

UCH-FC
Biotecnología
A 729
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



**“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 Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Erick Antonio Armingol González

Director del Seminario de Título:

Dr. Ricardo Mauricio Cabrera Paucar

Junio 2015

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Erick Antonio Armingol González**

“Análisis de Balance de Flujos del crecimiento en acetato de *Escherichia coli*: Efecto del cambio de especificidad por el cofactor de la Isocitrato Deshidrogenasa”

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

Director Seminario de Título:

Dr. Ricardo Cabrera Paucar



Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

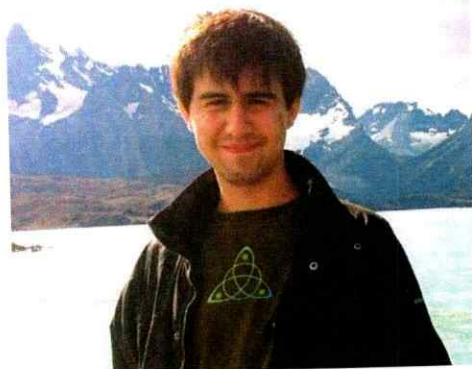
Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Evaluador:

Dra. Irene Martínez Basterrechea

Santiago de Chile, junio de 2015

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Erick Antonio Armingol González, nací en Santiago el 10 de julio de 1990, curiosamente el mismo día que Nikola Tesla. Se cree que mi primer apellido es de origen vikingo-catalán y que surgió de la fusión de Ermin y Gaut, nombres que representan al dios Odín y su caballo de ocho patas.

Comencé mis estudios en pre-kínder en el Colegio Grenoble, donde estuve hasta terminar primero básico. Luego, estudié hasta sexto básico en la Escuela Básica Salvador Sanfuentes. Finalmente ingresé en el año 2003 al Instituto Nacional, donde estuve desde séptimo básico hasta finalizar la enseñanza media.

Desde pequeño que me ha gustado la computación y las matemáticas. Mi gusto por la biología lo adquirí durante la educación media. Desde primero medio supe que debía estudiar algo que mezclara los tres temas, por lo que después de buscar posibles carreras para estudiar, concluí que lo mío sería la Biotecnología. Así, luego de dar la Prueba de Selección Universitaria (PSU) en el año 2008, en el 2009 ingresé a la Universidad de Chile a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular.

El año 2013 egresé de la carrera, obteniendo la licenciatura que lleva su mismo nombre. También ese año comencé este trabajo, el cual desarrollé bajo la tutoría del Dr. Ricardo Cabrera en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, en la Universidad de Chile.

Durante muchos años que uno de mis hobbies han sido los juegos online, como el Unreal Tournament, Ragnarok Online, World of Warcraft y actualmente el League of Legends. También disfruto de *hacer nada* en mis tiempos libres, estar con mi familia, la Cony (mi polola) y mis amigos... y cuando se puede, de la naturaleza.

A mis abuelos Humberto y Ema,
*que donde sea que estén en estos momentos,
sé que estarían muy orgullosos de este logro.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis padres y a mi hermana, ya que sin ellos ni el apoyo que siempre me han dado no podría haber logrado esto. Agradezco el esfuerzo de mis padres para que nunca nos falte nada a mi hermana y a mí. Gracias a toda mi familia, los que siempre han confiado en mí.

También quiero agradecer a la gente del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. En especial darle gracias al Dr. Ricardo Cabrera, quien confió en mí y me dio el apoyo para sacar adelante este trabajo. Gracias a Rodrigo Muñoz (*a.k.a.* Daddy), Luis Matsuda y Yessenia Aguillar por el apoyo técnico, la paciencia y la buena onda durante el desarrollo de esta tesis. De la misma forma a Ignacio Brescia, Ricardo Doberti, Matías Fuentealba, Pablo Maturana, Eduardo Tobar y al niño Juan Carlitos, por los buenos momentos, conversaciones y discusiones que se daban de vez en cuando. También agradecer a los chicos del grupo de la profe Vicky y el profe Babul.

Sin duda uno de los apoyos más importantes que he recibido en los últimos años ha sido el de mi polola, Constanza Torres, quien ha estado ante cualquier circunstancia para escucharme, aconsejarme y apoyarme. Le agradezco todo lo que hemos vivido y también lo que viviremos.

Quiero dar las gracias a mis amigos más cercanos, con quienes conversamos de cualquier tema y con los que he contado en las buenas y en las malas, en especial a Francisco Osorio e Ignacio Ávalos. También gracias a los miembros de BioBronce V, por todos los *fails* y risas que han salido de nuestras aventuras en división madera.

Finalmente, agradecer el financiamiento del Proyecto FONDECYT 1121170.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Rol de NADH y NADPH	2
1.2. Transferencia de equivalentes de reducción entre NAD(H) y NADP(H)	4
1.3. Crecimiento de <i>E. coli</i> en Acetato como única fuente de carbono.....	5
1.4. Cambios de Especificidad de las Deshidrogenasas.....	9
1.5. Análisis de Balance de Flujos para predecir las distribuciones de flujos metabólicos	11
1.6. Hipótesis	13
1.7. Objetivo General.....	13
1.8. Objetivos Específicos	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. Materiales Utilizados	14
2.1.1. Cepas bacterianas	14
2.1.2. Reactivos	14
2.1.3. Medios de cultivo	15
2.1.4. Plásmidos	16
2.1.5. Partidores	16
2.2. Metodologías de Biología Molecular.....	17
2.2.1. Extracción de DNA.....	17
2.2.2. Amplificación de DNA mediante PCR	17
2.2.3. Verificación del tamaño de DNA mediante electroforesis en gel	18
2.2.4. Secuenciación y análisis de secuencias	18
2.2.5. Preparación de células electrocompetentes y transformación.....	19
2.3. Metodologías para la Generación de Cepas.....	20
2.3.1. Recombinación homóloga en un paso con producto de PCR	20
2.3.2. Transferencia de las modificaciones mediante retrocruce o <i>backcross</i>	21

2.3.3. Remoción del gen de resistencia a kanamicina	22
2.4. Metodologías para la Caracterización Fisiológica de las Cepas.....	22
2.4.1. Condiciones de cultivo, monitoreo de las curvas de crecimiento y obtención de muestras.....	23
2.4.2. Determinación de la concentración de acetato en el medio de cultivo mediante HPLC.....	24
2.4.3. Determinación del consumo de acetato	25
2.5. Metodologías para el Análisis de Balance de Flujos	27
2.5.1. Generación de modelos de cepas.....	29
2.5.2. Cálculo del ATP de mantención.....	30
2.5.3. Análisis de sensibilidad.....	31
2.5.4. Obtención de las distribuciones de flujos metabólicos	31
2.5.5. Cálculo de la tasa de producción de metabolitos	35
2.5.6. Comparación <i>High-Throughput: Flux-Array</i>	35
2.6. Metodologías para el Análisis Estadístico	38
3. RESULTADOS.....	39
3.1. Generación de Cepas.....	39
3.2. Caracterización Fisiológica de las Cepas.....	41
3.2.1. Tasa de crecimiento.....	41
3.2.2. Rendimiento y tasa de consumo de acetato	43
3.3. Análisis de Balance de Flujos	47
3.3.1. ATP de mantención	47
3.3.2. Análisis de sensibilidad de la tasa de crecimiento y del rendimiento	48
3.3.3. Distribuciones de flujos metabólicos	54
3.3.4. Tasa de producción de metabolitos	57
3.3.5. Análisis <i>Flux-Array</i>	61
4. DISCUSIÓN.....	65
4.1. La presencia de una ICDH NAD-dependiente tiene un impacto negativo sobre la fisiología de <i>E. coli</i> durante su crecimiento en acetato.....	66
4.2. El cambio de especificidad de la ICDH genera un aumento del gasto energético destinado a la mantención celular	68

4.3. Durante el crecimiento en acetato, la vía del glioxilato no sólo evita la pérdida de CO ₂ en favor de la biosíntesis, sino que también afecta el balance de NADPH	70
4.4. El cambio de especificidad de la ICDH provoca cambios de distribución de flujos que impactan el balance redox y la disponibilidad de intermediarios para la biosíntesis	73
4.5. El aumento de producción de NADH debido al cambio de especificad de la ICDH puede ser utilizada con fines electrogénicos	78
5. CONCLUSIONES	80
6. BIBLIOGRAFÍA	81
7. ANEXOS	86
7.1. Diferencias entre gen <i>icd</i> silvestre y el gen <i>icd</i> ^{NAD}	86
7.2. Códigos de Programación para los modelamientos metabólicos	87
7.2.1. Generación de modelos	87
7.2.2. Incorporar parámetros experimentales	87
7.2.3. Calcular ATP de mantención (ATPM)	88
7.2.4. Análisis de robustez del crecimiento respecto al consumo de acetato	89
7.2.5. Phenotype Phase Plane: Rendimiento respecto al flujo de producción de isocitrato y a la partición hacia la vía del glioxilato	90
7.2.6. Calcular distribución de flujos	91
7.2.7. Calcular producción de metabolitos	91
7.2.8. Análisis de robustez del flujo de UdhA respecto a la partición de isocitrato	92
7.2.9. Funciones utilizadas en los comandos anteriores	93
7.3. Material Suplementario del análisis <i>Flux-Array</i>	95
7.3.1. Abreviaciones de los nombres de cada columna	95
7.3.2. Principales cambios entre cepas: <i>icd</i> ^{NAD} versus <i>icd</i> ^{NADP}	96
7.3.3. Principales cambios entre cepas: <i>icd</i> ^{NAD} Δ <i>pntAB</i> versus <i>icd</i> ^{NADP} Δ <i>pntAB</i>	97
7.4. Expresión de genes en <i>E coli</i> durante el crecimiento en acetato	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros fisiológicos de cepas <i>wild type</i> de <i>E. coli</i> durante el crecimiento en medio mínimo suplementado con acetato como única fuente de carbono	7
Tabla 2. Cepas utilizadas y sus características relevantes	14
Tabla 3. Reactivos utilizados durante el seminario de título	14
Tabla 4. Plásmidos ocupados en este estudio.....	16
Tabla 5. Partidores utilizados para la modificación y secuenciación de las cepas	16
Tabla 6. Parámetros fisiológicos de las cepas de <i>E. coli</i> estudiadas, durante el crecimiento en acetato como única fuente de carbono	46
Tabla 7. Partición de flujos a partir de la bifurcación de isocitrato.....	57
Tabla 8. Resumen de tasas de producción de distintos metabolitos para cada cepa ..	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cofactores orgánicos más utilizados en el metabolismo de <i>Escherichia coli</i> ..	1
Figura 2. Producción de NAD(P)H en las vías centrales de <i>E. coli</i>	3
Figura 3. Relación de los principales cofactores orgánicos con las vías catabólicas y anabólicas en el metabolismo heterotrófico	4
Figura 4. Distribuciones de flujos metabólicos de cepas <i>wild type</i> de <i>E. coli</i> creciendo en acetato.....	8
Figura 5. Recombinación homóloga de los productos de PCR.....	21
Figura 6. Esquema resumen de las etapas de análisis <i>in silico</i>	29
Figura 7. Método para el cálculo de las distribuciones de flujos	32
Figura 8. Representación de <i>loops</i> en una distribución de flujos metabólicos	33
Figura 9. Asignación de color a cada reacción del modelo para representarla en <i>Flux-Array</i>	37
Figura 10. Verificación de la construcción de las cepas mediante PCR-colonia	40
Figura 11. Verificación de la construcción de las cepas mediante secuenciación	40
Figura 12. Curvas de crecimiento de las cepas.....	42
Figura 13. Determinación del factor de conversión de absorbancia a peso seco	43
Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de acetato.....	44
Figura 15. Determinación del rendimiento de producción de biomasa por acetato consumido	45
Figura 16. Dependencia de la tasa de crecimiento y del rendimiento con la velocidad de consumo de acetato	48
Figura 17. Rendimiento de biomasa de las cepas caracterizadas en función del flujo de formación de isocitrato y partición hacia la vía del glioxilato	50
Figura 18. Efecto de la partición de flujo hacia la vía del glioxilato sobre la sobreproducción de NADPH.....	52
Figura 19. Distribución de flujos metabólicos simulada para cada cepa.....	56
Figura 20. Contribución de diferentes puntos de producción de NADPH y NADH.....	60
Figura 21. Análisis <i>Flux-Array</i> para detectar los cambios de distribución entre cepas con <i>icd^{NAD}</i> y con <i>icd^{NADP}</i>	63
Figura 22. Producción neta de NADPH en <i>E. coli</i> cultivada en distintas fuentes de carbono	72
Figura 23. Efectos del cambio de especificidad por el cofactor de la ICDH de <i>E. coli</i> durante el crecimiento en acetato	77
Figura 24. Esquema de una Celda de Combustible Microbiana	79

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Tasa específica de crecimiento o Tasa de crecimiento
1,3DPG	1,3-bifosfoglicerato
6PG	6-fosfogluconato
A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
AcCoA	Acetil coenzima A
ADP	Adenosín difosfato
AKG	α -cetogluturato
AKGDH	α -cetogluturato deshidrogenasa
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
ATPM	ATP destinado a mantención celular (no asociado a crecimiento)
CIT	Citrato
$\Delta pntAB$	Delección del operón de genes <i>pntA</i> y <i>pntAB</i> que codifican la transhidrogenasa PntAB
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E4P	Eritrosa-4-fosfato
EM (NADP)	Enzima Mállica NADP-dependiente
ES	Espacio de solución
F6P	Fructosa-6-fosfato
FBA	Análisis de Balance de Flujos (del inglés. <i>Flux Balance Analysis</i>)
FUM	Fumarato
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GLIOXI	Glioxilato
GND	6-fosfogluconato deshidrogenasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (del inglés, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
<i>icd</i>	Gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
<i>icd</i> ^{NAD}	Gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa NAD-dependiente
<i>icd</i> ^{NADP}	Gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente
ICIT	Isocitrato
ICL	Isocitrato liasa
L.A.P.	Límite de Aumento de Proporción
LB	Caldo de lisogenia (del inglés, <i>Lysogeny Broth</i>)

L.D.P.	Límite de Disminución de Proporción
MaeB	Enzima málica NADP-dependiente
MAL	Malato
MDH	Malato deshidrogenasa
MFA	Análisis de Flujos Metabólicos (del inglés, <i>Metabolic Flux Analysis</i>)
MFC	Celda de Combustible Microbiana (del inglés, <i>Microbial Fuel Cell</i>)
MTHFD	Metilenotetrahidrofolato deshidrogenasa
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
OAA	Oxalacetato
OD	Densidad Óptica
OD _{600nm}	Densidad Óptica a 600 nm
OXO	2-Oxoglutarato
PCK	PEP-carboxiquinasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEP	Fosfoenolpiruvato
P.F.	Proporción de Flujo
PGCD	Fosfoglicerato deshidrogenasa
PIR	Piruvato
<i>pntAB</i>	Operón de genes <i>pntA</i> y <i>pntAB</i> que codifican la transhidrogenasa PntAB
PntAB	Transhidrogenasa de membrana
PPP	Plano de Fase del Fenotipo (del inglés, <i>Phenotype Phase Plane</i>)
Q _{ac}	Tasa de Consumo de Acetato
R5P	Ribosa-5-fosfato
RL5P	Ribulosa-5-fosfato
S7P	Sedoheptulosa-7-fosfato
SUC	Succinato
SUC-CoA	Succinil coenzima A
UdhA	Transhidrogenasa soluble
WT	Silvestre (del inglés, <i>wild type</i>)
X5P	Xilulosa-5-fosfato
Y _{xs}	Rendimiento de biomasa por sustrato

RESUMEN

En el metabolismo heterotrófico, NADH y NADPH se producen a partir de la oxidación de intermediarios por las deshidrogenasas presentes en las vías centrales. Durante el crecimiento de *Escherichia coli* en acetato como única fuente de carbono, la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) contribuye con más de un 80% de la producción total de NADPH. Las ICDHs se pueden clasificar de acuerdo a su especificidad: Aquellas que utilizan NADP para oxidar isocitrato (como la de *E. coli*) y las NAD-dependientes. Previamente se ha estudiado el efecto de reemplazar la ICDH endógena por una forma NAD-dependiente en *E. coli* (cepa *icd^{NAD}*). En dicho estudio se postuló que la utilización de NADPH por la ICDH de *E. coli* fue una consecuencia evolutiva que mejoró el crecimiento en acetato. Sin embargo, no se han investigado los cambios en la distribución de flujos metabólicos asociados a la especificidad de la ICDH.

En este trabajo, evaluamos la hipótesis de que las redistribuciones de flujo que acompañan la pérdida de producción de NADPH en ICDH de *E. coli*, debido al cambio de especificidad del cofactor, responden al restablecimiento del balance de producción de NADPH y de intermediarios para la biosíntesis durante el crecimiento en acetato. Estudiamos mediante herramientas de modelamiento la distribución de flujos metabólicos de cepas de *E. coli* que poseen el reemplazo de la isocitrato deshidrogenasa por una forma NAD-dependiente en presencia y ausencia del gen de la transhidrogenasa PntAB, la que mantiene el balance redox ante una caída en la producción de NADPH, en cultivos con acetato como única fuente de carbono. Para esto se generaron las cepas mutantes a partir de la cepa K-12 MG1655 de *E. coli* (cepa *wild type*), mediante el método de Datsenko-Wanner y un posterior retrocruce. Las distribuciones de flujos se obtuvieron

in silico a partir del Análisis de Balance de Flujos (FBA) de las cepas *wild type*, $\Delta pntAB$, icd^{NAD} e $icd^{NAD} \Delta pntAB$. Utilizando COBRA, integramos el modelo metabólico iJO1366 de *E. coli* con las tasas de crecimiento y de consumo de acetato obtenidas experimentalmente durante la fase exponencial de crecimiento en cultivos *batch*. El paso de optimización de FBA consistió en maximizar el ATP de mantención y luego minimizar el flujo neto de la red. Con nuestros resultados pudimos comprender el potencial de adaptación a escala genómica de *E. coli* frente al cambio de especificidad de la ICDH, enfocándonos particularmente en los puntos de producción de NAD(P)H. Observamos que los parámetros fisiológicos se vieron afectados principalmente debido al cambio de especificidad de la ICDH. Las simulaciones predijeron la activación de la enzima málica, la gluconeogénesis, la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato y también que la partición de flujos en la bifurcación del isocitrato varía para coordinar la producción de NADPH con la biosíntesis. Finalmente, en vista de que la modificación de la ICDH generó una disminución en la producción de NADPH y un aumento en la de NADH, discutimos como proyección biotecnológica la utilización de las cepas icd^{NAD} para la generación de electricidad empleando microorganismos.

ABSTRACT

In the heterotrophic metabolism, NADH and NADPH are produced from the oxidation of intermediates by dehydrogenases present in central pathways. During the growth of *Escherichia coli* on acetate as the sole carbon source, isocitrate dehydrogenase (ICDH) contributes over 80% of the total NADPH production. ICDHs can be classified according to their specificity: those using NADP to oxidize isocitrate (such as the ICDH of *E. coli*) and the NAD-dependent ICDHs. The effect of the replacement of the endogenous ICDH by a NAD-dependent form over the growth rate in *E. coli* (*icd^{NAD}* strain), has been previously studied. It was postulated that the use of NADP by *E. coli* ICDH was a consequence of an evolutionary event that improved the growth on acetate. However, changes in the metabolic flux distribution associated to the specificity of ICDH have remained unassessed.

In this work, we have evaluated the hypothesis that in *E. coli*, the redistribution of fluxes resulting from the loss of NADPH production by ICDH, due to the change in its cofactor specificity, responds to re-establish the balance of NADPH production and to replenish the intermediates of biosynthesis during the growth on acetate. We used modeling tools to study the distribution of metabolic fluxes in *E. coli* strains possessing a NAD-dependent form of ICDH in the presence and absence of the transhydrogenase PntAB, which maintains the redox balance in response to a fall in the NADPH production, grown in acetate as the sole carbon source. For this, the Datsenko-Wanner method and subsequent backcross procedure were used to generate the mutant strains from *E. coli* K-12 MG1655 (*wild type*). Metabolic flux distributions were obtained *in silico* by Flux Balance Analysis (FBA) for the *wild type*, Δ *pntAB*, *icd^{NAD}* and *icd^{NAD} ΔpntAB* strains. By

using COBRA, we integrated the model iJO1366 of *E. coli* with the growth and the acetate consumption rates, experimentally obtained at the exponential phase of growth in batch cultures. FBA was used to maximize the maintenance ATP and then minimize the net flux of the network. Our results showed the adaptive potential at the genome-scale of *E. coli* upon the swapping the ICDH cofactor specificity, particularly focussing on the NAD(P)H production points. We observed that the physiological parameters were mainly affected by the ICDH specificity. The simulations predicted the activation of the malic enzyme, gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway, as well as the changes of partition fluxes at the isocitrate bifurcation, in order to coordinate the production of NADPH with biosynthesis. Finally, given that the modification of ICDH caused both, a decrease in the NADPH and an increment in the NADH production rates, employing these strains in order to generate electricity is discussed as a biotechnological projection.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos heterótrofos poseen diferentes vías metabólicas que les permiten oxidar la fuente de carbono. Dichas rutas cumplen principalmente dos funciones: (1) generar los precursores para la biosíntesis o anabolismo, y (2) proveer la energía (como el ATP, el NADPH y la fuerza protón-motriz) que se necesita para el consumo de nutrientes y la biosíntesis (Holms, 1986).

En el caso de *Escherichia coli*, el metabolismo anabólico se encuentra constituido por casi 1000 reacciones, pero el núcleo de esta red lo componen sólo 11 intermediarios de las vías centrales y los cofactores ATP, NADH y NADPH (Sauer y col., 2004). Los dinucleótidos de nicotinamida y adenina (NAD y NADP) actúan como transportadores de electrones en varios puntos de la red, participando en más de cien reacciones como se muestra en la Figura 1 (Orth y col., 2011).

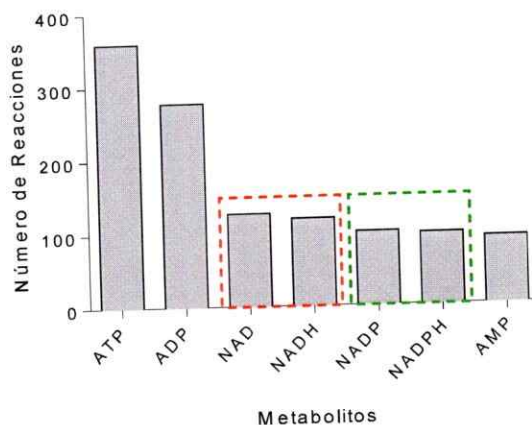


Figura 1. Cofactores orgánicos más utilizados en el metabolismo de *Escherichia coli*
Las barras indican el número de reacciones en las que participan. Los recuadros de líneas segmentadas de color rojo y verde encierran las barras de NAD(H) y NADP(H), respectivamente. Las reacciones fueron contadas en el modelo metabólico iJO1366 de *E. coli* (Orth y col., 2011).

1.1. Rol de NADH y NADPH

En la red de *E. coli*, la generación de NADH y NADPH ocurre en diferentes vías del metabolismo central, debido a las especificidades o preferencias que presentan las deshidrogenasas por estos cofactores (Olavarría y col., 2014), como se muestra en la Figura 2.

A pesar que NADH y NADPH son moléculas muy similares y poseen el mismo potencial estándar de óxido-reducción, éstas cumplen funciones diferentes (Carugo & Argos, 1997). La primera está relacionada con la generación de energía al transferir equivalentes de reducción a la cadena transportadora de electrones para la producción de ATP y también con procesos de fermentación. Mientras que NADPH participa en las reacciones de biosíntesis y en la defensa antioxidante, lo que lo hace un cofactor que vincula el catabolismo con el anabolismo (Fuhrer & Sauer, 2009). Dichas funciones son posibles porque el equilibrio químico de estos cofactores se encuentra desplazado a la oxidación o a la reducción. La célula mantiene casi todo el NAD(H) en estado oxidado y la mayor parte de NADP(H) en su forma reducida (Reich & Sel'kov, 1981), permitiendo que NAD acepte electrones desde las vías catabólicas y NADPH done electrones a las anabólicas (Figura 3).

