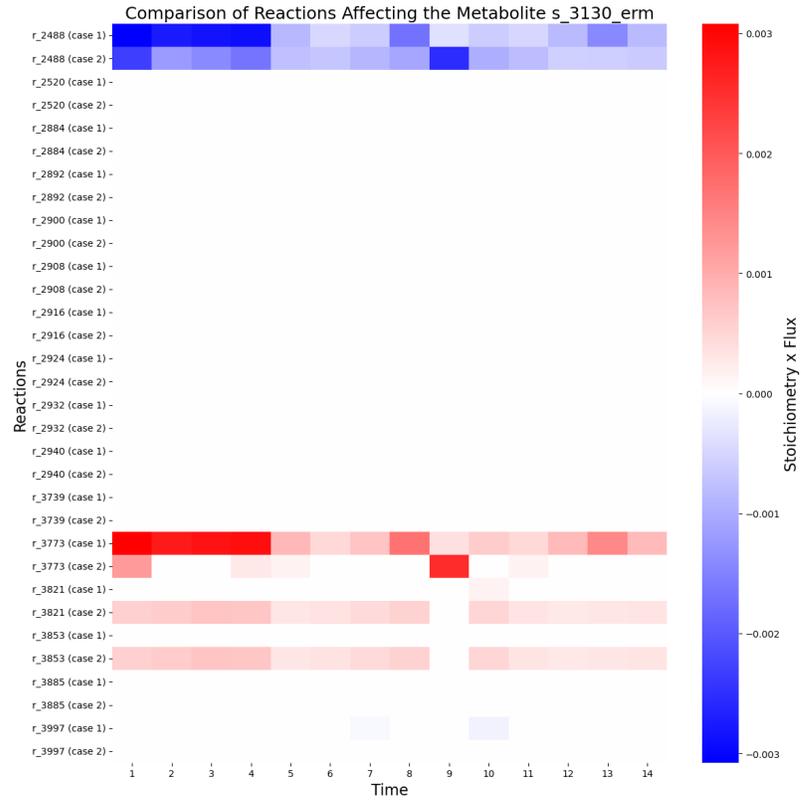


Figura G.1: Comparación de las reacciones del metabolito s_3130

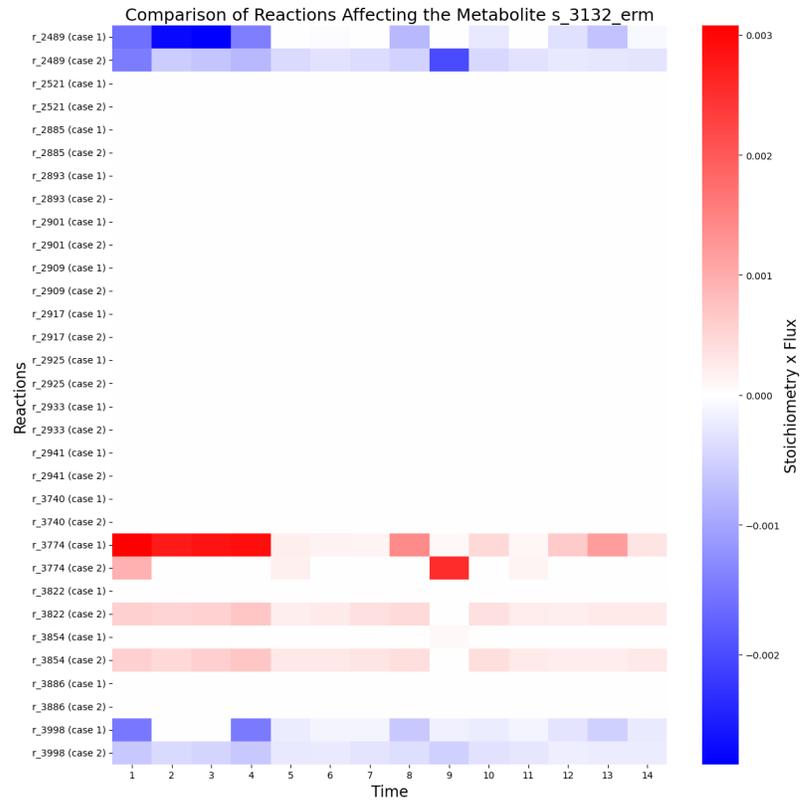


Figura G.2: Comparación de las reacciones del metabolito s_3132

