



Universidad de Chile - Facultad de Ciencias - Escuela de Pregrado

**Estudio bioinformático de flujos metabólicos en
cepas de *Escherichia coli* mutantes del
metabolismo de NADH/NADPH en condiciones
electrogénicas.**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Antonietta Michea Karmelic

Director del Seminario de Título: Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Mayo 2019

Santiago - Chile



Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Antonieta Michea Karmelic**

“Estudio bioinformático de flujos metabólicos en cepas de *Escherichia coli* mutantes del metabolismo de NADH/NADPH en condiciones electrogénicas.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título:

Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Comisión Revisora y Evaluadora:

Presidente Comisión:

Dr. Juan Carlos Letelier Parga

Evaluador:

Dr. Ignacio Poblete Castro

Santiago de Chile, mayo del 2019

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Antonieta Michea Karmelic, nací el 27 de septiembre de 1993. Mis antepasados provienen mayoritariamente de Italia y Croacia, pero tanto yo como mis hermanas, padres y abuelos, somos todos Chilenos.

Mi formación básica fue realizada en el Santiago College, desde Pre-Kinder hasta 4to Medio. Tuve el privilegio de tener una educación bilingüe y excelentes profesores que me inspiraron a aprender. Si bien tenía afinidad por las artes y la computación, la ciencia fue mi interés principal por lo que me decidí a estudiar una carrera científica una vez graduada del colegio el año 2011.

Entré a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2012 a la Universidad de Chile. Una vez egresada el año 2017 entré al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias a desarrollar la actual investigación para la realización de mi Seminario de Título.

Si bien me casé con la ciencia, durante la carrera encontré el amor por la informática, la cual decidí aplicar a mi investigación. Las artes siguen siendo parte de mi vida, siendo uno de mis principales hobbies la pintura en acuarela, junto a mis otras pasiones incluyendo los videojuegos, el acuarismo y la cocina.

DEDICATORIA

Al actual lector de esta frase,
por tomarte el tiempo para leer mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda mi familia y amigos que me han acompañado en las distintas etapas de mi vida personal. Entre ellos cabe destacar a mis padres Mirna Karmelic y Fernando Michea, a mis hermanas Josefina e Isadora Michea y a mis mejores amigas Javiera Jimenez y Claudio Ponce.

A los grupos de estudio que se armaron en la U y a aquellos que me ayudaron este proceso de Seminario de Titulo. Muchas gracias por hacer de mi estadía en la Universidad una experiencia memorable.

Sin embargo, a quienes más agradezco es a todos los profesores que me he encontrado a lo largo de los años. Desde las tías del jardín hasta mi tutor de seminario Ricardo Cabrera. Tuve el privilegio de tener excelentes profesores toda mi vida, que me inspiraron a aprender y tuvieron la paciencia de enseñarme. Definitivamente este logro académico se debe a ellas y ellos. Por siempre estaré agradecida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Poder reductor NADH y NADPH	1
1.2. Electrogénesis y celdas de combustible microbiológicas	4
1.3. Ingeniería metabólica del poder reductor	7
1.4. Herramientas bioinformáticas para el estudio del metabolismo	9
1.5. Hipótesis	10
1.6. Objetivo general	10
1.7. Objetivos específicos	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Materiales Utilizados	11
2.1.1. Cepas bacterianas	11
2.1.2. Reactivos	11
2.1.3. Medios de Cultivo	12
2.2. Cultivos Bacterianos y Mediciones	12
2.2.1. Pre-inóculos	12
2.2.2. Celda de combustible microbiológica	13
2.2.3. Cultivos electrogénicos	14
2.2.4. Determinación del factor de conversión de biomasa	15
2.2.5. Determinación del consumo de glucosa	15
2.2.6. Determinación del flujo de electrones	17
2.3. Análisis Bioinformático	18
2.3.1. Construcción de modelos de cepas	21
2.3.2. Determinación del ATP de mantención	23
2.3.3. Análisis de los mecanismos electrogénicos	23
2.3.4. Distribuciones de flujo	24
2.3.5. Cálculo de la tasa de producción de metabolitos	25

3. RESULTADOS	26
3.1. Parámetros Fisiológicos	26
3.1.1. Coeficiente de conversión de biomasa	26
3.1.2. Tasa de crecimiento, consumo de glucosa y flujo de electrones	27
3.2. Análisis Bioinformáticos	30
3.2.1. ATP de mantención	30
3.2.2. Mecanismos Electrogénicos	31
3.2.3. Distribución de Flujos	37
3.2.4. Flujos metabólicos de electrones en NADH y NADPH	41
4. DISCUSIÓN	44
4.1. Energía de mantención: efecto del ATPM en el metabolismo.	44
4.2. Mecanismo electrogénico: DHORD5 como proveedor de menaquinol	47
4.3. Deleción de PGI y cambio de especificidad de la G6PDH: efecto en la distribución de flujos y el balance redox	50
4.4. Metabolismo electrogénico: limitantes, proyecciones y aplicaciones	52
5. CONCLUSIONES	55
6. BIBLIOGRAFÍA	56
7. ANEXO	60
7.1. Codigos de Programación	60
7.1.1. Generación de modelos e incorporación de parámetros experimentales	60
7.1.2. Determinación del ATP de mantención	62
7.1.3. Mecanismos Electrogénicos	62
7.1.4. Importancia DHORD5	64
7.1.5. Markov Chain Monte Carlo	66
7.1.6. Producción NADH NADPH	67
7.1.7. Función Opt_ATPM y Mets	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas y sus características relevantes	11
Tabla 2. Reactivos utilizados durante este trabajo	11
Tabla 3. Mecanismos electrogénicos analizados en el modelo WT	24
Tabla 4. Valores de los parámetros fisiológicos de los cultivos electrogénicos	30
Tabla 5. Flujos de producción total de cofactores NADH y NADPH.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación de los cofactores NADH y NADPH dentro del metabolismo. . .	1
Figura 2. Producción de NADH y NADPH en en el metabolismo central de <i>E. coli</i> . . .	3
Figura 3. Celda de combustible microbiológica (MFC).	5
Figura 4. Modelos postulados del mecanismo de transferencia de electrones provenientes de NADH en una MFC.	6
Figura 5. Vías metabólicas de las cepas de <i>E. coli</i> con cambio de especificidad de la G6PDH y delección de <i>pgi</i>	8
Figura 6. Esquema de la celda de combustible microbiológica (MFC)	14
Figura 7. Modelaje basado en restricciones	20
Figura 8. Muestreo del espacio de soluciones según <i>Flux Balance Analysis</i> o <i>Markov Chain Monte Carlo</i>	21
Figura 9. Método para la determinación de las distribuciones de flujos	25
Figura 10. Determinación del factor de conversión de absorbancia a peso seco. . .	26
Figura 11. Medición de los parámetros fisiológicos cepas WT y NAD-G6PDH. . .	28
Figura 12. Medición de los parámetros fisiológicos cepas Δpgi y doble mutante. .	29
Figura 13. Modelos electrogénicos y su relación con el NADH y el menaquinol. . .	31
Figura 14. Análisis de sensibilidad de los posibles mecanismos electrogénicos de la cepa <i>Wild Type</i> de <i>Escherichia coli</i>	32
Figura 15. Ruta metabólica de DHORD5 en la síntesis de purinas y pirimidinas. . .	33
Figura 16. Efecto de DHORD5 en el metabolismo electrogénico de <i>Escherichia coli</i> . .	35
Figura 17. Mapa metabólico de las reacciones involucradas en el efecto del uso de ácido dihidroorotico (DHORD5) en el metabolismo electrogénico de <i>Escherichia coli</i>	36
Figura 18. Distribución de flujos metabólicos para las cuatro cepas estudiadas con DHORD5 como mecanismo electrogénico.	39
Figura 19. Distribución de fujos metabólicos para la cepa WT comparando los mecanismos electrogénicos DHORD5 y NADH17pp.	40
Figura 20. Contribución del metabolismo en la producción de poder reductor. . .	42
Figura 21. Sensibilidad a ATPM sobre la biomasa y el consumo de glucosa	46
Figura 22. Relación del ATP de mantención en el metabolismo energético.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

3PG	3-fosfoglicerato
6PGC	6-fosfogluconato
AC	Acetato
ACCOA	Acetil-CoA
AKG	Oxoglutarato
ADP	Adenosín Difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
ATPM	ATP de mantención
C-13	Carbono 13
CIT	Citrato
Δpgi	Delección del gen <i>pgi</i> que codifica la fosfogluco isomerasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfotransferasa
DHORD5	Reacción del ácido dihidroorotico
DHORTS	Reacción dihidroorotasa
DHORDfum	Reacción DHORD fumarato dependiente
DO	Densidad óptica
E4P	Eritrosa-4-fosfato
ED	Vía Entner Doudoroff
ETOH	Etanol
f	Factor de conversión de densidad óptica a biomasa
F_e	Flujo metabólico de salida de electrones
F6P	Fructosa-6-fosfato
FBA	Flux Balance Analysis
FOR	Formato
FUM	Reacción fumarasa
G3P	Gliceraldehido-3-fosfato

G6P	Glucosa-3-fosfato
GAPD	Reacción gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
gDW	Gramos de peso seco
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
G6PDH2r	Reacción glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GND	Reacción fosfogluconato deshidrogenasa
HACD	Reacción hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
HK	Hexokinasa
<i>i</i>	Corriente eléctrica
ICDH_{yr}	Reacción isocitrato deshidrogenasa
ICIT	Isocitrato
LAC	Lactato
LB	Caldo de lisogenia
MAL	Malato
MCMC	Monte Carlo Markov Chain
MDH	Reacción malato deshidrogenasa
MFC	Celda de Combustible Microbiológica
MOX	Reacción malato oxidasa
N_A	Número de Avogadro
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADP	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido
NAD(H)	NAD y NADH
NADP(H)	NADP y NADPH
NAD(P)	NAD y NADP
NAD(P)H	NADH y NADPH
NADTRHD	Reacción NAD transhidrogenasa

NADH10	Reacción NADH deshidrogenasa
NADH17pp	Reacción NADH deshidrogenasa periplasmática
NAD-G6PDH	G6PDH con cambio de especificidad para NAD
NR	Rojo neutro
NRH₂	Rojo neutro reducido
OAA	Oxalacetato
ORTP	Reacción orotato fosforibosiltransferasa
OxPPP	Vía oxidativa de las pentosas fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PGI	Fosfogluco isomerasa
<i>pgi</i>	Gen que codifica la enzima fosfogluco isomerasa
PntAB	Deshidrogenasa de membrana
PPC	Reacción fosfoenilpiruvato carboxilasa
PYK	Reacción piruvato kinasa
PYR	Piruvato
Q_{glc}	Tasa de consumo de glucosa
<i>r</i>	Razón de cambio de la corriente respecto a la densidad óptica
R5P	Ribosa-5-fosfato
RU5P	Ribulosa-5-fosfato
S7P	Sedoheptulosa-7-fosfato
SUC	Succinato
SUCOAS	Succinil-CoA sintetasa
μ	Tasa de crecimiento
UdhA	Transhidrogenasa soluble
WT	Silvestre
XU5P	Xilulosa-5-phosphate
Y_(x/s)	Rendimiento de biomasa por sustrato

RESUMEN

En los organismos heterótrofos las moléculas con poder reductor NADH y NADPH tienen funciones esenciales en la célula; el primero está principalmente involucrado en la formación de ATP y el otro en la producción de biomasa. En el metabolismo existe un balance entre el consumo y la producción de estos cofactores, cuya perturbación causa cambios en los flujos de carbono en las vías centrales. Por otra parte, existen microorganismos capaces de generar electricidad, denominados electrogénicos, los cuales son utilizados en celdas de combustible microbiológicas (MFC). Es posible mediante la adición de mediadores hacer que un organismo no electrogénico, como *Escherichia coli*, sea capaz de generar electricidad. Se postula que los electrones necesarios para el proceso de electrogénesis se originan del poder reductor proveniente del metabolismo celular, particularmente del cofactor NADH. A partir de esto se propone estudiar el efecto de la modificación del balance NADH/NADPH sobre la generación de electricidad en MFC utilizando Neutral Red como mediador en cultivos de cepas K-12 MG1655 de *E. coli*. Específicamente, se estudió el cambio en la especificidad del cofactor de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH-NAD) y la ausencia o presencia de la fosfoglucoisomerasa (Δpgi). Se evaluó el efecto de las mutaciones sobre la red metabólica mediante análisis *in silico* y se simuló los distintos mecanismos posibles por el cual ocurre la generación de electricidad. Se implementó la metodología de *Flux Balance Analysis* (FBA) y muestreo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) mediante la herramienta COBRA en MatLab (MathWorks®). Los análisis demostraron que el cambio de especificidad de la G6PDH y la delección del gen *pgi* generan una adaptación metabólica dentro de la red para sostener el desbalance de los poderes reductores, lo cual afecta a los parámetros de crecimiento, consumo de fuente de carbono y producción de electricidad. Sin embargo, se concluye que a los valores de flujos de producción de electricidad observados en este trabajo, el organismo no utiliza el NADH como donador de electrones, sino que extrae electrones del orotato dentro del metabolismo anabólico. Se discute el efecto del balance NADH/NADPH sobre el metabolismo energético, el reordenamiento del metabolismo central y su efecto sobre parámetros fisiológicos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Poder reductor NADH y NADPH

El metabolismo se define como la suma de reacciones químicas que ocurren dentro de un organismo. Mediante su metabolismo los organismos heterótrofos son capaces de oxidar la fuente de carbono con dos principales consecuencias: (1) la generación de moléculas precursoras para la biosíntesis y (2) la provisión de energía necesaria para el funcionamiento del metabolismo (Holms, 1986).

La red metabólica del microorganismo modelo, *Escherichia coli*, está constituida por más de 2000 reacciones. En el metabolismo destacan los dinucleótidos de nicotinamida y adenina, NAD y NADP, ya que son utilizados como intermediarios capaces de transportar energía en forma de electrones variando entre su forma oxidada y reducida y además participan en más de cien reacciones (Orth y cols., 2011).

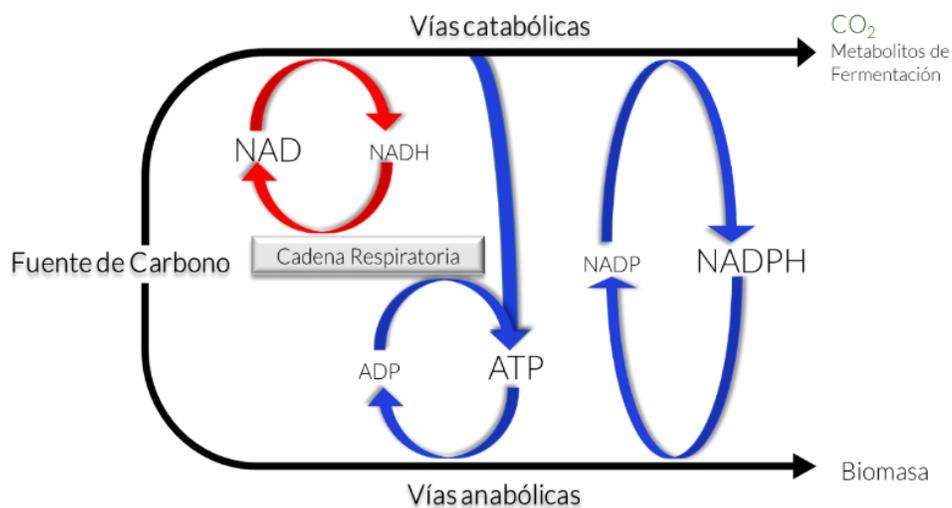


Figura 1. Relación de los cofactores NADH y NADPH dentro del metabolismo.

La fuente de carbono puede ser utilizada en las vías anabólicas donde se produce la generación de biomasa donde se requiere del consumo de NADPH y ATP, o en las vías catabólicas donde se genera la producción de energía en forma de ATP en el proceso de respiración, donde se requiere de NADH. Imagen modificada de la figura original de la tesis de Canonaco (2003).

Si bien el NAD(H) y el NADP(H) son moléculas de estructura similar e idénticos potenciales estandar de óxido reducción ($E_0' = -0.32$ V), cumplen funciones diferentes y la producción de su forma reducida se encuentra segregada dentro del metabolismo (Carugo y Argos, 1997). El NADH es utilizado por la célula en la formación energía a partir de ATP en la cadena transportadora de electrones y en reacciones fermentativas, mientras que el NADPH es utilizado mayoritariamente en distintos procesos de biosíntesis (Fuhrer y Sauer, 2009). De esta forma, los electrones transportados por el NADH son capaces de salir de la célula a través de metabolitos de fermentación o mediante el aceptor final externo en la respiración. Por otro lado los electrones transportados por el NADPH permanecen dentro de la célula formando parte de la biomasa en forma de aminoácidos, nucleótidos, etc.

Debido a la diferencia en la función de NADH y NADPH, el metabolismo de *E. coli* se adaptó para diferenciar la síntesis de ambas moléculas dentro de la red (Olavarría y cols, 2014). En la Figura 2 se observa un mapa simplificado del metabolismo central de *E. coli*, destacando la localización de las deshidrogenasas, las cuales debido a su especificidad por un cofactor producen NADH o NADPH de forma segregada. Esto quiere decir que la producción de NADPH se encuentra concentrada en la vía de las pentosas fosfato mediante las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y fosfogluconato deshidrogenasa (GND), mientras que la producción de NADH se encuentra en la glicólisis y el ciclo de Krebs. De esta forma *E. coli* es capaz de poder adaptar los flujos de las vías metabólicas según los requerimientos, modificando la producción de NADH o NADPH.

Respecto a las funciones de generación de energía y producción de biomasa, esta claro que se requiere de una concordancia entre ambas para la viabilidad de un organismo. De esta misma forma, a pesar de tener función y vías de producción diferentes, se necesita de un balance entre los flujos de producción de NADH y NADPH. Además de poder redistribuir los flujos de sus vías metabólicas, *E. coli* cuenta con dos isoformas de transhidrogenasa: la de membrana (PntAB) y la soluble (UdhA) las cuales son capaces de transferir los hidruros del NADH al NADP y viceversa, respectivamente (Fuhrer y Sauer, 2009).

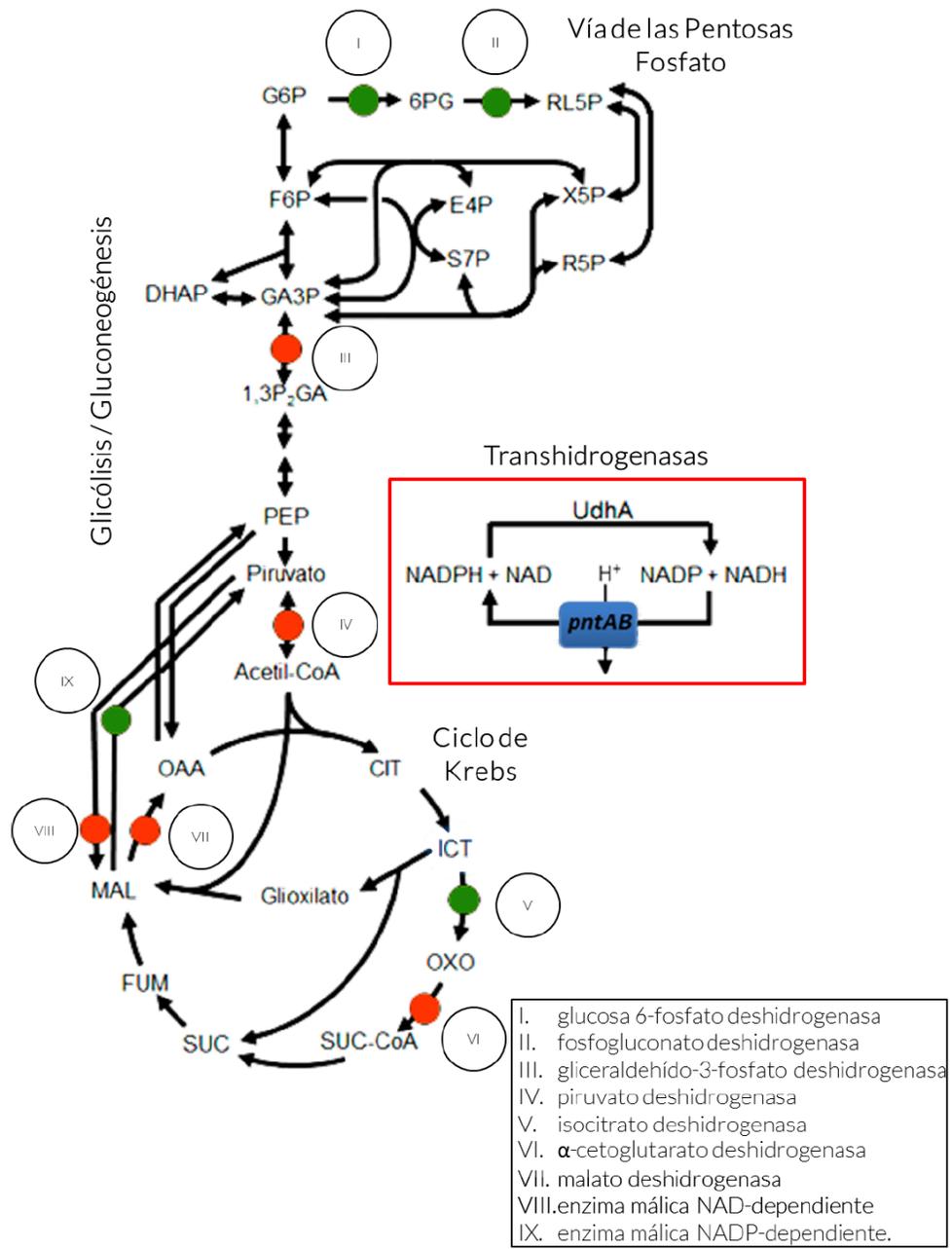


Figura 2. Producción de NADH y NADPH en el metabolismo central de *E. coli*.

Metabolismo central de *E. coli* que incluye la vía de las pentosas fosfato, la glicólisis y el ciclo de Krebs. En verde se presentan las reacciones deshidrogenasas productoras de NADPH y en rojo las productoras de NADH. Adicionalmente en el cuadro rojo se presentan las transhidrogenasas pntAB y UdhA. Extraído y modificado de la tesis de Erick Armingol, 2015.

1.2. Electrogénesis y celdas de combustible microbiológicas

Como se mencionó, a través del NADH, las células tienen la capacidad de establecer un flujo de electrones desde los nutrientes al medio externo. Un ejemplo es el traspaso de electrones a un aceptor final en la respiración, el cual puede ser el oxígeno en condiciones aeróbicas u otros aceptores como fumarato o a aceptores sólidos en diferentes tipos de respiración anaeróbica (Nelson y cols., 2017. Jensen y cols, 2010).