Así, debido a la función metabólica en que estos cofactores se encuentran implicados, los electrones provenientes de NADH pueden salir del sistema (a través del aceptor final en la respiración, o de los metabolitos de fermentación), mientras que en el caso de NADPH, los electrones permanecen en la célula, formando parte de la biomasa (aminoácidos, nucleótidos, etc.).

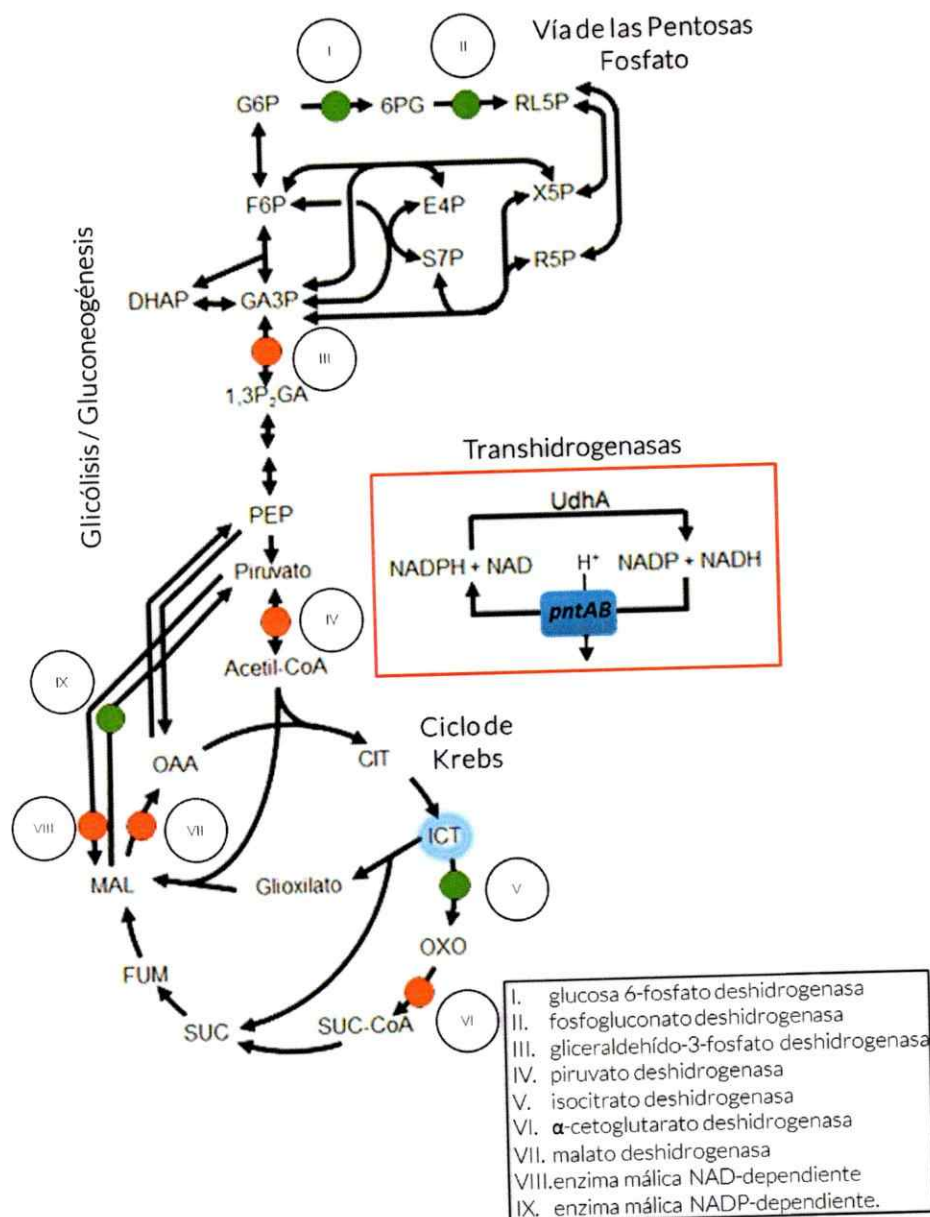


Figura 2. Producción de NAD(P)H en las vías centrales de *E. coli*

Se muestran las vías centrales de *E. coli* y los distintos puntos de reducción de NAD(P) a NAD(P)H. Los metabolitos representados se detallan en la Lista de Abreviatura. Las flechas corresponden a las reacciones enzimáticas, los círculos verdes muestran las deshidrogenasas NADP-dependientes y los rojos a las NAD-dependientes. Los círculos blancos numerados destacan las nueve deshidrogenasas que reducen a estos cofactores, y sus nombres se detallan en la leyenda. En el recuadro rojo se muestran las transhidrogenasas de membrana (PntAB) y la soluble (UdhA), que interconvierten estos cofactores. Por último, en azul se destaca el isocitrato como un punto de bifurcación entre la vía del glioxilato y la isocitrato deshidrogenasa.

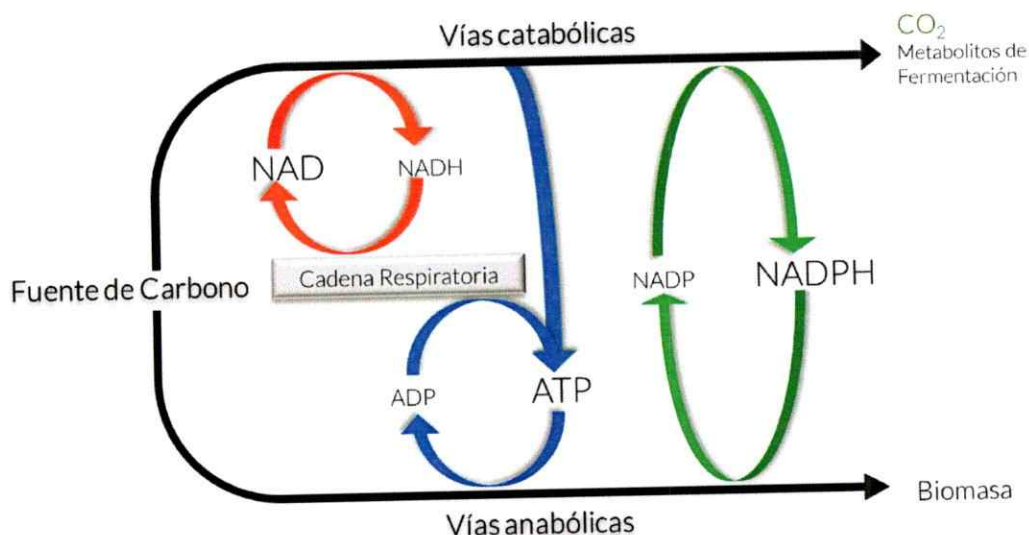


Figura 3. Relación de los principales cofactores orgánicos con las vías catabólicas y anabólicas en el metabolismo heterotrófico

Los átomos de carbono pueden fluir a través de vías catabólicas para la producción de energía y poder reductor, o a través del anabolismo para la generación de precursores de la biosíntesis. NAD(H) participa exclusivamente en las primeras, relacionándose con el anabolismo a través de la cadena respiratoria. Mientras que la energía liberada por la hidrólisis del ATP hace posible el anabolismo, formándose desde la cadena respiratoria y/o el catabolismo (fosforilación a nivel de sustrato). Finalmente, NADP(H) es el cofactor redox que relaciona de manera directa la transferencia de electrones desde el catabolismo al anabolismo. Para cada cofactor el tamaño de letra se relaciona con su concentración intracelular. Imagen modificada de la figura original de la tesis de Canonaco (2003).

1.2. Transferencia de equivalentes de reducción entre NAD(H) y NADP(H)

Puesto que NADPH se encuentra acoplado a la tasa de crecimiento o de generación de biomasa y existen muy pocas reacciones distintas a las vinculadas con la biosíntesis para reoxidarlo; en organismos como *Saccharomyces cerevisiae* los flujos de producción se encuentran balanceados con los requerimientos de NADPH para el anabolismo (Haverkorn, 2012). Sin embargo, en *E. coli* y muchas otras bacterias se da el caso en que la producción de NADPH se encuentra por debajo o por sobre el consumo anabólico. *E. coli* es capaz de contrarrestar esta situación mediante dos isoformas de

transhidrogenasa: la de membrana (PntAB) y la soluble (UdhA), mostradas en la Figura 2. La primera cataliza la transferencia de hidruros desde NADH a NADP, de manera acoplada a la fuerza protón motriz, para poder ir en contra del equilibrio químico ya desplazado hacia NAD y NADPH. Mientras que a partir de estos últimos, la segunda transhidrogenasa cataliza la reacción a favor del equilibrio (Fuhrer & Sauer, 2009). De esta forma, cuando sea necesario, PntAB completa el requerimiento anabólico mediante la producción de NADPH, mientras que en los casos de sobreproducción de este cofactor, UdhA es capaz de contrarrestar esta situación consumiéndolo.

Interesantemente, se ha visto que ambas transhidrogenasas son reguladas de manera opuesta. Por ejemplo, como respuesta al nivel de leucina, el factor Lrp activa la transcripción de *pntAB* y reprime la de *udhA*. Bajo la misma lógica actúa Crp, activando a *udhA*, pero reprimiendo a *pntAB* (Haverkorn, 2012). Así, la acción de estas transhidrogenasas estaría segregada según el contexto metabólico, estando una activa y la otra reprimida ante determinadas condiciones de crecimiento.

1.3. Crecimiento de *E. coli* en Acetato como única fuente de carbono

A diferencia de la glucosa, el acetato es una fuente de carbono que se encuentra más oxidada. Por esto, el rendimiento de generación de biomasa por energía liberada por esta fuente de carbono es menor que en la primera (Tempest & Neijssel, 1987). Una vez que el acetato ingresa a la célula, es transformado a acetil-CoA. Dicho metabolito puede ser oxidado completamente en el ciclo de Krebs, liberando dos moléculas de CO₂ por acción de la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (AKGDH). La primera oxida el isocitrato en 2-oxoglutarato (también conocido como α -cetoglutarato), y la segunda convierte este último en succinil-CoA. En

ambos casos se genera poder reductor, en forma de NADPH y NADH, respectivamente (Figura 2).

Existen evidencias de que aquellos organismos capaces de crecer en acetato comparten como característica la presencia de la vía del glioxilato, que actúa como *bypass* evitando la pérdida de moléculas de carbono a través de la oxidación descarboxilativa del ciclo de Krebs y de esta forma reponer intermediarios necesarios para la biosíntesis (Nunn, 1987). Por esto, se ha visto que este *bypass* es imprescindible para que los organismos sean capaces de crecer en acetato (Kornberg, 1966). También se ha observado que los organismos que poseen la vía del glioxilato siempre poseen una isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente, mientras que los con una ICDH específica por NAD no poseen esta vía (Zhu y col., 2005). Esto último también relaciona la especificidad de esta enzima con las capacidades de crecimiento en esta fuente de carbono.

Al igual que el resto de los organismos que pueden crecer en acetato, en *E. coli* la regulación de la bifurcación desde isocitrato cumple un rol fundamental durante el crecimiento en esta fuente de carbono. El operón *ace* contiene los genes de las enzimas presentes en la vía del glioxilato y un regulador de la isocitrato deshidrogenasa, que regula la partición de flujo a través del *bypass* y del ciclo de Krebs (LaPorte y col., 1985).

Como se muestra en la Tabla 1, existen diversos estudios en los que caracterizaron fisiológicamente la cepa *wild type* (WT) de *E. coli* durante el crecimiento en acetato. Para comprender las capacidades metabólicas de esta bacteria durante el crecimiento en dicha fuente de carbono (Raman & Chandra, 2009), algunos autores han empleado métodos de Análisis de Flujos Metabólicos (MFA, del inglés *Metabolic Flux*

Analysis) para determinar distribuciones de flujos (Figura 4), enfocándose principalmente en la bifurcación del isocitrato. Esta herramienta utiliza la información experimental del marcado isotópico y el análisis matemático. En los últimos años ha mostrado ser bastante precisa en la determinación de flujos intracelulares (Crown & Antoniewicz, 2013). Sin embargo, el número de reacciones que se pueden analizar es bajo (entre 20 y 30, las que generalmente corresponden a las vías centrales) en comparación con el total presente en la red metabólica (2583 para *E. coli*).

Tabla 1. Parámetros fisiológicos de cepas *wild type* de *E. coli* durante el crecimiento en medio mínimo suplementado con acetato como única fuente de carbono

Cepa	μ	Q_{ac}	$Y_{X/S}$	Medio de cultivo	Tipo	Referencia
<i>E. coli</i> WT BW25113	0.20	11.46	0.017	M9 + Acetato 4 g/L	Continuo	Zhao y col. (2004)
<i>E. coli</i> WT BW25113	0.29	12.58	0.023	M9 + Acetato 5 g/L	Batch	Haverkorn (2012)
<i>E. coli</i> WT K-12	0.22	14.43	0.015	M9 + Acetato de Sodio 2 g/L	Continuo	Zhao & Shimizu (2003)
<i>E. coli</i> WT K-12	0.11	7.18	0.015	M9 + Acetato de Sodio 2 g/L	Continuo	Zhao & Shimizu (2003)
<i>E. coli</i> WT K-12	0.22	n.d.	n.d.	M9 + Acetato de Sodio 3 g/L	Batch	Thakur y col. (2010)
<i>E. coli</i> WT K-12	0.29	16.31	0.018	MOPS + Acetato 5.9 g/L	Batch	Walsh & Koshland Jr. (1984, 1985)
<i>E. coli</i> WT MC4100	0.33	n.d.	n.d.	M9 + Acetato 2.5 g/L	Batch	Oh y col. (2002)
<i>E. coli</i> WT MG1655	0.31	15.5	0.020	M9 + Acetato 4 g/L	Batch	Edwards y col. (2001)
<i>E. coli</i> WT MG1655	0.20	n.d.	n.d.	M9 + Acetato 5 g/L	Batch	Sauer y col. (2004)
<i>E. coli</i> WT MG1655	0.21	n.d.	n.d.	MOPS + Acetato 0.33 g/L	Batch	Liu y col. (2005)
<i>E. coli</i> WT MG1655	0.10	6.92	0.014	MOPS + Acetato 6.7 g/L	Continuo	Taymaz-Nikerel y col. (2010)
<i>E. coli</i> WT MG1655	0.35	n.d.	n.d.	MOPS + Acetato 20 g/L	Batch	Wang y col. (2011)
<i>E. coli</i> WT ML308	0.43	20.16	0.021	LMR + Acetato 1.77 g/L	Batch	Holms (1986)

μ : Tasa específica de crecimiento (h^{-1})

Q_{ac} : Tasa de consumo de acetato ($mmol \cdot gDW^{-1} \cdot h^{-1}$)

$Y_{X/S}$: Rendimiento de biomasa (gDW por mmol de acetato)

n.d.: Parámetro no determinado

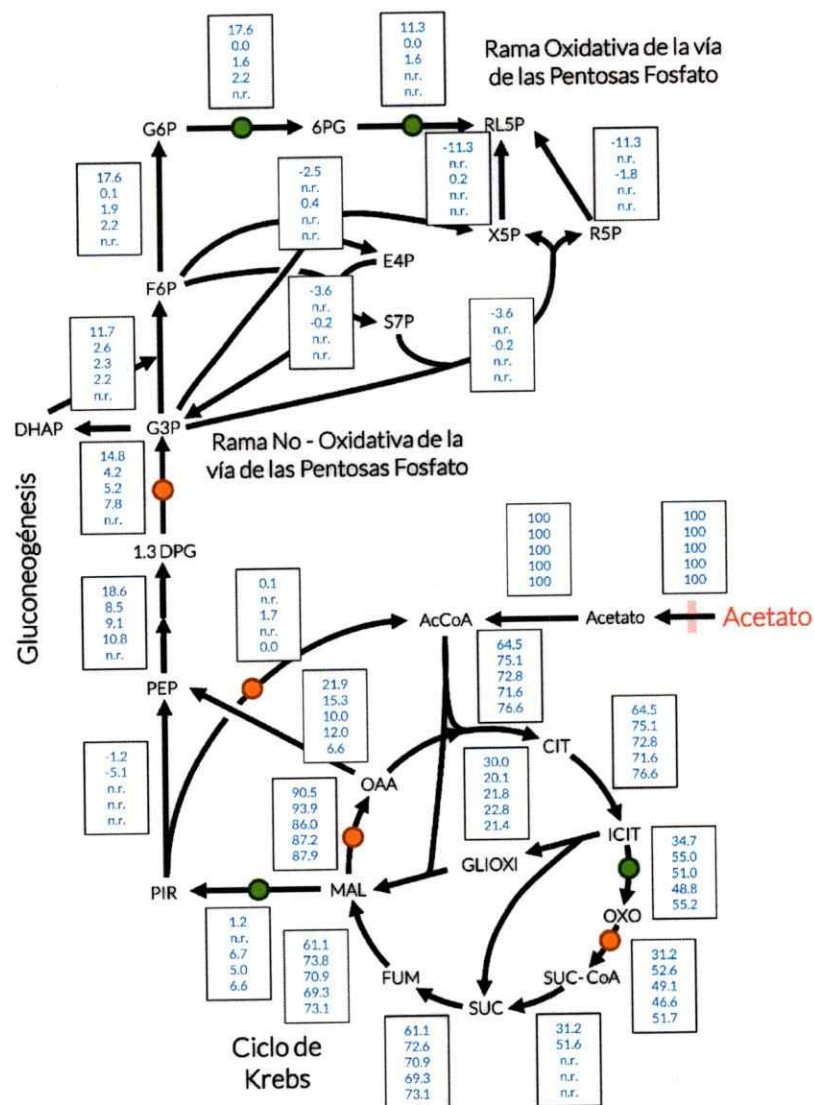


Figura 4. Distribuciones de flujos metabólicos de cepas *wild type* de *E. coli* creciendo en acetato.

Distribuciones de flujos determinadas con técnicas de ^{13}C junto a espectrometría de masa y/o resonancia magnética nuclear. Junto a cada reacción mostrada (representadas por las flechas) se muestra un recuadro con cinco valores. Estos corresponden a la velocidad de la reacción, en términos del porcentaje del flujo de consumo de acetato. Cuando el sentido de la reacción es opuesto al de la flecha, el número es negativo. Los valores no reportados se muestran como n.r. Desde el primer al quinto valor de cada recuadro corresponde a lo observado por Haverkorn (2012), Taymaz-Nikerel y col. (2010), Zhao & Shimizu (2003), Holms (1996) y Walsh & Koshland Jr. (1984, 1985), respectivamente. Los círculos representan las deshidrogenasas en la red; en verde las específicas por NADP y en rojo por NAD. Se muestra la única enzima málica activa (la NADP-dependiente). Los metabolitos se detallan en la Lista de Abreviatura

Así, durante el crecimiento en acetato, se ha observado que la ICDH de *E. coli* produce sobre un 80% del NADPH total (Zhao & Shimizu, 2003). Sin embargo, la capacidad de producción de esta enzima también genera un exceso en la tasa de producción de dicho cofactor, haciendo que ésta se encuentre muy por arriba de la demanda anabólica de NADPH. Esta situación es contrarrestada por la acción de la transhidrogenasa UdhA, reflejando la importancia de mantener los balances redox en el metabolismo (Haverkorn, 2012).

1.4. Cambios de Especificidad de las Deshidrogenasas

El balance redox está dado principalmente por cofactores como NAD(P) y sus especies reducidas. Como se mencionó anteriormente, este balance es importante para mantener las reacciones de biosíntesis y de generación de energía a partir de sustratos, como por ejemplo glucosa y acetato.

Aprovechando lo anterior, una de las estrategias que se ha utilizado recientemente en la ingeniería metabólica para mejorar la producción de compuestos de interés comercial es la modificación de la disponibilidad de NADH y NADPH para lograr un efecto sistémico en la red. Este razonamiento también se ha empleado para comprender la evolución de las redes metabólicas y cómo ciertas vías fueron confiriéndoles nuevas características a los organismos.

Un ejemplo del primer caso es el trabajo de Kabus y col. (2007), donde expresaron la transhidrogenasa PntAB de *E. coli* en *Corynebacterium*, que no posee este tipo de enzima para aumentar la producción de L-lisina. Así generaron un mayor abastecimiento de NADPH para las vías anabólicas, lo que desencadenó un aumento de la formación de biomasa y de L-lisina. Otro caso es el de Balzer y col. (2013), quienes

aumentaron la disponibilidad de NADH y disminuyeron la producción de formato en *E. coli* al expresar heterológamente la formato deshidrogenasa NAD-dependiente de *Candida boidinii*, con el fin de aumentar la producción de succinato.

Dada la preponderancia de la disponibilidad de NAD(H) y NADP(H), existen estudios que se enfocan en la importancia de la especificidad que tienen las deshidrogenasas por el cofactor en la regulación del metabolismo (Wang y col, 2013). Tal es el caso de la investigación de Bologna y col. (2007), donde ellos estudiaron dos formas de la enzima málica: una específica por NAD y la otra por NADP. Se vio que éstas presentan estructura y sistemas de regulación diferentes, lo que refleja la importancia de la especificidad en el control metabólico ante contextos distintos.

Particularmente, en el trabajo desarrollado por Zhu y col. (2005), analizaron en *E. coli* el efecto del reemplazo del gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente (ICDH) por una forma mutante específica por NAD. Mencionaron que debido al estado de oxidación del acetato éste no puede ser utilizado a través de la vía de las pentosas fosfato para la producción de NADPH por lo que la bacteria necesitaría de fuentes alternativas para producir este cofactor, como lo es PntAB, la enzima málica NADP-dependiente (MaeB) y la ICDH. Una de las conclusiones de este trabajo fue que las ICDH NADP-dependiente emergieron como una adaptación que favorece el crecimiento en acetato.

Si bien estos trabajos han aportado a comprender la importancia del balance redox para la producción de ciertos metabolitos y el control sistémico de la red metabólica, son pocos los estudios donde se ha explicado la repercusión del cambio de la disponibilidad de NAD(H) y NADP(H) a nivel de flujos metabólicos. Entre estos últimos

destacan las investigaciones de Marx y col. (1999), Martínez y col. (2008), y Olavarría y col. (2014), en las que se analizaron los flujos metabólicos al cambiar la especificidad de la glutamato deshidrogenasa de *C. glutamicum*, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *E. coli*, y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *E. coli* por una NADH productora, respectivamente. Por su parte, King & Feist (2014) analizaron de manera *in silico* el cambio de especificidad de distintas deshidrogenasas de *E. coli* y *S. cerevisiae* para mejorar la producción de metabolitos de interés.

Zhu y col. (2005) examinaron el efecto fisiológico de la especificidad de la ICDH de *E. coli* durante el crecimiento en acetato, observando que la preferencia por NADP es una adaptación que mejoró el crecimiento en dicha fuente de carbono. Sin embargo, no vieron el efecto metabólico asociado al cambio de especificidad. Por este motivo, en este trabajo se examinaron los cambios en las distribuciones de flujos y los efectos asociados ante las perturbaciones redox impuestas por la especificidad de la ICDH y la presencia y/o ausencia de la transhidrogenasa PntAB. En capítulos posteriores se discutirá la importancia de los cofactores redox y en los puntos de la red donde participan, respondiendo a la disponibilidad de estos en el contexto del presente estudio. También, se abordará una posible aplicación biotecnológica relacionada al cambio realizado en el abastecimiento de NAD(P)H en el metabolismo central.