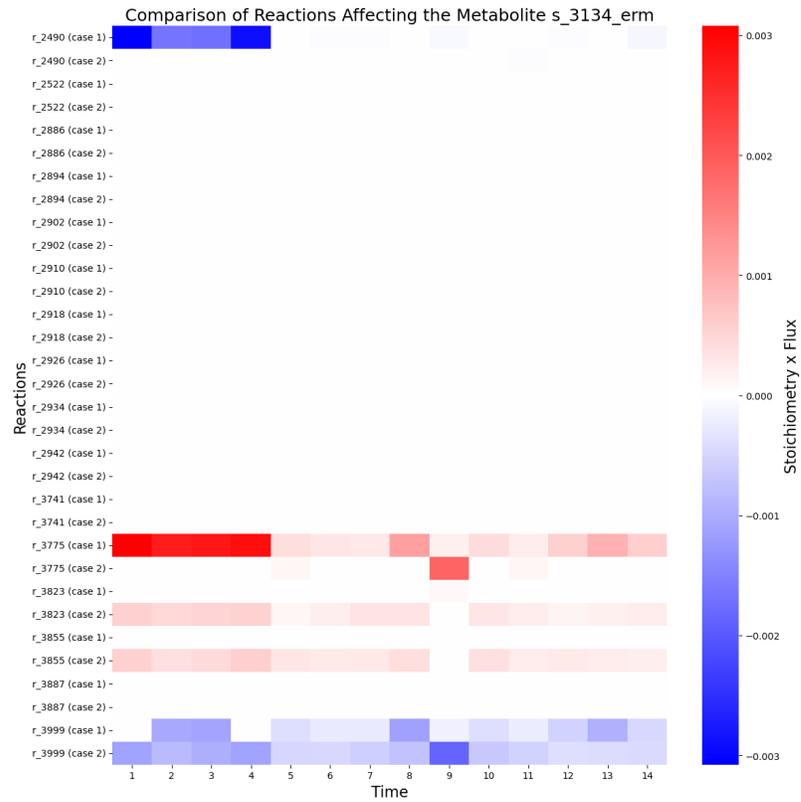


Figura G.3: Comparación de las reacciones del metabolito s_3134

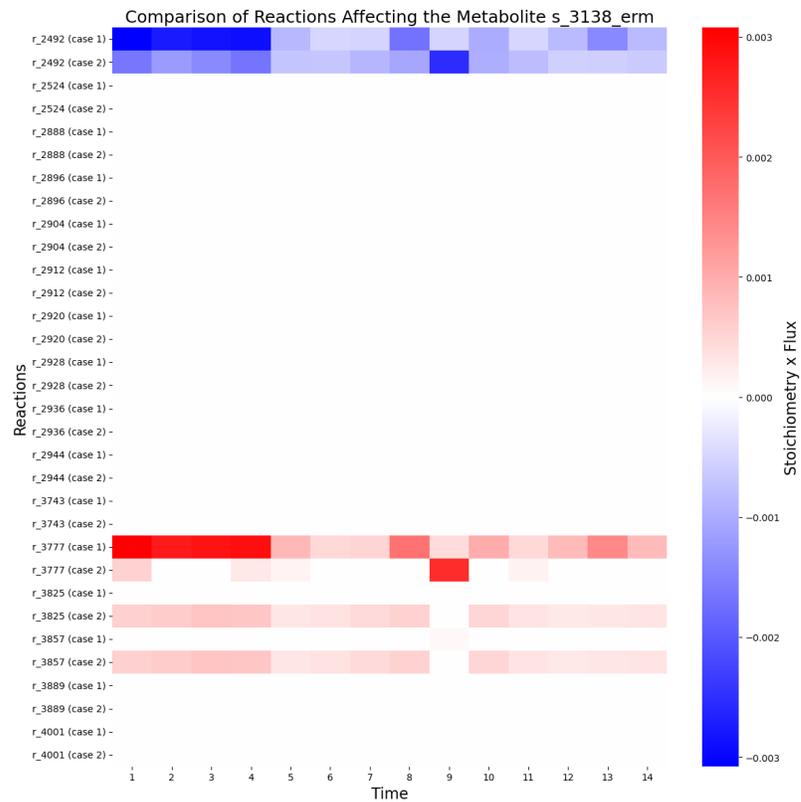


Figura G.4: Comparación de las reacciones del metabolito s_3138

