

# Tabla de Contenido

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

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

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

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