1.5. Análisis de Balance de Flujos para predecir las distribuciones de flujos metabólicos

El Análisis de Balance de Flujos (FBA, abreviación en inglés de *Flux Balance Analysis*) es una aproximación matemática que permite calcular la distribución de velocidades de reacción dentro de una red metabólica completa de un organismo. Dicho

de otro modo, es un análisis *in silico* que predice los flujos metabólicos, la tasa de duplicación celular, y también la tasa de consumo y/o de producción de metabolitos (Orth y col., 2010). Si bien MFA permite determinar los flujos de las vías centrales de manera experimental, con FBA es posible predecirlos para la red completa. Para esto se necesita determinar experimentalmente un número menor de parámetros fisiológicos como lo pueden ser la tasa de crecimiento, de consumo de fuente de carbono, de consumo de oxígeno, de producción de CO₂ y/o de metabolitos de fermentación.

Por características como la anterior, se empleó FBA para predecir las distribuciones de flujos ante las perturbaciones asociadas al cambio de especificidad de la ICDH durante el crecimiento de *E. coli* en acetato. Para más detalles del método, revisar la sección 2 (Materiales y Métodos) y/o la revisión de Orth y col. (2010).



1.6. Hipótesis

En *Escherichia coli*, las redistribuciones de flujo que acompañan la pérdida de producción de NADPH en ICDH debido al cambio de especificidad del cofactor, responden al restablecimiento del balance de producción de NADPH y de intermediarios para la biosíntesis durante el crecimiento en acetato.

1.7. Objetivo General

Estudiar mediante herramientas de modelamiento la distribución de flujos metabólicos de cepas de *Escherichia coli* que poseen el reemplazo de la isocitrato deshidrogenasa por una forma NAD-dependiente en presencia y ausencia del gen de la transhidrogenasa PntAB en cultivos con acetato como única fuente de carbono.

1.8. Objetivos Específicos

- 1) Generar cepas de *E. coli* que posean el reemplazo del gen *icd* por el gen *icd^{NAD}* en presencia y ausencia del gen de la transhidrogenasa PntAB mediante recombinación homóloga.
- 2) Realizar estudios fisiológicos, incluyendo la determinación de la tasa de crecimiento, el rendimiento y la tasa de consumo de fuente de carbono de las cepas generadas en el Objetivo 1, cultivadas en acetato.
- 3) Estudiar el impacto metabólico de las modificaciones realizadas en el Objetivo 1 mediante el modelamiento de los flujos metabólicos por Análisis de Balance de Flujos utilizando como restricciones los resultados obtenidos del Objetivo 2.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales Utilizados

2.1.1. Cepas bacterianas

Todas las cepas construidas y utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas utilizadas y sus características relevantes

Cepa	Características relevantes
<i>wild type</i> ^{a,b}	Cepa K-12 MG1655 con genotipo F ⁻ λ ⁻ rph-1
Δ pntAB::kan ^R ^a	Ausencia de la transhidrogenasa de membrana (PntAB) y presencia de resistencia a kanamicina
<i>icd</i> ^{NAD} ::kan ^R ^a	Cambio de especificidad de la ICDH y presencia de resistencia a kanamicina
<i>icd</i> ^{NAD} Δ pntAB::kan ^R ^a	Cambio de especificidad de la ICDH, ausencia de PntAB y presencia de resistencia a kanamicina
Δ pntAB ^b	Ausencia de PntAB
<i>icd</i> ^{NAD} ^{a,b}	Cambio de especificidad de la ICDH
<i>icd</i> ^{NAD} Δ pntAB ^b	Cambio de especificidad de la ICDH y ausencia de PntAB

^a : Se empleó en la construcción de otra(s) cepa(s)
^b : Se caracterizó fisiológicamente

2.1.2. Reactivos

Tabla 3. Reactivos utilizados durante el seminario de título

Proveedor	Reactivos
Agilent Technologies Inc (CA-USA)	PfuUltra II fusion HS DNA polymerase
Becton Dickinson (NJ-USA)	Peptona
Biotium (CA-USA)	Gel Red
Clontech Laboratories, Inc. (CA-USA)	SapphireAmp® Fast PCR Master Mix
IDT (IO-USA)	Partidores
Lonza (Basel-Switzerland)	LE Agarosa SeaKem®
Merck (NJ-USA)	Agar, Extracto de levadura, cloruro de sodio y sales para medios de cultivo
New England Biolabs® Inc (MA-USA)	1 kb DNA Ladder, Gel Loading Dye Blue (6X), Enzima de restricción <i>Dpn</i> I
OMEGA Bio-tek (GA-USA)	E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II (Mini-prep)
Promega (WI-USA)	Bovine Serum Albumin Acetylated (BSA), Wizard® Genomic DNA Purification Kit
Sigma-Aldrich (MO-USA)	Acetato de sodio
US Biological (MA-USA)	Kanamicina, ampicilina

El agua utilizada en todos los experimentos fue de calidad miliQ, con una conductividad de 0.05 μ S·cm⁻¹.

2.1.3. Medios de cultivo

Medio *Lysogeny broth* (LB)

La composición del medio líquido LB por cada 1 L es la siguiente: 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Para su preparación se disolvieron los componentes en 900 mL de agua mili-Q y se ajustó el pH a 7. Luego se completó el volumen con agua mili-Q a 1 L. Se esterilizó por autoclave.

En el caso del medio sólido LB, se empleó la composición anterior salvo que se suplementó con agar al 1.7% p/v (17 g de agar). También se esterilizó por autoclave.

Cuando fue necesario, se suplementó L-arabinosa, glucosa, ampicilina y kanamicina, a concentraciones finales de 0.2%, 5 g·L⁻¹, 100 mg·L⁻¹ y 50 mg·L⁻¹, respectivamente.

Medio Mínimo M9 - Acetato

La composición del medio mínimo M9 por cada 1 L es la siguiente: 3.0 g de KH₂PO₄, 5.96 g de Na₂HPO₄, 1.02 g de NH₄Cl, 0.5 g de NaCl. Para su preparación se disolvieron los componentes en 900 mL de agua mili-Q y se esterilizó por autoclave. Se adicionó 1 mL de las siguientes soluciones esterilizadas por separado: MgSO₄ 2 M, CaCl₂ 0.1 M, Tiamina 3 mM, Sales traza. Y también 40 mL de acetato de sodio 75 g·L⁻¹ para ajustar el pH a 7 y suplementarlo al medio a una concentración final de 3 g·L⁻¹.

La solución de sales traza por cada 1 L posee: 1.8 g de ZnSO₄ · 7H₂O, 1.2 g de CuCl₂ · 2H₂O, 1.4 g de MnCl₂ · 4H₂O, 2.1 g de CoSO₄ · 7H₂O y 10 g de FeCl₃ · 6H₂O.

2.1.4. Plásmidos

Tabla 4. Plásmidos ocupados en este estudio

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pKD13	Sitios FRT flanqueando al gen de resistencia a kanamicina (<i>kan^R</i>)	Datsenko y Wanner (2000)
pKD46	Termosensible (M: 30°C, C: 37°C). Inducible por L-arabinosa. Sistema de recombinación del bacteriófago λ Red.	Datsenko y Wanner (2000)
pCP20	Gen de resistencia a ampicilina (<i>amp^R</i>) Termosensible (M: 30°C, C: 43°C). Recombinasa Fli que reconoce los sitios FRT. Gen de resistencia a ampicilina (<i>amp^R</i>)	Datsenko y Wanner (2000)
pUC57- <i>icd^{NAD}</i> -FRT- <i>kan^R</i> -FRT	Gen <i>icd^{NAD}</i> fusionado al <i>cassette</i> FRT- <i>kan^R</i> -FRT proveniente del plásmido pKD13. Resistencia a kanamicina y ampicilina (genes <i>kan^R</i> y <i>amp^R</i> , respectivamente)	Aporte del Dr. Karel Olavarría

M: Temperatura de mantención del plásmido; C: Temperatura de "cura" o lavado del plásmido

2.1.5. Partidores

Tabla 5. Partidores utilizados para la modificación y secuenciación de las cepas

Partidor	Secuencia
Secuenciación del <i>cassette</i> de reemplazo del gen <i>icd</i>	
M13-FP	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
M13R	5'-GCGGATAACAATTCACACAG-3'
Amplificación del <i>cassette</i> de reemplazo del gen <i>icd</i>	
PFicdNAD-KanFRT	5'- <u>GCAAACCGTAGCGCTCGAAGGAGAGGTGA</u> ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTC-3'
PRicdNAD-KanFRT	5'- <u>TCCCGTTAATAAATTTAACAACTACGGCA</u> GTCGACCTGCAGTTCCG-3'
Amplificación del <i>cassette</i> de delección del operón <i>pntAB</i>	
FwDWpnt	5'- <u>CGTTCTGTTAAGCGATCTCAATAAAGAGTGACGGC</u> TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
ReDWpnt	5'- <u>CTAGATCACAGGCATAATTTTCAGTACGTTATAG</u> ATTCCGGGATCCGTCGACC-3'
Amplificación de la región codificante del gen <i>icd</i>	
FSicdh	5'-CATATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGG-3'
RSicdh	5'-GAGCTCTTACATGTTTTCGATGATCGC -3'
Amplificación de la región codificante del operón <i>pntAB</i>	
FSpnt	5'-AGACTGCAGCAGGGTTACAGAGCTTTTCAG-3'
RSpnt	5'-TCAGGATCCCGATGGAAGGGAATATCATG-3'
Verificación del tamaño y secuenciación de la región del gen <i>icd</i>	
11 ^a	5'-CATGACGGCAAACAATAGGGTAGTA-3'
12 ^a	5'-CCAAACTACCGAGGGGTTTTGATA-3'
13 ^b	5'-TATGCGGGTATCGAATGGAAAGC-3'
Verificación del tamaño y secuenciación de la región del operón <i>pntAB</i>	
1 ^a	5'-CAGCGGGAGGTCAAAGCATC-3'
2 ^a	5'-ACGGTGTAAGTGTCTGCGTC-3'
9 ^b	5'-GTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG-3'
10 ^b	5'-GTCCATAAAACCGCCAGTCTAGCTATC-3'

Se muestra una región subrayada y destacada en rojo para los partidores empleados en el procedimiento de Datsenko y Wanner (2000). Ésta corresponde al sitio de recombinación homóloga entre un extremo del producto de PCR y la región cromosómica.

^a : Partidor utilizado para amplificar la región de interés y en una reacción de secuenciación.

^b : Partidor utilizado exclusivamente en una reacción de secuenciación

2.2. Metodologías de Biología Molecular

2.2.1. Extracción de DNA

Se extrajo el DNA genómico utilizando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), mientras que los plásmidos se purificaron con E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II (OMEGA BIO-TEK). En ambos casos se siguieron las indicaciones del fabricante.

2.2.2. Amplificación de DNA mediante PCR

Los *cassettes* empleados para las modificaciones a nivel cromosómico fueron amplificados mediante PCR utilizando la DNA Polimerasa PfuUltra II Fusion HS (Agilent Technologies). La mezcla de reacción se preparó en un microtubo de 200 μ L, la cual está compuesta por: 5 μ L de 10x PfuUltra II reaction buffer, 0.5 μ L de mezcla de dNTPs (cada uno a una concentración de 25 mM), 100 ng de DNA molde, 1 μ L de cada partidor (*forward* y *reverse*) a una concentración 10 μ M y 1 μ L de Polimerasa. Se completó un volumen final de 50 μ L con agua estéril libre de DNAsas. El protocolo de PCR consistió en: *i.* una etapa de pre-calentamiento a 95°C durante 2 min, *ii.* 30 ciclos que comprenden un período de desnaturalización a 95°C por 20 s, de alineamiento de partidores según su T_m (45.5°C para el *cassette* de reemplazo del gen *icd*, y 55°C para el *cassette* de delección del operón *pntAB*) durante 20 s y de elongación a 72°C durante 45 s, *iii.* una etapa de post-calentamiento a 72°C por 3 min y *iv.* un período de mantención a 4°C durante 10 min. Luego de obtener el producto de PCR, se le adicionó 1 μ L de la enzima de restricción *Dpn* I (New England Biolabs® Inc), la cual reconoce y degrada DNA metilado, lo que permitió eliminar el plásmido presente en la mezcla de reacción. Se incubó toda la noche a 37°C.

Tras cada paso de obtención de cepas, las modificaciones fueron verificadas mediante PCR-colonia, amplificando la región de interés para analizar su tamaño. La mezcla de reacción se preparó en un microtubo de 200 μ L: primero se depositaron 11.25 μ L de agua estéril libre de DNAsas y luego se arrastró una colonia por las paredes internas del tubo, la cual fue picada desde la placa donde fue cultivada. Posteriormente, se agregó: 0.25 μ L de BSA, 12.5 μ L de SapphireAmp® Fast PCR Master Mix, y 0.5 μ L de cada partidador (*forward* y *reverse*) a una concentración 10 μ M. El protocolo de PCR-colonia consistió en: *i.* una etapa de pre-calentamiento a 94°C durante 10 min, *ii.* 30 ciclos que comprenden un período de desnaturalización a 98°C por 10 s, de alineamiento de partidores a 55°C durante 10 s y de elongación a 72°C durante 30 s, y *iii.* un período de mantención a 4°C durante 10 min.

2.2.3. Verificación del tamaño de DNA mediante electroforesis en gel

Cada muestra de DNA se mezcló en proporción 2:1 con una solución Gel Loading Dye Blue (New England Biolabs® Inc) y luego se cargó en un gel de agarosa al 0.8% p/v, preparado en una solución TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y Gel Red 3X (Biotium). Además de las muestras, se cargó en un carril el estándar de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* (New England Biolabs® Inc). La electroforesis se realizó a voltaje constante de 80 V en una cámara de electroforesis horizontal H2 (Fermelo). Finalmente, el gel se observó sobre un transiluminador UV y se fotografió.

2.2.4. Secuenciación y análisis de secuencias

Además del PCR-colonia, se verificaron las modificaciones realizadas mediante secuenciación. Para esto se extrajo el DNA genómico y luego se amplificaron por PCR las regiones de interés empleando el protocolo que utiliza la Polimerasa PfuUltra II. Los

productos de PCR y el plásmido pUC57-icd^{NAD}-FRT-kan^R-FRT se enviaron a secuenciar a Macrogen USA, empleando los partidores de secuenciación detallados en la Tabla 5. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el software Geneious Pro 4.8.5, utilizando las regiones de solapamiento consideradas en el diseño de los partidores. Luego se comprobaron las modificaciones mediante alineamiento con las secuencias esperadas.

2.2.5. Preparación de células electrocompetentes y transformación

Se prepararon células electrocompetentes de *E. coli* cultivando la cepa correspondiente durante toda la noche en 3 mL de medio LB a 37°C (o a la temperatura de mantención si la cepa posee un plásmido termosensible), luego se inoculó con 1 mL de dicho cultivo en un matraz con 50 mL del mismo medio y se incubó en agitación a la misma temperatura, hasta alcanzar una OD_{600nm} determinada. Posteriormente, se incubó el matraz en hielo durante 5 min y se centrifugó el cultivo en un tubo Falcon® de 50 mL durante 10 min a una velocidad de 8000 rpm y a una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante y luego se suspendió el sedimento en 20 mL de glicerol al 10% mantenido en hielo. Se centrifugó 3 veces adicionales de la misma manera, pero la última suspensión del sedimento se realizó en 1 mL de glicerol al 10%, y se traspasó a un microtubo de 1.7 mL estéril. La transformación de las células electrocompetentes se llevó a cabo mediante eletroporación en cubetas de 2 mm, mezclando 90 µL de células desde el microtubo de 1.7 mL con 10 µL de DNA. Para esto se utilizó el equipo Eppendorf Eporator® en condiciones de voltaje 2.5 kV, capacitancia 25 µF y resistencia de 200 Ohm. La recuperación se realizó en 1 mL de medio LB (si corresponde, suplementado con glucosa y/o L-arabinosa) a 37°C durante 2 h. Posteriormente, se sembraron las células en placas con medio LB sólido suplementado con el antibiótico que corresponda.

2.3. Metodologías para la Generación de Cepas

2.3.1. Recombinación homóloga en un paso con producto de PCR

El *cassette* FRT-kan^R-FRT contenido en el plásmido pKD13 fue amplificado utilizando los partidores correspondientes para generar el producto de PCR con extremos de 35 pb y homólogos a las regiones cromosómicas adyacentes al operón *pntAB* de *E. coli* (Figura 5a). Mientras que el *cassette* *icd*^{NAD}-FRT-kan^R-FRT fue amplificado desde el plásmido pUC57-*icd*^{NAD}-FRT-kan^R-FRT, generando el producto de PCR con extremos homólogos a las regiones cromosómicas de 30 pb adyacentes al gen *icd* de *E. coli* (Figura 5b). Cada uno de estos *cassettes* se utilizó por separado para células electrocompetentes de la cepa *wild type* previamente transformada con el plásmido pKD46 (Datsenko & Wanner, 2000). Para lograr la recombinación, las células electrocompetentes fueron preparadas en medio LB suplementado con L-arabinosa y ampicilina a 30°C hasta alcanzar una OD_{600nm} 0.5 - 0.6, para expresar la recombinasa λ Red presente en el plásmido. Luego de la recuperación en LB suplementado con glucosa a 37°C durante 2 h, las células fueron sembradas en medio sólido LB, suplementado con kanamicina. Aquellas colonias que crecieron, resultaron ser las cepas $\Delta pntAB::kan^R$ e *icd*^{NAD}-kan^R, según el respectivo *cassette* utilizado para la transformación. Las modificaciones fueron verificadas por PCR-colonia y secuenciación.

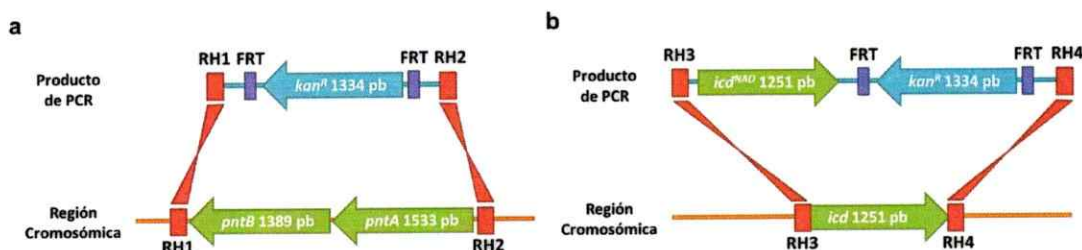


Figura 5. Recombinación homóloga de los productos de PCR

Se muestran los fragmentos lineales utilizados para la construcción de cepas. En (b), el producto de PCR presenta el *cassette* FRT-kan^R-FRT empleado para la delección del operón *pntAB*. Mientras que en (a), presenta el *cassette* *icd*^{NAD}-FRT-kan^R-FRT para reemplazar el gen *icd* por el gen *icd*^{NAD}. Ambos productos de PCR tienen extremos que homólogos con las regiones cromosómicas adyacentes al sitio modificado (RH1 a RH4). El evento de recombinación homóloga se representa por las formas elongadas que conectan la región RH en el producto de PCR con la misma en la región cromosómica.

2.3.2. Transferencia de las modificaciones mediante retrocruce o *backcross*

Posteriormente, las modificaciones fueron transferidas a células electrocompetentes frescas de la cepa *wild type* mediante retrocruce o *backcross* (Toro y cols., 1998) para descartar alteraciones al azar en el genoma debido a la sobre-expresión del gen de la recombinasa λ Red. Para esto, se extrajo el DNA genómico de las cepas modificadas, éste presentó una concentración entre 800 - 1000 ng· μ L⁻¹ y tuvo una pureza sobre 1.7 dada por la proporción A_{260}/A_{280} . Se agitó intensamente mediante vortex durante 20 min para fragmentarlo, y así se utilizó para transformar las células. Para lograr la recombinación mediada por la maquinaria de reparación de *E. coli*, las células electrocompetentes fueron preparadas en medio LB a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} 0.70 - 0.75. Luego de la recuperación en LB a 37°C durante 1 h, las células fueron sembradas en medio sólido LB, suplementado con kanamicina. Aquellas colonias que crecieron fueron analizadas por PCR-colonia y secuenciación para verificar la correcta incorporación de las modificaciones. Una vez que los resultados de estos análisis fueron positivos, se escindió el gen de resistencia a kanamicina como se detalla

en la siguiente sección, generándose las cepas $\Delta pntAB$ e icd^{NAD} . Para generar la cepa $icd^{NAD} \Delta pntAB::kan^R$ se empleó el procedimiento de *backcross*, utilizando células electrocompetentes de la cepa icd^{NAD} y el DNA genómico de la cepa $\Delta pntAB::kan^R$. Posteriormente, el gen de resistencia se escindió del mismo modo, obteniéndose finalmente la cepa $icd^{NAD} \Delta pntAB$.

2.3.3. Remoción del gen de resistencia a kanamicina

Luego de que se confirmó que cada cepa obtenida presentaba resistencia sólo a kanamicina, se transformaron células de cada una de estas con el plásmido pCP20 mediante electroporación como se detalló en la sección 2.2.5. Luego de su recuperación, se sembraron en una placa con LB-agar suplementada con ampicilina y se incubaron a 30°C toda la noche. Esto permitió la escisión del gen kan^R debido a la recombinación de los sitios FRT por acción de la recombinasa Flp, cuyo gen se encuentra en el plásmido pCP20. Para "curar" este plásmido, de aquellas colonias que crecieron se tomaron 8 al azar y se sembraron en medio sólido LB-agar e incubaron a 43°C toda la noche. Posteriormente, se sembraron en tres condiciones distintas de medio sólido LB-agar: *i.* sin antibiótico, *ii.* suplementado con kanamicina y *iii.* suplementado con ampicilina, y se incubaron a 30°C toda la noche. Aquellas que crecieron sólo en la condición sin antibiótico fueron las que perdieron el gen kan^R y no contienen el plásmido pCP20, lo que se confirmó mediante PCR-colonia y secuenciación.

2.4. Metodologías para la Caracterización Fisiológica de las Cepas

La caracterización fisiológica de las cepas en este caso consistió en determinar la tasa de crecimiento, consumo de acetato y el rendimiento de biomasa de cada una de estas.

2.4.1. Condiciones de cultivo, monitoreo de las curvas de crecimiento y obtención de muestras

Las cepas estudiadas fueron cultivadas aeróbicamente en matraces de 500 mL que contenían 100 mL de medio mínimo M9 – Acetato (composición detallada en la sección 2.1.3.), a 37°C y a una agitación de 200 rpm.

Previamente a esto, se preparó un *Stock* de Inoculación de cada cepa, cultivándolas en 25 mL de medio mínimo M9 – Glucosa (misma composición de medio mínimo M9 – Acetato, salvo que se empleó glucosa a una concentración final de 6 g·L⁻¹ en lugar de acetato, debido a un crecimiento más rápido de *E. coli* en esta fuente de carbono) hasta alcanzar una OD_{600nm} de 1.0. Luego se incubó el matraz en hielo durante 15 min y posteriormente se centrifugó el cultivo en un tubo Falcon® de 50 mL durante 10 min a una velocidad de 5000 rpm y a una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en un volumen de glicerol 10% equivalente a 1/25 parte del volumen del cultivo centrifugado. Se transvasó el *stock* a un microtubo de 2 mL y se mantuvo almacenado a -80°C para ser utilizado cuando se requiriera inocular.

Para el estudio de cada cepa, la noche anterior al monitoreo se inoculó el cultivo con 240 µL de *Stock* de Inoculación, obteniéndose una OD_{600nm} inicial entre 0.05 - 0.07. Este procedimiento sirvió para que todos los cultivos partieran con una biomasa similar y también para que la fase *lag* de estos durara entre 10 - 13 h. De esta forma, debido a la baja velocidad de crecimiento que presenta *E. coli* en acetato, la fase exponencial se pudo caracterizar por completo al día siguiente de la inoculación. Previamente a la implementación de este método se realizaron controles para descartar que la tasa de

crecimiento se viera afectada. Utilizando un cultivo previo (pre-inóculo) en lugar del *Stock* de Inoculación, se observó que sólo disminuye la duración de la fase *lag* sin mostrar diferencias en la tasa de crecimiento respecto a lo registrado con el método empleado en este trabajo.