El traspaso de electrones a aceptores sólidos metálicos es de gran interés por la capacidad de generar electricidad a partir de microorganismos. Existen dos mecanismos por los cuales este traspaso de electrones puede ocurrir: una transferencia directa (DET) o una transferencia mediada (MET) (Mao y Verwoerd, 2013A). En el mecanismo directo el organismo cuenta con un Citocromo-c de membrana el cual es capaz de interactuar directamente con el sólido metálico. Entre las especies bacterianas electrogénicas que cuentan con esta maquinaria está *Shewanella* (El-Naggar y cols, 2010), *Geobacter* (Reguera y cols, 2005) y *Rhodospirillum rubrum* (Bullen y cols, 2006). Por otro lado, la transferencia mediada requiere de una molécula, soluble o de membrana, capaz de transportar los electrones al exterior hasta el aceptor sólido. Existen organismos capaces de sintetizar sus propios mediadores tales como flavinas o quinonas, denominándose mediadores endógenos (Okamoto y cols, 2013). Sin embargo, es posible agregar de forma exógena moléculas capaces de extraer y transportar los electrones desde un organismo hacia al aceptor sólido, generando electricidad a partir de organismos naturalmente no electrogénicos, tales como *E. coli*. Existen varios mediadores exógenos, entre ellos el rojo neutro (NR) se ha reportado ser el mediador con mayor eficiencia en la generación de electricidad (Park y Zeikus, 2000).

Las Celdas de Combustible Microbianas (MFC) son dispositivos capaces de aprovechar el fenómeno de electrogénesis a partir de microorganismos. Estas están formados por dos compartimientos: uno anódico y uno catódico, separados por una membrana permeable a protones. En el ánodo se encuentra el cultivo en condiciones anaeróbicas donde se generan electrones los cuales son transportados mediante el electrodo hacia el cátodo en donde al estar en presencia de oxígeno y protones forma agua, generando una diferencia de potencial que finalmente se traduce en una corriente eléctrica (Logan y cols. 2006).

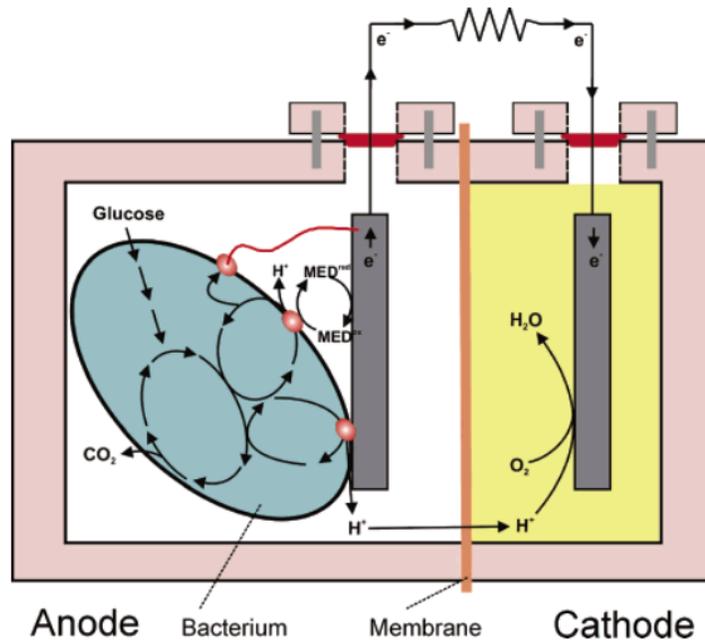


Figura 3. Celda de combustible microbiológica (MFC).

Diagrama del funcionamiento de una MFC. El cultivo microbiológico se encuentra en el ánodo donde transfiere sus electrones a un electrodo metálico capaz de transportar la corriente hasta el cátodo. Extraído de Logan y cols., 2006.

Hasta el momento se han realizado variadas investigaciones acerca del proceso de optimización de los componentes de las MFC con el objetivo de mejorar la generación de corriente (Mao y Verwoerd, 2013A). A su vez, se utiliza el organismo modelo *E. coli* en estas investigaciones. Por esta razón, actualmente existe un debate sobre el mecanismo exacto por el cual *E. coli* permite el traspaso de electrones en una MFC. Se ha propuesto que el NADH está involucrado en el traspaso de electrones en la MFC. Park y Zeikus (2000) postularon que el mediador exógeno Neutral Red interactúa directamente con el NADH, siendo el NADH la molécula donadora directa de electrones. Sin embargo, más recientemente Harrington y cols. (2015) postularon que el menaquinol, reducido previamente por el NADH, es en realidad la molécula involucrada en la interacción con Neutral Red. Los dos modelos postulados se observan en la Figura 4.

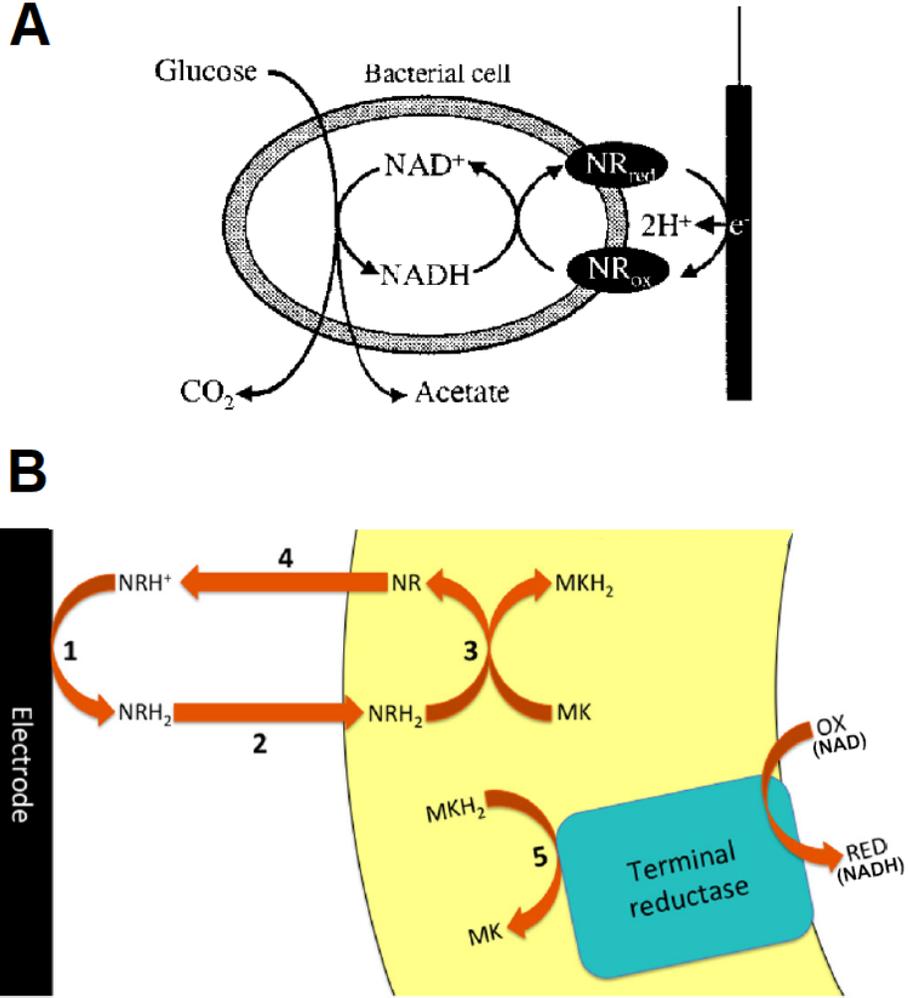


Figura 4. Modelos postulados del mecanismo de transferencia de electrones provenientes de NADH en una MFC.

Diagramas de los dos modelos postulados por Park y Zeikus (A) y Harrington y cols. (B) sobre mecanismo de la transferencia de electrones provenientes de NADH en la generación de electricidad de *E. coli* en una MFC. Park y Zeikus postulan que el NADH interactúa directamente con el Neutral Red, transportando sus electrones hacia el electrodo (A). Harrington y cols. postulan que el neutral red no interactúa directamente con el NADH, sino con el menaquinol previamente reducido por el NADH (B). En la Tabla 3 se presentan las reacciones involucradas en cada modelo, NADH_{dir} para el modelo de Park y Zeikus y NADH_{17pp} con NADH₁₀ para el modelo de Harrington y cols. Figuras modificadas de Park y Zeikus, 2000 y Harrington y cols., 2015

1.3. Ingeniería metabólica del poder reductor

Las moléculas NAD, NADP y sus formas reducidas son una de las principales responsables del balance redox dentro de la célula. Debido a su importancia existe un interés en estudiar el efecto de este balance sobre la red metabólica, por lo que se han realizado varios estudios relacionados a la modificación de la producción y consumo de NADH y NADPH.

Un tema de interés es la producción de metabolitos de importancia industrial, como es el caso del trabajo de Balzer y cols. (2013), los cuales al generar un aumento de NADH mediante la expresión heteróloga de la formato deshidrogenasa NAD-dependiente de *C. boidinii* en *E.coli*, lograron elevar la producción de succinato. Otro ejemplo es el trabajo de Kabus y cols. (2007), los cuales al generar un aumento de NADPH expresando la transhidrogenasa PntAB de *E. coli* en *C. glutamicum*, lograron elevar la producción de L-lisina.

Otra área de estudio tiene que ver con la importancia de la especificidad de las deshidrogenasas por el cofactor NAD o NADP dentro del metabolismo. Bologna y cols. (2007) estudiaron dos formas de la enzima málca, una NAD-dependiente y otra NADP-dependiente. Los resultados indican que el cambio de especificidad esta relacionado a una diferencia en las estructuras de las enzimas y en sus sistemas de regulación dentro del metabolismo.

En el laboratorio donde se realiza el presente trabajo, Olavarría y cols. el 2014 estudiaron el efecto del cambio de especificidad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), de una NADP-dependiente a una NAD-dependiente. Adicionalmente realizaron la delección de la proteína fosfogluco-isomerasa (PGI) para aumentar el flujo por la vía de las pentosas fosfato donde se encuentra la G6PDH. En la Figura 5 se observan las cepas estudiadas por Olavarría y cols. El cambio de especificidad genera una disminución de la tasa de crecimiento 44 % respecto de la cepa silvestre debido a una falta de disponibilidad de NADPH en la célula. Por otro lado, respecto de la cepa Δpgi , la tasa de crecimiento aumenta un 59 % con el cambio de especificidad de G6PDH ya que esta parcialmente alivia el exceso de NADPH producido por la vía de las pentosas. Tanto Olavarría y cols. (2014) como Long y cols. (2017) observan que la delección de *pgi* resulta en una severa disminución

de la tasa de crecimiento, en 77% y 80% respectivamente, debido a diferentes factores, tales como una disminución en el consumo de glucosa y el mencionado exceso de producción de NADPH, en comparación a la cepa silvestre.

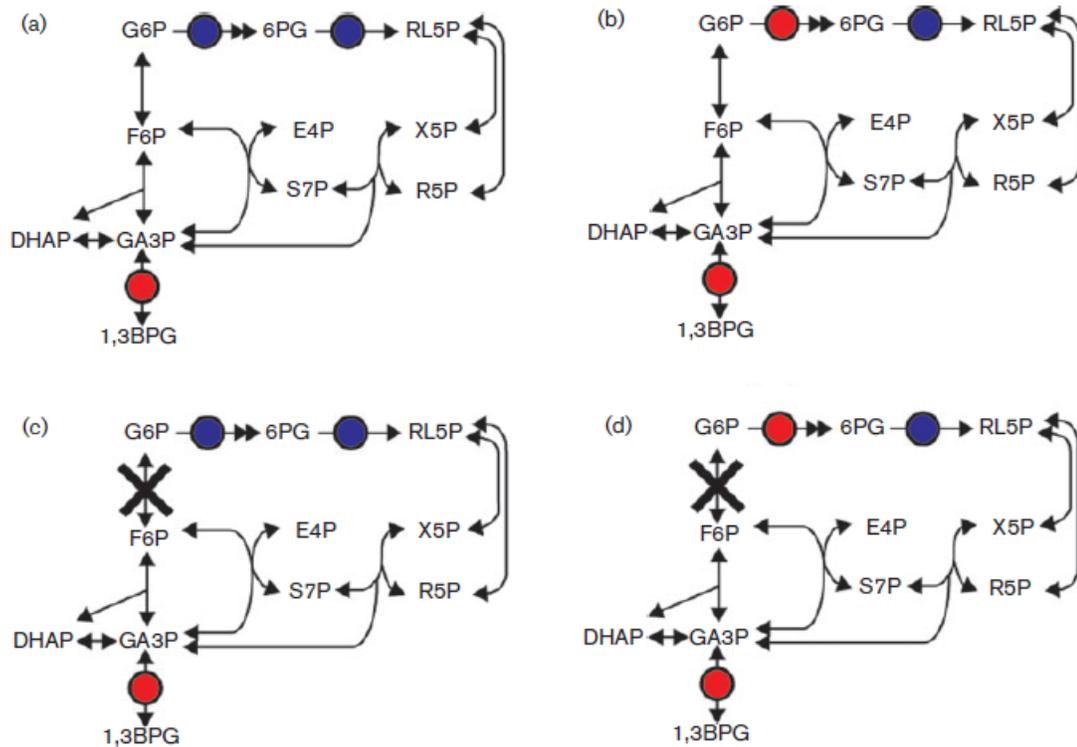


Figura 5. Vías metabólicas de las cepas de *E. coli* con cambio de especificidad de la G6PDH y delección de *pgi*.

Se ilustra un resumen de las vía de las pentosas fosfato e inicio de la glicólisis para las cepas de *E. coli* utilizadas por Olavarría y cols. (2014). La cepa silvestre presentó una tasa de crecimiento de 0.64 h^{-1} (a). La cepa con cambio de especificidad en la enzima G6PDH (NAD-G6PDH) presentó una tasa de crecimiento de 0.36 h^{-1} (b). La cepa con la delección en *ppgi* (Δpgi) presentó una tasa de crecimiento de 0.145 h^{-1} (c). La cepa doble mutante (NAD-G6PDH- Δpgi) presentó una tasa de crecimiento de 0.231 h^{-1} (d). Modificado de Olavarría y cols., 2014.

Finalmente, existe el interés de incrementar la generación de electricidad en MFC mediante la modificación genética de microorganismos (Yong y cols., 2009, 2014a, 2014b, Wong y cols., 2016). Sin embargo, faltan estudios que relacionen la producción de electri-

cidad con el metabolismo de producción y consumo de NADH y NADPH más allá de las propuestas de tanto Park y Zeikus (2000) como Harrington y cols. (2015) sobre la relación entre el NADH y la producción de corriente. A partir de esto, surge la idea de estudiar el impacto del metabolismo de los cofactores NADH y NADPH mediante las mutantes realizadas por Olavarría y cols. (2014), sobre la producción de electricidad mediante el sistema de MFC diseñado por Fernanda Retamal (2018).

1.4. Herramientas bioinformáticas para el estudio del metabolismo

Durante el último tiempo, se han generado herramientas informáticas para el estudio de procesos biológicos. Una de estas es Flux Balance Analysis (FBA): un método matemático que permite simular los flujos de reacciones dentro de una red metabólica completa optimizando una función objetivo (generación de biomasa, consumo de fuente de carbono, tasa de respiración, etc.) y estableciendo límites a partir de parámetros asignados experimentalmente (Orth y cols., 2010). Investigadores ya han usado esta herramienta para estudiar la generación de electricidad en MFC en organismos electrogénicos como *Geobacter sulfurreducens* (Mao, L., y Verwoerd, W. S., 2013B) y en organismos no electrogénicos como *Saccharomyces cerevisiae* (Mao, L., y Verwoerd, W. S. 2013C). Si bien Flux Balance Analysis ha permitido el estudio *in silico* de flujos metabólicos con éxito, esta asume que el organismo optimiza un proceso en particular, cuando en ciertos casos se ha demostrado que las bacterias funcionan en un sub-óptimo (Schuetz y cols., 2012). Una alternativa a este enfoque metodológico es emplear el muestreo mediante Markov chain Monte Carlo (MCMC), el cual no requiere de una función objetivo a optimizar y se considera imparcial, a diferencia de FBA. Este modelo se basa en la selección al azar de una posible solución y a partir de este punto explorar el espacio de soluciones de forma estocástica (Bordobar y cols., 2014). Este método finalmente entrega una distribución de las soluciones posibles según la frecuencia en la que fueron muestreadas, entregando el flujo más probable en lugar del óptimo. Este procedimiento ya ha sido utilizado con éxito en análisis de flujos metabólicos de bacterias como *Corynebacterium glutamicum*, donde se estudiaron los flujos metabóli-

cos centrales (Kadiramanathan y cols, 2006). Estos métodos fueron implementados en este trabajo y se encuentran detallados en la sección 2.3

1.5. Hipótesis

Las mutaciones de cambio de especificidad de G6PDH a una NADH-dependiente y la delección del gén *pgi* en *Escherichia coli* en condiciones de cultivos electrogénicos generarán adaptaciones metabólicas y energéticas, donde las cepas con una mayor producción de NADH tendrán la mayor producción de corriente mediante el uso de menaquinol como intermediario, lo que se verá evidenciado mediante análisis bioinformáticos.

1.6. Objetivo general

Análisis de la distribución de flujos metabólicos mediante FBA y MCMC de cepas de *Escherichia coli* que poseen el reemplazo de la G6PDH (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) por una forma NAD-dependiente en presencia o ausencia del gen *pgi* (fosfogluco-isomerasa) de cultivos en condiciones electrogénicas con glucosa como única fuente de carbono.

1.7. Objetivos específicos

1. Determinación del factor de conversión de absorbancia a peso seco de los cultivos anaeróbicos de *E. coli*.
2. Medición de tasa de crecimiento y consumo de glucosa de cultivos MFC de las cepas WT, G6PDH-NADH, Δpgi y Δpgi G6PDH-NADH
3. Generación de modelos con la reacción electrogénica para las cepas WT, G6PDH-NADH, Δpgi y Δpgi G6PDH-NADH.
4. Análisis de flujos metabólicos mediante Flux Balance Analysis (FBA) y muestreo de Monte Carlo por Cadenas de Markov (MCMC).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales Utilizados

2.1.1. Cepas bacterianas

En este trabajo se utilizaron 4 cepas bacterianas las cuales se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas y sus características relevantes

Cepa	Características relevantes
<i>Wild Type</i>	Cepa K-12 MG1655 con genotipo F- λ -
NAD-G6PDH	Cambio de especificidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Δpgi	Ausencia de fosfoglucoasa isomerasa
Δpgi NAD-G6PDH	Cambio de especificidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y ausencia de fosfoglucoasa isomerasa

2.1.2. Reactivos

Tabla 2. Reactivos utilizados durante este trabajo

Reactivo	Proveedor
Agarosa	Calbiochem
Felpa de Grafito	Sigracell
Membrana permeable a cationes	Membranes International Inc.
Cable Platino	Agencias Nórdicas S.A.
Peptona	DIFCO
Extracto de Levadura	DIFCO
$K_3[Fe(CN)_6]$	Sigma-Aldrich
Rezasurina	Sigma-Aldrich
Tiamina	Sigma-Aldrich
KH_2PO_4	Merck S.A.
NaCl	Merck S.A.
Rojo Neutro	Merck S.A.
D-Glucosa	Merck S.A.
$FeCl_2$	Merck S.A.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck S.A.
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck S.A.
Etanol	Merck S.A.
NH_4Cl	Merck S.A.
NaH_2PO_4	Merck S.A.
$ZnSO_4$	Merck S.A.
$CuCl_2$	Merck S.A.
$MnCl_2$	Merck S.A.
$CoSO_4$	Merck S.A.

2.1.3. Medios de Cultivo

Medio *Lysogeny broth* (LB)

Cada litro de medio LB se constituye de los siguientes componentes: 10 g de peptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura. Los componentes se disolvieron en 900 mL de agua mili-Q y se ajustó el pH a 7. Luego se agregó agua mili-Q hasta alcanzar el volumen de 1 L y se esterilizó mediante autoclave.

Medio *Lysogeny broth* Agar (LB Agar)

Cada litro de medio LB Agar se constituye de los siguientes componentes: 10 g de peptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 17 g de agar. Los componentes se disolvieron en 900 mL de agua mili-Q y se ajustó el pH a 7. Luego se agregó agua mili-Q hasta alcanzar el volumen de 1 L y se esterilizó mediante autoclave.

Medio Mínimo M9 Glucosa

Cada litro de medio mínimo M9 glucosa se constituye de los siguientes componentes: 3,0 g de KH_2PO_4 , 5,96 g de Na_2HPO_4 , 1,02 g de NH_4Cl y 0,5 g de NaCl. Los componentes se disolvieron en 900 mL de agua mili-Q y se esterilizó mediante autoclave. Se adicionó 1 mL de cada una de las siguientes soluciones previamente esterilizadas: MgSO_4 2 M, CaCl_2 0,1 M, Tiamina 3 mM y sales traza. La solución de sales traza de compone cada 1 L de: 1,8 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,1 g de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 10 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Finalmente se agregó glucosa al medio a una concentración final de $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.2. Cultivos Bacterianos y Mediciones

2.2.1. Pre-inóculos

Las cepas utilizadas en este trabajo se mantuvieron almacenadas en LB 50% glicerol a -80°C . Para las cepas WT y NAD-G6PDH se aislaron colonias inoculando placas con

medio LB Agar las cuales finalmente fueron incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Para las cepas Δpgi y Δpgi NAD-G6PDH se realizaron pre-inóculos anaeróbicos en medio LB. Para esto, se utilizaron botellas de 100 mL conteniendo 25 mL de medio LB. Se purgó el medio dentro de la botella con nitrógeno gaseoso por 3 minutos. Con una punta esterilizada se retiró bacteria del stock de -80°C y se inoculó el medio introduciendo la punta a la botella. Luego se cerró la botella con una tapa que posee dos septas de butilo y mediante la septa se purgó el aire restante por 2 minutos. Finalmente las botellas fueron incubadas bajo agitación a 37°C por aproximadamente 3 horas.