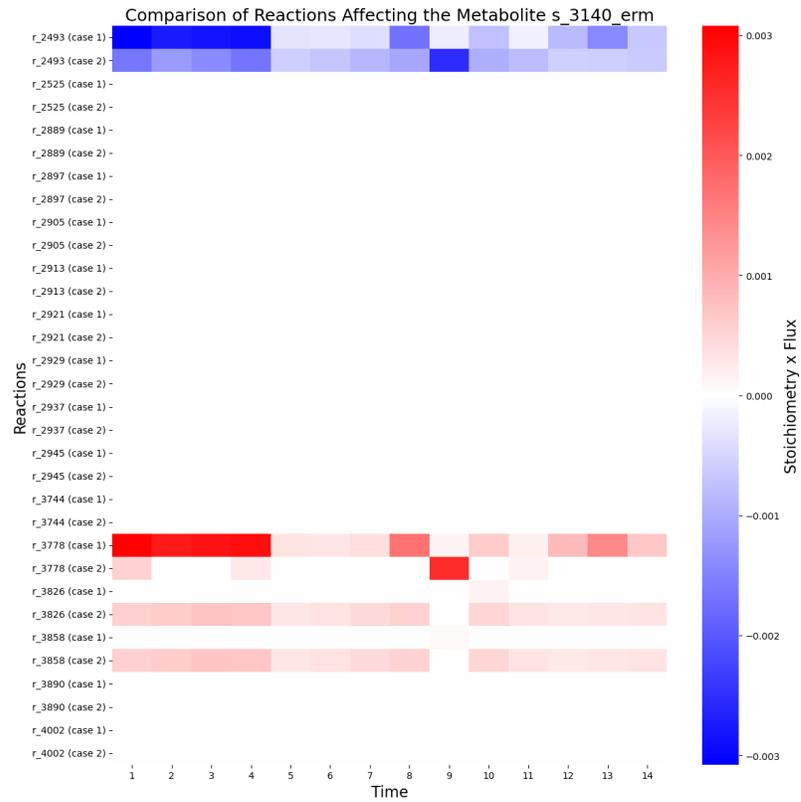


Figura G.5: Comparación de las reacciones del metabolito s_3140

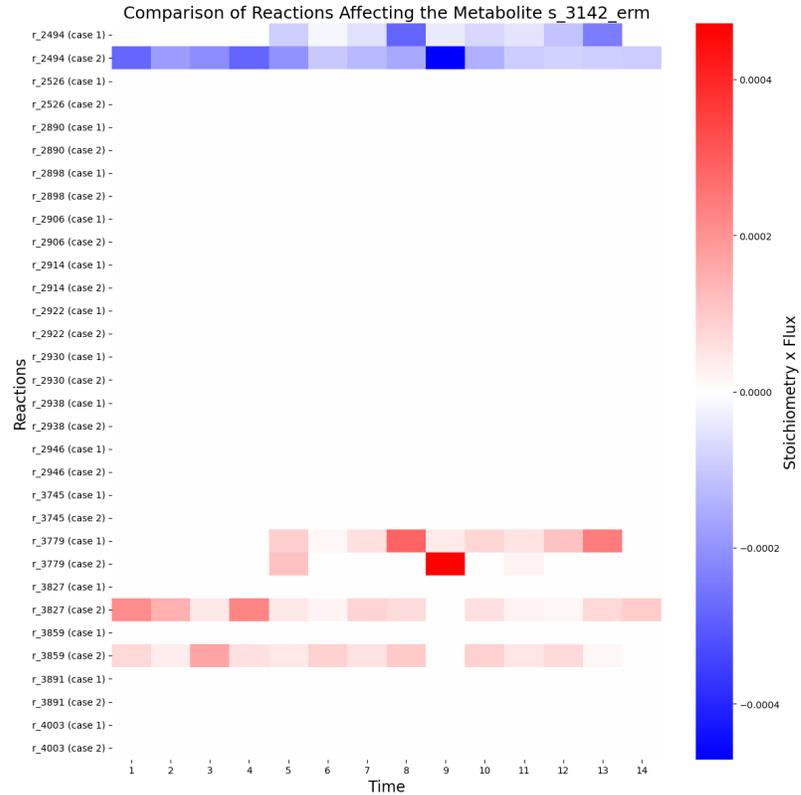


Figura G.6: Comparación de las reacciones del metabolito s_3142