De cada cultivo realizado para caracterizar fisiológicamente las cepas estudiadas, se tomaron muestras cada 1 h para: *i.* medir densidad óptica a 600 nm; *ii.* obtener el medio extracelular mediante filtración con filtros con tamaño de poro de 0.22 μm , y guardar estas muestras a -80°C para luego analizar la concentración de acetato mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

2.4.2. Determinación de la concentración de acetato en el medio de cultivo mediante HPLC

Las muestras de medio extracelular fueron analizadas por HPLC ocupando el equipo Waters 1525 y la columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (BioRad) para carbohidratos y ácidos orgánicos. Se utilizó una fase móvil de H_2SO_4 a una concentración de 5 mM, las bombas se operaron a un flujo neto de $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y la columna se mantuvo a 65°C . Los detectores ocupados fueron de índice de refracción (Waters 2414) y UV (Waters 2487) a una longitud de onda de trabajo de 210 nm.

Se determinó la concentración de acetato presente en cada muestra, interpolando los valores de área obtenidos con la curva de calibración realizada en las mismas condiciones de medio de cultivo (medio mínimo M9 – Acetato), variando la concentración de acetato de sodio en un rango de 0 a $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.4.3. Determinación del consumo de acetato

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

$$\frac{dS(t)}{dt} = \frac{-\mu(S(t))}{Y_{X/S}} \cdot X(t) \quad (1)$$

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu(S(t)) \cdot X(t) \quad (2)$$

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

Desde la Ecuación (2) se tiene:

$$\mu(S(t)) = \frac{dX(t)}{dt} \cdot \frac{1}{X(t)} \quad (3)$$

Que al reemplazarlo en la Ecuación (1) queda:

$$dS(t) = \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot dX(t) \quad (4)$$

Integrando:

$$\int_{S(0)}^{S(t)} dS(r) = \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot \int_{X(0)}^{X(t)} dX(r) \quad (5)$$

$$S(t) - S(0) = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot X(0) + \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot X(t) \quad (6)$$

Resultando finalmente:

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

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.

Por este motivo, se graficó la concentración de sustrato medida por HPLC 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 $-1/Y_{X/S}$. Este valor permitió calcular la tasa de consumo de acetato (Q_{ac} , con unidades de $\text{mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) al multiplicarlo por la tasa de crecimiento obtenida del cultivo:

$$Q_{ac} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \cdot \mu(S(t)) \quad (8)$$

El factor de conversión de biomasa (f) para expresar la densidad óptica medida a 600 nm en unidades de $\text{gDW} \cdot \text{L}^{-1}$, se obtuvo como la pendiente de la regresión lineal de la biomasa en peso seco por litro, respecto de la biomasa en OD. Para esto, se realizaron tres cultivos de la cepa *wild type* bajo las condiciones mencionadas en la sección 2.4.1; de cada uno se tomaron dos veces muestras en triplicado de 16 mL a distintos tiempos de cultivo, de las cuales se utilizó 1 mL para determinar la OD y el volumen restante se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en 100 μL y se dejó secar durante 24 h a 100°C en un recipiente previamente masado. Posteriormente, se masó el recipiente con la muestra seca en su interior, y se determinó la masa de ésta por diferencia. Finalmente, se normalizó dividiéndola por el volumen de la muestra centrifugada (15 mL en todos los casos).

2.5. Metodologías para el Análisis de Balance de Flujos

La red metabólica de un organismo puede ser representada matemáticamente en su totalidad mediante la matriz estequiométrica (**S**). Esta posee *m* filas y *n* columnas, representando respectivamente el número de metabolitos y de reacciones en el sistema. Cada celda de esta matriz contiene el coeficiente estequiométrico con el que un determinado metabolito participa en cada reacción. 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.

Por otro lado, todos los flujos metabólicos de la red pueden ser representados por un **vector** \vec{v} , de dimensión igual al número de reacciones del sistema (o al número de columnas de la matriz **S**). Mientras que el cambio de las concentraciones en el tiempo, de todos los metabolitos, se encuentra contenido en un **vector** $\frac{d\vec{x}}{dt}$, de dimensión igual al número de metabolitos del sistema (o 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 \vec{v} :

$$\frac{d\vec{x}}{dt} = S \cdot \vec{v} \quad (9)$$

Sin embargo, este sistema de ecuaciones presenta un espacio de solución (ES) indeterminado. El ES contiene todas las combinaciones de flujos que hacen posible la igualdad de la Ecuación (9), por lo que para generar un ES acotado, FBA considera la condición en que la tasa de cambio de concentración de todo metabolito debe ser igual a cero (estado estacionario):

$$S \cdot \vec{v} = \vec{0} \quad (10)$$

Esto significa que las concentraciones se mantienen constantes en el tiempo, como lo que se espera que suceda en la fase exponencial del crecimiento microbiano (Monod, 1949). Es decir, la velocidad de producción de los distintos intermediarios es igual a la velocidad de su consumo debido al crecimiento.

Con esto es posible encontrar distintos vectores \vec{v} que son solución del sistema de ecuaciones. Además se facilita el análisis, pues al no trabajar con las concentraciones de los metabolitos, no sería necesario conocer parámetros cinéticos. Para encontrar un único vector, FBA emplea métodos de programación lineal para optimizar una función objetivo. 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. Para hacer más preciso este cálculo, y el resultado consistente con las tasas de crecimiento registradas experimentalmente, se suelen utilizar datos experimentales de flujos metabólicos externos para restringir el modelo, poniéndole límites mínimos y máximos, como por ejemplo a la tasa de consumo de fuente de carbono, consumo de oxígeno, producción de metabolitos de fermentación, etc.

Empleando el FBA como herramienta predictiva, se puede realizar una serie de análisis que dan cuenta del comportamiento metabólico de un organismo. En la Figura 6 se resumen métodos empleados para los análisis *in silico* realizados en el presente trabajo. Aquí se destacan el cálculo del ATP de mantención (ATPM), los análisis de sensibilidad que dan cuenta de la robustez de la red, la distribución de flujos metabólicos en la red completa, tasas de producción y consumo de los metabolitos del sistema y comparaciones *high-throughput* que permiten identificar fácilmente las diferencias entre las cepas estudiadas a nivel de flujo a través de vías metabólicas. Dichos métodos se

llevaron a cabo utilizando la COBRA Toolbox v2.0.5 (Schellenberger y col., 2011a) para MATLAB (MathWorks®). Los códigos de programación para estos análisis se pueden encontrar en el Anexo N° 7.2.

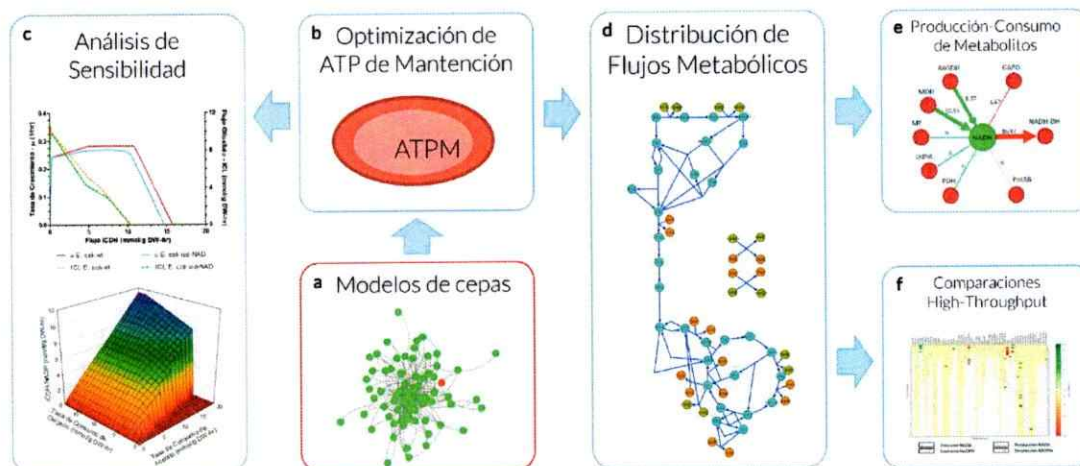


Figura 6. Esquema resumen de las etapas de análisis *in silico*

Primero se generaron los modelos de cada cepa (a), luego a estos se les calculó el ATP de mantenimiento (b) mediante optimización de acuerdo a parámetros experimentales. Posteriormente, los modelos se utilizaron para realizar una serie de análisis: Análisis de sensibilidad (c), con el fin de estudiar la robustez de la red ante perturbaciones a nivel de flujos metabólicos. Predecir la distribución de flujos metabólicos (d), lo que da cuenta de cuáles son las vías activas en la red. Con esto, se obtienen valores de velocidad de todas las reacciones en cada cepa, las que se pueden emplear para: Calcular la tasa producción o de consumo de cada metabolito de la red (e) y comparar los flujos entre distintas cepas de manera *high-throughput* (f), observando las diferencias a través de vías metabólicas y/o reacciones determinadas.

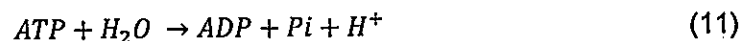
2.5.1. Generación de modelos de cepas

Se utilizó el modelo iJO1366 como reconstrucción metabólica de *E. coli* (Orth y col., 2011). Sobre éste se generaron los modelos de las cepas construidas en este trabajo, modificando los coeficientes estequiométricos de las reacciones catalizadas por las enzimas modificadas. Para los modelos de aquellas cepas que presentan una ICDH NAD-dependiente, los coeficientes estequiométricos de NADP y NADPH en esta reacción se reemplazaron por un valor 0, mientras que para NAD y NADH se modificaron

por -1 y 1, respectivamente. Por otro lado, para los modelos de las cepas que presentan la delección de la transhidrogenasa PntAB, se restringió el límite inferior y superior del valor de flujo metabólico que puede adoptar la reacción catalizada por esta enzima a un valor de 0. Del mismo modo, se restringieron los límites de la reacción de generación de biomasa y de la de consumo de acetato, empleando las tasas medidas experimentalmente para cada cepa (Anexo 7.2.).

2.5.2. Cálculo del ATP de mantención

Además del ATP necesario para la generación de macromoléculas, existe una demanda energética basal que se puede dividir en la asociada al crecimiento y la no asociada al crecimiento (ATPM). Ejemplos de estas demandas son los costos asociados a la polimerización de proteínas y al reciclaje de la membrana, respectivamente (Feist y col., 2007). En el modelo, el valor de ATP de mantención se expresa como el límite inferior del flujo de la reacción ATPM, la cual tiene la siguiente fórmula:



El valor del ATPM se puede obtener experimentalmente desde cultivos continuos (Russell & Cook, 1995) o también se puede estimar con FBA. En este caso corresponde a maximizar el flujo de la reacción ATPM en el modelo, lo que también corresponde a optimizar el rendimiento de ATP. Tras fijar la tasa de crecimiento y el consumo de acetato a los valores experimentales, se utilizó esta aproximación debido a que los flujos bacterianos se aproximan a una superficie de Pareto que contempla el crecimiento máximo, la mayor producción de energía (ATPM máximo) y el uso del menor número de enzimas (Schuetz y col., 2012). Una vez maximizado el ATPM, su valor se empleó para fijar el límite inferior de dicha reacción. Desde la optimización realizada para calcular este valor, se obtiene una distribución de flujos como se detalla en la sección 2.5.4.

2.5.3. Análisis de sensibilidad

Los análisis de sensibilidad consisten en modificar el valor de flujo de una o más reacciones determinadas y ver el comportamiento de la red metabólica. Se puede usar como variable dependiente el cambio en la velocidad de la reacción optimizada o de otra(s) distinta a la(s) alterada(s). Para cada cepa se realizaron los siguientes análisis:

- (1) Un análisis de robustez, en el cual se hizo un barrido de la tasa de consumo de acetato y se observó el comportamiento de la tasa de crecimiento y del rendimiento.
- (2) Un análisis de *Phenotype Phase Plane*, el cual consiste en realizar un barrido del flujo de dos reacciones simultáneamente. En este caso se modificó la velocidad con que el acetato se destina al punto de bifurcación del isocitrato (como porcentaje del consumo de acetato, desde 0 a 100), y el porcentaje de este flujo que se destina a la isocitrato liasa (ICL, de la vía del glioxilato), observando el efecto sobre el rendimiento de biomasa.
- (3) Un análisis de robustez para observar el exceso de producción de NADPH al variar la partición hacia ICL (0 - 100% del flujo de consumo de isocitrato, el que representa el valor neto desde la bifurcación). El flujo máximo de la transhidrogenasa UdhA se usó como indicador de la sobreproducción de NADPH. También se analizó la tasa de crecimiento ante el cambio de la partición hacia ICL para ver cómo influye el exceso de este cofactor con los cambios de producción de biomasa.

2.5.4. Obtención de las distribuciones de flujos metabólicos

Una distribución de flujos metabólicos corresponde a los valores de velocidad de todas las reacciones del modelo metabólico. En este trabajo, se calculó la distribución de flujos empleando el modelo de cada cepa estudiada bajo las condiciones de tasa de

crecimiento y consumo de acetato determinadas experimentalmente. Como se muestra en la Figura 7, sobre el modelo de cada cepa se pueden especificar las condiciones experimentales, utilizando las tasas obtenidas desde cultivos bacterianos como restricciones de los modelos. Puesto que no se realizó la determinación experimental del consumo de oxígeno, éste se predijo de manera *in silico* como el oxígeno óptimo para las condiciones experimentales incluidas en el modelo.

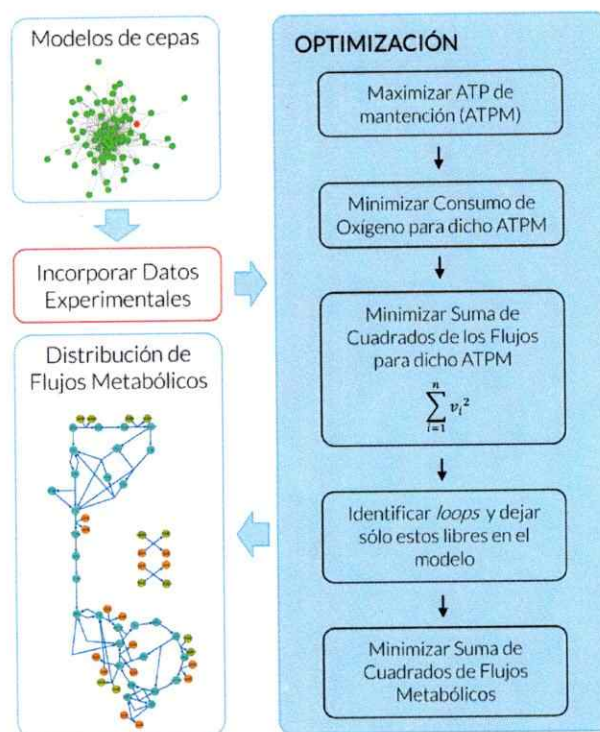


Figura 7. Método para el cálculo de las distribuciones de flujos

Primero se incorporaron los parámetros determinados experimentalmente, restringiendo los valores de flujos que pueden adoptar dichas reacciones. Luego, se realizó una serie de optimizaciones de manera iterativa como se resume en la imagen. Primero se maximizó el flujo de ATPM. Después, la tasa de consumo de oxígeno se minimizó para obtener el valor óptimo asociado al crecimiento simulado. Luego, para eliminar los *loops* de la distribución, se realizó una minimización de la suma de los cuadrados de los flujos. Posteriormente, se identificaron los *loops* restantes que superaran el flujo umbral (500 mmol·gDW⁻¹·h⁻¹ en este caso), y se fijaron todos los otros valores en el modelo para nuevamente minimizar la suma de los cuadrados, obteniéndose finalmente una distribución de flujos sin *loops*.

Un *loop* puede ser definido como un flujo a través de reacciones que devuelven el sistema al mismo estado de origen. Esto ocurre cuando un grupo de reacciones ocurren simultáneamente en direcciones opuestas. En la Figura 8 se esquematiza que las reacciones que conforman un *loop* pueden alcanzar valores muy altos de velocidad, lo cual dificulta los análisis posteriores al cálculo de la distribución. Uno de los principales problemas de determinar las distribuciones de flujos utilizando modelos grandes, como lo es el iJO1366 (que posee 2583 reacciones y 1805 metabolitos), es que al no disponer de un número de mediciones experimentales capaz de acotar suficientemente el espacio de solución, aparecen *loops* en distintos puntos de la red.

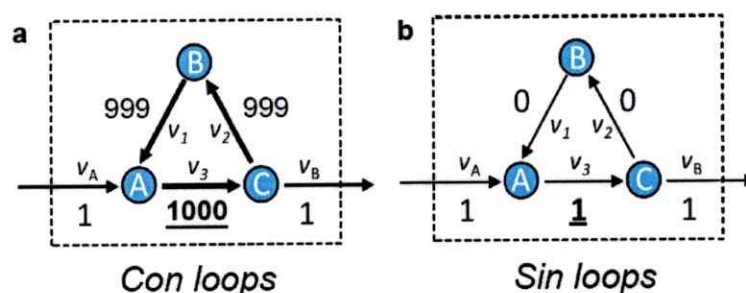


Figura 8. Representación de *loops* en una distribución de flujos metabólicos

En una red metabólica, la ley de *loops* se considera análoga a la segunda ley de Kirchhoff en un circuito eléctrico. En la figura (a) se muestra un ejemplo de la presencia de un *loop* en una vía metabólica, lo que permite que las velocidades de las reacciones que lo componen (v_1 , v_2 y v_3) puedan alcanzar flujos máximos sin afectar a las vías adyacentes (con flujos v_A y v_B). Sin embargo, este caso es desfavorable termodinámicamente, por lo que es necesario emplear métodos predictivos que permitan corregir este comportamiento en cálculos de distribuciones de flujos. En la figura (b) se muestra una condición sin *loop*, que es termodinámicamente favorable, luego de implementar un protocolo de corrección. Figura modificada de Schellenberger y col. (2011b).

Es por esto que en este trabajo se utilizó una tercera etapa de optimización, que consiste en calcular una nueva distribución de flujos que mantenga el ATPM y el consumo de oxígeno determinados en los dos primeros pasos de optimización, pero que a su vez minimice la suma de los cuadrados de los flujos metabólicos. Esto disminuye la



velocidad de las reacciones que presentan *loops* y se fundamenta en que los organismos utilizan el menor número posible de vías activas (Blank y col., 2005):

$$\sum_{i=1}^n v_i^2 \quad (12)$$

Donde v_i representa la velocidad de la reacción i , y n es el número total de reacciones de la red metabólica. Luego, se analizó la nueva distribución calculada, y se fijaron los valores que estuvieron bajo del umbral de *loop* establecido (en este caso 500 $\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Aquellos por sobre este valor, se dejaron libres en el modelo y nuevamente se minimizó la suma de cuadrados, resultando en una optimización de manera iterativa con el fin de reducir los tiempos de simulación. En cada uno de los últimos dos pasos de optimización se buscaron 400 óptimos distintos utilizando métodos de programación lineal entera mixta (Reed & Palsson, 2004), ocupando la función *enumerateOptimalSolutions* de COBRA. De cada conjunto de óptimos se seleccionó el que mejor cumpliera los criterios antes mencionados, según corresponda. Finalmente, la distribución obtenida tras el último paso no presentó *loops*.

Así, la reducción de *loops* empleada sigue el fundamento descrito por Dauner y Sauer (2001): se maximizó el ATPM por unidad de flujo de la red (suma de los cuadrados), pero en este caso con la condición de que en primer lugar el flujo por ATPM sea máximo y luego la suma de los cuadrados de flujos sea mínima:

$$\max \frac{v_{ATPM}}{\sum_{i=1}^n v_i^2} \quad (13)$$

2.5.5. Cálculo de la tasa de producción de metabolitos

Una vez obtenida la distribución de flujos, es posible calcular la tasa de producción y de consumo de cada metabolito del sistema. Considerando que el FBA se fundamenta en el estado estacionario, se tiene que la tasa de producción de una molécula es igual a su tasa de consumo. Con esto, calculamos la tasa de producción (φ) de un determinado metabolito i (NADH, NADPH, etc.), empleando la siguiente fórmula:

$$\varphi_i = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^n |S_{(i,j)} \cdot v_j| \quad (14)$$

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

2.5.6. Comparación *High-Throughput: Flux-Array*

En este trabajo se desarrolló un programa en Python con el fin de identificar fácilmente las diferencias de flujos metabólicos a escala genómica (de todas las reacciones del modelo), entre dos condiciones (o cepas) y amistosa visualmente. Además, esta herramienta entrega la información relacionada con los subsistemas o vías metabólicas en que se encuentran las reacciones que presentan cambios significativos, así como también, si corresponden o no a reacciones de producción o consumo de NAD(P)H.

Esta herramienta corresponde a una matriz visual, en que cada celda representa una reacción, y se encuentra coloreada según el tipo de cambio que presente en una condición respecto de otra. Para esto, es necesario establecer una condición de comparación y otra de referencia, como por ejemplo la cepa ica^{NAD} y la cepa *wild type*,

respectivamente. El color verde de la celda indica un aumento o activación del flujo de la reacción (desde un determinado valor o desde cero) en la condición de comparación respecto a la de referencia. Mientras que el color rojo indica que hubo una disminución o una inversión del flujo (esto último representa que el flujo de la condición de comparación tiene signo opuesto al de la condición de referencia). El color amarillo indica que no hubo cambio significativo entre las dos condiciones para una determinada reacción. Por otro lado, el color también puede ser amarillo cuando su velocidad no supera un flujo umbral establecido (en este caso 10^{-2}), en ambas condiciones simultáneamente. En cambio, el color blanco significa que en dicha celda no hay reacción asociada.

La intensidad de cambio de los colores se puede establecer manualmente mediante límites de proporción (de aumento y de disminución). En este caso, el color verde con mayor intensidad correspondió a una variación del flujo de comparación de cinco o más veces respecto del de referencia (Límite de Aumento de Proporción, L.A.P igual a 5). Mientras que el color rojo más intenso representó una disminución en un quinto o menos veces (Límite de Disminución de Proporción, L.D.P. igual a 0.2). En la Figura 9 se detallan las diferentes formas de asignación de colores de celdas que representan una determinada reacción.

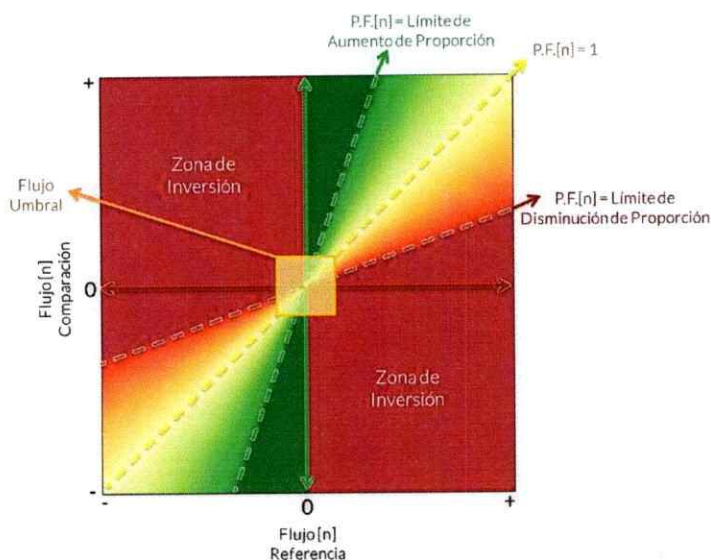


Figura 9. Asignación de color a cada reacción del modelo para representarla en Flux-Array

La reacción [n] puede poseer un valor de flujo para la condición de referencia (X) y otro para la condición de comparación (Y). Estos valores son representados en esta figura por el punto (X,Y). En ambas condiciones, el flujo puede ir desde valores negativos (-) a positivos (+), pasando por cero (0). Dependiendo de la ubicación de este punto en el gráfico, es el color que tendrá la celda asociada a la reacción [n] en el análisis *Flux-Array*. La manera en que se determinaron los colores de todos los puntos del gráfico consistió en obtener, para cada uno de estos, la fracción Y/X , denominada Proporción de Flujo (P.F.). Cuando el valor $P.F.[n]$ (P.F. de la reacción [n]) sea mayor o igual al Límite de Aumento de Proporción (L.A.P.), el color asignado será el mismo que el de la recta con pendiente igual a L.A.P. (recta verde segmentada). Mientras $P.F.[n]$ sea menor o igual que el Límite de Disminución de Proporción (L.D.P.), el color será el mismo que el de la recta con pendiente igual a L.D.P. (recta roja segmentada). En cambio, si $P.F.[n]$ es igual a uno, tendrá el color de la recta amarilla segmentada, y significará que el flujo de la reacción es el mismo para ambas condiciones. Si $P.F.[n]$ adopta un valor menor que L.A.P. y mayor que L.D.P., el color asignado se ubicará en el gradiente entre verde y rojo (zona localizada entre las rectas segmentadas que poseen estos colores). Si $P.F.[n]$ es negativa (signos opuestos entre el flujo de cada condición), el punto (X,Y) se ubicará en la Zona de Inversión, y así la celda será roja. Si el punto se ubica en uno de los ejes (es decir, el flujo de una de las condiciones es cero), la celda adoptará el color verde o rojo, dependiendo de cuál condición tenga el flujo de valor cero (si es de la de referencia, será verde, mientras que si es la de comparación, será roja). Por último, si el flujo de la reacción [n], para ambas condiciones simultáneamente, no supera un Flujo Umbral (10^{-2} en este caso), el punto (X,Y) asociado a la reacción se ubicará dentro del cuadrado amarillo que se encuentra en el centro del gráfico, y por ende, su celda asociada en el análisis *Flux-Array* será de color amarillo (esto es para descartar P.F. muy elevadas ante flujos muy pequeños).