2.2.2. Celda de combustible microbiológica

La celda de combustible microbiológica se compone de una celda de dos compartimientos de 120 mL, el ánodo y el cátodo, separados mediante una membrana permeable a protones circular de 9,62 cm². El ánodo debe mantenerse en condiciones anaeróbicas, por lo cual tiene una tapa con dos septas de butilo tapadas con gomas. Por una de las septas cruza el alambre de platino del electrodo y por la otra cruza la aguja de una jeringa, con una manguera conectada dentro de la botella para la toma de muestras. La aguja a su vez esta conectada a la jeringa mediante una llave de tres pasos. El compartimiento anódico contiene el cultivo bacteriano detallado en la sección 2.2.3. El cátodo debe mantenerse en condiciones aeróbicas, por lo que posee una tapa con un espacio abierto el cual se cubre con parafilm y se hacen orificios. En un orificio se inserta el alambre de platino del electrodo. El compartimento catódico contiene una solución de 100 mM de buffer fosfato y 50 mM de ferricianuro. Tanto el electrodo del anión como el del catión poseen una felpa de grafito de 2cm² unida en la punta del alambre de platino. Al electrodo anódico se le conecta una resistencia de 1 k Ω , el cual a su vez se conecta a un multímetro (HoldPeak HP-90EPC) y finalmente se cierra el circuito con el multímetro unido al electrodo catódico. El multímetro se conecta a un computador capaz de registrar los datos de intensidad de corriente (μA). Tanto el compartimiento anódico como el compartimento catódico tienen una barra magnética. El sistema finalmente se monta en un contenedor con un baño termorregulado a 37°C sobre un agitador magnético. El esquema de la celda de combustible se encuentra ilustrado en la Figura 6.

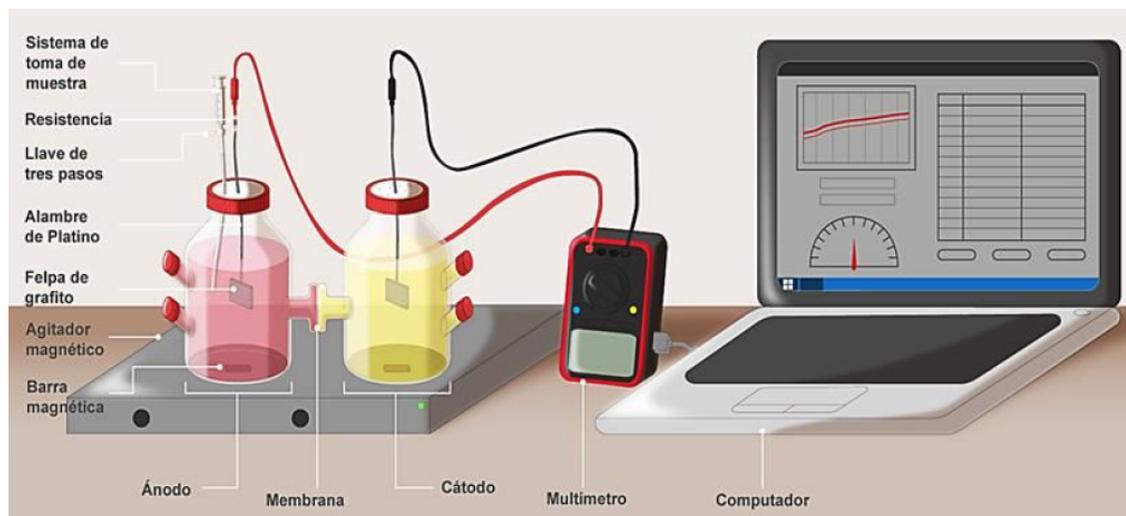


Figura 6. Esquema de la celda de combustible microbiana (MFC)

Diagrama del montaje de los componentes de la MFC diseñado por Fernanda Retamal (2018). El baño termostático no se encuentra ilustrado.

2.2.3. Cultivos electrogénicos

Para los experimentos en las MFC se realizaron cultivos con las cepas en el compartimiento anódico. La solución anódica consistía de 120 mL de medio mínimo M9-Glucosa y NR 20 μ M. Para lograr la condición de anaerobiosis se purgó la solución anódica con nitrógeno gaseoso por 10 minutos. En el caso de las cepas WT y NAD-G6PDH el medio fue inoculado mediante colonias aisladas, mientras que para las cepas Δpgi y Δpgi NAD-G6PDH se utilizaron pre-inóculos anaeróbicos, tal como se describen en la sección 2.2.1. Una vez montada la celda de combustible microbiana, se registró la intensidad de corriente y se tomó una muestra de 1 mL del cultivo cada 30 o 60 minutos para medir el consumo de glucosa y la tasa de crecimiento. De la muestra se extrajo 100 μ L para la medición del consumo de glucosa, los cuales se dejaron incubar por 10 minutos a 90°C para luego ser centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para obtener el medio extracelular se tomaron 80 μ L del sobrenadante los cuales luego se diluyeron con agua nanopura hasta alcanzar un volumen final de 800 μ L para finalmente ser almacenados a -80°C. Con el volumen sobrante de la muestra original se midió la densidad óptica a 660 nm.

2.2.4. Determinación del factor de conversión de biomasa

Para poder expresar la biomasa en unidades de $\text{gDW}\cdot\text{L}^{-1}$ se requiere del factor de conversión de biomasa (f). Para obtener el valor de f se realizaron tres cultivos de la cepa WT en medio mínimo M9 glucosa, dejándolos incubar a 37°C bajo agitación. Se tomaron dos alícuotas de 15 mL en triplicado a distintos tiempos del crecimiento del cultivo, depositándolas en tubos previamente masados. De los 15 mL, se utilizó 1 mL para medir la densidad óptica a 600 nm y el resto se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento a 100°C por 24 horas. Finalmente se masó el tubo conteniendo la muestra secada y se calculó la diferencia con el tubo vacío, normalizando por el volumen de la muestra centrifugada (14 mL).

2.2.5. Determinación del consumo de glucosa

Se midió la concentración de glucosa de las muestras de medio extracelular utilizando kit D-glucosa-HK (Megazyme) junto al equipo Synergy 2 Multi-Mode Microplate Readers (BioTek). El kit consiste en un ensayo acoplado en donde la D-glucosa es fosforilada por la enzima Hexokinasa (HK) + ATP, a glucosa-6-fosfato (G-6-P). La glucosa-6-fosfato (G-6-P) en presencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) es oxidada por NADP^+ a gluconato-6-fosfato, formando NADPH con una relación estequiométrica 1:1 con la D-glucosa consumida. Es posible medir el cambio de concentración de NADPH ya que este absorbe a 340 nm.

Las muestras fueron medidas en una placa de 96 pocillos que se constituían de 200 μL de agua, 10 μL de buffer, 10 μL de solución $\text{NADP} + \text{ATP}$ y 10 μL de medio (agua en el caso del blanco y glucosa a una concentración de $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el caso del estandar). Se midió la absorbancia de la solución a 340 nm por 5 minutos con una temperatura de 37°C . Luego se agregó 2 μL del mix de enzimas HK-G6PDH y se volvió a medir la absorbancia en las mismas condiciones. La concentración de glucosa presente en la muestra se calculó

utilizando la siguiente fórmula:

$$[Glucosa\ muestra] = \frac{\Delta A\ muestra}{\Delta A\ estandar} [Glucosa\ estandar] F_D \quad (1)$$

Donde ΔA corresponde a la diferencia entre las absorbancias después y antes de adicionar las enzimas y F_D el factor de dilución de la muestra.

El crecimiento bacteriano en un cultivo batch puede ser descrito por el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\frac{\mu(S(t))}{Y_{X/S}} X(t) \quad (2)$$

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu(S(t)) X(t) \quad (3)$$

Donde la ecuación (2) representa la tasa de cambio del sustrato en el tiempo (en este caso, glucosa) y la ecuación (3) representa la variación de biomasa en el tiempo. $S(t)$ corresponde a la concentración de sustrato (mM) en un tiempo (t) determinado de cultivo; $\mu(S(t))$ corresponde a la tasa de crecimiento (h^{-1}) determinada para la concentración de sustrato al tiempo t; $Y_{X/S}$ corresponde al rendimiento de biomasa producida por sustrato consumido (gDW de biomasa \cdot mmol de glucosa $^{-1}$) y $X(t)$ representa la concentración de biomasa ($gDW \cdot L^{-1}$) en el tiempo t. De la ecuación (3) se tiene:

$$\mu(S(t)) = \frac{dX(t)}{dt} \frac{1}{X(t)} \quad (4)$$

Que al reemplazarlo en la ecuación (2) queda:

$$dS(t) = \frac{-1}{Y_{X/S}} dX(t) \quad (5)$$

Integrando:

$$\int_{S(0)}^{S(t)} dS(r) = \frac{-1}{Y_{X/S}} \int_{X(0)}^{X(t)} dX(r) \quad (6)$$

$$S(t) - S(0) = \frac{1}{Y_{X/S}} (X(0) - X(t)) \quad (7)$$

Resultado finalmente:

$$S(t) = S(0) + \frac{1}{Y_{X/S}} (X(0) - X(t)) \quad (8)$$

Donde $S(0)$ y $X(0)$ corresponden a la concentración inicial de sustrato (mM) y de biomasa inoculada ($\text{gDW} \cdot \text{L}^{-1}$), respectivamente. A partir de esto, se graficó la concentración de sustrato medida en función de la biomasa expresada en $\text{gDW} \cdot \text{L}^{-1}$ para el mismo tiempo de medición. Al realizar la regresión lineal, la pendiente obtenida correspondió a $-1/Y_{X/S}$, el cual al multiplicarlo por la tasa de crecimiento fue posible calcular la tasa de consumo de glucosa (Q_{glc}) en unidades de $\text{mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$:

$$Q_{\text{glc}} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \mu(S(t)) \quad (9)$$

2.2.6. Determinación del flujo de electrones

Para determinar el flujo de electrones por unidad de biomasa se consideró la siguiente relación entre la intensidad de corriente y la densidad óptica:

$$r = \frac{d(i)}{d(DO)} \quad (10)$$

Donde r es la razón de cambio de la corriente en función de la densidad óptica, es decir, la cantidad de corriente en mA que aporta cada unidad de biomasa en términos de densidad óptica. Para expresar el flujo de salida de electrones desde la bacteria en función de r ($Fe(r)$), es necesario convertir la DO a unidades de peso seco:

$$Fe(r) = \frac{r}{f} V \left[\frac{\text{mA}}{\text{gDW}} \right] \quad (11)$$

Donde V corresponde al volumen en litros y f al factor de conversión a biomasa en unidades de $\text{gDW} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{DO}^{-1}$ descrito en la sección 2.2.4. El registro experimental de la corriente fue en amperes, pero es posible representar la corriente como Coulomb de carga

por segundo:

$$1 [A] = 1 [C s^{-1}] \quad (12)$$

Al dividir 1 C por la carga elemental ($e = 1,6021 \cdot 10^{-19}$ C) se obtiene el número de electrones presentes en 1 C. El número de electrones dividido por el número de Avogadro ($N_A = 6,0225 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) equivale al número de moles de electrones equivalentes presentes en 1 C.

$$1[C] = \frac{1}{e N_A} [mol] \quad (13)$$

Reescribiendo la ecuación (12) para expresarla en unidades de mmoles y horas:

$$1[mA] = \frac{1}{e N_A} \left[\frac{mmol}{s} \right] = \frac{3600}{e N_A} \left[\frac{mmol}{h} \right] \quad (14)$$

Reemplazando la Ecuación (14) en la Ecuación (11), se obtiene el flujo de electrones en mmoles de electrones por unidad de peso seco por hora:

$$Fe(r) = \frac{r \cdot 0,0373}{f V} \left[\frac{mmol}{gDW h} \right] \quad (15)$$

2.3. Análisis Bioinformático

La red metabólica de un organismo puede ser representada matemáticamente en su totalidad mediante la matriz estequiométrica (S). Esta posee m filas, que representa el número de metabolitos, y n columnas, que representa el número de reacciones del sistema. Cada celda de esta matriz contiene el coeficiente estequiométrico el cual determina los metabolitos que participan en las reacciones. Se asigna un valor negativo para aquellos metabolitos que son consumidos, cero para los que no participan y positivo para los que son producidos en la respectiva reacción. Todos los flujos metabólicos de la red pueden ser representados por un vector de velocidad (\vec{v}), de dimensión igual al número de reacciones del sistema (equivalente al número de columnas de la matriz S). El cambio de las concentraciones de los metabolitos en el tiempo se encuentra contenido en un vector $d\vec{x}/dt$, de dimensión igual al número de metabolitos del sistema (equivalente al número de filas de la

matriz S). Este cambio puede ser representado mediante ecuaciones de balance de masa, utilizando la matriz S y el vector v :

$$\frac{d\vec{x}}{dt} = S \vec{v} \quad (16)$$

El espacio de soluciones contiene todas las combinaciones de flujos que hacen posible la ecuación (16), presentando una infinidad de soluciones. Para reducir el tamaño del espacio de soluciones, el modelaje basado en restricciones integra la condición de estado estacionario, donde la tasa de cambio de todo metabolito debe ser igual a cero:

$$S \vec{v} = 0 \quad (17)$$

El estado estacionario implica que todo flujo de producción de un metabolito debe ser equiparado por uno de consumo, manteniendo las concentraciones constantes en el tiempo, tal como se espera que suceda en la fase exponencial del crecimiento microbiano (Monod, 1949). A su vez, es posible integrar valores de flujos metabólicos calculados experimentalmente que restringen aún más el espacio de soluciones, tal como la biomasa, el consumo de fuente de carbono o el consumo de oxígeno. De esta forma, el espacio de soluciones se reduce y es posible encontrar los distintos vectores \vec{v} que componen este espacio, tal como se encuentra esquematizado en la Figura 7.

Actualmente, investigadores han generado modelos *in silico* que representan las reacciones metabólicas de un organismo. Existen modelos de variadas especies, desde *E. coli* hasta *H. sapiens*. Los modelos se encuentran en bases de datos como BiGG Models y son actualizados a medida que las investigaciones revelan más conocimiento sobre las redes metabólicas de los organismos. Estos son descargables de forma gratuita, permitiendo realizar análisis o modificaciones sobre ellos según el interés de la investigación.

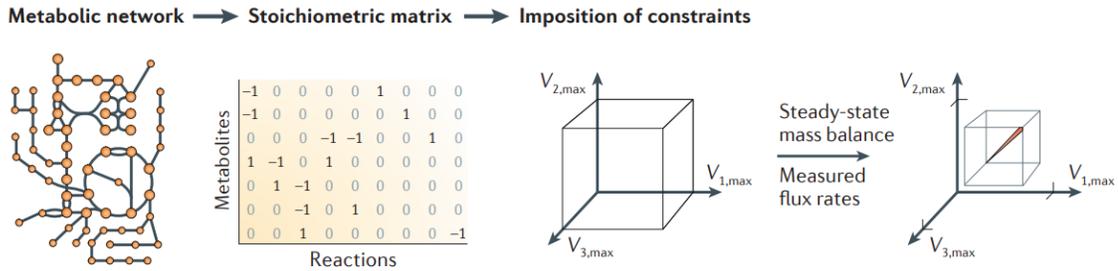


Figura 7. Modelaje basado en restricciones

Diagrama de los pasos del modelaje basado en restricciones. Una red metabólica puede ser expresada como una matriz estequiométrica que contiene la producción y consumo de los metabolitos asociada a cada reacción de dicha red. Las velocidades que estas reacciones presentan un espacio de soluciones infinito el cual es restringido según la condición de estado estacionario y parámetros medidos experimentalmente. Extraído de Bordbar A. y cols, 2014.

Existen diferentes herramientas bioinformáticas que permiten explorar el espacio de soluciones. *Flux Balance Analysis* emplea métodos de programación lineal para optimizar una función objetivo, obteniendo los valores mínimos o máximos del \vec{v} de la reacción seleccionada, los cuales corresponden a los vértices del espacio de soluciones. Esto frecuentemente corresponde a la maximización de la velocidad de producción de biomasa (tasa de crecimiento), fundamentado en que durante la fase exponencial ésta es máxima. Sin embargo, FBA contiene el sesgo que supone que el organismo está activamente optimizando sus recursos para una de sus reacciones metabólicas. Para evitar esto, se han desarrollado métodos de muestreo que exploran el espacio de soluciones sin preferencias. Uno de estos algoritmos es *Markov chain Monte Carlo*, el cual genera puntos de inicio aleatorios y se mueve de forma estocástica a través del espacio de soluciones, muestreando el espacio. MCMC finalmente entrega la frecuencia con que cada punto fue muestreado, donde los valores de \vec{v} de mayor frecuencia son los más probables para cada una de las reacciones del modelo. En la Figura 8 se encuentran las diferencias entre FBA y MCMC.

Utilizando FBA y MCMC es posible realizar una serie de análisis bioinformáticos que reflejen el comportamiento metabólico de un organismo. En este trabajo se construyeron de forma *in silico* las distintas cepas utilizadas en los experimentos de MFC, calculando su

ATP de mantención, analizando los distintos mecanismos electrogénicos posibles mediante barridos de sensibilidad y simulando las distribuciones de flujos del metabolismo central. Esto fue llevado a cabo utilizando la herramienta COBRA Toolbox (Schellenberger y cols., 2011) para MATLAB (MathWorks®). Todos los códigos escritos para este trabajo se encuentran en el Anexo 1.

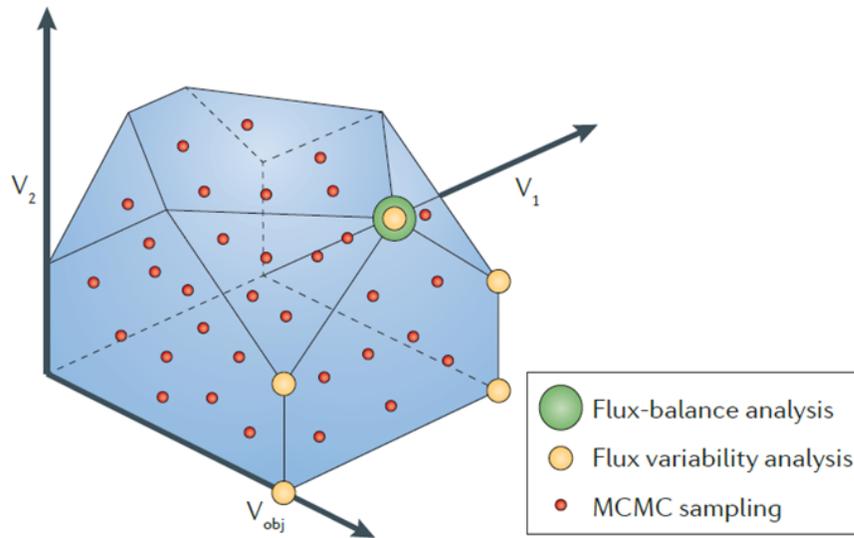


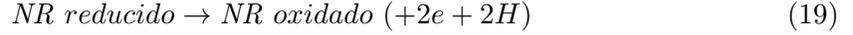
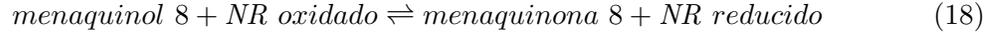
Figura 8. Muestreo del espacio de soluciones según *Flux Balance Analysis* o *Markov Chain Monte Carlo*

Esquema de la metodología de FBA y MCMC para explorar el espacio de soluciones. Los ejes corresponden a los vectores \vec{v} de las distintas reacciones del modelo, en este caso, simplificado a solo tres. FBA entrega los vértices del espacio de soluciones, los cuales corresponden a los mínimos y máximos, mientras que MCMC muestrea el espacio de soluciones en su totalidad. Extraído y modificado de Bordbar A. y cols, 2014.

2.3.1. Construcción de modelos de cepas

En este trabajo se utilizó el modelo iJO1366 como reconstrucción metabólica de la cepa K-12 MG1655 de *E. coli* (Orth y cols, 2011). A partir de este modelo se constuyeron los modelos de las cepas electrogénicas WT, NAD-G6PDH, Δpgi y NAD-G6PDH Δpgi . Para esto, fue necesario agregar reacciones que simularan la extracción de electrones del proceso

electrogénico:



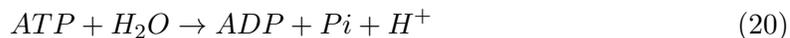
La ecuación (18) y (19) daría cuenta a la salida de 2 electrones y 2 protones hacia afuera de la célula, obtenidos a partir del menaquinol utilizando el rojo neutro como intermediario. Estas reacciones fueron fijadas a los valores de flujo de electrones obtenidos experimentalmente para cada cepa.

En el caso de las cepas mutantes, se simuló la delección de *pgi* restringiendo el límite inferior y superior del valor de flujo metabólico que puede adoptar la reacción catalizada por esta enzima a un valor de 0. La simulación del cambio de especificidad de la enzima G6PDH se logró mediante el cambio de los coeficientes estequiométricos de NADP y NADPH de esta reacción, fijándolos en 0, mientras que para NAD y NADH se modificaron por -1 y 1, respectivamente.

Adicionalmente a los valores de flujo de electrones, se restringieron los modelos de cada cepa según los datos de tasa de crecimiento y consumo de glucosa determinados experimentalmente y simulando la condición de anaerobiosis fijando el valor del consumo de oxígeno a 0. Debido a problemas con el modelo (loops, flujos falsos), fue necesario forzar los flujos de la reacción G6PDH con valores de literatura, al 12,20 % del consumo de glucosa para las cepas WT y NAD-G6PDH (Chen y cols, 2011) y al 100 % del consumo de glucosa para las cepas $\Delta\textit{pgi}$ y NAD-G6PDH $\Delta\textit{pgi}$. Adicionalmente fue necesario forzar los flujos de entrada de glucosa vía PEP (GLCptspp) de las cepas $\Delta\textit{pgi}$ y NAD-G6PDH $\Delta\textit{pgi}$ al 100 % del consumo de glucosa. Finalmente se restringieron reacciones que contradecían la realidad biológica de las cepas tales como MOX, SUCOAS y HACD. Todas estas restricciones tienen como objetivo que el estudio de las simulaciones de los cultivos electrogénicos sean lo mas similares posibles a los fenómenos que ocurren *in vivo*.

2.3.2. Determinación del ATP de mantención

El ATP de mantención (ATPM) corresponde a la demanda energética basal no asociada a la generación de macromoléculas ni al crecimiento, tal como el reciclaje de membrana o la mantención de la homeostasis celular (Feist y cols, 2007). En el modelo, esta demanda energética es representada con la siguiente fórmula:



Es posible obtener el valor del ATPM de forma experimental desde cultivos continuos (Russell y Cook, 1995), sin embargo también es posible estimar su valor mediante *Flux Balance Analysis*. Para esto, primero se fijaron los valores experimentales (biomasa, consumo de glucosa, flujo de electrones y consumo de oxígeno) para luego se maximizar el flujo de la reacción de ATPM del modelo, lo que a su vez significa la optimización del rendimiento de ATP. Se realizó esta aproximación debido a que los flujos bacterianos se aproximan a una superficie de Pareto que contempla el crecimiento y producción de energía máxima con el mínimo uso de enzimas (Schuetz y cols, 2012). El valor obtenido se fijó al límite inferior de la reacción de ATPM.