Cada columna de la matriz representa un subsistema o vía metabólica, por lo que cada celda de una determinada columna es una reacción de la vía. La abreviación que se utilizó para nombrar cada subsistema o columna se puede encontrar en el Anexo 7.3.1.

Por otro lado, cada celda puede poseer o no un círculo en su interior. Si lo posee en su costado izquierdo, la reacción está asociada a NADH; y si lo posee a su derecha, está asociada a NADPH. El color de dicho círculo puede ser rosado o celeste, indicando consumo o producción de dichos cofactores, respectivamente.

2.6. Metodologías para el Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos experimentalmente, tasa de crecimiento, consumo de acetato y rendimiento de cada cepa fueron comparados mediante *t-test* ajustado con la corrección de Welch (para espacio muestral pequeño, en este caso $n = 3$). Para esto se utilizó el software GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software, Inc).

3. RESULTADOS

Con el fin de modelar la distribución de flujos en cepas que posean el reemplazo de ICDH, así como la delección de *pntAB*, primero fue necesario generar las cepas mediante procedimientos de biología molecular para luego medir sus parámetros fisiológicos en cultivos durante la fase exponencial.

3.1. Generación de Cepas

El procedimiento se describe en la sección 2.3. Previo a la etapa final se obtuvieron cepas intermedias que presentaron resistencia a kanamicina como resultado de los procedimientos de Datsenko-Wanner y del respectivo retrocruce. Finalmente, estas se transformaron con el plásmido pCP20 para la escisión de la resistencia al antibiótico, obteniéndose las cepas finales. En la Tabla 2 se detallan las cepas generadas y las características que poseen. Todas fueron analizadas mediante PCR-colonia y posteriormente por la secuenciación de los fragmentos amplificados. En la Figura 10a se muestran los fragmentos amplificados según la modificación de cada cepa y las masas moleculares esperadas tras el análisis de PCR-colonia. Las bandas se encuentran en el rango de tamaño esperado (Figura 10b). En aquellas cepas que se les reemplazó el gen *icd*, se apreció un aumento del tamaño del fragmento debido a la integración del *cassette* icd^{NAD} -FRT-kan^R-FRT, mientras que en las que se delecionó el operón *pntAB*, se observó una disminución debido a la integración del *cassette* FRT-kan^R-FRT en el lugar del operón. En las cepas tratadas con pCP20 para remover la resistencia, se observó una disminución del tamaño de los fragmentos provenientes de los *cassettes* integrados, debido a la escisión del gen *kan^R*. También se muestra un ejemplo de secuenciación (Figura 11).

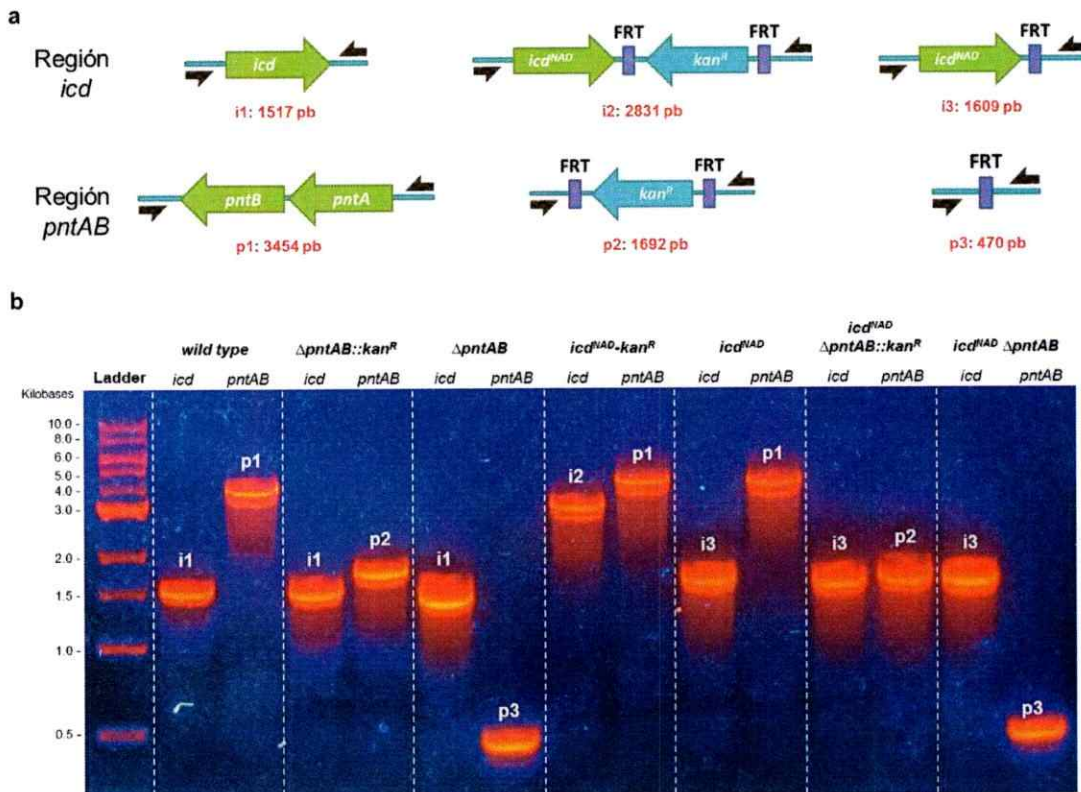


Figura 10. Verificación de la construcción de las cepas mediante PCR-colonia
 En (a) se muestran los esquemas de las regiones *icd* y *pntAB*, según la modificación que corresponda. Las flechas negras representan el posicionamiento de los partidores utilizados para la verificación de tamaños (Tabla 5). Bajo cada fragmento se indica su código de una letra y un número (i para *icd* y p para *pntAB*), y también el tamaño esperado. En (b) se muestra el gel obtenido de la electroforesis de los productos del PCR-colonia. El primer carril es el estándar de peso molecular (*Ladder*). Luego, cada par corresponde a una determinada cepa. El primero de cada par muestra la amplificación de la región del gen *icd*, mientras que el segundo muestra la del operón *pntAB*. Sobre cada banda se indica el código del esquema que le corresponde en (a).

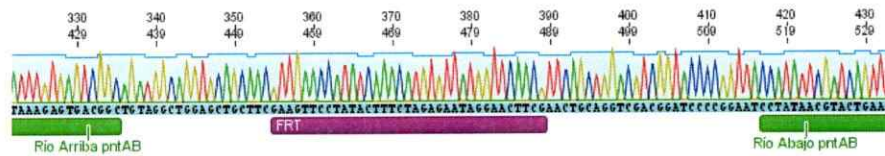


Figura 11. Verificación de la construcción de las cepas mediante secuenciación
 Se muestra como ejemplo el cromatograma de secuenciación de la región del operón *pntAB* de la cepa $\Delta pntAB$. Mediante alineamientos con las regiones correspondientes, se logró identificar la cicatriz FRT generada con el plásmido pCP20. Se destacan las regiones río arriba y río abajo del operón, y entre éstas la cicatriz que lo reemplaza.

3.2. Caracterización Fisiológica de las Cepas

El comportamiento metabólico de un organismo se puede simular con FBA al incorporar parámetros fisiológicos obtenidos experimentalmente (Orth y col., 2010). Por eso se determinó la tasa de crecimiento, el rendimiento y la tasa de consumo de acetato de las cepas construidas en este trabajo, durante la fase exponencial del crecimiento en acetato como única fuente de carbono.

3.2.1. Tasa de crecimiento

Cada cepa se cultivó en triplicado y se tomó una muestra cada 1 h para medir la OD_{600nm} . En la Figura 12 se muestra el curso temporal del incremento en biomasa y la regresión lineal del gráfico logarítmico para cada réplica.

Las cepas a las que se les reemplazó el gen *icd* por el gen *icd^{NAD}* se vieron mayormente afectadas en su tasa de crecimiento respecto a la cepa *wild type*, cayendo desde 0.196 a valores cercanos a 0.130 (aproximadamente, un 33% menos). Mientras que la cepa $\Delta pntAB$ no presentó una diferencia significativa con esta última, con un valor de 0.191 (con una diferencia de un 3%).

Por otro lado, al comparar la cepa *icd^{NAD}* con la *wild type*; y la cepa *icd^{NAD} $\Delta pntAB$* con la $\Delta pntAB$ (conservando el mismo fondo génico del operón *pntAB*), se tuvo que el reemplazo del gen *icd* en ambos casos generó una disminución de la tasa de crecimiento ($p\text{-value} < 0.01$). Mientras que al contrastar la cepa *icd^{NAD} $\Delta pntAB$* con la *icd^{NAD}*, y la cepa $\Delta pntAB$ con la *wild type* (conservando el mismo fondo génico del gen *icd*), se obtuvo que la delección del operón *pntAB* no provocó un efecto importante ($p\text{-value}$ de 0.06 y 0.34, para las respectivas comparaciones).

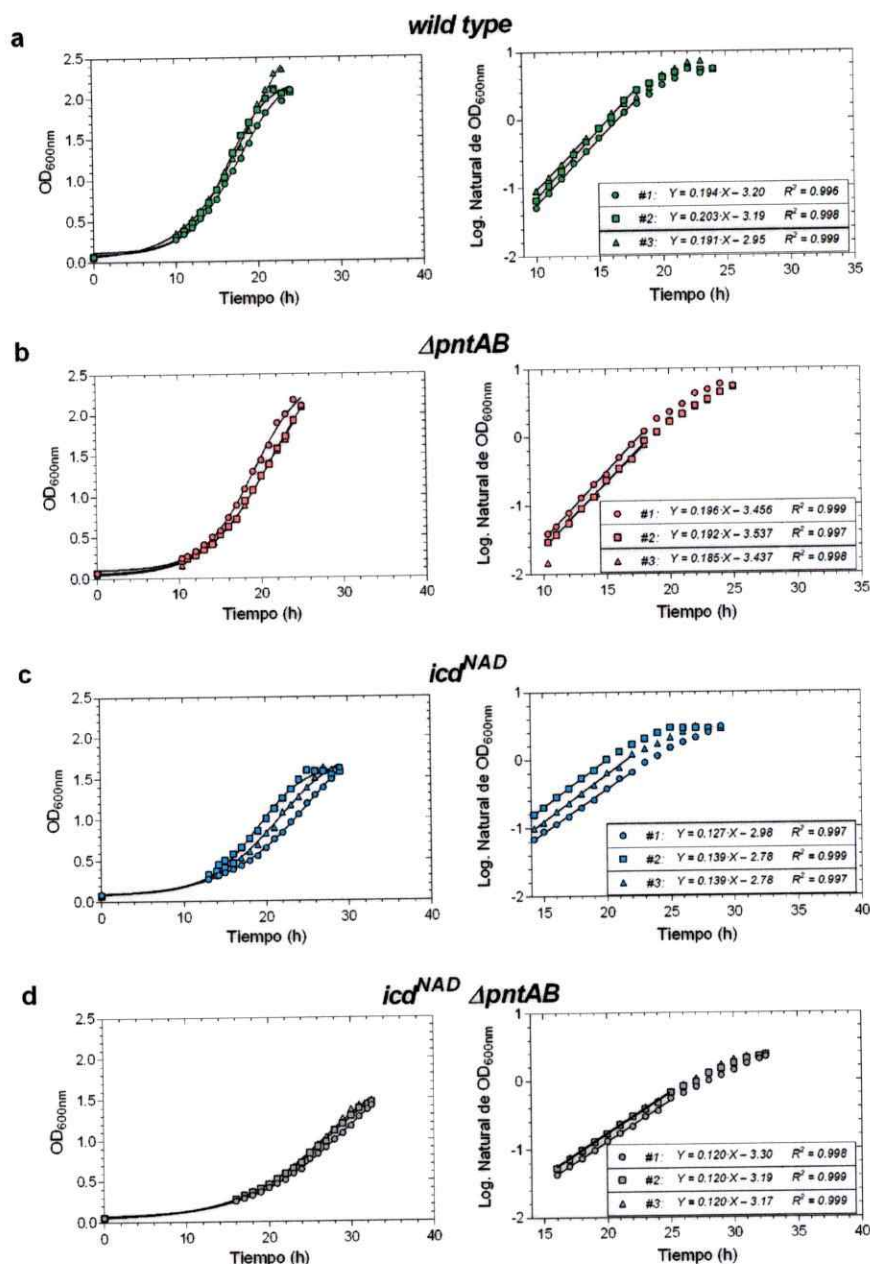


Figura 12. Curvas de crecimiento de las cepas

El curso temporal de la OD_{600nm} , se grafica con el eje de la ordenada en escala normal (izquierda) y escala logarítmica (derecha). Los gráficos muestran los triplicados biológicos de las cepas (a) *wild type*, (b) $\Delta pntAB$, (c) ica^{NAD} e (d) $ica^{NAD} \Delta pntAB$. En los distintos cultivos se muestreó principalmente la fase exponencial del crecimiento, pues en ésta se cumple de mejor forma el estado estacionario, esencial para el FBA. Bajo el gráfico logarítmico se muestran las regresiones de los puntos que presentaron una tendencia lineal para cada cultivo (rectas en el gráfico). La pendiente de cada ecuación corresponde a la tasa de crecimiento (μ) en unidades de h^{-1} .

3.2.2. Rendimiento y tasa de consumo de acetato

Para determinar la tasa de consumo de acetato se tomaron muestras a distintos tiempos que fueron analizadas mediante HPLC para determinar la concentración de acetato remanente en el medio de cultivo.

Sin embargo, para determinar el rendimiento y posteriormente la tasa de consumo de acetato, es necesario tener los valores de biomasa en unidades de gramos de peso seco por litro ($\text{gDW}\cdot\text{L}^{-1}$). Por este motivo, primero se determinó el coeficiente de conversión f ($\text{gDW}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{OD}^{-1}$) que relaciona la OD con el peso seco por litro. Para ello, junto con medir la absorbancia se tomaron simultáneamente muestras para masar la biomasa presente desde un mismo cultivo. Como se expone en la Figura 13, la pendiente de la regresión resultante correspondió a f .

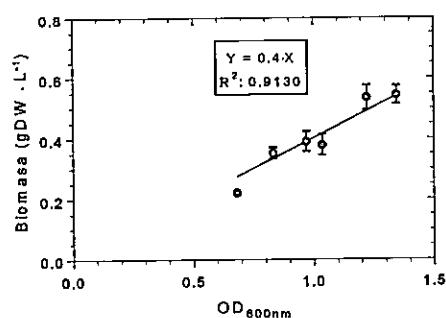


Figura 13. Determinación del factor de conversión de absorbancia a peso seco
Se muestra la correlación entre la biomasa medida a distintos tiempos de muestreo, luego de secar las muestras durante 24 h a 100°C , y la OD registrada en el cultivo en el momento de la obtención de la muestra. La masa se dividió por el volumen de la muestra secada. Los puntos rojos representan el promedio de las mediciones en triplicado técnico, y las barras negras la desviación estándar. En el recuadro se muestra la ecuación resultante de la regresión lineal. La pendiente corresponde al coeficiente de conversión f .

Se obtuvo un valor de f de $0,4 \text{ gDW}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{OD}^{-1}$, el cual se utilizó para transformar los valores de OD presentes en las curvas de crecimiento (Figura 12) a unidades de $\text{gDW}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para medir la concentración de acetato en las muestras tomadas desde los cultivos caracterizados en la sección anterior, primero se realizó una curva de calibración en el HPLC. Para esto, se inyectaron distintas muestras de medio M9 suplementadas con diferentes concentraciones de acetato de sodio en un rango entre 0 y $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. En la Figura 14 se muestran los cromatogramas y la pendiente obtenida para convertir el área bajo la curva en concentración de acetato.

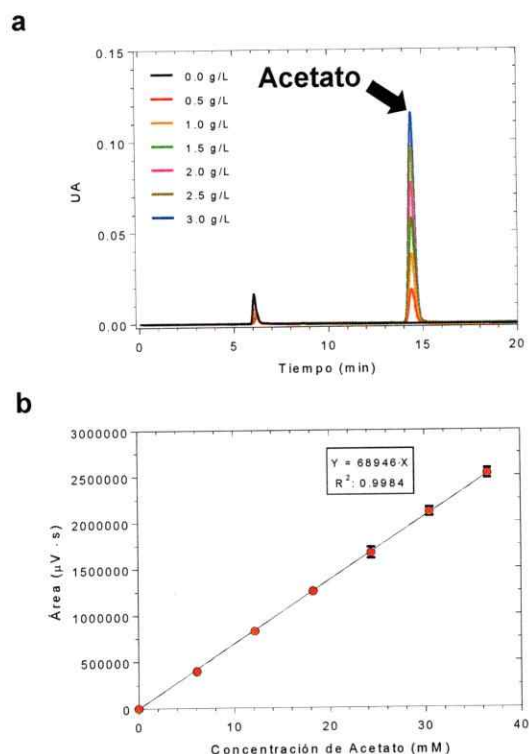


Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de acetato

En (a) se presentan los cromatogramas de diferentes concentraciones conocidas de acetato de sodio. La flecha negra señala el pico correspondiente a acetato. En (b) se muestra la relación entre el área bajo el pico de acetato y su concentración. Los círculos rojos representan el promedio del triplicado de la curva, mientras que las barras negras la desviación estándar. La ecuación obtenida de la regresión lineal se utilizó para calcular la concentración de acetato en las muestras de cultivo.

Se observó que el pico de acetato apareció luego de un tiempo de retención de 14.5 min aproximadamente y que el factor de conversión de concentración de acetato a área bajo la curva tiene un valor de $68946 \mu\text{V} \cdot \text{s} \cdot \text{mM}^{-1}$.

Posteriormente, se inyectaron las muestras obtenidas desde los cultivos caracterizados en la Figura 12 y empleando la curva de calibración se determinó la concentración de acetato en cada una. A continuación se muestran los gráficos de la concentración de acetato versus la biomasa por litro de cultivo, presente en cada tiempo de muestreo.

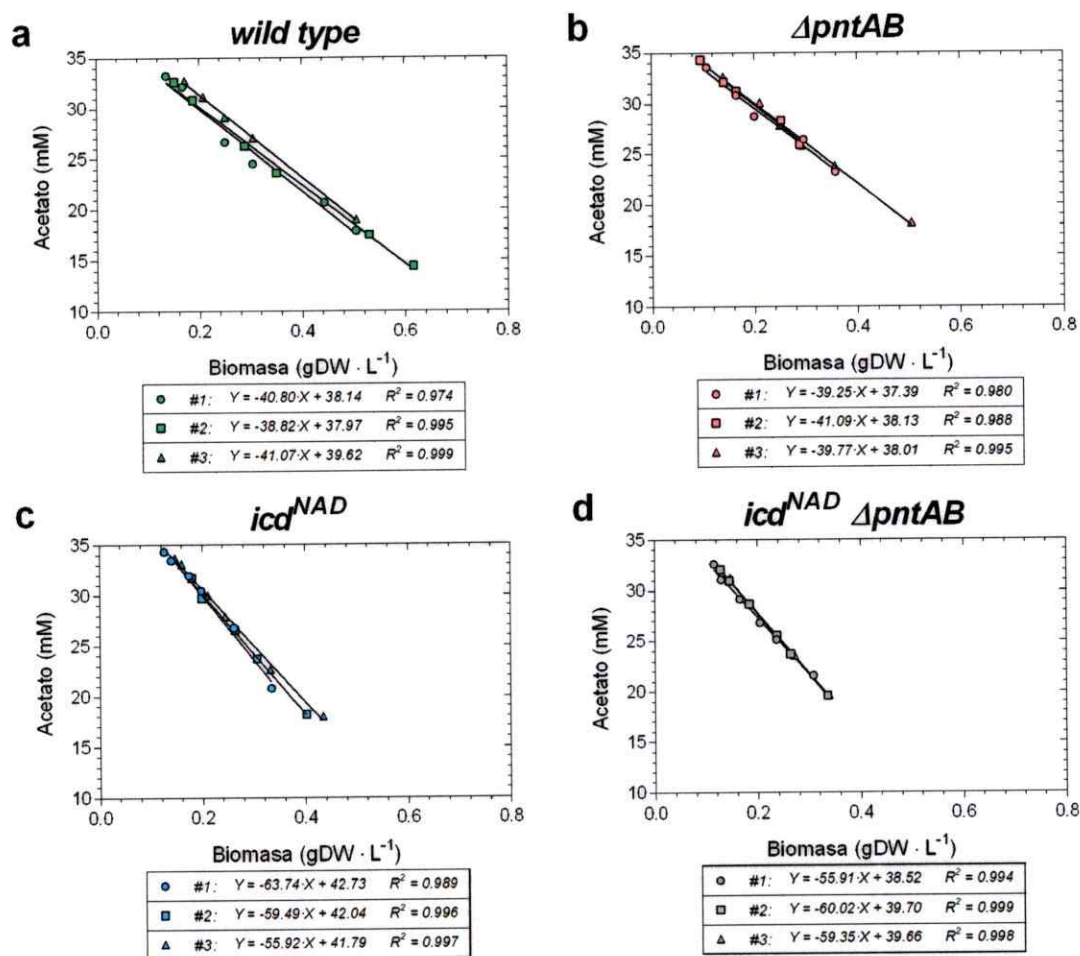


Figura 15. Determinación del rendimiento de producción de biomasa por acetato consumido

Se muestra la concentración de acetato en función de la concentración de biomasa en el medio de cultivo, para las cepas: (a) *wild type*, (b) $\Delta pntAB$, (c) icd^{NAD} e (d) $icd^{NAD} \Delta pntAB$. Los distintos puntos corresponden a la concentración de acetato y de biomasa en un mismo tiempo. Los gráficos muestran los triplicados biológicos para cada cepa con distintos símbolos. Se calculó la regresión lineal para cada réplica, donde la pendiente corresponde al recíproco del rendimiento.

La pendiente de la regresión obtenida en los gráficos de la Figura 15 corresponde al recíproco del rendimiento ($Y_{X/S}^{-1}$), de acuerdo con la Ecuación (7). Empleando la ecuación (8), con este valor y la tasa de crecimiento se puede calcular la tasa de consumo de acetato (Q_{ac}). En la Tabla 6 se muestran los valores obtenidos.

Tabla 6. Parámetros fisiológicos de las cepas de *E. coli* estudiadas, durante el crecimiento en acetato como única fuente de carbono

Cepa	μ (h^{-1})	$Y_{X/S}$ (gDW por mmol de acetato)	Q_{ac} (mmol·gDW ⁻¹ ·h ⁻¹)
<i>wild type</i>	0.196 ± 0.006 ^a	0.025 ± 0.001 ^a	7.88 ± 0.03 ^a
$\Delta pntAB$	0.191 ± 0.006 ^a	0.025 ± 0.001 ^a	7.6 ± 0.3 ^{a, b}
<i>icd^{NAD}</i>	0.135 ± 0.007 ^b	0.017 ± 0.001 ^b	8.0 ± 0.3 ^a
<i>icd^{NAD} ΔpntAB</i>	0.1203 ± 0.0002 ^b	0.0171 ± 0.0007 ^b	7.0 ± 0.3 ^b

Para cada cepa se detallan los valores de tasa de crecimiento (μ), rendimiento ($Y_{X/S}$) y tasa de consumo de acetato (Q_{ac}). Se muestra el promedio y la desviación estándar de observaciones realizadas en triplicado.
^a: Dentro de un mismo parámetro fisiológico, aquellos valores marcados con este superíndice no presentan diferencias significativas entre sí, en cambio, sí lo tienen con aquellos que sólo poseen uno diferente (p-value < 0.05).
^b: Representa lo mismo que el superíndice anterior.

De la misma forma a lo observado en la tasa de crecimiento, el rendimiento disminuyó significativamente ante el reemplazo del gen *icd* por el *icd^{NAD}*. Las cepas con dicha modificación mostraron los valores de $Y_{X/S}$ más bajos (un 32% menos). Por otro lado, la ausencia del operón *pntAB* no afectó el rendimiento al igual que como se observó con la tasa de crecimiento.

En el caso de la tasa de consumo de acetato, se tuvo que los valores menores corresponden a las cepas que no poseen el operón *pntAB*. Sin embargo, sólo fue significativa la disminución que presentó la cepa *icd^{NAD} ΔpntAB* respecto a las cepas *wild type* e *icd^{NAD}* (un 11% menos), no así con $\Delta pntAB$ (un 8% menos).

3.3. Análisis de Balance de Flujos

3.3.1. ATP de mantención

Junto con la tasa de consumo de acetato, se utilizó la tasa de crecimiento para restringir parámetros de cada modelo. En este escenario, no se optimizó el crecimiento, sino que en su lugar se calculó el ATP de mantención óptimo, que daría cuenta de las tasas determinadas experimentalmente. Previamente van Gulik & Heijnen (1995) utilizaron esta optimización en *S. cerevisiae* y *Candida utilis*. Sin embargo, el sentido biológico fue determinado por Schuetz y col. (2012), quienes a partir de la información experimental de 44 casos analizados por MFA, concluyeron que la mejor representación del comportamiento metabólico sería una superficie de Pareto que contempla la tasa de crecimiento, el ATPM y el flujo neto de la red. Por su parte, Chen y col. (2011) demostraron que el ATPM varía según las condiciones de crecimiento. Por todas estas razones, suponemos que también puede variar frente a contextos genéticos diferentes.

Luego de ejecutar el FBA, los valores obtenidos de ATPM fueron 1.6; 1.1; 16.5 y 13.8 mmol-gDW⁻¹·h⁻¹ para la cepa *wild type*, $\Delta pntAB$, icd^{NAD} e $icd^{NAD} \Delta pntAB$, respectivamente. Las cepas *wild type* y $\Delta pntAB$ presentaron los valores más bajos de ATPM, sin mayores diferencias entre ellas. En cambio, las que presentaron el gen icd^{NAD} tuvieron un valor de ATPM mayor que aquellas con el gen icd^{NADP} : 10.1 veces mayor en el contexto de que ambas cepas sean $pntAB^+$ y 12.6 veces en la situación $pntAB^-$. Al comparar las cepas con un mismo gen icd , pero distinta región $pntAB$, la mayor diferencia fue entre las icd^{NADP} con un 48% versus el 19% que hubo entre las icd^{NAD} . Los valores obtenidos por FBA se utilizaron para restringir el límite inferior de la reacción ATPM, y

así actualizar la información de ATPM en el modelo de cada cepa para los análisis posteriores.

3.3.2. Análisis de sensibilidad de la tasa de crecimiento y del rendimiento

Después de actualizar los modelos con los valores de ATPM, se realizó un análisis de robustez para ver el comportamiento de la tasa de crecimiento y del rendimiento ante variaciones en la tasa de consumo de acetato para cada cepa. Este flujo se varió en un rango entre 0 y 10 $\text{mmol} \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. En la Figura 16 se muestra el resultado del análisis.

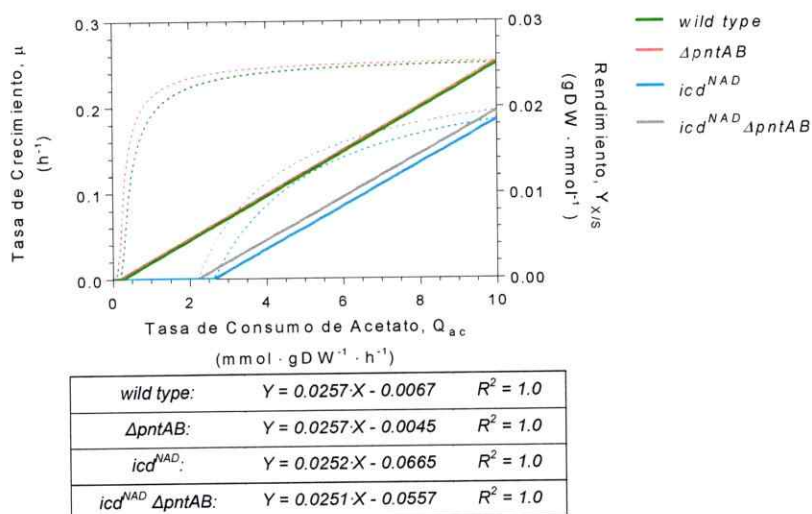


Figura 16. Dependencia de la tasa de crecimiento y del rendimiento con la velocidad de consumo de acetato

Análisis de robustez, donde se observa que la tasa de crecimiento (μ , líneas continuas) se incrementa linealmente con la tasa de consumo de acetato (Q_{ac}). Bajo el gráfico se presenta la regresión lineal de los valores de μ respecto a los de Q_{ac} . El rendimiento ($Y_{x/s}$, líneas segmentadas) se incrementa hiperbólicamente con Q_{ac} . Éste se obtuvo como resultado de la división de μ por su respectivo Q_{ac} . Cada cepa se representa según el color mostrado en la leyenda.

En la Figura 16, se puede apreciar que para todas las cepas se tuvo una pendiente similar de la tasa de crecimiento con el consumo de acetato, pero un coeficiente de posición en que las diferencias fueron mayores al comparar las cepas

icd^{NAD} con las icd^{NADP} . Además, las cepas con el gen icd^{NADP} (*wild type* y $\Delta pntAB$) mostraron una capacidad de crecimiento a menores flujos de consumo de acetato que aquellas con el gen icd^{NAD} (icd^{NAD} e $icd^{NAD} \Delta pntAB$).

Respecto al rendimiento (el cual se calculó a partir de la división de la tasa de crecimiento por la de consumo de acetato, como se muestra en la Ecuación (8) en la sección 2.4.3), en todos los casos se apreció un comportamiento hiperbólico ante la variación de la tasa de consumo de acetato. Al igual que con la tasa de crecimiento, se apreció que en las cepas icd^{NADP} el rendimiento comenzó a aumentar a valores de consumo de fuente de carbono menores que las icd^{NAD} .

Tanto en la cepa *wild type* como en la $\Delta pntAB$ rápidamente se alcanzó una saturación del rendimiento en un valor cercano a 0.025. Sin embargo, las cepas icd^{NAD} e $icd^{NAD} \Delta pntAB$ no alcanzaron la saturación en el rango de consumo de acetato analizado, reflejando un aumento más gradual. Es interesante notar que si la tasa de consumo de acetato es mayor que las registradas experimentalmente para estas cepas es posible obtener un rendimiento mayor que el obtenido desde los cultivos.

Si el acetato fuera completamente oxidado a través del ciclo de Krebs, se perderían dos átomos de carbono en forma de CO_2 , dejando sin sustrato a la red para la síntesis de componentes celulares. Sin embargo, la vía del glioxilato proporciona una bifurcación a nivel del isocitrato que permite desviar el flujo de carbono por este *bypass*, permitiendo el abastecimiento de energía y precursores de cuatro carbonos para la biosíntesis. Es por ello que, se realizó un análisis de robustez en tres dimensiones, denominado *Phenotype Phase Plane*, para ver el comportamiento del rendimiento de

cada cepa ante la variación del flujo de producción de isocitrato, y la variación del flujo desviado a la vía del glioxilato (Figura 17).

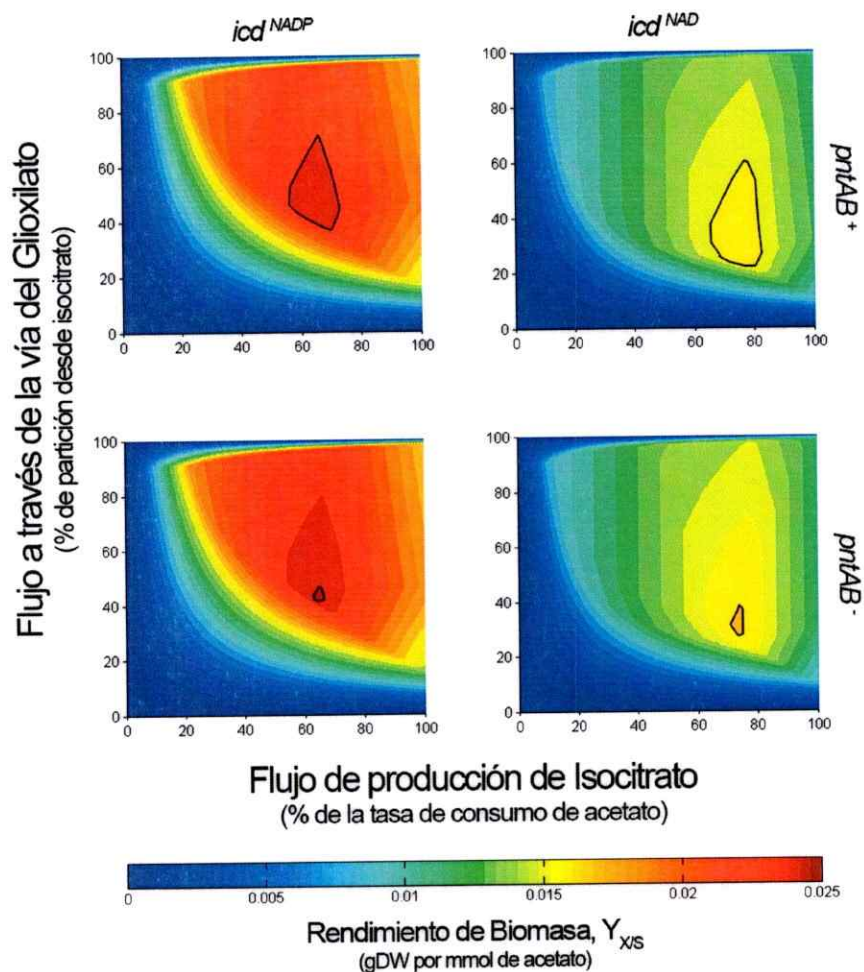


Figura 17. Rendimiento de biomasa de las cepas caracterizadas en función del flujo de formación de isocitrato y partición hacia la vía del glioxilato

Análisis de *Phenotype Phase Plane*, que muestra el comportamiento del rendimiento de biomasa (valores representados en colores en la barra inferior) ante la variación del flujo de formación de isocitrato (porcentaje del flujo de consumo de acetato determinado experimentalmente para la respectiva cepa) y la variación del flujo a través de la vía del glioxilato (porcentaje del flujo de consumo de isocitrato). Cada gráfico representa una cepa, estos se encuentran ordenados en columnas y filas, dando cuenta del tipo de gen *icd* que posee cada cepa (columnas) y de la presencia (+) o ausencia (-) del operón *pntAB* (filas). Las regiones con contornos negros en cada gráfico representan la zona de mayor rendimiento.

En la Figura 17 se observó que los modelos de las cuatro cepas presentaron una región común de combinaciones de flujos que permite el crecimiento en acetato (delimitada por el color celeste).

En relación con el flujo de producción de isocitrato, se vio que en todos los casos es necesario un flujo mínimo para permitir el crecimiento, mostrando que es esencial la actividad del ciclo de Krebs. Por otro lado, al observar el porcentaje del flujo que debe ser destinado a través de la vía del glioxilato, desde la bifurcación del isocitrato, se vio que a 0% de partición al *bypass* ninguna cepa crece; ocurriendo lo mismo a 100%. En el primer caso, se estaría dando la situación de que el flujo a través de la ICDH sería 100%, mientras que en el segundo 0%. De esta forma, se denotaría que es esencial que haya de una partición de flujos entre la ICL (comienzo de la vía del glioxilato) y la ICDH, y no exclusivamente un flujo por sólo una de estas dos.

A medida que aumentan los porcentajes de formación de isocitrato y de partición a glioxilato, se aprecia un aumento del rendimiento, alcanzando un máximo denotado por la región más intensa de cada gráfico (región óptima, destacada por el contorno negro de la Figura 17) y posteriormente una disminución de este óptimo.

Los valores de rendimiento fueron mayores en las cepas icd^{NADP} respecto a los de las cepas icd^{NAD} . No se apreció mayores diferencias entre cepas con la misma ICDH, por lo que la presencia o ausencia de *pntAB* no estaría afectando directamente el rendimiento. Sin embargo, se apreció que la ausencia de este operón provocó que la región óptima se acotara, alcanzando rendimientos levemente más altos que en su presencia (1% en el contexto icd^{NADP} , y 2% en icd^{NAD}).

Puesto que se ha visto que durante el crecimiento de *E. coli* en acetato existe una sobreproducción de NADPH y que ésta es compensada por la acción de la transhidrogenasa UdhA (Sauer y col. 2004), se evaluó el efecto del flujo a través de la vía del glioxilato sobre la actividad de UdhA y las implicancias que este *bypass* tendría en la tasa de crecimiento. Para esto se calculó la tasa de crecimiento óptima ante una determinada partición a ICL, luego se fijó este valor y se maximizó el flujo a través de UdhA. Este paso se repitió para cada porcentaje de partición (Figura 18).

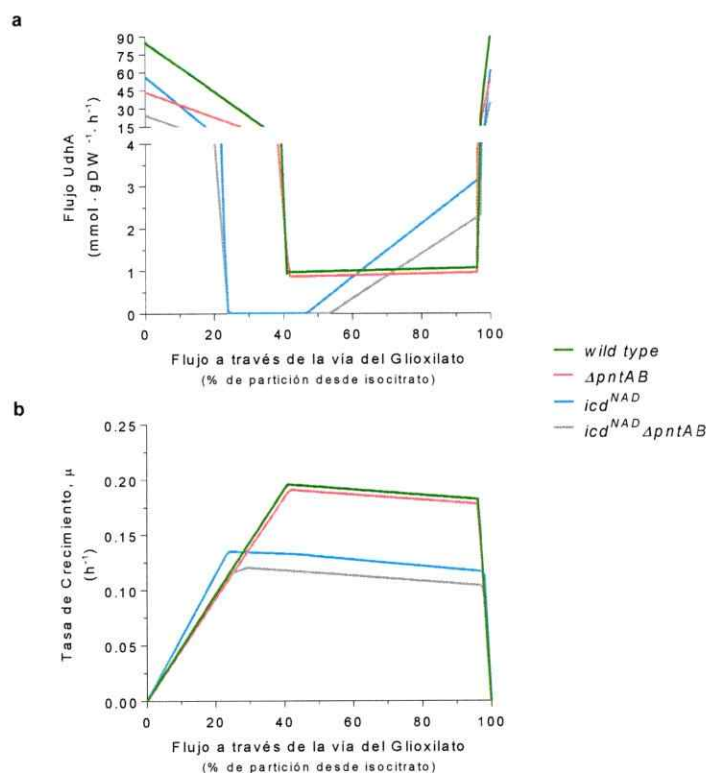


Figura 18. Efecto de la partición de flujo hacia la vía del glioxilato sobre la sobreproducción de NADPH

Análisis de robustez, donde se muestra la dependencia de (a) el flujo de la transhidrogenasa UdhA y (b) la tasa de crecimiento con el flujo a través de la vía del glioxilato (porcentaje del flujo de consumo de isocitrato). El flujo de la transhidrogenasa UdhA se calculó como el máximo permitido ante una tasa de crecimiento óptima para cada valor de partición a la vía del glioxilato. Cada cepa es representada por un color según la leyenda.

En la Figura 18a se aprecia que todas las cepas presentaron una zona de partición a glioxilato en que el flujo de UdhA fue mínimo. En las cepas *wild type*, $\Delta pntAB$, icd^{NAD} e $icd^{NAD} \Delta pntAB$ esta zona comprendió rangos de partición de 41 a 97, 43 a 97, 24 a 47 y 25 a 54%, respectivamente. En estos intervalos de flujo a glioxilato se puede considerar que hay una menor sobreproducción de NADPH, debido a que se generaría un balance entre su producción en las vías catabólicas y su consumo en las anabólicas. Por lo tanto, las cepas icd^{NADP} requieren una mayor partición que las icd^{NAD} para compensar el exceso de flujo de producción de NADPH. El menor valor de flujo de UdhA alcanzando por las cepas icd^{NADP} fue cercano a $1 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, mientras que por las icd^{NAD} fue $0 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

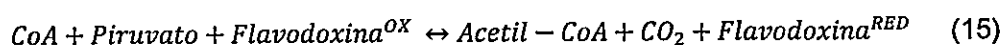
Para todas las cepas se vio que en la región de partición previa al mínimo, ocurre una disminución abrupta en los valores de flujo de UdhA ante un aumento de la partición a glioxilato. Mientras que en la posterior, todas las cepas presentaron un incremento, el que fue más gradual en las icd^{NAD} que en las icd^{NADP} .

El máximo valor de flujo de UdhA lo alcanzó la cepa *wild type* (con $91.5 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), y el menor lo tuvo la $icd^{NAD} \Delta pntAB$ ($35.1 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Lo que se puede entender como que la primera tuvo la mayor sobreproducción de NADPH y la segunda la menor.

Por último, se observó que las regiones de menor flujo de UdhA coinciden con las zonas de máximo crecimiento o de valores subóptimos de cada cepa (Figura 18b) y que el comportamiento de ésta tasa muestra lo mismo que en la Figura 17.

3.3.3. Distribuciones de flujos metabólicos

Una vez obtenida la distribución de flujos sin *loops*, según se describe en la sección 2.5.4. de Materiales y Métodos, se identificó que la reacción catalizada por la piruvato sintasa (POR5, Ecuación 15) se encontraba activa en el sentido de la fijación de CO₂.



Con el fin de evaluar este comportamiento, se realizó una búsqueda en la base de datos EcoCyc. Sin embargo, no se encontró información respecto de su reversibilidad *in vivo*. Por este motivo, para mejorar la coherencia con la fisiología bacteriana, se bloqueó el sentido inverso de POR5. Es decir, se fijó su límite inferior de flujo igual a cero (por lo que no puede estar activa en el sentido inverso) y se repitió todo el procedimiento descrito en la sección 2.5.4., para obtener una distribución de flujos depurada.

Posteriormente, tras incorporar las tasas determinadas experimentalmente (crecimiento y consumo de acetato), se optimizó el ATPM. De esta forma, fue posible obtener un conjunto de distribuciones de flujos óptimos, pero se escogió aquella que cumpliera con la minimización de los cuadrados de cada flujo de reacción (eliminación de *loops*). Esto se realizó para cada una de las cuatro cepas estudiadas en este trabajo.

Puesto que no se midió experimentalmente el consumo de oxígeno, dicho flujo también se calculó a partir de los pasos de optimización (Figura 7). Para esto se minimizó el flujo de consumo de oxígeno, representado por la maximización del flujo de la reacción EX_o2(e), ya que el consumo es representado por un flujo negativo.

En la Figura 19 se muestran las distribuciones de flujos predichas para cada cepa, para cada caso las velocidades de reacción fueron representadas como porcentaje de la tasa de consumo de acetato.

Las tasas de consumo de oxígeno calculadas fueron 7.30; 6.95; 10.17 y 8.81 mmol-gDW⁻¹·h⁻¹ para las cepas *wild type*, $\Delta pntAB$, *icd^{NAD}* e *icd^{NAD} ΔpntAB*, respectivamente. Como resultado de la obtención de las distribuciones de flujo, también se calcularon las tasas de producción de CO₂, siendo: 7.71; 7.36; 10.46 y 9.06 mmol-gDW⁻¹·h⁻¹ para las distintas cepas en el mismo orden anterior.

En este caso aquellas cepas con el gen *icd* silvestre presentaron un menor flujo a través del ciclo de Krebs que aquellas con el gen *icd^{NAD}*. Interesantemente, en aquellas con una ICDH NADP-dependiente se encontró activa la transhidrogenasa UdhA, no así en las que poseen la enzima NAD-dependiente. Por otro lado, la transhidrogenasa PntAB se vio activa en la cepa *icd^{NAD}*, no así en la cepa *wild type*. Junto a esto, la primera también presentó un menor flujo que el resto de las cepas, a través de vías anapleróticas: glioxilato, enzima málica y PEP-carboxiquinasa (PCK). Esto conllevó a que el flujo hacia gluconeogénesis en las cepas *icd^{NAD}* fuera menor.

Se vio que la cepa *icd^{NAD} ΔpntAB* presentó los principales cambios en redistribución de flujos, mostrando un aumento a través de la gluconeogénesis, inversión del sentido de flujo de la rama no-oxidativa de la vía de las pentosas fosfato y activación de la rama oxidativa de esta misma vía.

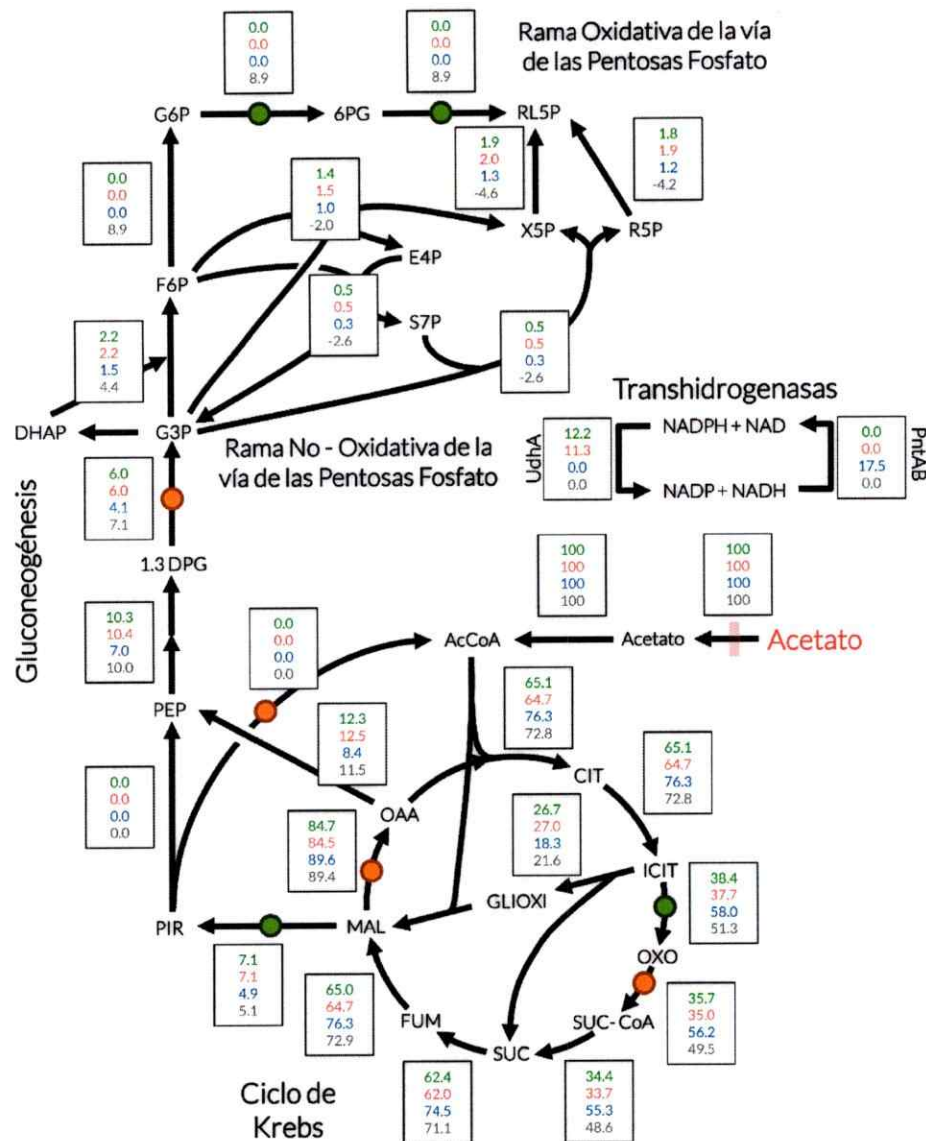


Figura 19. Distribución de flujos metabólicos simulada para cada cepa

Se muestra el mapa de las vías centrales de *E. coli* y las transhidrogenasas (UdhA y PntAB). Para el conjunto de reacciones (representadas por flechas) se muestran recuadros con cuatro valores. Estos corresponden al flujo de la respectiva reacción para cada cepa, expresado como porcentaje de la tasa de consumo de acetato determinada experimentalmente. Los flujos se muestran en colores según la cepa a la que corresponden: *wild type*, $\Delta pntAB$, icd^{NAD} e $icd^{NAD} \Delta pntAB$. Cuando el sentido de la reacción es opuesto al de la flecha, el número es negativo. Los círculos representan las deshidrogenasas en la red; el color verde indica especificidad por NADP y el rojo por NAD. Sólo se muestra la enzima mágica NADP-dependiente (la única activa). En la Lista de Abreviaturas se encuentran los metabolitos representados en la figura.