2.3.3. Análisis de los mecanismos electrogénicos

En este trabajo se analizaron los distintos mecanismos electrogénicos que podría presentar *E. coli*. Se simularon cuatro posibles mecanismos en el modelo de cepa WT, listados en la Tabla 3. Los modelos NADH17pp, NADH10 y DHORD5 corresponden a mecanismos que utilizan menaquinona, la cual actúa como un intermediario interactuando con el rojo neutro el cual finalmente libera los electrones hacia el electrodo. De estos tres mecanismos, dos de ellos, NADH17pp y NADH10, utiliza NADH como dador de electrones entregándoselos a la menaquinona mediante reacciones de su mismo nombre. La diferencia de estas dos reacciones es que NADH17pp genera una gradiente de protones, mientras que NADH10 no. DHORD5 a diferencia de NADH17pp y NADH10, no utiliza NADH como dador de

electrones sino que utiliza la molecula dihidroorotato. Se estudió este mecanismo ya que al dejar el modelo libre el sistema escoge la reacción DHORD5 como dador de electrones para la reacción electrogénica. Adicionalmente, se simuló el mecanismo en donde no se utiliza menaquinona como intermediario, sino que el NADH interactúa directamente con el rojo neutro para la generación de electricidad (NAD_{dir}). Para estudiar los distintos modelos, se realizó un análisis de sensibilidad variando el flujo de electrones por los distintos mecanismos, optimizando biomasa en condiciones anaeróbicas y el consumo de glucosa fijo al valor medido experimentalmente. De esta forma, se pudo analizar el beneficio a nivel de biomasa de cada mecanismo y como el metabolismo responde a su variación.

Tabla 3. Mecanismos electrogénicos analizados en el modelo WT

Mecanismo	Reacciones electrogénicas
NADH _{dir}	$H[c] + NADH[c] + NR_{ox} \rightleftharpoons NAD[c] + NR_{red}$ $NR_{red} \rightarrow NR_{ox}$
NADH17pp	$4H[c] + mqn8[c] + NADH[c] \rightleftharpoons mql8[c] + NAD[c] + 3H[p]$ $mql8[c] + NR_{ox} \rightleftharpoons mqn8[c] + NR_{red}$ $NR_{red} \rightarrow NR_{ox}$
NADH10	$H[c] + mqn8[c] + NADH[c] \rightleftharpoons mql8[c] + NAD[c]$ $mql8[c] + NR_{ox} \rightleftharpoons mqn8[c] + NR_{red}$ $NR_{red} \rightarrow NR_{ox}$
DHORD5	$dhorS[c] + mqn8[c] \rightleftharpoons mql8[c] + orot[c]$ $mql8[c] + NR_{ox} \rightleftharpoons mqn8[c] + NR_{red}$ $NR_{red} \rightarrow NR_{ox}$

2.3.4. Distribuciones de flujo

Una distribución de flujos metabólicos corresponde a la determinación de los valores de todas las reacciones dentro de un modelo metabólico. Tal como se resume en la Figura 9, se realizó este análisis para cada una de las cepas estudiadas, restringiendo los modelos con los valores experimentales (tasa de crecimiento, consumo de glucosa, flujo de electrones y consumo de oxígeno) correspondientes a cada cepa. De esta forma, se simularon las condiciones de los cultivos para estudiar los mecanismos de adaptación del metabolismo según

las distintas mutaciones. El análisis se realizó mediante el método de MCMC, seleccionando los valores de flujo más probables, tras las previas restricciones descritas en la sección 2.3.1. y optimización de ATPM. Si bien se obtuvieron los flujos de las 2583 reacciones que componen al modelo iJO1366, el análisis se realizó con un enfoque al metabolismo central de la bacteria.

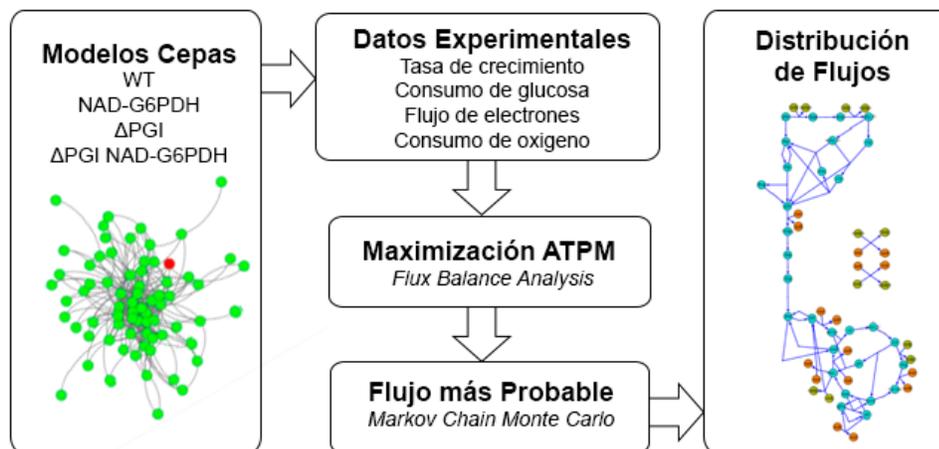


Figura 9. Método para la determinación de las distribuciones de flujos

Resumen de los pasos descritos en la sección 2.3.4. para la obtención de la distribución de flujos metabólicos *in silico* de las cuatro cepas estudiadas en este trabajo.

2.3.5. Cálculo de la tasa de producción de metabolitos

A partir de la distribución de flujos obtenida anteriormente, es posible calcular la tasa de producción y de consumo de cada metabolismo del sistema. A partir de los modelos utilizados en COBRA que supone un estado estacionario, se calcula la tasa de producción (φ) de un determinado metabolito (i) utilizando la siguiente fórmula:

$$\varphi_i = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^n |S_{(i,j)} \cdot v_j| \quad (21)$$

Donde j representa el número de reacción del modelo, por lo que $S_{(i,j)}$ representa el coeficiente estequiométrico del metabolito i en la reacción j, presente en la matriz estequiométrica (S) y v_j indica el flujo metabólico de dicha reacción.

3. RESULTADOS

3.1. Parámetros Fisiológicos

3.1.1. Coeficiente de conversión de biomasa

Las herramientas de COBRA utilizan valores de flujos metabólicos en unidades de $\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, por lo que es necesario estimar los parámetros fisiológicos en estas unidades. Para esto se requiere que la biomasa esté representada en gramos de peso seco por litro ($\text{gDW}\cdot\text{L}^{-1}$). Sin embargo, experimentalmente la biomasa fue medida en unidades de DO, por lo que fue necesario determinar el coeficiente de conversión de biomasa (f) que relaciona la DO con el peso seco por litro. Para ello, se tomaron muestras de un mismo cultivo a distintos tiempos, a los cuales se les midió la absorbancia y la masa de la muestra seca. El factor de conversión (f) corresponde a la pendiente de la regresión lineal de la Figura 10, para la cual se obtuvo un valor de $f=0.4 \text{ gDW}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{DO}^{-1}$.

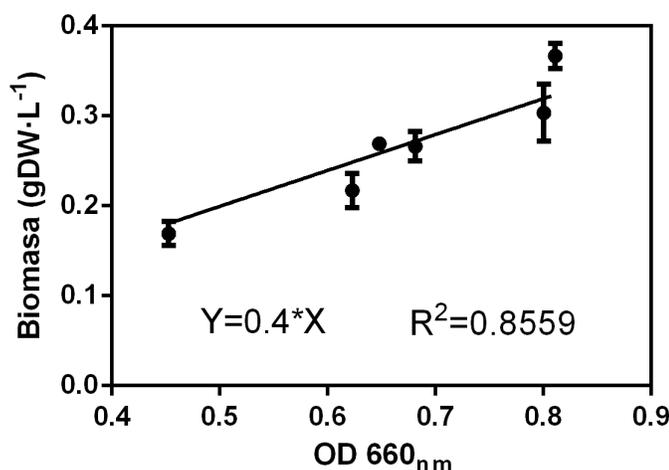


Figura 10. Determinación del factor de conversión de absorbancia a peso seco.

Se exhibe la correlación entre la densidad óptica registrada y la masa de las muestras secadas por 24 horas a 100°C a distintos tiempos del cultivo anaeróbico en presencia de rojo neutro $20 \mu\text{M}$. La masa fue normalizada a unidades de concentración dividiendo por el volumen de las muestras extraídas. Se muestra el promedio de las mediciones en triplicado (círculos) y la desviación estándar correspondiente (barras). Resultados extraídos junto a F. Retamal.

3.1.2. Tasa de crecimiento, consumo de glucosa y flujo de electrones

En el presente trabajo, se estudiaron cultivos electrogénicos en condiciones anaeróbicas de cuatro cepas distintas; *Wild Type*, NAD-G6PDH, Δpgi y NAD-G6PDH Δpgi , a las cuales se determinaron los valores de tasa de crecimiento, consumo de glucosa y flujo de electrones.

Para cada cultivo se midió a lo largo del tiempo; la corriente producida, la absorbancia a 660nm y la concentración de glucosa presente en el medio. El curso temporal del incremento en biomasa junto a la corriente generada se observan en la Figura 11a, 11e, 12a y 12e para las cepas *Wild Type*, NAD-G6PDH, Δpgi y NAD-G6PDH Δpgi respectivamente. La relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa respecto al tiempo se observa en la Figura 11d, 11i, 12d y 12i para cada cepa en el mismo orden anterior.

Para determinar la tasa de crecimiento (μ) se realizó la regresión lineal del gráfico logarítmico del incremento de biomasa respecto al tiempo (Figura 11b, 11g, 12b, 12g), donde la pendiente corresponde al valor en unidades de h^{-1} .

El flujo de electrones (Fe) se obtuvo a partir de la regresión lineal de la corriente en mA en función de la biomasa en densidad óptica (Figura 11c, 11h, 12c, 12h). La pendiente de esta regresión entrega el valor de r ($\text{mA}\cdot\text{DO}^{-1}$, el cual corresponde al rendimiento de electricidad por unidad de biomasa. Utilizando la Ecuación 15 es posible calcular el flujo de electrones en valores de $\text{mmoles}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

El consumo de glucosa (Q_{glc}) se determinó mediante la regresión lineal de la relación entre la concentración de glucosa en mM y la biomasa en unidades de $\text{gDW}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 11e, 11j, 12e, 12j), donde la pendiente corresponde al inverso negativo del rendimiento $Y_{\text{X/S}}$. Al multiplicar la pendiente por la tasa de crecimiento se obtiene el consumo de glucosa en unidades de $\text{mmoles}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Ecuación 9).

En la Tabla 4 se presentan los valores de los parámetros mencionados para cada cepa. De estos, los valores de la tasa de crecimiento, el flujo de electrones y el consumo de glucosa, junto a la condición de anaerobiosis (consumo de oxígeno igual a 0), serán utilizados como restricciones para la simulación *in silico*.

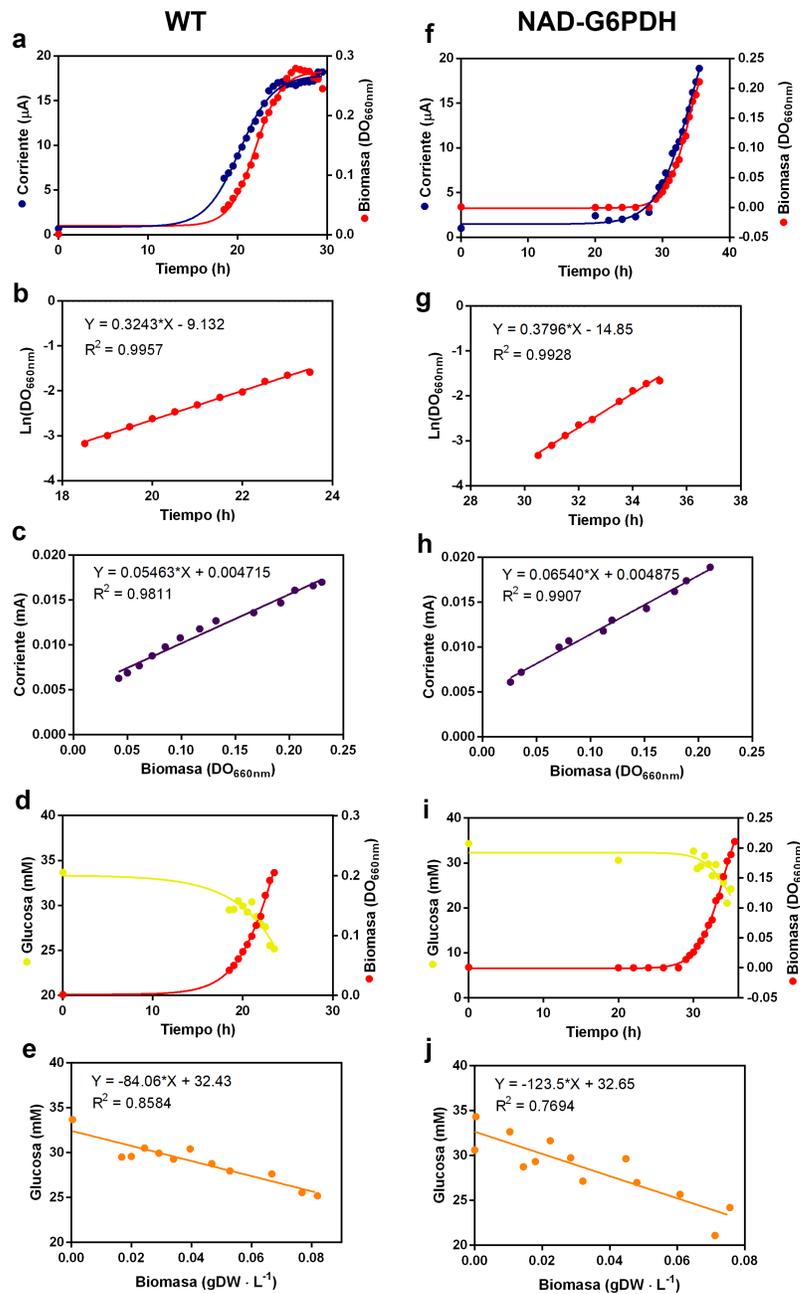


Figura 11. Medición de los parámetros fisiológicos cepas WT y NAD-G6PDH.

La primera columna (a-e) corresponde al cultivo de la cepa WT y la segunda (f-j) a la cepa NAD-G6PDH. Se midieron los siguientes parámetros: (a,f) El curso temporal del incremento en biomasa junto a la corriente generada. (b,g) La regresión lineal del logaritmo natural de la biomasa a través del tiempo. (c,h) La regresión lineal de la corriente en función de la biomasa. (d,i) El curso temporal de la relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa. (e,j) La regresión lineal de la concentración de glucosa en relación a la biomasa. Resultados extraídos junto a F. Retamal.

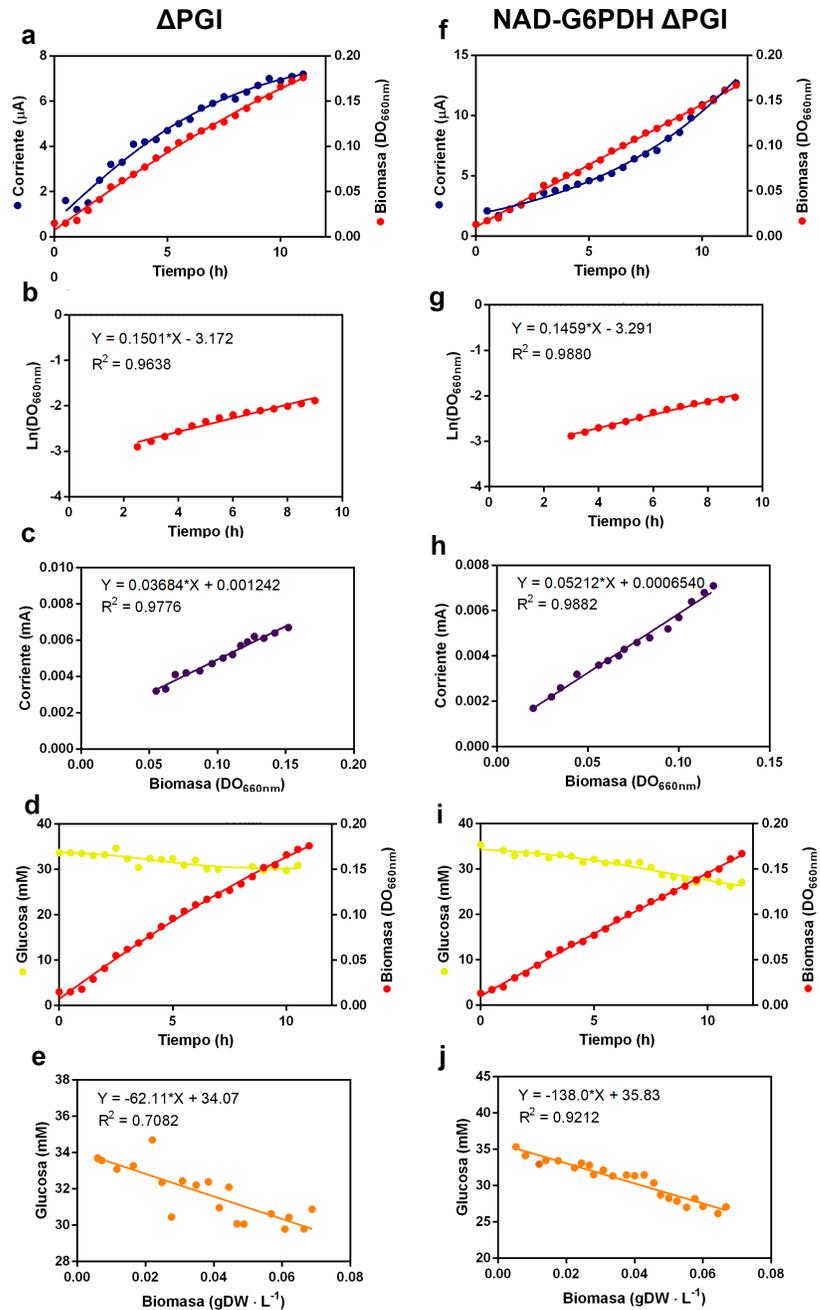


Figura 12. Medición de los parámetros fisiológicos cepas Δpgi y doble mutante.

La primera columna (a-e) corresponde al cultivo de la cepa Δpgi y la segunda (f-j) a la cepa NAD-G6PDH- Δpgi . Se midieron los siguientes parámetros: (a,f) El curso temporal del incremento en biomasa junto a la corriente generada. (b,g) La regresión lineal del logaritmo natural de la biomasa a través del tiempo. (c,h) La regresión lineal de la corriente en función de la biomasa. (d,i) El curso temporal de la relación entre cantidad de glucosa en el medio y biomasa. (e,j) La regresión lineal de la concentración de glucosa en relación a la biomasa. Resultados extraídos junto a F. Retamal.

Tabla 4. Valores de los parámetros fisiológicos de los cultivos electrogénicos

Parámetro	WT	NAD-G6PDH	Δpgi	NAD-G6PDH- Δpgi
Tasa de Crecimiento μ (h^{-1})	0.3243	0.3796	0.1501	0.1459
Rendimiento de Electrones r ($\text{mA}\cdot\text{DO}^{-1}$)	0.0546	0.0654	0.0368	0.0521
Flujo de Electrones Fe ($\text{mmol}_e\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.0425	0.0508	0.0286	0.0405
Rendimiento de Biomasa $Y_{X/S}$ ($\text{gDW}\cdot\text{mmol}_{\text{glc}}^{-1}$)	0.0119	0.0081	0.0161	0.0072
Consumo de Glucosa Q_{glc} ($\text{mmol}_{\text{glc}}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	27.261	46.881	9.323	20.134

3.2. Análisis Bioinformáticos

3.2.1. ATP de mantención

Para el modelamiento de las cuatro cepas se usaron restricciones provenientes de los datos fisiológicos mencionados de la Tabla 4, además de la condición de anaerobiosis. Mediante FBA se procedió a optimizar la función de ATP de mantención (ATPM), debido a las razones presentadas en la sección 2.3.2., optimizando su máximo valor para cada modelo. Los valores de los flujos de ATPM calculados para cada cepa fueron de 36.3, 76.5, 0.3 y 16.8 $\text{mmoles}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para las cepas WT, NAD-G6PDH, Δpgi y NAD-G6PDH- Δpgi respectivamente. Considerando el ATP total como la suma del ATPM más el ATP utilizado en biomasa, el consumo de ATP destinado a mantención representa el 67%, el 79%, el 4% y el 68% del ATP total del organismo para las cepas WT, NAD-G6PDH, Δpgi y NAD-G6PDH- Δpgi respectivamente.

Las diferencias observadas entre los valores para cada cepa resultan de que los cultivos tuvieron distintos valores en su tasas de crecimiento y consumo de glucosa (Tabla 4). Los flujos de ATPM calculados fueron usados como restricción en cada modelo correspondiente para las siguientes simulaciones de distribución de flujos metabólicos.

3.2.2. Mecanismos Electrogénicos

Como se mostró en la sección 1.2. (Figura 4), para *E. coli* existen dos mecanismos propuestos para la salida de electrones desde el metabolismo hacia la molécula mediadora NR, en la producción de electricidad en MFCs. Para evaluar la hipótesis de Parks y Zeikus, se generó el modelo NADHdir, mientras que para evaluar la de Harrington y cols. se tuvo que evaluar dos posibilidades debido a que existen dos reacciones que permiten el traspaso de protones de NADH hasta la menaquinona en el modelo iJO1366. El primero, NADH10 utiliza un proton citoplasmático para reducir la menaquinona a menaquinol, mientras que la segunda, NADH17pp, utiliza cuatro protones citoplasmáticos, uno para reducir la menaquinona mientras que los tres sobrantes pasan al periplasma, aumentando la gradiente protón motriz del sistema. Por otro lado, la distribución de flujos de la optimización de ATPM previamente realizada mediante FBA en la sección 3.2.1. indica que si bien la salida de electrones hacia el NR podía ocurrir a través del menaquinol, no requería de las reacciones NADH10 ni NADH17pp para abastecerse de equivalentes de reducción (datos no presentados). Interesantemente, en vez de NADH, el modelo prefiere la reaccion DHORD5 la cual utiliza dihidroorotato, reduciendo la menaquinona a menaquinol y generando orotato. Por lo tanto, finalmente se evaluaron cuatro mecanismos: NADH17pp, NADH10, DHORD5 y NADHdir. Es posible observar cada modelo con las reacciones involucradas en la Tabla 3, además de un diagrama en la Figura 13.