En la bifurcación de isocitrato, se observó que la partición se encuentra en la región óptima de las distintas cepas (Figura 17). En la Tabla 7 se muestran los porcentajes de partición en este nodo.

Tabla 7. Partición de flujos a partir de la bifurcación de isocitrato

Cepa	Partición a ICL (vía del glioxilato)	Partición a ICDH
<i>wild type</i>	41%	59%
Δ <i>pntAB</i>	42%	58%
<i>icd^{NAD}</i>	24%	76%
<i>icd^{NAD} ΔpntAB</i>	30%	70%

Los valores representan un porcentaje del flujo de conversión de citrato a Isocitrato. Estos resultados corresponden a la partición óptima predicha para cada caso (Figura 19).

Las cepas con una ICDH NADP-dependiente presentaron una mayor partición a la vía del glioxilato, con valores similares entre ellas (aproximadamente un 35% más que las otras). Por otra parte, la cepa *icd^{NAD} ΔpntAB* presentó un aumento de partición hacia ICL respecto de la *icd^{NAD}* (un 24% más). Si bien en las cuatro cepas el flujo a través de la ICDH fue mayor que en la ICL, cuando esta deshidrogenasa es específica por NADP su flujo es menor que la forma preferente por NAD.

3.3.4. Tasa de producción de metabolitos

Para cada cepa, a partir la distribución de flujo obtenida se calculó la tasa de producción de distintos metabolitos (equivalente a la tasa de consumo; ver sección 2.5.5.): intermediarios de las vías centrales, cofactores y aminoácidos (Tabla 8).

Se pudo ver que independiente de la distribución de flujo de los diferentes modelos, la producción de glioxilato por unidad de biomasa se mantuvo en valores cercanos entre las distintas cepas. Por el contrario, se vio un aumento de la producción de metabolitos como acetil-CoA, 2-oxoglutarato e isocitrato en aquellas cepas con una

ICDH NAD-dependiente. En el caso de la ribosa 5-fosfato, la cepa *wild type* tuvo la menor producción, mientras que en la cepa *icd^{NAD} ΔpntAB* presentó la mayor producción. Las cepas *ΔpntAB* e *icd^{NAD}* presentaron valores similares entre sí e intermedios a las dos cepas anteriores. Al generarse desde precursores más reducidos que el acetil-CoA, su producción daría cuenta de la redistribución y/o adaptación de la célula para mantener el balance ante las modificaciones realizadas y el crecimiento en acetato como única fuente de carbono.

En el caso de cofactores como el ATP y ADP, los valores de producción fueron diferentes. Estos aumentaron en las cepas con el gen *icd^{NAD}*, respecto a las con el gen *icd^{NADP}*. Lo mismo ocurrió para NADPH y NADH, en cambio, AMP presentó el mayor sólo en la cepa *wild type*, mientras que el resto mantuvo el mismo valor.

Respecto a la producción de aminoácidos, se observó que el valor siempre fue el mismo sin importar la cepa, dando cuenta de que su producción sólo estaría respondiendo a la demanda para la producción de biomasa.

Tabla 8. Resumen de tasas de producción de distintos metabolitos para cada cepa

Metabolito	Nombre	<i>wild type</i>	Δ <i>pntAB</i>	<i>icd</i> ^{NAD}	<i>icd</i> ^{NAD} Δ <i>pntAB</i>
Intermediarios					
accoa	Acetil-CoA	40.787	40.373	59.924	58.879
akg	2-Oxoglutarato	22.899	22.485	41.872	37.338
glx	Glioxilato	10.754	10.754	10.835	12.580
icit	Isocitrato	26.175	25.762	45.230	42.441
r5p	Ribosa 5-Fosfato	0.934	2.626	2.626	4.146
Cofactores					
adp	ADP	126.644	122.908	258.768	254.007
amp	AMP	3.389	1.692	1.692	1.692
atp	ATP	125.880	124.574	260.460	255.699
nadh	NADH	56.097	54.856	123.623	113.484
nadph	NADPH	19.250	18.837	14.271	14.244
Aminoácidos					
ala-L	Alanina	0.583	0.583	0.583	0.583
arg-L	Arginina	0.296	0.296	0.296	0.296
asn-L	Asparagina	0.241	0.241	0.241	0.241
asp-L	Aspartato	2.928	2.928	2.928	2.928
cys-L	Cisteína	0.248	0.248	0.248	0.248
gln-L	Glutamina	1.811	1.811	1.811	1.811
glu-L	Glutamato	10.104	10.099	10.099	10.099
gly	Glicina	1.117	1.115	1.115	1.115
his-L	Histidina	0.095	0.095	0.095	0.095
ile-L	Isoleucina	0.291	0.291	0.291	0.291
leu-L	Leucina	0.451	0.451	0.451	0.451
lys-L	Lisina	0.343	0.343	0.343	0.343
met-L	Metionina	0.155	0.155	0.155	0.155
phe-L	Fenilalanina	0.185	0.185	0.185	0.185
pro-L	Prolina	0.221	0.221	0.221	0.221
ser-L	Serina	1.718	1.718	1.718	1.718
thr-L	Treonina	0.544	0.544	0.544	0.544
trp-L	Triptófano	0.057	0.057	0.057	0.057
tyr-L	Tirosina	0.138	0.138	0.138	0.138
val-L	Valina	1.005	1.005	1.005	1.005

Valores de producción (equivalentes al consumo) simulados para metabolitos intermediarios de vías como el ciclo de Krebs, vía del glioxilato y ruta de las pentosas fosfato. Se muestran también los principales cofactores orgánicos y los 20 aminoácidos. Los valores se expresan como mmol·gDW⁻¹ y no con unidades de flujos (mmol·gDW⁻¹·h⁻¹), ya que el flujo neto se normalizó al dividirlo por la tasa de crecimiento de la respectiva cepa.

Por otro lado, se desglosó el flujo de producción neto de los cofactores NADPH y NADH en las reacciones con mayor aporte a su producción con el fin de entender cómo cambió la distribución de flujos a modo de compensar el desbalance redox impuesto en las distintas cepas ante las modificaciones genómicas realizadas. En la Figura 20a se muestran los puntos de producción de NADPH y en 20b los de NADH. También, se expone la cantidad y/o proporción con la que cada uno de estos aporta al flujo de producción total en la respectiva cepa.

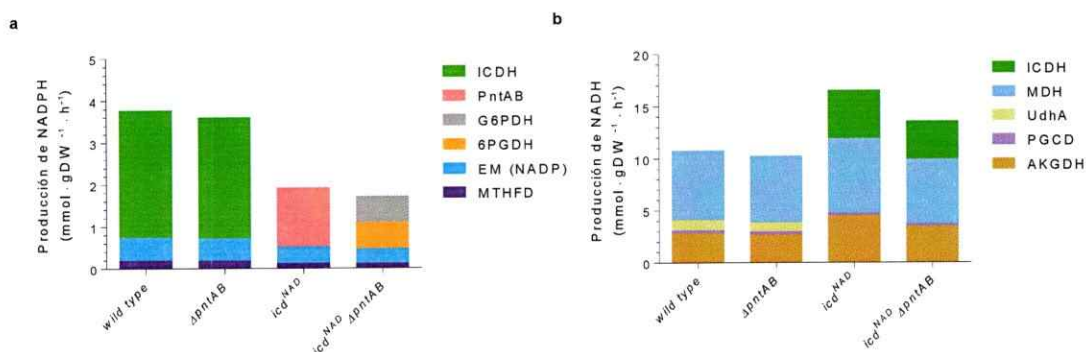


Figura 20. Contribución de diferentes puntos de producción de NADPH y NADH
 En la leyenda se muestran las principales reacciones que contribuyen a la producción de (a) NADPH y (b) NADH, en la respectiva cepa. El código de las reacciones se detalla en la Lista de Abreviaturas.

En la Figura 20 se aprecia que entre la cepa *wild type* y $\Delta pntAB$ hay sólo un 4% de diferencia en el flujo neto de producción de NADPH (3.77 y 3.60 mmol·gDW⁻¹·h⁻¹, respectivamente). De la misma forma ocurre entre la cepa *icd^{NAD}* e *icd^{NAD} ΔpntAB* (1.93 y 1.71 mmol·gDW⁻¹·h⁻¹, respectivamente), con una diferencia de un 12%. Sin embargo, la diferencia ocurre al comparar las cepas según su gen *icd*. Aquellas con una ICDH NADP-dependiente mostraron en promedio el doble de flujo de producción de NADPH que las cepas con la enzima que utiliza NAD. En relación a las vías específicas que contribuyen a la producción de NADPH, se aprecia que entre las cepas *icd^{NADP}* no existió una mayor diferencia, ni tampoco en la proporción en que estas lo hacen. Sin embargo, entre las cepas *icd^{NAD}* sí se observa un comportamiento distinto debido a la ausencia de PntAB, lo que generó una compensación a nivel de la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, a la producción de NADPH.

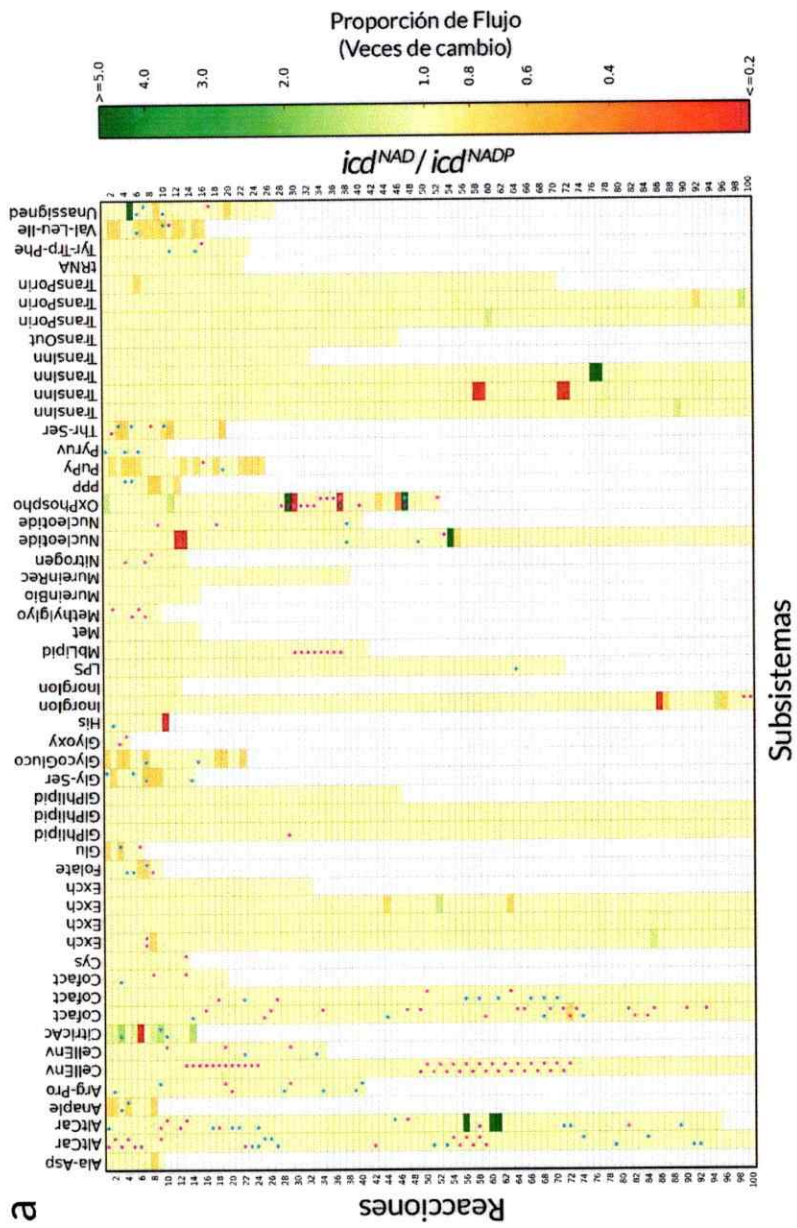
En el caso del flujo neto de producción de NADH al analizar la cepa *wild type* y $\Delta pntAB$ ocurre lo mismo, hay sólo un 5% de diferencia (11.0 y 10.5 mmol·gDW⁻¹·h⁻¹, respectivamente). Sin embargo, esta vez entre la cepa *icd^{NAD}* e *icd^{NAD} ΔpntAB* sí existe un cambio considerable (16.7 y 13.7 mmol·gDW⁻¹·h⁻¹, respectivamente), de un 22%.

Entre las distintas cepas no se vio una mayor diferencia en las vías que aportan a la producción de NADH, salvo el aporte debido al cambio de especificidad. Por otro lado, en las cepas *icd^{NAD}* se observó un leve aumento del flujo a través de la enzima malato deshidrogenasa, en el mismo valor que presentó la transhidrogenasa UdhA en las cepas con el gen *icd^{NADP}* para la producción de NADH. Ante el reemplazo de la ICDH, también se ve un aumento de la contribución de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa.

Todas las cepas presentaron enzimas en común que contribuyeron a la producción de estos cofactores: Para NADPH estas fueron la enzima málica y la metileno tetrahidrofolato deshidrogenasa (MTHFD), mientras que para NADH lo fue la malato deshidrogenasa, la fosfoglicerato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa.

3.3.5. Análisis *Flux-Array*

Esta herramienta fue desarrollada en este trabajo para determinar los principales cambios de distribución de flujos a nivel de modelo completo, entre las distintas cepas. En este caso, se compararon los flujos normalizados (o divididos) por la tasa de consumo de acetato determinada experimentalmente para cada cepa. Con el fin de abordar el efecto del cambio de especificidad, se comparó la condición *icd^{NAD}* respecto de la *icd^{NADP}* (cepa *wild type*) y paralelamente la cepa *icd^{NAD} ΔpntAB* respecto de la *icd^{NADP} ΔpntAB* (cepa *ΔpntAB*). En la Figura 21 se muestran los cambios más importantes notándose que ciertas vías aumentan o disminuyen su flujo. En las Tablas A2 y A3 presentes en el Anexo 7.3. se muestran los valores de cambio para todas las reacciones que lo hicieron.



2

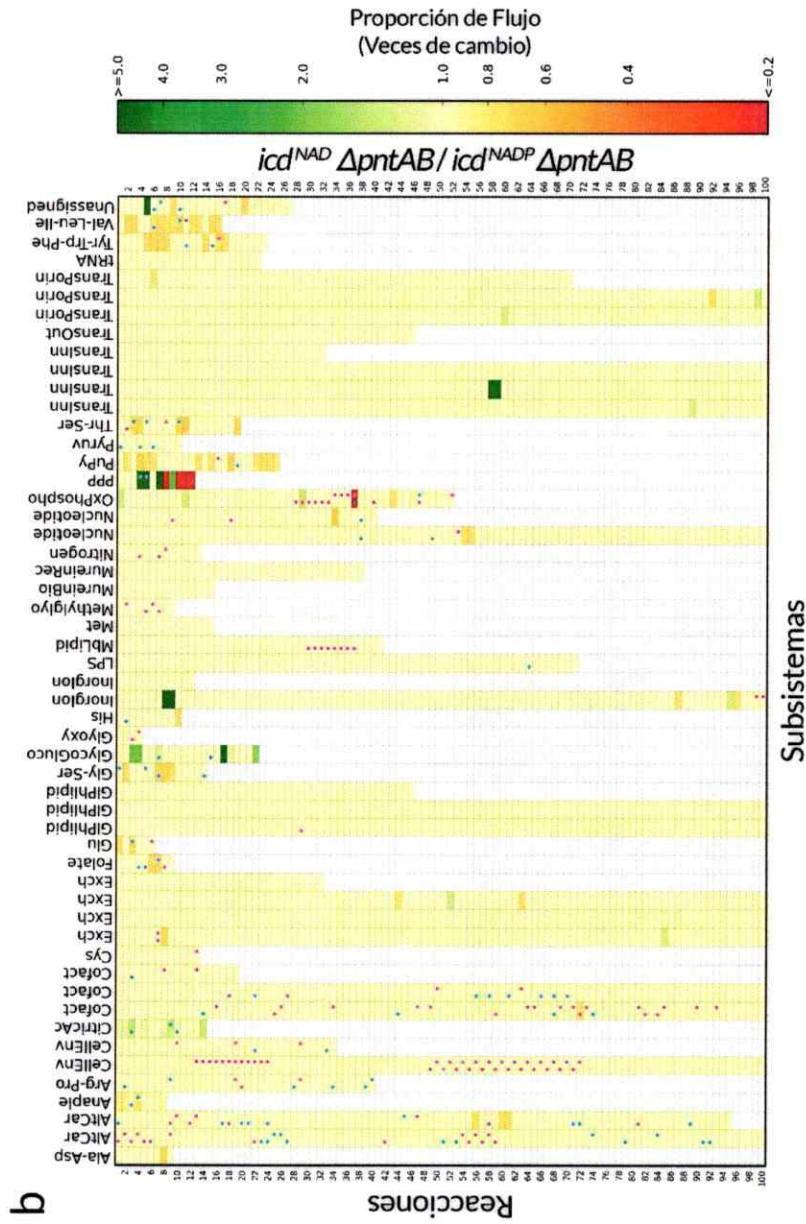


Figura 21. Análisis Flux-Array para detectar los cambios de distribución entre cepas con icd^{NAD} y con icd^{NADP}
 En cada matriz se representan los cambios de flujos para cada reacción, ordenada en columnas según la vía metabólica (o subsistema) en la que participa. El número de veces de cambio entre la condición de comparación respecto de la referencia se representa por un color según la barra de la derecha. La matriz en (a) muestra los cambios de la cepa icd^{NAD} (comparación) respecto de la *wild type* (referencia), mientras que la matriz en (b) muestra los cambios de la cepa icd^{NAD} ($\Delta pntAB$ (comparación) respecto de la $\Delta pntAB$ (referencia). Si la celda presenta un círculo en su interior y se encuentra a la izquierda o a la derecha, en la reacción participa NADH o NADPH, respectivamente. El color rosado indica consumo, mientras que el celeste producción.

Entre los principales cambios se observa una disminución del flujo a través de la transhidrogenasa UdhA y un aumento del flujo a través de la fosforilación oxidativa, para ambas cepas *icd^{NAD}*.

De manera individual, la cepa *icd^{NAD}* difirió principalmente de la *wild type* en que tiene más activo el ciclo de Krebs, utilizó en menor medida vías anapleróticas como la del glioxilato y la enzima málica, presentó un menor flujo a través de la gluconeogénesis y por esto también en la vía de las pentosas fosfato, no hubo flujo en la transhidrogenasa UdhA, pero sí en PntAB. Por otro lado, presentó una leve disminución de flujos en vías relacionadas con síntesis de valina, leucina e isoleucina; glicina y serina, metabolismo de folatos, treonina y lisina; y otras relacionadas con la síntesis de purinas y pirimidinas, pero sin afectar y/o variar mayormente el flujo neto de producción de estos metabolitos.

La cepa *icd^{NAD} ΔpntAB* se diferenció principalmente de *ΔpntAB* en que también tuvo un ciclo de Krebs más activo, un menor uso de vías anapleróticas como la del glioxilato y la enzima málica, pero en este caso se presentó un mayor flujo a través de la vía de gluconeogénesis. A diferencia de las otras cepas, ésta presentó actividad importante en la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (cerca de un 9% del flujo de carbono), y por esto mismo tuvo una reversión del sentido de la rama no-oxidativa. No mostró una UdhA activa, y tampoco PntAB debido a la delección. De la misma manera que el par de cepas anteriormente comparado, tuvo una leve disminución de flujos en vías relacionadas con síntesis de valina, leucina e isoleucina; glicina y serina, metabolismo de folatos, treonina y lisina; y otras relacionadas con la síntesis de purinas y pirimidinas.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizó FBA para comprender las capacidades metabólicas de las cepas de *E. coli* descritas en la Tabla 2. Este método necesita de la optimización de una función objetivo, lo cual implica la premisa sesgada de que los organismos evolucionaron hacia la optimización de las propiedades de su metabolismo (Bordbar y col., 2014). Sin embargo, Schuetz y col. (2012), a partir de la información experimental de 44 casos analizados por MFA, concluyeron que la mejor representación del comportamiento metabólico sería una superficie de Pareto definida por la combinación de tres objetivos: maximizar la generación de biomasa, maximizar el rendimiento de ATP y minimizar el flujo neto a través de la red metabólica. Desde este resultado, también observaron que los organismos presentaron un crecimiento más bien sub-óptimo respecto a dicha superficie, lo que les permitiría una rápida adaptación a las perturbaciones ambientales.

Para cada cepa generada fuimos capaces de medir la tasa de crecimiento, el rendimiento y la tasa de consumo de acetato; parámetros que se utilizaron para restringir los respectivos modelos. Considerando las tres funciones objetivos que describen la superficie de Pareto, en nuestro caso la maximización de la generación de biomasa estaría dada por la tasa de crecimiento en fase exponencial medida experimentalmente, por lo que para acercarnos a la aproximación de Schuetz y col., la optimización empleada en este trabajo buscó maximizar el rendimiento de ATP (flujo de la reacción ATPM) junto a la minimización del flujo neto de la red (como se muestra en la Ecuación 13, Materiales y Métodos). De esta forma buscamos obtener una distribución de flujos que nos permitiera interpretar las capacidades metabólicas de *E. coli* durante el crecimiento en

acetato como única fuente de carbono, enfocándonos en la bifurcación del isocitrato y en el impacto de la especificidad por NAD(P) de su ICDH.