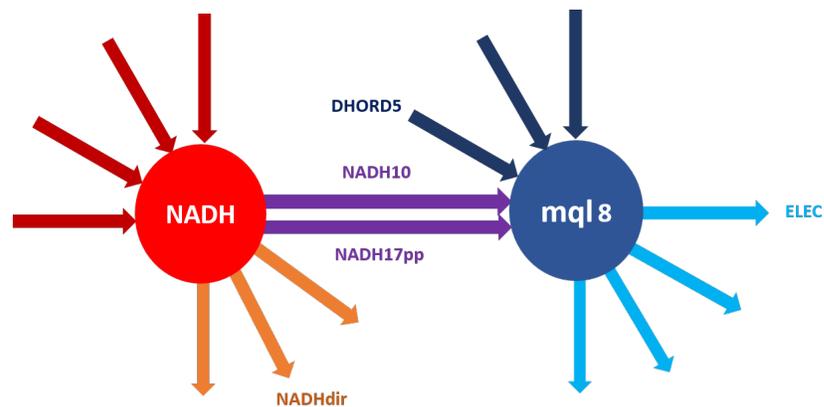


Figura 13. Modelos electrogénicos y su relación con el NADH y el menaquinol.

El NADH puede ser producido por varias reacciones, (flechas rojas) a si mismo como puede ser consumido por otras reacciones (flechas naranjas y moradas). Según la hipótesis de Parks y Zeikus

este puede ser consumido directamente para la producción de electricidad con la reacción NADHdir. A su vez, el NADH también tiene la opción mediante las reacciones NADH10 y NADH17pp de producir menaquinol (flechas moradas) el cual finamente puede ser utilizado en varias reacciones (flechas celestes), entre ellas la reacción electrogénica ELEC. Adicionalmente, el menaquinol puede ser producido por otras reacciones que no utilizan el NADH como cofactor (flechas azules), entre ellas DHORD5.

Una vez construidos los modelos, se realizó un análisis de sensibilidad en el cual se simuló el efecto que tiene el flujo de salida de electrones hacia NR mediante cada uno de los posibles mecanismos electrogénicos en relación a la biomasa del organismo. Para esto se utilizó el modelo WT bajo las restricciones de consumo de oxígeno y glucosa experimental junto al valor de ATPM previamente calculado para esta cepa. Los resultados del análisis de sensibilidad de cada mecanismo se observan en la Figura 14.

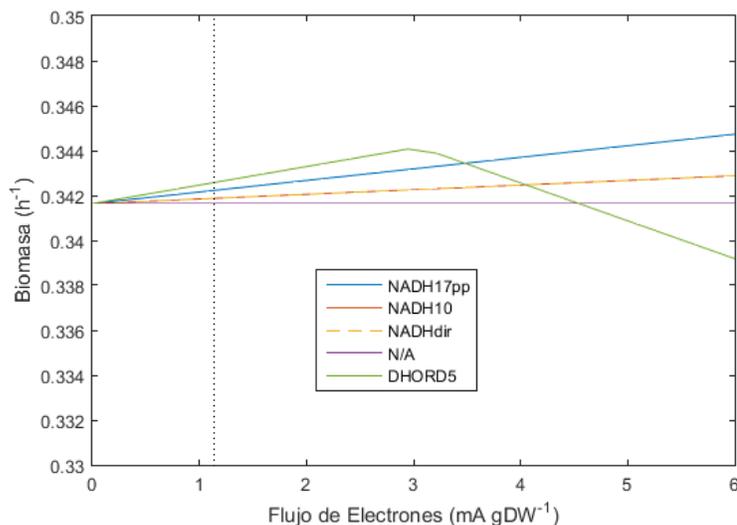


Figura 14. Análisis de sensibilidad de los posibles mecanismos electrogénicos de la cepa *Wild Type* de *Escherichia coli*.

Optimización mediante FBA con la biomasa como función objetivo barriendo el flujo de electrones en modelos que presentan los distintos mecanismos electrogénicos: NADH17pp (azul), NADH10 (rojo), NADHdir (amarillo) y DHORD5 (verde). Adicionalmente, se agregó una guía de referencia del crecimiento en ausencia de salida de electrones en púrpura (N/A). La línea punteada negra representa el valor experimental del flujo de electrones, el cual es de 1.138 mA·gDW⁻¹.

Inicialmente, en los cuatro posibles mecanismos existe una relación lineal positiva entre el aumento del flujo de electrones y la biomasa producida. A bajos flujos de salida de electrones, DHORD5 presenta el mayor beneficio en el crecimiento en relación al flujo de electrones, alcanzando la mayor producción de biomasa para el amperaje calculado experimentalmente ($1.138 \text{ mA}\cdot\text{gDW}^{-1}$). Sin embargo, al alcanzar un valor de $2.95 \text{ mA}\cdot\text{gDW}^{-1}$ este comienza a presentar un efecto negativo en el crecimiento, mientras que el resto de los mecanismos mantienen su relación lineal positiva. NADH17pp es el modelo con el mayor beneficio a la biomasa a altas tasas de flujo de electrones, mientras que los mecanismos NADH10 y NADHdir presentan tendencias idénticas pero con menor beneficio al crecimiento que NADH17pp.

DHORD5 corresponde a una enzima en la vía de producción de pirimidina en el metabolismo de síntesis de ácidos nucleicos, la cual utiliza dihidroorotato y menaquinona para generar orotato y menaquinol. Su ruta metabólica se observa en la Figura 15. A su vez, existe la reacción DHORDfum, que realiza la misma función que DHORD5, excepto que en vez de utilizar menaquinona como oxidante, este utiliza fumarato generando succinato.

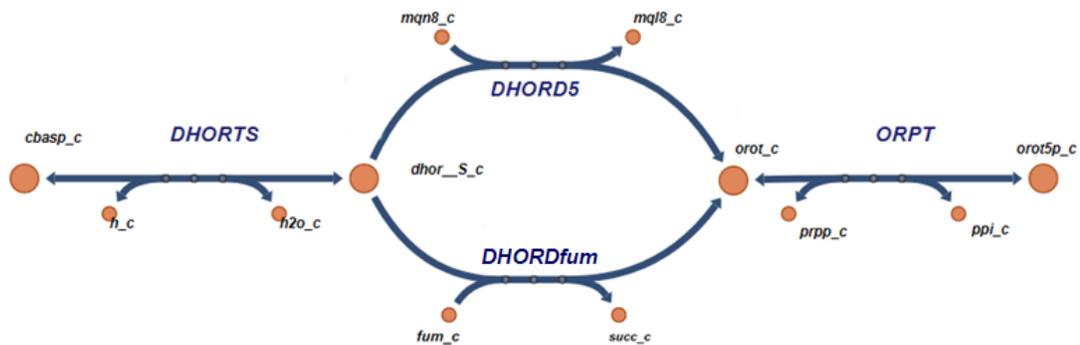


Figura 15. Ruta metabólica de DHORD5 en la síntesis de purinas y pirimidinas.

La dihidroorotasa (DHORTS) sintetiza la producción de dihidroorotato, el cual puede ser consumido para generar orotato mediante el ácido dihidroorótico (DHORD5) utilizando menaquinol, o por DHORD fumarato dependiente (DHORDfum) utilizando fumarato. El orotato sigue la vía de síntesis de ácidos nucleicos mediante la orotato fosforibosiltransferasa (ORPT). Imagen modificada a partir de *Escher maps* de Bigg Model.

Para estudiar el efecto de la reacción DHORD5 en la producción de biomasa, se analizaron los flujos metabólicos de dos regímenes de la curva en la Figura 14: cuando existe una relación positiva entre el flujo de electrones y la producción de biomasa (flujo de electrones menor o igual a $2.95 \text{ mA}\cdot\text{gDW}^{-1}$), y cuando existe una relación negativa entre el flujo de electrones y la biomasa (flujo de electrones mayor a $2.95 \text{ mA}\cdot\text{gDW}^{-1}$).

Se determinó que, en cualquier caso, se debe cumplir que el flujo de entrada de dihidro-orotato por DHORTS y el flujo de salida de orotato por ORPT tienen que ser iguales para un determinado valor de biomasa. Por lo tanto, en el primer régimen observamos que cuando se aumenta el flujo de DHORD5, DHORDfum disminuye con la misma proporción, tal como se muestra en la Figura 16. En consecuencia, la disminución del flujo de DHORDfum provoca una redistribución de los flujos intracelulares para consumir el fumarato mediante otras vías (Figura 16). En la Figura 17 se ilustra la red metabólica de las reacciones implicadas en este cambio. Se observa un aumento en el flujo de la fumarasa (FUM) la cual consume este metabolito para generar malato en el Ciclo de Krebs. El malato es utilizado por la malato deshidrogenasa (MDH), generando oxalacetato el cual continúa por el ciclo. Al tener oxalacetato disponible a partir del fumarato, la célula ya no necesita proveer de este metabolito mediante el consumo de fosfoenolpiruvato por la reacción fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC). El fosfoenolpiruvato, por lo tanto, puede ser utilizado en la formación de ATP mediante la reacción piruvato quinasa (PYK). El aumento de ATP en el organismo, finalmente, es el responsable de una mayor producción de biomasa para flujos de salida de electrones menores o iguales a $2.95 \text{ mA}\cdot\text{gDW}^{-1}$.

Por otro lado, el consumo de glucosa del organismo, el cual se mantiene fijo en el análisis de sensibilidad al valor determinado experimentalmente, restringe el metabolismo y su capacidad de generar precursores biosintéticos. De esta forma, en el segundo régimen, al aumentar el flujo de DHORD5 a valores sobre $2.95 \text{ mA}\cdot\text{gDW}^{-1}$, el metabolismo gasta un exceso de recursos en generar ácidos nucleicos los cuales no va a poder utilizar en la producción de biomasa debido al limitado consumo de fuente de carbono, lo cual finalmente desfavorecería la tasa de crecimiento.

Debido a que los valores de flujo de electrones alcanzados experimentalmente indican a DHORD5 como el modelo con mayor beneficio a la producción de biomasa, beneficio el cual fue justificado metabólicamente mediante los análisis de sensibilidad, se decidió fijar este mecanismo electrogénico para los análisis de distribución de flujo mediante MCMC para cada cepa. Adicionalmente se comparó la distribución de flujos metabólicos mediante MCMC de la cepa WT con el segundo mecanismo electrogénico más beneficioso a la biomasa, NADH17pp.

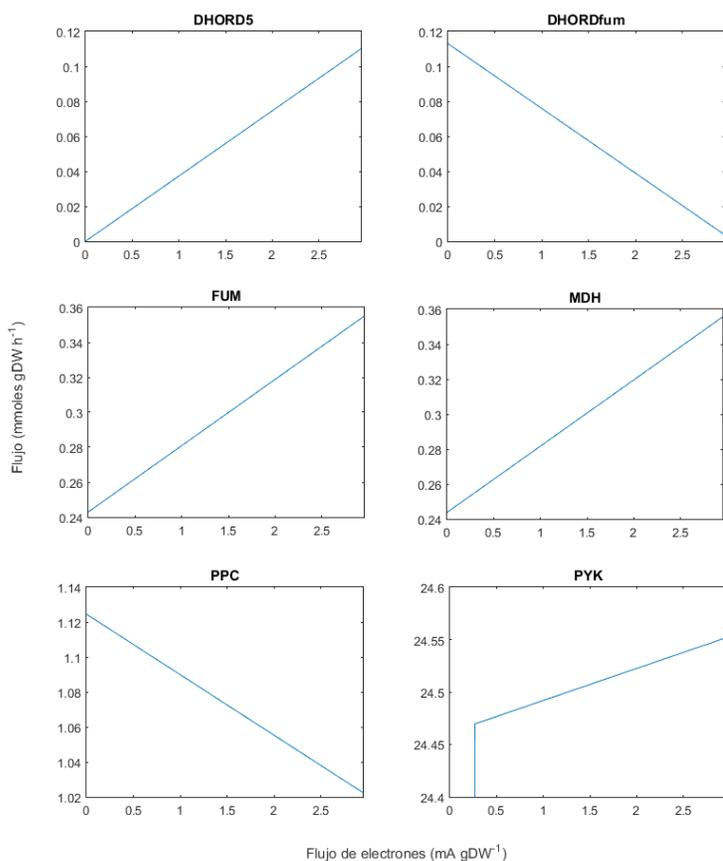


Figura 16. Efecto de DHORD5 en el metabolismo electrogénico de *Escherichia coli*.

Consecuencias metabólicas del uso de DHORD5 como mecanismo electrogénico. Se observa los flujos de seis reacciones, ácido dihidroorotico (DHORD5), DHORD fumarato dependiente (DHORDfum), fumarasa (FUM), malato deshidrogenasa (MDH), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PPC) y piruvato quinasa (PYK), del análisis de sensibilidad a un barrido de flujo de electrones de 0 mA·gDW⁻¹ hasta 2.95 mA·gDW⁻¹, rango en el cual existe una relación positiva entre el flujo de electrones y la producción de biomasa.

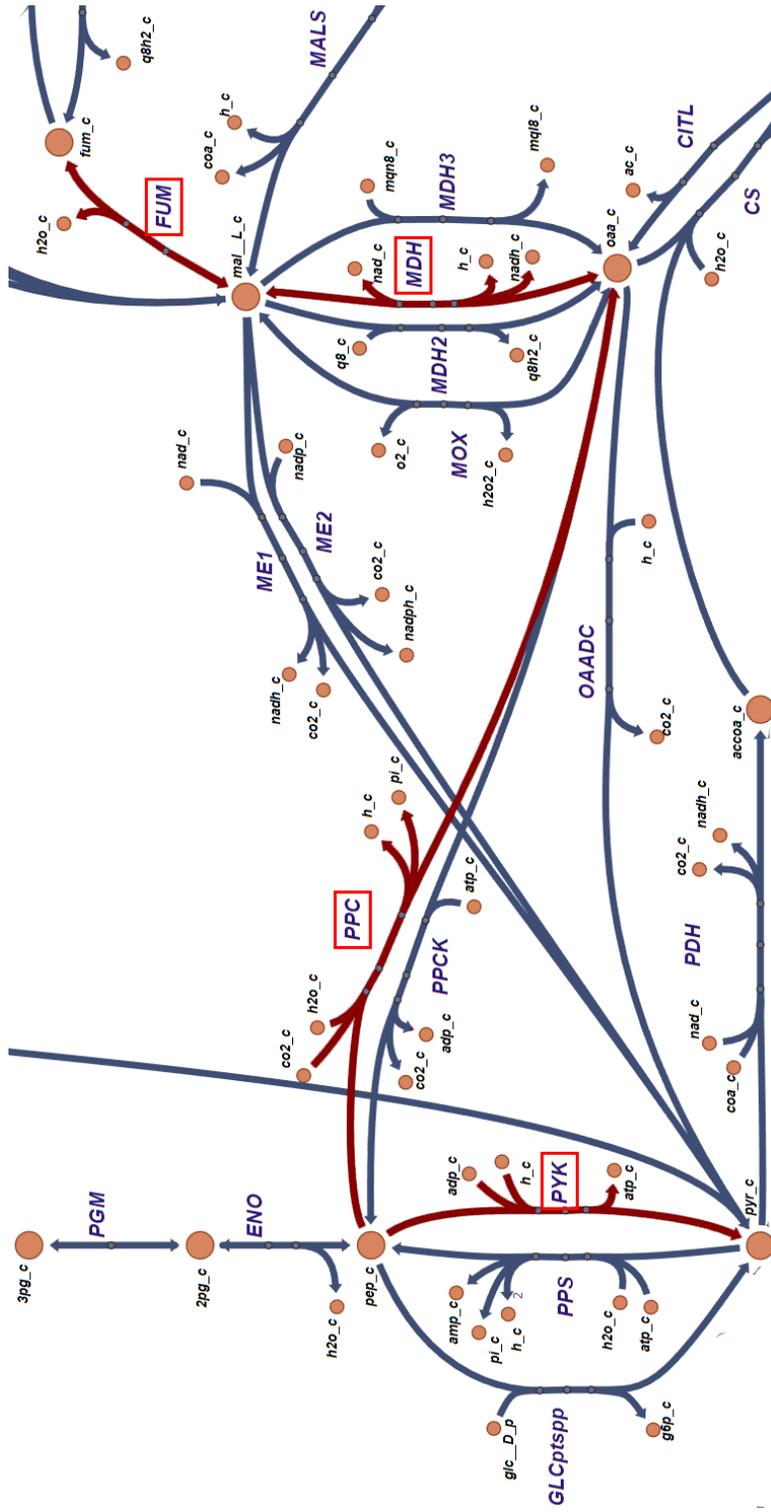


Figura 17. Mapa metabólico de las reacciones involucradas en el efecto del uso de ácido dihidroorótico (DHORD5) en el metabolismo electrogénico de *Escherichia coli*.

Se presenta el mapa del metabolismo central de *Escherichia coli* iJO1366, extraído de *Escher maps* de Bigg Model. Las reacciones analizadas de la Figura 16, FUM, MDH, PPC y PYK se encuentran destacadas con un marco rojo junto a sus flechas en color rojo oscuro. El uso de DHORD5 permite una mayor disponibilidad de fumarato lo que desencadena un mayor flujo mediante la reacción productora de energía PYK.

3.2.3. Distribución de Flujos

Tras generar los modelos de las cuatro cepas utilizando DHORD5 como mecanismo electrogenico, incluir restricciones a partir de los datos medidos fisiológicamente (tasa de crecimiento, consumo de glucosa, flujo de electrones y consumo de oxígeno) y los valores de ATP de mantención calculados mediante FBA, se procedió a obtener la distribución de flujos metabólicos para las cuatro cepas. Adicionalmente, para la cepa WT se obtuvo la distribución de flujos no solo con DHORD5, sino que también con NADH17pp como mecanismo electrogénico para evaluar diferencias entre estos dos modelos en el metabolismo central del organismo. Para esto, se implementó el algoritmo de MCMC debido a las razones descritas en la sección 1.4 y se determinó el flujo mas probable para las distintas reacciones. Se realizaron mapas metabólicos con los resultados para comparar las diferencias entre las cuatro cepas, todas con DHORD5 como mecanismo electrogénico en la Figura 18 y la comparación entre el modelo NADH17pp y DHORD5 para la cepa WT en la Figura 19.

En el mapa se observa como *E. coli* presenta un reordenamiento del metabolismo frente a las distintas mutaciones. En todas las cepas, la glucosa se transforma en glucosa-6-fosfato (G6P) al entrar a la célula. En el caso de las cepas con la mutación Δpgi estas utilizan la vía de las pentosas para consumir la G6P, en contraste a las cepas sin esa mutación que son capaces de utilizar la reacción PGI hacia la formación de fructosa-6-fosfato (F6P) siguiendo la vía de la glicólisis.

Debido a que en las cepas Δpgi y la doble mutante el 100 % de la glucosa consumida forma 6-fosfogluconato (6PGC), existe un alto flujo por la vía Entner-Doudoroff, 80 % y 89 % respectivamente, para evitar la pérdida de carbonos por la reacción GND en forma de CO_2 . Por esta vía el 6-fosfogluconato se divide en dos moléculas de tres carbonos, piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (G3P). Esto causa que el flujo por las últimas reacciones de la glicólisis hasta llegar a fosfoenolpiruvato (PEP) sean muy cercanas a 100 %. Por otro lado, las cepas WT y NAD-G6PDH utilizan mayoritariamente la glicólisis donde se divide la fructosa-6-fosfato en dos moléculas gliceraldehido-3-fosfato, obteniendo un flujo casi dos veces mayor al consumo de glucosa hacia la formación de PEP (186 % y 192 %). Con

todo esto las cepas con la mutación Δpgi producen considerablemente menos ATP por fosforilación a nivel de sustrato mediante la fosfoglicerato quinasa.

El fosfoenolpiruvato es necesario para la entrada de glucosa a la célula mediante GLC-ptspp, el transportador periplasmático de glucosa vía PEP. Por lo tanto, en todas las cepas esta reacción debe tener un valor del 100 %. El fosfoenolpiruvato restante puede ser utilizado en la generación de ATP mediante la reacción piruvato quinasa (PYK). Sin embargo, notamos que esta reacción tiene un flujo cercano a 0 % en las cepas con la mutación en *pgi* y un flujo de 51.6 % y 57.0 % para las cepas WT y NAD-G6PDH respectivamente.

Es importante notar que en todas las cepas existe una alta producción de metabolitos de fermentación, 185.1 % de formato, 84.5 % de acetato y 94.8 % de etanol en la cepa WT, donde el resto de las cepas siguen la misma tendencia. Sin embargo, en ningún modelo se observa formación de lactato.

El ciclo de Krebs, en todos los casos, se observa incompleto y poco activado. Sin embargo, Δpgi presenta un mayor flujo en la reacción malato deshidrogenasa la cual utiliza malato para formar oxalacetato y NADH.

Respecto a la diferencia de los mecanismos electrogénicos NADH17pp y DHORD5 en WT, existen leves cambios en la redistribución de flujos en solo nueve reacciones en donde la máxima diferencia es menor a un 1 %. Entre ellos esta el consumo de fumarato mediante la fumarasa y la fumarato reductasa, la cual tiene un menor flujo en el modelo NADH17pp, tal como se menciona en la sección 3.2.2. Este menor consumo de fumarato provoca una disminución en el flujo de la malato deshidrogenasa, por lo que se requiere una mayor entrada de oxalacetato mediante la fosfopiruvato carboxilasa, 0.1 % más en comparación al modelo DHORD5, el cual finalmente se traduce en un menor uso de la piruvato quinasa. Se realizó el mismo análisis para las cepas NAD-G6PDH, Δpgi y Δpgi -NAD-G6PDH, donde demostraron tener el mismo resultado que la cepa WT (datos no presentados).

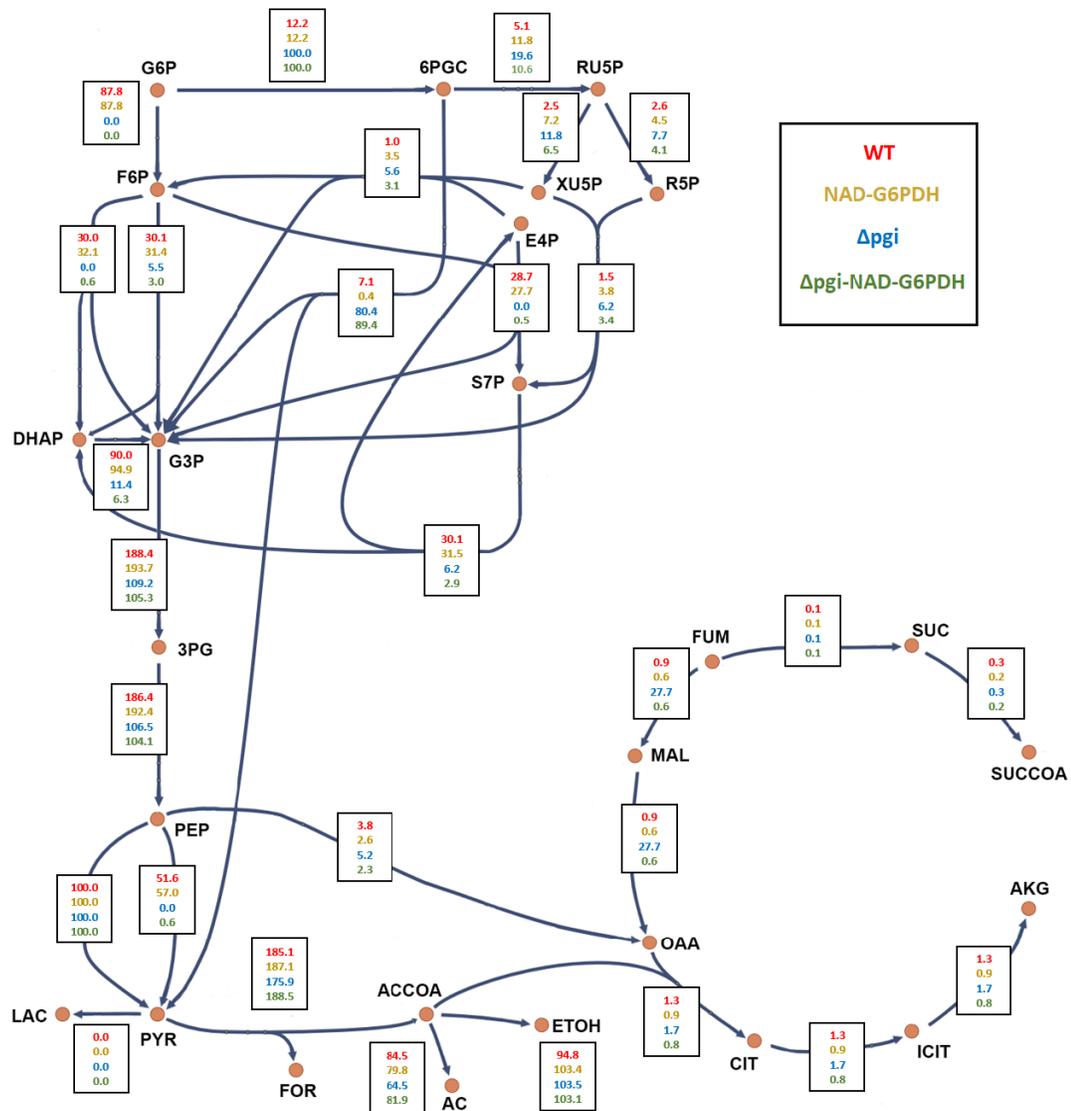


Figura 18. Distribución de flujos metabólicos para las cuatro cepas estudiadas con DHORD5 como mecanismo electrogénico.

Se ilustra el mapa del metabolismo central de *E. coli* con los principales metabolitos de la red (ver lista de abreviaturas para nombres completos). Las reacciones están representadas con flechas en el sentido que ocurren metabólicamente, con un cuadro que contiene el valor del flujo para cada cepa. Los valores están expresados como porcentaje de la tasa de consumo de glucosa determinada experimentalmente. Todas las cepas fueron simuladas con DHORD5 como mecanismo electrogénico, donde los valores en rojo corresponden a la cepa de WT, en amarillo los de la cepa NAD-G6PDH, en azul los de Δpgi y en verde los de NAD-G6PDH- Δpgi .

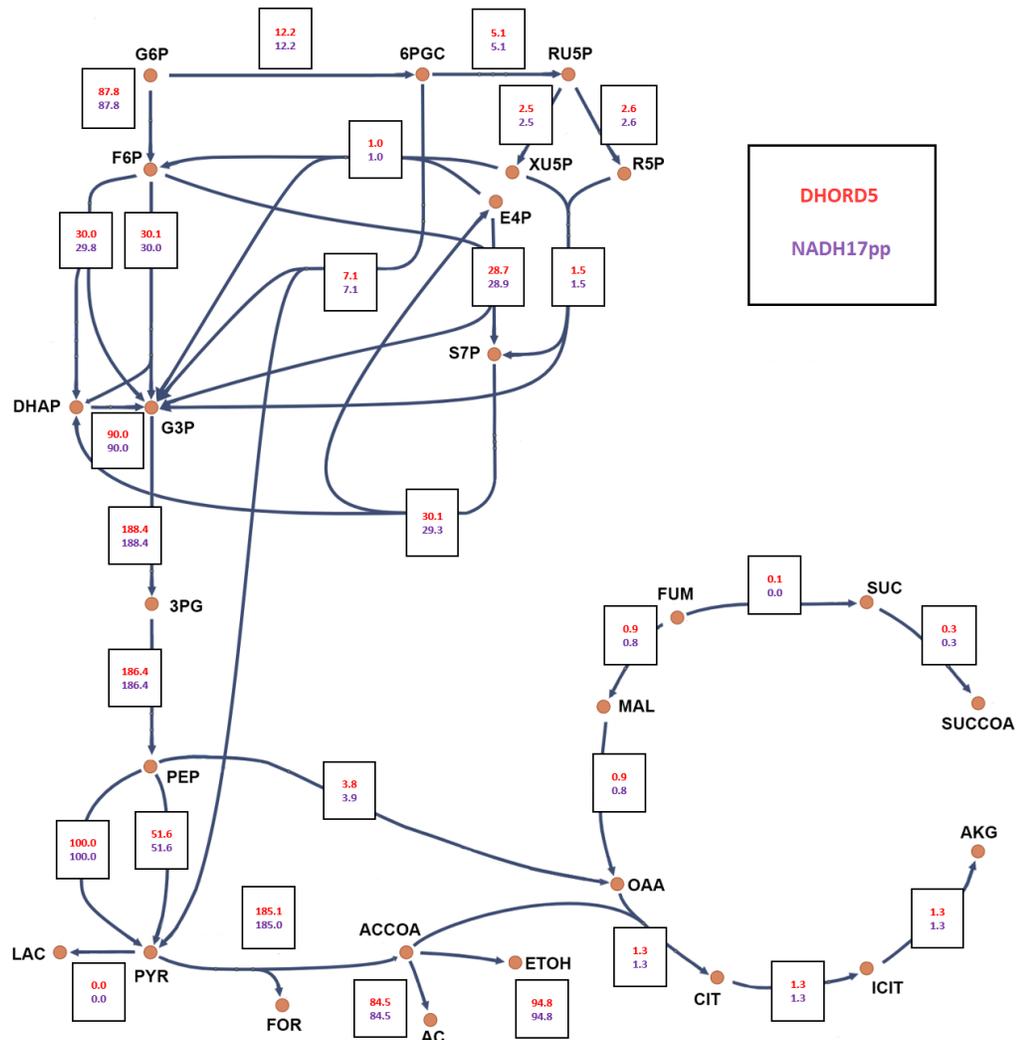


Figura 19. Distribución de flujos metabólicos para la cepa WT comparando los mecanismos electrogénicos DHORD5 y NADH17pp.

Se ilustra el mapa del metabolismo central de *E. coli* con los principales metabolitos de la red (ver lista de abreviaturas para nombres completos). Las reacciones están representadas con flechas en el sentido que ocurren metabólicamente, con un cuadro que contiene el valor del flujo para cada cepa. Los valores están expresados como porcentaje de la tasa de consumo de glucosa determinada experimentalmente. La cepa WT con DHORD5 como mecanismo electrogénico se presenta en color rojo. La cepa WT con NADH17pp como mecanismo electrogénico se presenta en color púrpura.

3.2.4. Flujos metabólicos de electrones en NADH y NADPH

A partir de la simulación mediante MCMC fue posible calcular los flujos de las reacciones de producción de NADH y NADPH de forma *in silico*. En la Tabla 5 se observa el total de NADH y NADPH producido para cada cepa según el mecanismo DHORD5. A su vez, se determinó la proporción de contribución de las reacciones productoras de poder reductor para cada cepa, ilustrado en la Figura 20.

Tabla 5. Flujos de producción total de cofactores NADH y NADPH.

Metabolito	WT	NAD-G6PDH	Δpgi	NAD-G6PDH- Δpgi
NADH (mmol.gDW ⁻¹ .h ⁻¹)	52.47	97.85	19.02	41.85
NADPH (mmol.gDW ⁻¹ .h ⁻¹)	5.36	6.27	11.44	2.41

A partir de esto, es posible observar como las distintas mutaciones afectan el metabolismo del poder reductor. En todas las cepas, la producción de NADH fue mayor a la de NADPH con una proporción aproximada de NADPH:NADH de 1:10, 1:16, 1:2 y 1:17 para la cepa WT, NAD-G6PDH, Δpgi y doble mutante respectivamente. La proporción es similar para los distintos modelos, excepto para la cepa Δpgi que al tener un flujo del 100% por la vía de las pentosas y sin tener cambio de especificidad en la enzima G6PDH, esta produce un exceso de NADPH lo que paralelamente significa una baja producción de NADH.

Las cuatro cepas utilizan mayoritariamente la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) para la producción de NADH, con un aporte del 97.9%, 92.8% y 53.5% y 50.7% del NADH total producido para las cepas WT, NAD-G6PDH, Δpgi y doble mutante respectivamente. Sin embargo, las cepas con la mutación Δpgi tienen un menor flujo por la vía de la glicólisis donde se encuentra la reacción GAPD, por lo que requieren de otras reacciones para producir NADH. La cepa doble mutante NAD-G6PDH- Δpgi es capaz de obtener este poder reductor faltante mediante la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH2r) la cual con su cambio de especificidad puede producir NADH (48.1%). Sin embargo, la cepa

Δpgi no tiene esta opción, por lo que debe utilizar otras reacciones como la transhidrogenasa pntAB (NADTRHD) y la malato deshidrogenasa (7.0 % y 13.6 % respectivamente) para producir el NADH que necesita.

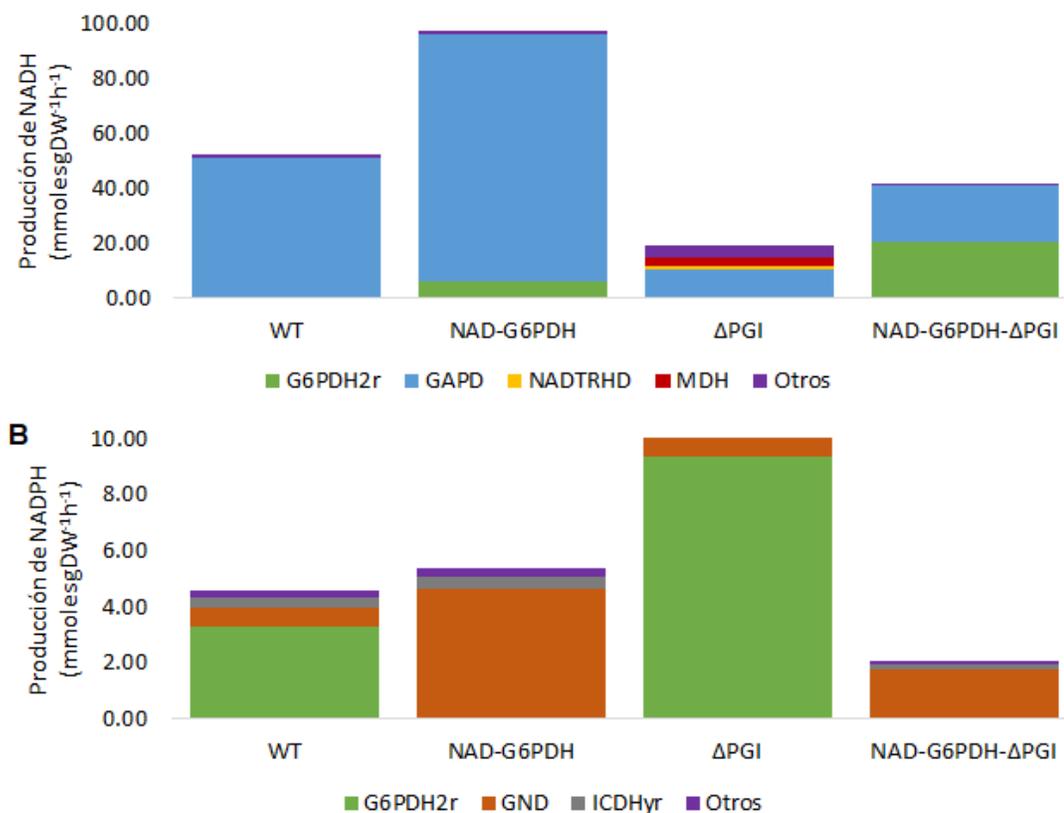


Figura 20. Contribución del metabolismo en la producción de poder reductor.

Se presentan las reacciones del metabolismo central que contribuyen a la producción de NADH (A) y NADPH (B) para las cuatro cepas estudiadas. En la lista de abreviaturas se encuentran los nombres completos de las reacciones. En ambos casos, 'otros' representan las reacciones que se encuentran fuera del metabolismo central que aportan a la producción de poder reductor.

En relación con la producción de NADPH, se observa que las cepas que tienen la especificidad nativa de la G6PDH2r para la producción de este metabolito (WT y Δpgi), utilizan mayoritariamente esta reacción para su producción (62.0 % y 81.5 %), mientras que las cepas mutantes que producen NADH en la G6PDH2r utilizan mayoritariamente

la fosfogluconato deshidrogenasa (GND) en la vía de las pentosas (ambos 88.2%). Sin embargo las cepas WT y Δpgi también son capaces de obtener NADPH a partir de la fosfogluconato deshidrogenasa (GND) pero solo representan respectivamente un 12.0% y un 15.9% del NADPH total producido. Adicionalmente, todas las cepas utilizan la reacción de la isocitrato deshidrogenasa (ICDHyr) para la producción de NADPH, pero el ciclo de Krebs al estar muy poco activo esta reacción presenta un bajo aporte (1.4% para Δpgi y 6.5% para el resto de las cepas).

Finalmente, cabe destacar que las transhidrogenasas *pntAB* y *UdhA* se encuentran desactivadas (0.0%) en todas las simulaciones de los modelos, a excepción de Δpgi la cual presenta un flujo de 1.34% en *UdhA*, favoreciendo la formación de NADH a partir del consumo de NADPH.

4. DISCUSIÓN

4.1. Energía de mantención: efecto del ATPM en el metabolismo.

La célula tiene varias funciones en las que consume ATP, las cuales no están ligadas a la formación de biomasa tales como la motilidad, la mantención de la osmolaridad y de los gradientes de transmembrana (Varma y Palsson, 1993). Debido a la dificultad de cuantificar todas estas funciones se utiliza el término de 'coeficiente de mantención', el cual representa el ATP que no se utiliza en los procesos de crecimiento (Pirt, 1965). La reacción ATPM representa este gasto energético dentro del análisis de COBRA ($ATP + H_2O \rightarrow ADP + H + Pi$). Este consumo puede ser determinado experimentalmente a partir de cultivos continuos (Russell y Cook, 1995), sin embargo, debido a que en este trabajo se realizaron cultivos en *batch*, este valor se obtuvo mediante optimización, como parte del protocolo de simulación utilizando *Flux Balance Analysis*. El uso de ATPM como función objetivo, permite obtener una distribución de flujos que maximiza su valor. Esto corresponde a la mayor producción de energía para un determinado crecimiento y consumo de fuente de carbono.

A su vez, el valor de ATP de mantención explica, por ejemplo, la razón de que algunas cepas consuman una mayor cantidad de fuente de carbono y sin embargo tengan menores tasas de crecimiento. Si la energía obtenida de la fuente de carbono por el catabolismo no es aprovechada completamente en el crecimiento, entonces una gran cantidad estará disponible para ser usada en funciones de mantención. Esto se puede observar en la cepa doble mutante la cual muestra un consumo de glucosa mayor a la de Δpgi ($20.1 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ vs $9.3 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) y sin embargo tiene una tasa de crecimiento similar (0.146 h^{-1} vs 0.150 h^{-1}). La diferencia entre estas cepas se encuentra en el ATP de mantención, donde Δpgi presenta un flujo de ATPM de $0.3 \text{ mmoles}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ mientras que la doble mutante requiere de $16.8 \text{ mmoles}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Al ser una función que explica el rendimiento del organismo, es indispensable mantener su valor fijo. Si el modelo no se restringe con este valor en las siguientes etapas de la simulación donde la función objetivo no es ATPM, el sistema utilizará el mínimo valor posible para la función de ATPM. Esto ocurre debido a que el

algoritmo no considera el ATPM como una función vital, sino solo como un drenaje de ATP, lo que es fisiológicamente incorrecto debido a que las funciones de mantención dentro de la célula son indispensables para la sobrevivencia del organismo.

A pesar de su importancia, el ATP de mantención es un parámetro que aún genera discusión dentro del área de la microbiología. Chen y cols. (2010) determinaron mediante C-13 y análisis de balances de flujo que el valor de ATPM *E. coli* K-12 MG1655 en condiciones de anaerobiosis es de $16.4 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, el cual corresponde al 51.09 % del ATP total. Este valor es menor al flujo calculado en este trabajo de $36.28 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, pero al igual que Chen y cols. representa más del 50 % del ATP total (67.40 %). Sin embargo, existe un debate acerca de la capacidad de los organismos de ajustar su ATP de mantención según las condiciones en las que se encuentre. Por ejemplo, Varela y cols (2004) determinaron una disminución de la tasa de crecimiento junto a un aumento del ATP de mantención al aplicar condiciones de estrés osmótico en *Corynebacterium glutamicum*. En este estudio se observó como la célula experimenta cambios metabólicos para hacer frente a la demanda de energía a medida que aumenta la presión osmótica en el medio extracelular, entre ellos un aumento de hasta 30 veces el valor del flujo de ATPM. De la misma forma, los valores de ATPM determinados por Chen y cols. varían según la condición de presencia o ausencia de oxígeno. Los cultivos utilizados en este trabajo se encuentran en condiciones de electrogenicidad, en contacto con Neutral Red el cual es una molécula invasiva y que genera estrés en el organismo (Retamal, 2018), por lo que estas condiciones estarían aumentando la necesidad de utilizar energía en la mantención celular a los valores medidos en este trabajo. También cabe destacar que, al igual que lo observado por Armingol (2015), el ATP de mantención varía según el contexto genético de la cepa.

El ATP de mantención tiene la capacidad de dictar la máxima capacidad de producción de energía disponible en el organismo para sus funciones de crecimiento. Tal como se observa en la Figura 21, cuando la tasa de glucosa se mantiene fija en un valor, al aumentar el ATP destinado a la mantención, disminuye el ATP disponible para el crecimiento y a su vez disminuyendo la producción de biomasa. De la misma forma, a una tasa de crecimiento

fija, al aumentar el ATPM el organismo requiere de un mayor consumo de glucosa para compensar el drenaje de ATP que exige esta vía. El ATPM por lo tanto está altamente vinculado con el metabolismo energético, siendo una fuerza de extracción de energía de la célula la cual afecta los flujos de formación de ATP y poder reductor, lo cual a su vez tiene un impacto sobre el crecimiento del organismo. En la Figura 22 se observa un diagrama de la relación de estos componentes metabólicos.

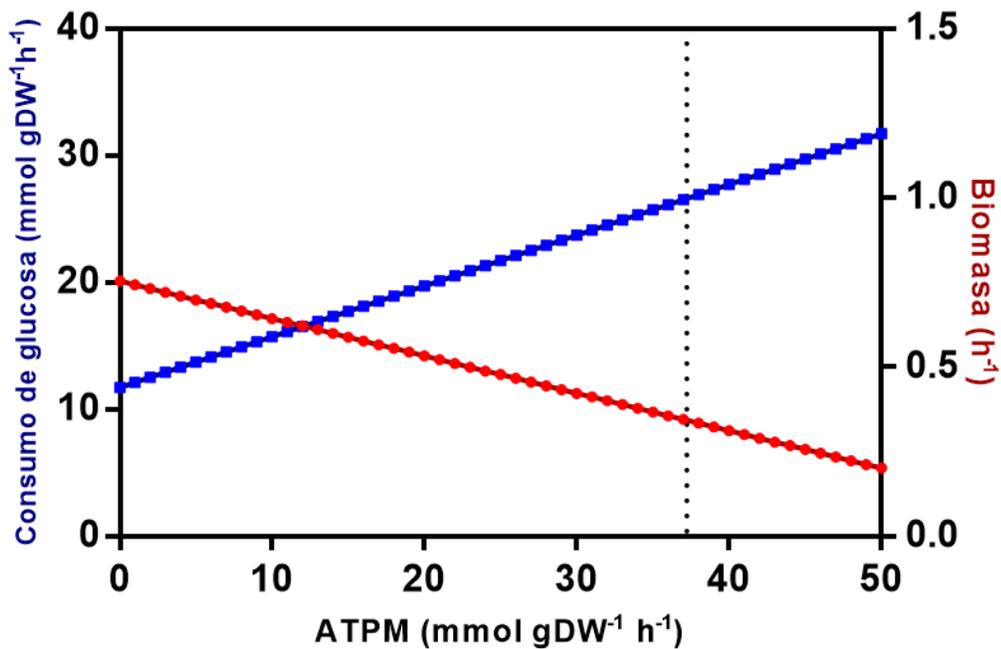


Figura 21. Sensibilidad a ATPM sobre la biomasa y el consumo de glucosa

Análisis de sensibilidad de la biomasa y el consumo de glucosa frente a un barrido del flujo de ATPM para la cepa WT. Se realizaron los dos análisis por separado. Para el caso de la optimización de biomasa (eje izquierdo azul) el valor de consumo de glucosa se mantuvo constante al valor medido experimentalmente, mientras que en el caso de la optimización de consumo de glucosa (eje derecho rojo) se mantuvo la tasa de crecimiento constante al valor medido experimentalmente. Con la línea punteada negra se indica el de ATPM calculado mediante FBA a partir de los valores fisiológicos para la cepa WT (36.28 mmoles·gDW⁻¹·h⁻¹)

Si bien fue posible demostrar el efecto del ATP de mantención sobre el metabolismo energético de *E. coli*, sería necesario corroborar los datos obtenidos mediante FBA con

mediciones experimentales de ATPM para concluir con mayor certeza los resultados. De todas maneras, fue posible analizar a nivel teórico mediante las simulaciones, el comportamiento del organismo frente a distintas exigencias de mantención, haciendo evidente su importancia dentro del metabolismo.

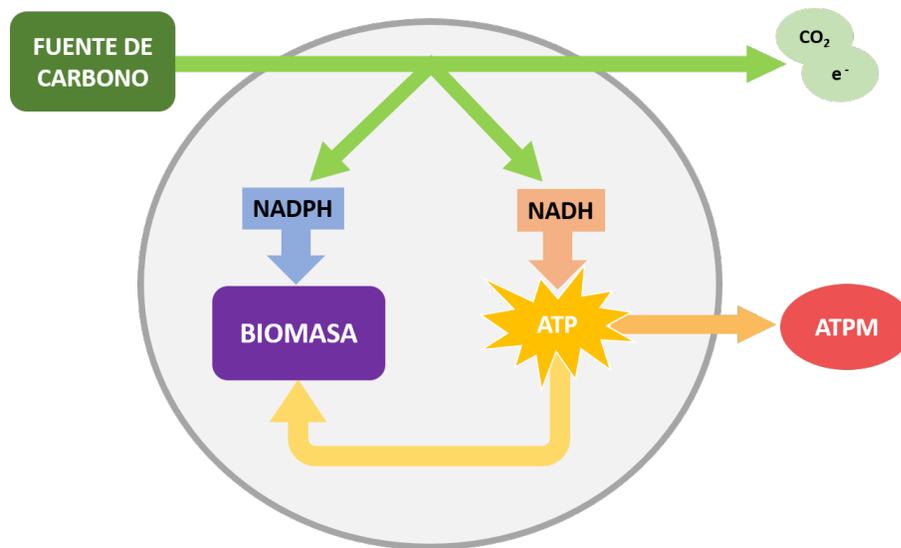


Figura 22. Relación del ATP de mantención en el metabolismo energético.

Diagrama que explica la relación del ATPM con la formación de poder reductor y ATP. La fuente de carbono entra al organismo, el cual mediante su metabolismo es capaz de utilizarlo para generar NADH y NADPH, perdiendo electrones y carbono en forma de CO_2 en el proceso. El NADPH se utiliza directamente en la formación de biomasa, mientras que el NADH genera ATP el cual puede ser utilizada en funciones de crecimiento. A su vez, el ATP puede ser consumido como ATPM, el cual no tiene un efecto sobre la biomasa.

4.2. Mecanismo electrogénico: DHORD5 como proveedor de menaquinol

Hasta hace poco tiempo, las investigaciones relacionadas a la electrogénesis en modelos bacterianos se habían concentrado en estudiar la producción de electricidad suponiendo que el NADH era capaz de entregar directamente sus electrones a un mediador externo. La evidencia dictaba que el mecanismo de traspaso de electrones a partir del NADH en la cadena respiratoria era muy similar al mecanismo de traspaso de electrones de una MFC,

sin embargo era necesaria una molécula mediadora para la extracción de electrones debido a la propiedad no conductora de la membrana citoplasmática (Fultz y Durst, 1982). A su vez, se observó que el mediador Neutral Red reducido (NRH_2) es capaz de reducir el NAD a NADH (Park y Zeikus, 1999), lo que reemplazaría la función de la menaquinona en el complejo fumarato reductasa postulados por Harrington y cols. 2015. Finalmente, los mismos investigadores lograron determinar que el aumento de la concentración de NADH en presencia de un mediador (NR) produce un aumento de la corriente generada en celdas de combustibles (Park y Zeikus, 2000). Sin embargo, Park y Zeikus notan que debido a la similitud entre los potenciales estandar de NAD (-0.320 V) y NR (-0.325 V), se requiere de una alta concentración de NADH para que ocurra el traspaso de electrones entre estas dos moléculas.

No es hasta el 2015 cuando Harrington y cols. publican su trabajo, proponiendo un nuevo mecanismo, en donde el NADH no interactúa directamente con NR sino que requiere de la menaquinona como intermediador. Según sus resultados, a diferencia de Park y Zeikus, ellos no fueron capaces de obtener NADH a partir de NR reducido y NAD, además de probar que al deletar el gen de la menaquinona se perdía la generación de corriente (Harrington y cols., 2015). Por lo tanto, según este estudio se determina que el mecanismo de electrogenesis se compone del NADH, el cual es el donador de electrones que reduce la menaquinona a menaquinol, el cual reduce el mediador NR que finalmente reduce el ánodo de la celda.

Debido a la evidencias de Harrington y cols., este trabajo se concentró en el mecanismo mediado por menaquinol y cómo las diferencias en la producción de NADH afectan la electrogénesis. Dentro del modelo iJO1366 de *E. coli*, existen dos reacciones que describen la reducción de menaquinona mediante NADH: NADH17pp y NADH10. La diferencia entre ambos es que NADH17pp es una reacción en que la oxidación está acoplada al traspaso de protones al periplasma, mientras que NADH10 no. Por lo tanto, NADH17pp estaría beneficiando más la producción de energía y, por consecuencia, la producción de biomasa en comparación a NADH10, lo cual es posible observar en la Figura 14. El mecanismo de

NADH10 presenta la misma tendencia en la Figura 14 que el mecanismo que propuesto por Park y Zeikus, NADHdir, donde el NADH es capaz de interactuar directamente con el NR.

Sin embargo, de forma inesperada se encontró otra reacción que cataliza el traspaso de menaquinona a menaquinol, DHORD5, la cual genera un mayor beneficio en la producción de biomasa que cualquier otra, a bajos flujos de electrones. Tal como se observa en la Figura 15, DHORD5, la dihidroorotato deshidrogenasa dependiente de menaquinol, es capaz de reducir la menaquinona acoplado a la generación de orotato dentro del metabolismo de la síntesis de pirimidinas, las cuales forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos. En literatura se describe que en *E. coli* esta reacción es necesaria en condiciones anaeróbicas para la viabilidad del organismo, donde el menaquinol se oxida de vuelta a menaquinona mediante la reducción de fumarato (Newton y cols., 1971). En el caso electrogénico, debido al bajo flujo de electrones la menaquinona se repone mediante la reducción de NR más la reducción de fumarato la cual se observa en la Figura 18.

La dihidroorotato deshidrogenasa, por lo tanto, tiene un flujo basal el cual es capaz de abastecer de menaquinol a la célula para la producción de electricidad a bajas exigencias de flujo de electrones. A diferencia de las reacciones NADH17 o NADH10, esta reacción no requiere del consumo de NADH en el proceso, el cual puede ser utilizado en la producción de metabolitos de fermentación lo que es energéticamente favorable para el organismo. A partir de esto se concluye que las cepas estudiadas en este trabajo podrían obtener el menaquinol necesario para la reacción electrogénica mediante el flujo por DHORD5, siendo el dihidroorotato el donador de electrones y no el NADH como se propone en la hipótesis de este trabajo. Adicionalmente se probó que la distribución de flujos del metabolismo central no se veían afectadas por el uso de este mecanismo, tal como se observa en la Figura 19.

No obstante, DHORD5 tiene un límite en cuanto a la producción de menaquinol. Este está restringido por la tasa de crecimiento del organismo, ya que al exigirle mayor flujo llega un punto en donde se generan más pirimidinas de las necesarias generando un efecto detrimental en la biomasa de la célula, tal como se observa en la Figura 14. En este trabajo

se obtuvieron bajos valores de producción de corriente, por lo que con las tasas de crecimiento que presentaron las cepas DHORD5 sería capaz de abastecer más menaquinol del exigido electrogénicamente. Sin embargo, en el caso de especies con una mayor producción de corriente como *Geobacter sulfurreducens*, probablemente se requiera del uso de NADH para la generación de menaquinol y sería de gran interés estudiar el aporte de reacciones como DHORD5 y NADH17pp en el proceso electrogénico.

4.3. Deleción de PGI y cambio de especificidad de la G6PDH: efecto en la distribución de flujos y el balance redox

A pesar de que se concluye que, en las condiciones estudiadas, la producción de electricidad no estaría ligada a la producción de NADH y NADPH, las mutantes que afectan el balance de estos cofactores aun son objeto importante de estudio.

En las condiciones anaeróbicas observadas no existe síntesis de ATP mediante la cadena respiratoria. Al contrario, se observa un uso de la ATP sintasa de forma reversa, resultados también observados por Chen y cols. (2010), para la generación de una gradiente de protones que permite el movimiento flagelar y transporte de nutrientes. A pesar de que el organismo no requiera de NADH para la generación ATP mediante la cadena respiratoria, este requiere de NADH para la producción de metabolitos de fermentación. La célula necesita liberar carbonos mediante estos metabolitos para mantener un flujo por la glicólisis y vías fermentativas donde es capaz de generar ATP, por lo que el NADH sigue teniendo un rol en la producción de energía celular.

Analizando las tasas de crecimiento presentadas en la Tabla 4, se observa que las cepas WT y NAD-G6PDH tienen una tasa de crecimiento similar entre ellas, al igual que las cepas Δpgi y Δpgi -NAD-G6PDH. Sin embargo, las cepas con la mutación Δpgi tienen menos de la mitad del valor de la tasa crecimiento que las cepas sin esta mutación. Esto se condice con la literatura, donde las mutantes Δpgi en condiciones aeróbicas con glucosa como su única fuente de carbono presentan reducidas tasas de crecimiento (Canonaco y cols. 2001). Esto se debe a la sobreproducción de NADPH generado por el alto flujo

por la vía de las pentosas fosfato, además de la pérdida de carbono en forma de CO_2 por la fosfogluconato deshidrogenasa y la disminución de la producción de NADH y ATP mediante la glicólisis. Este mismo comportamiento se observa en la Figura 20, donde la cepa Δpgi presenta un desbalance entre la producción de sus cofactores NAD(P)H, requiriendo un flujo por la transhidrogenasa UdhA y del consumo de fumarato mediante la reacción malato deshidrogenasa para la producción de NADH. Sin embargo, se ha observado que en condiciones aeróbicas la adición de la mutación NAD-G6PDH alivia el desbalance de Δpgi , permitiéndole mejorar su tasa de crecimiento (Olavarría y cols., 2014). Esto se contradice con los datos obtenidos en este estudio, donde la cepa doble mutante NAD-G6PDH- Δpgi presenta una menor tasa de crecimiento que la cepa Δpgi . Esto se debe a que en condiciones anaeróbicas se activa la vía Entner-Doudoroff (Chen y cols. 2010). El uso de esta vía reduce el flujo por la fosfogluconato deshidrogenasa, en consecuencia disminuyendo la producción de NADPH y dejando a la G6PDH como la principal productora de este cofactor, tal como se observa en la Figura 20.B. Por lo tanto, la cepa doble mutante la cual su G6PDH produce NADH en vez de NADPH, presenta una deficiencia en la producción de NADPH, generando una baja producción de biomasa. Tanto Δpgi como NAD-G6PDH- Δpgi presentan tasas de crecimiento reducidas debido al reducido uso de la vía glicolítica y al desbalance de la producción de poderes redox. No obstante el desbalance de Δpgi se debe a una falta de NADH más una sobreproducción de NADPH, mientras que el desbalance de NAD-G6PDH- Δpgi se debe a una deficiencia en la producción de NADPH.

Respecto a la mutante NAD-G6PDH, esta presenta una tasa de crecimiento mayor a la de la cepa WT. Esto se contradice con los resultados obtenidos por Olavarría y cols. (2014), donde en condiciones aeróbicas la mutante presenta una menor producción de biomasa que la cepa silvestre. La diferencia nuevamente resulta ser la activación de la vía Entner-Doudoroff en condiciones anaeróbicas. La mutante NAD-G6PDH obtiene el NADPH mayoritariamente del uso de la enzima fosfogluconato deshidrogenasa, por lo que presenta un bajo flujo por la vía ED a diferencia de la cepa WT, la cual utiliza la enzima G6PDH para la producción del NADPH, prefiriendo el uso de la vía ED evitando

la sobreproducción de NADPH, tal como se observa en la Figura 18. Si bien la vía ED presenta el beneficio de evitar la pérdida de carbonos en forma de CO₂ que presenta la reacción fosfogluconato deshidrogenasa, este bifurca el flujo de carbonos hacia piruvato, disminuyendo el pool de gliceraldehido-3-fosfato y por consecuencia, reduciendo el flujo por la glicólisis. La ruta de la fosfogluconato deshidrogenasa en cambio desemboca en un mayor pool de gliceraldehido-3-fosfato, generando una mayor cantidad de NADH y ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato en la glicólisis. Por lo tanto, si bien el metabolismo de la mutante NAD-G6PDH tiene una pérdida de carbonos mediante el flujo por la reacción fosfogluconato deshidrogenasa, lo que a su vez se traduce en un elevado consumo de glucosa, esta ruta presenta una ventaja energética sobre la cepa silvestre, superando su tasa de crecimiento.

Finalmente, se compararon los datos de los flujos metabólicos obtenidos a partir de las simulaciones con los de Chen y cols. (2010), quienes realizaron medidas de C-13 para determinar los flujos del metabolismo central de *E. coli* en condiciones anaeróbicas. Los flujos de la Figura 18 tienen la misma estructura que aquellos determinados por Chen y cols.: un ciclo de Krebs poco activo e incompleto donde el fumarato se bifurca en malato y succinato, una alta producción de metabolitos de fermentación donde el de mayor producción es el formato seguido por el etanol y finalmente el acetato, y el uso de la vía Entner-Doudoroff. Sin embargo Chen y cols. observaron una leve producción de lactato, la cual no se observa en este trabajo. Si bien fue posible obtener una distribución de flujos semejante a la de Chen y cols. a partir de pocas medidas experimentales, las simulaciones mediante COBRA se benefician de la adicción de restricciones, tales como mediciones de metabolitos de fermentación, generando resultados más acordes a la realidad biológica de los organismos.

4.4. Metabolismo electrogénico: limitantes, proyecciones y aplicaciones

A partir de esta investigación fue posible responder varias preguntas acerca del metabolismo electrogénico de *E. coli*, sin embargo este también abrió nuevas incógnitas y

preguntas. A continuación se detallan las limitantes de este trabajo y las proyecciones y/o aplicaciones de esta tecnología.

Experimentalmente, uno de los principales problemas al trabajar con electrogénesis en *E. coli* es la dificultad de crecimiento que tiene el microorganismo. Los experimentos debieron realizarse en condiciones anaeróbicas y en presencia de Neutral Red, dos factores que deterioran el crecimiento de la bacteria, causando largos periodos de fase lag. Esto junto a limitaciones en los materiales necesarios para montar una MFC los experimentos toman una gran cantidad de tiempo lo que finalmente se traduce a una falta de réplicas debido al limitado tiempo requerido para esta investigación. Si bien se realizaron réplicas las cuales se encuentran detalladas en la tesis de Fernanda Retamal 2018, solo fue posible realizar la cuantificación de consumo de glucosa para una sola réplica de cada cepa por lo que finalmente se decidió analizar únicamente los datos de esos cultivos. Por lo tanto, sería necesario volver a realizar los experimentos con más tiempo para corroborar los datos de esta investigación.

Respecto al análisis bioinformático, COBRA resulto ser una herramienta capaz de responder las preguntas de este trabajo. Sin embargo, estas no dejan de ser simulaciones obtenidas a partir de un programa escrito por investigadores, por lo que indudablemente debe incluir sesgos o errores. Los modelos se van actualizando a medida que se encuentra evidencia del funcionamiento del metabolismo de los organismos, acercándose cada vez más a la realidad biológica de estos. A su vez, es posible mejorar los análisis entre mas restricciones experimentales se agreguen al modelo. Esto puede ser posible mediante la medición de metabolitos de fermentación o la cuantificación de flujos mediante carbono 13 (Choi y cols, 2007).

Tal como se concluyó en el punto 4.2., la discusión sobre los mecanismos electrogénicos de bacterias queda abierta a mayores investigaciones respecto a la capacidad de DHORD5 de abastecer de electrones en condiciones de generación de electricidad. Sería de gran interés evaluar la actividad de DHORD5 en bacterias electrogénicas tales como *Geobacter* o *Shewanella*. Por otro lado los estudios podrían seguir con *E. coli*, realizando mutantes

que generen mayor o menor flujo por la reacción DHORD5, o eliminando las reacciones NADH17pp y NADH10 para analizar su viabilidad electrogénica. Otra investigación de interés sería mediante un potencióstato forzar un flujo de salida de electrones y estudiar la respuesta del cultivo mediante mediciones fisiológicas de consumo de glucosa, tasa de crecimiento y producción de metabolitos de fermentación, analizando sus relaciones recreando la curva de la Figura 14.

Finalmente, cabe destacar la aplicación de esta tecnología fuera de la ciencia básica. En el escenario actual en donde se requiere encontrar formas de producir energía de forma renovable en reemplazo a los combustibles fósiles, la capacidad de generar electricidad a partir de organismos microbiológicos sería una buena alternativa para enfrentar esta necesidad. A su vez, existe la posibilidad de generar esta energía a partir de desechos o aguas residuales, disminuyendo la carga de nutrientes de estos mediante el crecimiento bacteriano, un proceso necesario para el manejo de residuos. Sin embargo, para lograr esto los cultivos electrogénicos realizados en el laboratorio deben ser adaptados a una producción a gran escala, proceso que resulta complicado para muchos microorganismos por lo que sería necesario un estudio enfocado únicamente a la adaptación de los cultivos a escalas industriales.

5. CONCLUSIONES

1. El ATP de mantención está altamente vinculado con el metabolismo energético, siendo una fuerza de extracción de energía de la célula la cual afecta los flujos de formación de ATP y poder reductor, lo cual a su vez tiene un impacto sobre el crecimiento del organismo.
2. A bajos flujos de producción de electricidad la utilización orotato mediante la reacción DHORD5 como abastecedor de menaquinol para las reacciones electrogénicas resulta ser más beneficioso para el crecimiento que el uso de NADH mediante reacciones como NADH_{17pp} o NADH₁₀.
3. El cambio de especificidad de la G6PDH y la delección del gen *pgi* tienen efectos sobre el balance de producción de los poderes reductores NADH y NADPH, generando adaptaciones metabólicas que en consecuencia causan cambios en el crecimiento del organismo.
 - a) El cambio de especificidad de G6PDH causa que la cepa presente una tasa de crecimiento más alta que la cepa WT debido a un menor uso de la vía ED, lo que genera una mayor producción de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato en la glicólisis, junto a una alta producción de NADH que desemboca en una mayor producción de metabolitos de fermentación.
 - b) La mutación Δpgi produce un desbalance de los poderes reductores debido a una deficiencia en la producción de NADH junto a una sobreproducción de NADPH, disminuyendo la capacidad de generar biomasa.
 - c) La doble mutante NAD-G6PDH- Δpgi también presenta un desbalance de los poderes reductores debido a la deficiencia en la producción de NADPH lo que deteriora el crecimiento de la cepa.
4. Los cambios en el balance de NADH y NADPH no afectan directamente a la producción de electricidad en *Escherichia coli* a baja producción de corriente.

6. BIBLIOGRAFÍA

Armingol, E. 2015. Análisis de Balance de Flujos del crecimiento en acetato de *Escherichia coli*: Efecto del cambio de especificidad por el cofactor de la Isocitrato Deshidrogenasa. Seminario de Titulo, Universidad de Chile

Bologna, F.P., Andreo, C.S. y Drincovich M.F. 2007. *Escherichia coli* Malic Enzymes: Two Isoforms with Substantial Differences in Kinetic Properties, Metabolic Regulation, and Structure. *Journal of Bacteriology* 189: 5937-5946.

Bordbar, A., Monk, J. M., King, Z. A., y Palsson, B. O. 2014. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 107-120.

Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B., y Walsh, F. C. 2006. Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics* , 21 (11), 2015-2045.

Canonaco, F. 2001. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiology Letters*, 204(2), 247-252.

Canonaco, F. 2003. The relevance of transhydrogenases and heterologous phosphagen kinases for microbial cofactor metabolism. Tesis PhD. ETH Zürich, Suiza: 12.

Carugo, O. y Argos, P. 1997. NADP-Dependent Enzymes. I: Conserved Stereochemistry of Cofactor Binding. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 28:10–28.

Chen, X., Alonso, A. P., Allen, D. K., Reed, J. L., y Shachar-Hill, Y. 2011. Synergy between ¹³C-metabolic flux analysis and flux balance analysis for understanding metabolic adaption to anaerobiosis in *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 13(1), 38-48.

Choi, H. S., Kim, T. Y., Lee, D., y Lee, S. Y. 2007. Incorporating metabolic flux ratios into constraint-based flux analysis by using artificial metabolites and converging ratio determinants. *Journal of Biotechnology*, 129(4), 696-705.

El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., y Gorby, Y. A. 2010. Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 107 (42), 18127-18131.

Feist, A.M., Henry, C.S., Reed, J.L., Krummenacker, M., Joyce, A.R., Karp, P.D. Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V. y Palsson, B.O. 2007. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Molecular Systems Biology* 3: 121.

Fuhrer, T. y Sauer, U. 2009. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *Journal of Bacteriology* 191: 2112-2121..

- Fultz, M. L., and R. A. Durst.** 1982. Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: a compilation. *Anal. Chim. Acta* 140:1–18.
- Harrington, T. D., Tran, V. N., Mohamed, A., Renslow, R., Biria, S., Orfe, L., Beyenal, H.** 2015. The mechanism of neutral red-mediated microbial electrosynthesis in *Escherichia coli* : menaquinone reduction. *Bioresource Technology* , 192 , 689-695.
- Holms, W.H.** 1986. Evolution of the glyoxylate bypass in *Escherichia coli* – an hypothesis which suggests an alternative to the Krebs cycle. *FEMS Microbiology Letters* 34: 123–127.
- Jensen, H. M., Albers, A. E., Malley, K. R., Londer, Y. Y., Cohen, B. E., Helms, B. A., y Ajo-Franklin, C. M.** 2010. Engineering of a synthetic electron conduit in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 107 (45), 19213-19218.
- Kabus, A., Georgi, T., Wendisch, V.F. y Bott, M.** 2007. Expression of the *Escherichia coli* pntAB genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 47-53.
- Kadirkamanathan, V., Yang, J., Billings, S. A., y Wright, P. C.** 2006. Markov Chain Monte Carlo Algorithm based metabolic flux distribution analysis on *Corynebacterium glutamicum*. *Bioinformatics*, 22(21), 2681-2687.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., y Rabaey, K.** 2006. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science & Technology* , 40 (17), 5181-5192.
- Mao, L., y Verwoerd, W. S.** 2013A. Selection of organisms for systems biology study of microbial electricity generation: a review. *International Journal of Energy and Environmental Engineering* , 4 (1), 1-18.
- Mao, L., y Verwoerd, W. S.** 2013B. Model-driven elucidation of the inherent capacity of *Geobacter sulfurreducens* for electricity generation. *Journal of Biological Engineering*, 7(1), 14.
- Mao, L., y Verwoerd, W. S.** 2013C. Genome-scale stoichiometry analysis to elucidate the innate capability of the cyanobacterium *Synechocystis* for electricity generation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(10), 1161-1180.
- Monod, J.** 1978. The Growth Of Bacterial Cultures. *Selected Papers in Molecular Biology* by Jacques Monod, 139-162.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., y Lehninger, A. L.** 2017. *Lehninger principles of biochemistry*. New York, NY: W.H. Freeman and Company.
- Newton, N., Cox, G., y Gibson, F.** 1971. The function of menaquinone (vitamin K2) in *Escherichia coli* K-12. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 244(1), 155-166.

- Okamoto, A., Hashimoto, K., Neelson, K. H., y Nakamura, R.** 2013. Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 110 (19), 7856-7861.
- Olavarría, K., De Ingeniis, J., Zielinski, D.C., Fuentealba, M., Muñoz, R., McCloskey, D., Feist, A.M. y Cabrera, R.** 2014. Metabolic impact of an NADH-producing glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Microbiology* 160: 2780-2793.
- Orth, J.D., Conrad, T.M., Na, J., Lerman, J.A., Nam, H., Feist, A.M. y Palsson, B.O.** 2011. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism. *Molecular Systems Biology* 7: 535-543.
- Park, D. H., Zeikus, J. G.** 1999. Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation. *J. Bacteriol.* 181:2403–2410.
- Park, D. H., Zeikus, J. G.** 2000. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Applied and Environmental Microbiology* , 66 (4), 1292-1297.
- Pirt S. J. y Cyril Norman Hinshelwood.** 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 163(991), 224-231.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., y Lovley, D. R.** 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* , 435 (7045), 1098-1101.
- Retamal, F.** 2018. Generación de electricidad en mutantes de *Escherichia coli* de la producción de NADH y NADPH. Tesis de Magister, Universidad de Chile
- Russell, J.B. y Cook, G.M.** 1995. Energetics of Bacterial Growth: Balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews* 59: 48-62.
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R.M., Thiele, I., Orth, J.D., Feist, A.M., Zielinski, D.C., Bordbar, A., Lewis, N.E., Rahmanian, S., Kang, J., Hyduke, D.R. y Palsson, B.O.** 2011. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols* 6: 1290-1307.
- Schuetz, R., Zamboni, N., Zampieri, M., Heinemann, M. y Sauer, U.** 2012. Multidimensional optimality of microbial metabolism. *Science* 336: 601-604.
- Varela, Cristian A, Mauricio E Baez, y Eduardo Agosin.** 2004. Osmotic Stress Response : Quantification of Cell Maintenance and Metabolic Fluxes in a Lysine Overproducing Strain of *Corynebacterium Glutamicum* 70 (7): 4222–29.
- Varma, A., y Palsson, B.O.** 1993. Metabolic Capabilities of *Escherichia coli* II. Optimal Growth Patterns. *Journal of Theoretical Biology* 165: 503-522.

Wong, M. T., Cheng, D., Wang, R., y Hsing, I. M. 2016. Modifying the endogenous electron fluxes of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4. 1 for improved electricity generation . *Enzyme and Microbial Technology* , 86, 45-51.

Yong, Y. C., Yu, Y. Y., Yang, Y., Li, C. M., Jiang, R., Wang, X., y Song, H. 2012. Increasing intracellular releasable electrons dramatically enhances bioelectricity output in microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications* , 19 , 13-16.

Yong, X. Y., Feng, J., Chen, Y. L., Shi, D. Y., Xu, Y. S., Zhou, J., y Shi, C. L. 2014a. Enhancement of bioelectricity generation by cofactor manipulation in microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics* , 56, 19-25.

Yong, X. Y., Shi, D. Y., Chen, Y. L., Jiao, F., Lin, X., Zhou, J., y Zheng, T. 2014b. Enhancement of bioelectricity generation by manipulation of the electron shuttles synthesis pathway in microbial fuel cells. *Bioresource Technology* , 152, 220-224.

7. ANEXO

7.1. Codigos de Programación

7.1.1. Generación de modelos e incorporación de parámetros experimentales

```
1 load('iJO1366mejorado.mat')
2 iJO1366elec=iJO1366;
3
4 %Agregar reacciones electrogenicas
5 iJO1366elec = addMetabolite(iJO1366elec, 'NR_ox', 'Neutral Red
   oxidado');
6 iJO1366elec = addMetabolite(iJO1366elec, 'NR_red', 'Neutral Red
   reducido');
7 iJO1366elec = addReaction(iJO1366elec, 'MENAQUELECTRICA', {'mql8[c
   ]', 'NR_ox', 'mqn8[c]', 'NR_red'}, [-1 -1 1 1], true);
8 iJO1366elec = addReaction(iJO1366elec, 'NR', {'NR_red', 'NR_ox'}, [-1
   1], false);
9
10 %Cambiar reacciones malas
11 iJO1366elec = changeRxnBounds(iJO1366elec, 'HACD1', 0, 'u');
12 iJO1366elec = changeRxnBounds(iJO1366elec, 'HACD2', 0, 'u');
13 iJO1366elec = changeRxnBounds(iJO1366elec, 'HACD3', 0, 'u');
14 iJO1366elec = changeRxnBounds(iJO1366elec, 'HACD4', 0, 'u');
15 iJO1366elec = changeRxnBounds(iJO1366elec, 'HACD5', 0, 'u');
16 iJO1366elec = changeRxnBounds(iJO1366elec, 'HACD6', 0, 'u');
17 iJO1366elec = changeRxnBounds(iJO1366elec, 'HACD7', 0, 'u');
18 iJO1366elec=changeRxnBounds(iJO1366elec, 'MOX', 0, 'b');
19 iJO1366elec=changeRxnBounds(iJO1366elec, 'SUCOAS', 0, 'l');
20
21 % Wild Type
22
23 %Generar Modelo
24 WT=iJO1366elec;
25
26 %Parametros Experimentales
27 uWT=0.3243;
28 GlcWT=-27.2606;
29 ElecWT=0.0425;
30 WT=changeRxnBounds(WT, 'EX_o2(e)', 0, 'b'); %Anaerobico
31 WT=changeRxnBounds(WT, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M', uWT, 'b');
32 WT=changeRxnBounds(WT, 'EX_glc(e)', GlcWT, 'b');
33 WT=changeRxnBounds(WT, 'MENAQUELECTRICA', ElecWT/2, 'b');
34 WT=changeRxnBounds(WT, 'NR', ElecWT/2, 'b');
35
36 %NAD-G6PDH
```

```

37
38 %Generar Modelo
39 NADG6=iJO1366elec;
40 NADG6=changeRxnMets(NADG6,{ 'nadp[c] ', 'nadph[c] '},{ 'nad[c] ', 'nadh[
      c] ' }, 'G6PDH2r' ,[-1;1]); %ambiar NADP por NAD
41
42 %Parametros Experimentales
43 uNADG6=0.3796;
44 GlcNADG6=-46.8806;
45 ElecNADG6=0.0508;
46 NADG6=changeRxnBounds(NADG6, 'EX_o2(e) ',0, 'b'); %Anaerobico
47 NADG6=changeRxnBounds(NADG6, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M ',
      uNADG6, 'b');
48 NADG6=changeRxnBounds(NADG6, 'EX_glc(e) ',GlcNADG6, 'b');
49 NADG6=changeRxnBounds(NADG6, 'MENAQUIELECTRICA ',ElecNADG6/2, 'b');
50 NADG6=changeRxnBounds(NADG6, 'NR ',ElecNADG6/2, 'b');
51
52 % pgi
53
54 %Generar Modelo
55 PGI=iJO1366elec;
56 PGI=changeRxnBounds(PGI, 'PGI ',0, 'b');
57
58 %Parametros Experimentales
59 uPGI=0.1501;
60 GlcPGI=-9.3227;
61 ElecPGI=0.0286;
62 PGI=changeRxnBounds(PGI, 'EX_o2(e) ',0, 'b'); %Anaerobico
63 PGI=changeRxnBounds(PGI, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M ',uPGI, 'b'
      );
64 PGI=changeRxnBounds(PGI, 'EX_glc(e) ',GlcPGI, 'b');
65 PGI=changeRxnBounds(PGI, 'MENAQUIELECTRICA ',ElecPGI/2, 'b');
66 PGI=changeRxnBounds(PGI, 'NR ',ElecPGI/2, 'b');
67
68 PGI=changeRxnBounds(PGI, 'GLCptspp ',-GlcPGI, 'b');
69
70 % Doble Mutante
71
72 %Generar Modelo
73 DM=iJO1366elec;
74 DM=changeRxnBounds(DM, 'PGI ',0, 'b');
75 DM=changeRxnMets(DM,{ 'nadp[c] ', 'nadph[c] '},{ 'nad[c] ', 'nadh[c] ' }, '
      G6PDH2r' ,[-1;1]); %ambiar NADP por NAD
76
77 %Parametros Experimentales
78 uDM=0.1459;

```

```

79 GlcDM=-20.1342;
80 ElecDM=0.0405;
81 DM=changeRxnBounds(DM, 'EX_o2(e)', 0, 'b'); %Anaerobico
82 DM=changeRxnBounds(DM, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M', uDM, 'b');
83 DM=changeRxnBounds(DM, 'EX_glc(e)', GlcDM, 'b');
84 DM=changeRxnBounds(DM, 'MENAQUELECTRICA', ElecDM/2, 'b');
85 DM=changeRxnBounds(DM, 'NR', ElecDM/2, 'b');
86
87 % Forzar G6PDH
88 WT=changeRxnBounds(WT, 'G6PDH2r', -0.1220*GlcWT, 'b');
89 NADG6=changeRxnBounds(NADG6, 'G6PDH2r', -0.1220*GlcNADG6, 'b');
90 PGI=changeRxnBounds(PGI, 'G6PDH2r', -1*GlcPGI, 'b');
91 DM=changeRxnBounds(DM, 'G6PDH2r', -1*GlcDM, 'b');
92
93 % Hacer modelo para NADH17pp y DHORD5 para WT
94 WT_NADH17pp=changeRxnBounds(WT, 'NADH17pp', ElecWT/2, 'b');
95 WT_NADH17pp=changeRxnBounds(WT_NADH17pp, 'DHORD5', 0, 'b');
96 WT_DHORD5=WT;

```

7.1.2. Determinación del ATP de mantención

```

1 % Optimizar ATPM y fijarlo
2 WT_NADH17pp=Opt_ATPM(WT_NADH17pp);
3 WT_DHORD5=Opt_ATPM(WT_DHORD5);
4 NADG6=Opt_ATPM(NADG6);
5 PGI=Opt_ATPM(PGI);
6 DM=Opt_ATPM(DM);
7
8 ATPM=[WT_NADH17pp.lb(748), WT_DHORD5.lb(748), NADG6.lb(748), PGI.lb
      (748), DM.lb(748)];

```

7.1.3. Mecanismos Electrogénicos

```

1 load('iJO1366mejorado.mat')
2 iJO1366elec=iJO1366;
3 iJO1366elec=changeRxnBounds(iJO1366elec, 'EX_o2(e)', 0, 'b');
4 iJO1366elec=changeRxnBounds(iJO1366elec, 'EX_glc(e)', -27.26, 'b');
5 iJO1366elec=changeRxnBounds(iJO1366elec, 'ATPM', 36.2846691964639, '
      b');
6 iJO1366elec=addMetabolite(iJO1366elec, 'NR_ox', 'Neutral Red
      oxidado');
7 iJO1366elec=addMetabolite(iJO1366elec, 'NR_red', 'Neutral Red
      reducido');

```

```

8
9 NADH17pp=iJO1366elec;
10 NADH17pp= addReaction(NADH17pp, 'MENAQUIELECTRICA', {'mql8[c]', '
    NR_ox', 'mqn8[c]', 'NR_red'}, [-1 -1 1 1], true);
11 NADH17pp= addReaction(NADH17pp, 'NR', {'NR_red', 'NR_ox'}, [-1 1],
    false);
12 NADH17pp= changeObjective(NADH17pp, '
    Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
13
14 NADH10=iJO1366elec;
15 NADH10= addReaction(NADH10, 'MENAQUIELECTRICA', {'mql8[c]', 'NR_ox',
    'mqn8[c]', 'NR_red'}, [-1 -1 1 1], true);
16 NADH10= addReaction(NADH10, 'NR', {'NR_red', 'NR_ox'}, [-1 1], false);
17 NADH10= changeObjective(NADH10, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
18
19 NADH=iJO1366elec;
20 NADH= addReaction(NADH, 'NADH_DIRECTO', {'nadh[c]', 'h[c]', 'NR_ox', '
    nad[c]', 'NR_red'}, [-1 -1 -1 1 1], true);
21 NADH= addReaction(NADH, 'NR', {'NR_red', 'NR_ox'}, [-1 1], false);
22 NADH= changeObjective(NADH, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
23
24 N_A=iJO1366elec;
25 N_A= changeObjective(N_A, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
26
27 DHORD5=iJO1366elec;
28 DHORD5= addReaction(DHORD5, 'MENAQUIELECTRICA', {'mql8[c]', 'NR_ox',
    'mqn8[c]', 'NR_red'}, [-1 -1 1 1], true);
29 DHORD5= addReaction(DHORD5, 'NR', {'NR_red', 'NR_ox'}, [-1 1], false);
30 DHORD5= changeObjective(DHORD5, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
31
32 BIOMASA=zeros(101,5);
33 for i=0:100;
34     NADH17pp=changeRxnBounds(NADH17pp, 'MENAQUIELECTRICA', i/100, 'b
        ');
35     NADH17pp=changeRxnBounds(NADH17pp, 'NR', i/100, 'b');
36     NADH17pp=changeRxnBounds(NADH17pp, 'NADH17pp', i/100, 'b');
37     FBA_NADH17pp=optimizeCbModel(NADH17pp, 'max');
38     BIOMASA(i+1,1)=FBA_NADH17pp.f;
39
40     NADH10=changeRxnBounds(NADH10, 'MENAQUIELECTRICA', i/100, 'b');
41     NADH10=changeRxnBounds(NADH10, 'NR', i/100, 'b');
42     NADH10=changeRxnBounds(NADH10, 'NADH10', i/100, 'b');
43     FBA_NADH10=optimizeCbModel(NADH10, 'max');
44     BIOMASA(i+1,2)=FBA_NADH10.f;
45
46     NADH=changeRxnBounds(NADH, 'NADH_DIRECTO', i/100, 'b');

```

```

47     NADH=changeRxnBounds(NADH, 'NR', i/100, 'b');
48     FBA_NADH=optimizeCbModel(NADH, 'max');
49     BIOMASA(i+1,3)=FBA_NADH.f;
50
51     FBA_N_A=optimizeCbModel(N_A, 'max');
52     BIOMASA(i+1,4)=FBA_N_A.f;
53
54     DHORD5=changeRxnBounds(DHORD5, 'MENAQUIELECTRICA', i/100, 'b');
55     DHORD5=changeRxnBounds(DHORD5, 'NR', i/100, 'b');
56     DHORD5=changeRxnBounds(DHORD5, 'DHORD5', i/100, 'b');
57     FBA_DHORD5=optimizeCbModel(DHORD5, 'max');
58     BIOMASA(i+1,5)=FBA_DHORD5.f;
59
60 end
61
62 %% Plot
63 X=0/0.0373:0.01/0.0373:1/0.0373; %pasar a mA gDW-1
64 plot(X,BIOMASA(:,1),X,BIOMASA(:,2),X,BIOMASA(:,3), '—',X,BIOMASA
    (:,4),X,BIOMASA(:,5))
65 vline(1.138, 'k: ')
66 legend('NADH17pp', 'NADH10', 'NADHdir', 'N/A', 'DHORD5')
67 xlabel('Flujo de Electrones (mA gDW-1)')
68 ylabel('Biomasa (h-1)')
69 xlim([0 6])
70 ylim([0.33 0.35])

```

7.1.4. Importancia DHORD5

```

1 load('iJO1366mejorado.mat')
2 iJO1366elec=iJO1366;
3 iJO1366elec=changeRxnBounds(iJO1366elec, 'EX_o2(e)', 0, 'b');
4 iJO1366elec=changeRxnBounds(iJO1366elec, 'EX_glc(e)', -27.26, 'b');
5 iJO1366elec=changeRxnBounds(iJO1366elec, 'ATPM', 37.24, 'b');
6 iJO1366elec=addMetabolite(iJO1366elec, 'NR_ox', 'Neutral Red
    oxidado');
7 iJO1366elec=addMetabolite(iJO1366elec, 'NR_red', 'Neutral Red
    reducido');
8
9 DHORD5=iJO1366elec;
10 DHORD5= addReaction(DHORD5, 'MENAQUIELECTRICA', {'mql8[c]', 'NR_ox',
    'mqn8[c]', 'NR_red'}, [-1 -1 1 1], true);
11 DHORD5= addReaction(DHORD5, 'NR', {'NR_red', 'NR_ox'}, [-1 1], false);
12 DHORD5= changeObjective(DHORD5, 'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
13

```

```

14 for i=0:24;
15     DHORD5=changeRxnBounds(DHORD5, 'MENAQUELECTRICA', i/100, 'b');
16     DHORD5=changeRxnBounds(DHORD5, 'NR', i/100, 'b');
17     DHORD5=changeRxnBounds(DHORD5, 'DHORD5', i/100, 'b');
18     FBA_DHORD5=optimizeCbModel(DHORD5, 'max');
19     DHORD5(:, i+1)=FBA_DHORD5.full(findRxnIDs(DHORD5, 'DHORD5'));
20     DHORDfum(:, i+1)=FBA_DHORD5.full(findRxnIDs(DHORD5, 'DHORDfum')
    );
21     FUM(:, i+1)=FBA_DHORD5.full(findRxnIDs(DHORD5, 'FUM'));
22     MDH(:, i+1)=FBA_DHORD5.full(findRxnIDs(DHORD5, 'MDH'));
23     PPC(:, i+1)=FBA_DHORD5.full(findRxnIDs(DHORD5, 'PPC'));
24     PYK(:, i+1)=FBA_DHORD5.full(findRxnIDs(DHORD5, 'PYK'));
25
26 end
27
28 %%
29
30 X=0:0.01/0.0373:0.24/0.0373;
31 subplot(2,3,1)
32 plot(X, DHORD55')
33 title('DHORD5')
34 xlim([0, 2.9491])
35
36 subplot(2,3,2)
37 plot(X, DHORDfum')
38 title('DHORDfum')
39 xlim([0, 2.9491])
40
41 subplot(2,3,3)
42 plot(X, FUM')
43 title('FUM')
44 xlim([0, 2.9491])
45
46 subplot(2,3,4)
47 plot(X, MDH')
48 title('MDH')
49 xlim([0, 2.9491])
50
51 subplot(2,3,5)
52 plot(X, PPC')
53 title('PPC')
54 xlim([0, 2.9491])
55
56 subplot(2,3,6)
57 plot(X, PYK')
58 title('PYK')

```

```

59 xlim([0,2.9491])
60 ylim([24.4,24.6])
61 suplabel('Flujo (mmoles gDW h-1)', 'y')
62 suplabel('Flujo de electrones (mA gDW-1)', 'x')

```

7.1.5. Markov Chain Monte Carlo

```

1  %%MCMC
2
3  %%MCMC WT
4  [Out_W1, ~] = gpSampler(WT_NADH17pp);
5  A=length(WT_NADH17pp.rxns);
6  W1=zeros(A,1);
7  for i=1:A
8      gauss=fitdist(Out_W1.points(i,:), 'normal');
9      W1(i,1)=gauss.mu;
10 end
11
12 [Out_W2, ~] = gpSampler(WT_DHORD5);
13 A=length(WT_DHORD5.rxns);
14 W2=zeros(A,1);
15 for i=1:A
16     gauss=fitdist(Out_W2.points(i,:), 'normal');
17     W2(i,1)=gauss.mu;
18 end
19
20 %%MCMC NADG6
21 [Out_N1, ~] = gpSampler(NADG6);
22 A=length(NADG6.rxns);
23 N1=zeros(A,1);
24 for i=1:A
25     gauss=fitdist(Out_N1.points(i,:), 'normal');
26     N1(i,1)=gauss.mu;
27 end
28
29 %%MCMC PGI
30 [Out_P1, ~] = gpSampler(PGI);
31 A=length(PGI.rxns);
32 P1=zeros(A,1);
33 for i=1:A
34     gauss=fitdist(Out_P1.points(i,:), 'normal');
35     P1(i,1)=gauss.mu;
36 end
37
38 %%MCMC DM
39 [Out_D1, ~] = gpSampler(DM);

```

```

40 A=length(DM.rxnns);
41 D1=zeros(A,1);
42 for i=1:A
43     gauss=fitdist(Out_D1.points(i,:), 'normal');
44     D1(i,1)=gauss.mu;
45 end
46
47 load('N')
48 MCMC_flujos=zeros(94,5);
49
50 for j=1:94
51     MCMC_flujos(j,1)=W1(N(j),1);
52     MCMC_flujos(j,2)=W2(N(j),1);
53     MCMC_flujos(j,3)=N1(N(j),1);
54     MCMC_flujos(j,4)=P1(N(j),1);
55     MCMC_flujos(j,5)=D1(N(j),1);
56 end
57
58 MCMC_Porcentaje=zeros(94,5);
59 MCMC_Porcentaje(:,1)=MCMC_flujos(:,1)/(-1*GlcWT)*100;
60 MCMC_Porcentaje(:,2)=MCMC_flujos(:,2)/(-1*GlcWT)*100;
61 MCMC_Porcentaje(:,3)=MCMC_flujos(:,3)/(-1*GlcNADG6)*100;
62 MCMC_Porcentaje(:,4)=MCMC_flujos(:,4)/(-1*GlcPGI)*100;
63 MCMC_Porcentaje(:,5)=MCMC_flujos(:,5)/(-1*GlcDM)*100;

```

7.1.6. Producción NADH NADPH

```

1  MetsW1=Mets(WT_NADH17pp,W1);
2  MetsW2=Mets(WT_DHORD5,W2);
3  MetsN1=Mets(NADG6,N1);
4  MetsP1=Mets(PGI,P1);
5  MetsD1=Mets(DM,D1);
6
7  f=findMetIDs(WT, 'nadh[c]');
8  u=findMetIDs(WT, 'nadph[c]');
9
10 ProdnADH=[MetsW1(f),MetsW2(f),MetsN1(f),MetsP1(f),MetsD1(f)];
11 ProdnADPH=[MetsW1(u),MetsW2(u),MetsN1(u),MetsP1(u),MetsD1(u)];
12 g=findRxnIDs(WT, 'HPYRRx');
13 ProdnADH=ProdnADH-[W1(g),W2(g),N1(g),P1(g),D1(g)];
14 ProdnADH2=ProdnADH./[uWT,uWT,uNADG6,uPGI,uDM];
15 ProdnADPH2=ProdnADPH./[uWT,uWT,uNADG6,uPGI,uDM];

```

7.1.7. Función Opt_ATPM y Mets

```
1 function [cepa_optimizada] = Opt_ATPM(cepa)
2 cepa=changeObjective(cepa, 'ATPM');
3 cepa=changeRxnBounds(cepa, 'ATPM', 0, 'l');
4 cepa=changeRxnBounds(cepa, 'ATPM', 100, 'u');
5 FBA=optimizeCbModel(cepa, 'max');
6 cepa_optimizada=changeRxnBounds(cepa, 'ATPM', FBA.f, 'b');
7 end

1 function Production = Mets(modelo, dist)
2 for i = 1:length(modelo.mets);
3     B = 0;
4     for j = 1:length(modelo.rxns);
5         A = abs(dist(j)*modelo.S(i,j));
6         B = B + A;
7     end;
8     B = 0.5*B;
9     Production(i) = B;
10 end;
```