4.1. La presencia de una ICDH NAD-dependiente tiene un impacto negativo sobre la fisiología de *E. coli* durante su crecimiento en acetato

La primera aproximación al efecto que tiene el cambio de especificidad de la ICDH de *E. coli* fue a través de la tasa de crecimiento y el rendimiento de biomasa. En la Tabla 6 se observa que disminuyeron significativamente en las cepas con el gen *icd^{NAD}*, respecto a aquellas con el gen *icd* silvestre (*icd^{NADP}*). No se observó el mismo efecto respecto de la presencia o ausencia de PntAB, lo que coincide con lo visto en el estudio de Sauer y col. (2004), donde las cepas *wild type* y $\Delta pntAB$ tuvieron la misma tasa de crecimiento en acetato (0.2 h^{-1}). Lo anterior sugiere que el impacto sobre dichos parámetros fisiológicos se debe al cambio de especificidad de la ICDH. Esto se condice con lo observado por Zhu y col. (2005): la aparición de estas enzimas específicas por NADP fue una adaptación que permitió el crecimiento en acetato. Interesantemente, estos autores observaron que los organismos capaces de crecer en acetato necesitan una bifurcación en el nodo del isocitrato (isocitrato deshidrogenasa versus vía del glioxilato), de manera que los átomos de carbono del acetato no se pierden por descarboxilación. Diferentes bifurcaciones en las vías centrales presentan enzimas productoras de NADPH en una de sus ramas (vía de las pentosas versus glicólisis, enzima málica versus malato deshidrogenasa). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que cuando una bifurcación que contiene una deshidrogenasa en una de sus ramas no presenta especificidad por NADP, ocurre un efecto negativo en el crecimiento de la bacteria. Otros resultados de nuestro laboratorio apoyan esta observación (Olavarría y col. 2014).

Sin embargo, existen diferencias entre nuestros resultados y los observados por Zhu y col. Estos autores expresan el efecto del cambio de especificidad de ICDH como el cociente de las velocidades de crecimiento $\mu_{icd}^{NAD} / \mu_{wild\ type}$. En nuestro caso el cociente fue de 0.69, mientras que el de ellos fue 0.96. Respecto del cociente $\mu_{icd}^{NAD} / \mu_{\Delta pntAB}$ obtuvimos 0.63, comparado con 0.73 observado por ellos. También, las tasas de crecimiento que registraron para las cepas *wild type* e *icd^{NAD}* son más de un 70% mayores que las nuestras (sus tasas fueron de 0.35 y 0.34 h⁻¹ respectivamente; las que se muestran en el estudio de Wang y col., 2011). Una posible explicación a todo lo anterior, es la diferencia del protocolo de cultivo, ya que en la investigación de Zhu y col. utilizaron MOPS suplementado con acetato 338 mM, mientras que nosotros ocupamos M9 con acetato 37 mM. Importantemente, los valores de μ que registramos para la cepa *wild type* resultaron ser cercanos a los observados por otros investigadores que utilizaron condiciones de cultivo similares a las nuestras (en la Tabla 1, los estudios de Thakur y col. en 2010 y de Sauer y col. en 2004).

Lamentablemente, Zhu y col. no reportan los valores de rendimiento y tasa de consumo de acetato, lo cual hubiera sido útil para comparar con el comportamiento observado en la Figura 16, donde se evaluó *in silico* el cambio de la tasa de crecimiento y del rendimiento de cada cepa ante la variación de la tasa de consumo de acetato. La regresión lineal presente en esta figura muestra la tendencia de μ propuesta anteriormente por Pirt (1982):

$$\mu = \gamma_{X/S}^{MAX} \cdot Q_{ac} - m \quad (16)$$

Donde μ corresponde a la tasa de crecimiento, representada en función de la tasa de consumo de acetato (Q_{ac}). La pendiente es el rendimiento máximo ($\gamma_{X/S}^{MAX}$) y el

coeficiente de posición es la constante de mantención (**m**). En este caso, la diferencia entre las tasas de crecimiento podría explicarse por una diferencia a nivel de tasa de consumo de acetato.

Por otro lado, si consideramos que el rendimiento equivale a la división de μ por Q_{ac} se tiene:

$$Y_{X/S} = Y_{X/S}^{MAX} - \frac{m}{Q_{ac}} \quad (17)$$

La disminución del rendimiento ($Y_{X/S}$) observado en las cepas icd^{NAD} en comparación con las icd^{NADP} también podría estar explicado por la tasa de consumo de acetato, ya que si dicho valor en estas cepas fuera mayor a los registrados experimentalmente, el coeficiente $\frac{m}{Q_{ac}}$ se haría más pequeño y por ende, las cepas podrían alcanzar el rendimiento máximo, que fue similar en todas las cepas (cerca de 0.025). Así, todas las cepas tendrían el mismo potencial de crecimiento máximo. Esto explicaría por qué el grupo de Zhu y col. no observó una mayor diferencia a altas concentraciones de acetato entre las cepas icd^{NAD} y *wild type*, ya que de acuerdo con lo propuesto por Monod (1949): la tasa de crecimiento depende de la concentración de la fuente de carbono en el medio.

4.2. El cambio de especificidad de la ICDH genera un aumento del gasto energético destinado a la mantención celular

En la Figura 16 se aprecia un corrimiento de las rectas que representan el comportamiento de la tasa de crecimiento respecto al consumo de acetato. Las icd^{NAD} se ubicaron más a la derecha respecto de las icd^{NADP} . Como se muestra en la Ecuación (16), esto ocurre porque las primeras tienen un valor más alto de m . Mientras más grande

sea este valor, se requiere destinar una mayor proporción del total de fuente de carbono que ingresa a la célula a funciones de mantención. Este fenómeno se refleja también en el ATPM simulado, que fue mayor en las cepas *icd^{NAD}*. A su vez, al comparar las dos cepas que poseen una misma ICDH, se apreció que este valor fue menor en las que no poseen la transhidrogenasa PntAB. Esto resulta interesante, puesto que se aprecia un comportamiento similar al comparar los valores de Q_{ac} , la disminución del consumo de acetato podría deberse a que, de acuerdo al valor de ATPM, se necesita una menor cantidad destinada a la formación de ATP para la mantención celular.

En uno de los modelos propuestos por Pirt (1982) se menciona que la energía requerida para la mantención disminuye proporcionalmente con el aumento de la tasa de crecimiento, por lo que aquellos organismos que crecen más rápido requieren una menor cantidad de ATPM. Nuestros resultados se ajustan a lo anterior, puesto que las cepas *icd^{NADP}* son las que crecen más rápido y las que presentaron menores valores de ATPM simulados, mientras que las *icd^{NAD}* poseen menores tasas de crecimiento y una mayor demanda de ATPM.

Resulta interesante notar que los valores obtenidos de ATPM para las cepas *icd^{NADP}* rondan valores entre 1 y 2 $\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Se observa una diferencia importante al compararlos con los 11.5 $\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de flujo de ATPM que serían necesarios a una tasa de crecimiento como la registrada experimentalmente (Varma & Palsson, 1993). Del mismo modo, al compararlos con el valor actualizado en 2007 por Feist y col. (8.4 $\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), la magnitud sigue siendo significativamente menor. Sin embargo, nuestros valores se acercan más al ATPM de 3.2 $\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, el cual fue determinado experimentalmente por Taymaz-Nikerel y col. (2010) y al descrito en la reconstrucción metabólica de Orth y col. (2011), con un valor de 3.15 $\text{mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.



Por el contrario, los valores de las cepas *icd^{NAD}* se encuentran por encima de todos los valores ya registrados para las cepas *icd^{NADPH}*, acercándose más al mencionado por Varma y Palsson.

Independiente de las diferencias entre los valores simulados con los calculados por otros investigadores, Varma y Palsson (1993) proponen que es importante establecer un valor de ATPM apropiado para obtener una distribución de flujos que refleje lo registrado experimentalmente. En dicha publicación, ellos también mencionan que si el ATPM fuera cero, el rendimiento esperado sería cercano a 0.026 gDW por mmol de acetato, mientras que para valores de 12 mmol·gDW⁻¹·h⁻¹, el valor de $Y_{X/S}$ se acercaría a 0.017 gDW por mmol de acetato. Al contrastar esto con nuestros resultados, se observa que las cepas *icd^{NADP}* presentaron un rendimiento de 0.025 gDW por mmol de acetato y sus ATPM se aproximan más a 0 que a 12 mmol·gDW⁻¹·h⁻¹; mientras que las cepas *icd^{NAD}* tuvieron un rendimiento de 0.017 gDW por mmol de acetato y sus ATPM se acercan más al segundo valor. Por lo tanto, la tendencia de los resultados concuerda con lo reportado.

4.3. Durante el crecimiento en acetato, la vía del glioxilato no sólo evita la pérdida de CO₂ en favor de la biosíntesis, sino que también afecta el balance de NADPH

La importancia de la vía del glioxilato durante el crecimiento en acetato ha sido mostrada previamente (Kornberg, 1966). La delección del gen que codifica a ICL, la primera enzima de la vía, provoca que *E. coli* no sea capaz de crecer en esta fuente de carbono. Sin embargo, al evaluar esta delección en las simulaciones no se apreció el mismo comportamiento debido a que la reacción catalizada por la piruvato sintasa (POR5, sección 3.3.3) se encontraba activa en el sentido de la fijación de CO₂ (Ecuación 15). Al restringir el flujo de la reacción POR5 sólo en el sentido de la descarboxilación,

se pudo simular correctamente lo visto experimentalmente. Este descubrimiento es importante, ya que es una corrección que contribuye a aumentar la robustez de la información presente en el último modelo de *E. coli*.

Lo visto experimentalmente por Kornberg se aprecia en la Figura 18b, donde ninguna cepa es capaz de crecer en acetato ante un flujo cero a través de la vía del glioxilato (delección de ICL). Sin embargo, en la misma figura se puede ver que si el flujo es 100% por la ICL, las cepas tampoco son capaces de crecer. Esto indicaría que es necesario que haya flujo vía ICDH, AKDH y succinil-CoA sintetasa para mantener la producción de poder reductor, metabolitos esenciales para la producción de biomasa como el 2-oxoglutarato que es el precursor de glutamato (LaPorte y col., 1984) y fosforilación a nivel de sustrato. Lo cual se puede ver en que para todas las cepas se obtiene un crecimiento máximo a un determinado flujo (distinto de 0 y 100%) a través de la vía del glioxilato.

Por otra parte, la partición de flujos a nivel de la bifurcación también permitiría regular el balance redox del NADPH. Se ha visto que, a diferencia de otras fuentes de carbono, durante el crecimiento de *E. coli* en acetato existe una sobreproducción de NADPH (Figura 22), la cual es contrarrestada por acción de la transhidrogenasa UdhA (Sauer y col., 2004). Previamente otros investigadores han visto que la vía del glioxilato podría tener una función en el balance de los cofactores-redox en el contexto del ciclo fosfoenolpiruvato-glioxilato (PEP-glioxilato) (Fischer y Sauer, 2003). Observaron que su actividad previene la formación de NADPH en condiciones de sobrecarga de este cofactor, de la misma manera que la transhidrogenasa UdhA, siendo redundantes sus funciones. Así, la ICL también cumpliría un rol de regular el balance de NADPH (Maharjan y col., 2005).

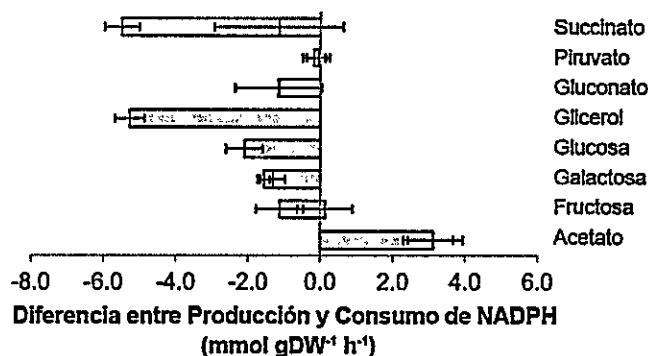


Figura 22. Producción neta de NADPH en *E. coli* cultivada en distintas fuentes de carbono

Se muestra la diferencia entre la producción de NADPH en las vías catabólicas y su consumo en las vías anabólicas. Para las distintas fuentes de carbono, el acetato es la única situación en que la producción supera al consumo. En el resto se estima que lo necesario para el consumo anabólico, es compensado por la transhidrogenasa PntAB. Las barras blancas consideran la producción de NADPH sólo a través de la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. Las barras grises incluyen el NADPH producido por la enzima málica NADP-dependiente. Figura modificada del Capítulo 4 de la tesis de Haverkorn (2012).

En el análisis de robustez mostrado en la Figura 18a, el nivel de flujo de UdhA es un indicador de la ocurrencia de sobreproducción de NADPH a nivel de las vías centrales. De hecho, las cepas que poseen una ICDH NADPH productora presentaron una mayor producción de este cofactor (Figura 20a) y niveles más altos de flujo a través de UdhA (Figura 18a), frente a todos los porcentajes de partición en el nodo del isocitrato. En el caso de las cepas *icd^{NADP}*, tanto UdhA como la vía del glioxilato contribuyen a disminuir la sobreproducción de NADPH. La acción sería conjunta, debido a que en el intervalo de partición en el que se observa la mayor disminución del exceso de NADPH, aún se requiere de flujo a través de UdhA. Interesantemente, la magnitud del flujo de UdhA predicho para este rango de valores se encuentra dentro del orden de magnitud del flujo de exceso de NADPH reportado en literatura (Figura 22). En cambio, cuando la actividad ICDH es NADH productora existe un intervalo de valores de partición en que la vía del glioxilato puede compensar completamente la sobreproducción de NADPH

(actividad UdhA cero). Esto podría deberse a que en las cepas *icd^{NAD}* la producción total de NADPH cae aproximadamente en $2 \text{ mmol}\cdot\text{gDW}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Figura 20a), lo cual se asemeja al flujo de sobreproducción de NADPH (Figura 22).

4.4. El cambio de especificidad de la ICDH provoca cambios de distribución de flujos que impactan el balance redox y la disponibilidad de intermediarios para la biosíntesis

Existen diferentes antecedentes experimentales reportados para el crecimiento de *E. coli wild type* en acetato:

El primer reporte de distribución de flujos fue realizado en 1984 por Walsh y Koshland Jr.¹ con el fin de determinar la partición en la bifurcación del isocitrato. Observaron que cerca de un 21% del flujo de acetato consumido es destinado a la vía del glioxilato (Figura 4). En nuestro caso, la simulación arrojó un valor de 26.7% (Figura 19). Respecto a la bifurcación misma, ellos observaron que por cada 1 mmol destinado a la vía del glioxilato se destinan 2.58 mmol al ciclo de Krebs. Nuestros resultados muestran que por cada mmol se desvían 1.44 (cerca de un 45% menos). Estos valores se acercan más a lo visto por Haverkorn en 2012 (en condiciones de cultivo similares a las nuestras, Tabla 1 y Figura 4): un 30% del flujo de carbono se destina a la vía del glioxilato, y por cada 1 mmol de isocitrato desviado hacia ésta se utiliza 1.16 mmol en el ciclo de Krebs.

Por otro lado, el comportamiento visto en las simulaciones es coherente con lo reportado por Oh y col. en 2002 (Figura A2 en Anexos), quienes observaron un aumento

¹ Las condiciones de cultivo utilizadas por Walsh y Koshland Jr. (1984) corresponden a medio MOPS suplementado con $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de acetato.

en la expresión de los genes que codifican las enzimas PCK y málica NADP-dependiente, cuando la fuente de carbono de *E. coli* es acetato en lugar de glucosa. En primer lugar, nuestras simulaciones muestran un flujo significativo en los pasos controlados por estos genes y en concordancia con lo anterior se ha demostrado que estas enzimas son importantes en el crecimiento acetato (Bologna y col., 2007), ya que la primera enzima desvía átomos de carbono hacia la gluconeogénesis (Oh y col., 2002) y la segunda regenera acetil-CoA (Murai y col., 1971). En segundo lugar, reportaron una menor expresión de los genes que controlan la glicólisis y la ruta de las pentosas en acetato respecto de glucosa, y en nuestras simulaciones la glicolisis no se encuentra activa y el flujo de la ruta de las pentosas es nulo. En tercer lugar, observaron una baja expresión del gen de la piruvato deshidrogenasa, coincidiendo con el bajo valor de flujo visto por otros autores (Figura 4) y el flujo cero de nuestras simulaciones. Finalmente, detectaron un aumento en la expresión de los genes de la vía del glicerato, lo que se condice con el flujo que observamos a través la fosfoglicerato deshidrogenasa, que contribuye a la formación de NADH (Figura 20b). Interesantemente, al igual que lo visto por Fan y col. (2014), nuestras simulaciones indicaron que existe un flujo a través de la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (MTHFD), siendo una vía productora de NADPH distinta a las clásicas que se conocen.

Puesto que la distribución de flujos simulada para la cepa *wild type* no se aleja de lo observado experimentalmente por otros autores, creemos que las obtenidas para el resto de las cepas representan bien lo que ocurriría de manera *in vivo*.

Con el cambio de especificidad tenemos en las cepas *icd^{NAD}* una menor velocidad de producción del NADPH total junto a una disminución del flujo a través de la vía del glioxilato y un aumento en el de la ICDH. Esta respuesta podría permitir mantener el

balance entre el NADPH producido y los intermediarios disponibles para la biosíntesis, ya que al disminuir el flujo a través de la vía del glioxilato, que es una fuente de estos intermediarios, se podría obtener un abastecimiento de intermediarios al nivel requerido por el NADPH disponible. Esta interpretación es complementaria con lo sugerido por Zhu y col. (2005): La especificidad por NADP de las ICDHs en organismos que poseen ICL, evolucionó por el requerimiento de una mayor disponibilidad de NADPH para la biosíntesis.

En esta misma línea de pensamiento, si bien ante la disminución de la producción de NADPH en la cepa *icd^{NAD}* vimos una activación de la transhidrogenasa PntAB de la misma forma como fue propuesto por Zhu y col. (2005), el flujo a través de ésta no fue suficiente para compensar la caída en la producción de este cofactor, lo que explicaría la disminución observada en el flujo a través de la vía del glioxilato.

A pesar que PntAB es importante para contrarrestar el efecto del cambio de especificidad, esta enzima no sería imprescindible porque como se vio en la cepa *icd^{NAD} ΔpntAB*, su aporte a la producción de NADPH podría ser suplida en su mayoría por la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato con la concomitante redistribución de flujos. El leve aumento de partición hacia la vía del glioxilato observado en esta cepa respecto de la *icd^{NAD}* puede explicarse por una mayor demanda de átomos de carbono para sostener el incremento del flujo a través de la gluconeogénesis y de la ruta de las pentosas fosfato. Contrario a lo propuesto por Zhu y col. (2005), nuestros resultados sugieren que la vía de las pentosas fosfato sí podría aportar a la producción de NADPH (con un 9% del flujo de carbono). Sin embargo, esto conllevaría a un gasto adicional de recursos (ATP para la gluconeogénesis), lo que se puede apreciar en que la región de rendimiento óptimo fue más acotada que la región de la cepa *icd^{NAD}*, lo que reduce su

adaptación ante perturbaciones externas. Por otro lado, las redistribuciones de flujos que compensan la caída en la producción de NADPH no muestran actividad de UdhA. En el caso de NADH, por el contrario, se vio un aumento debido al cambio de especificidad de la ICDH y al aumento mismo del flujo. Además, observamos que en las cepas *icd^{NAD}* aumentó la tasa de consumo de O₂ y la de producción de CO₂, lo que se debería al aumento del flujo a través del ciclo de Krebs, puesto que se favorece la descarboxilación del acetato y la respiración celular acoplada a esta vía.

Los principales cambios detectados con la herramienta *Flux-Array* coinciden con lo observado en las distribuciones de flujo de las vías centrales en las distintas cepas. En ambas cepas *icd^{NAD}* cayó la producción de NADPH y la partición a la vía del glioxilato, lo que conllevó una menor biosíntesis en general. Mediante esta herramienta se puede obtener un mayor nivel de detalle respecto a esto: una disminución a nivel de vías relacionadas con la síntesis de valina, leucina e isoleucina; glicina y serina, metabolismo de folatos, treonina y lisina; y otras relacionadas con la síntesis de purinas y pirimidinas.

Resumiendo lo observado en este trabajo, se puede decir que una ICDH NAD preferente en *E. coli* durante su crecimiento en acetato provoca: Primero, una mayor partición a ICDH, causando una caída en la producción de NADPH y un aumento en la de NADH, una mayor tasa de respiración (mayor consumo de O₂ y liberación de CO₂) y por ende, más producción de ATP. Esto último es disipado con una mayor demanda energética basal (ATPM), causando una caída del rendimiento de biomasa como primer efecto fisiológico. La menor producción de precursores de biosíntesis se asociaría con la disminución del flujo de la vía del glioxilato, lo que se observa fisiológicamente en la disminución de la tasa de crecimiento. Finalmente, los flujos metabólicos se redistribuirían respondiendo a los niveles de producción de NADPH (Figura 23).

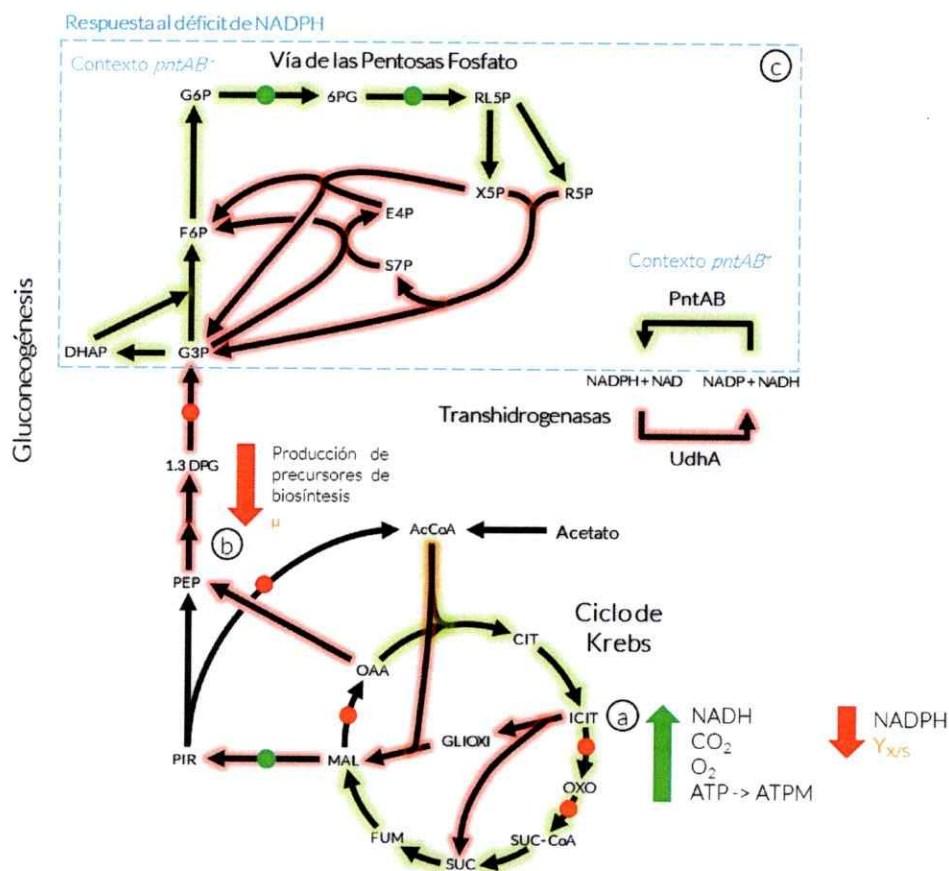


Figura 23. Efectos del cambio de especificidad por el cofactor de la ICDH de *E. coli* durante el crecimiento en acetato

Las flechas negras destacadas en verde o en rojo representan las reacciones de las vías centrales que presentaron cambios en sus flujos. El primer color corresponde al aumento y el segundo a la disminución del flujo en las cepas *icd*^{NAD} respecto a las *icd*^{NADP}. En (a) se tienen las consecuencias más directas al cambio de especificidad, destacándose un aumento de los niveles de producción NADH y CO₂, consumo de O₂, producción de ATP, destinada principalmente a ATPM, y una disminución del nivel de producción de NADPH y el rendimiento de biomasa. En (b) se muestran las consecuencias indirectas, apreciándose una caída en la disponibilidad de los átomos de carbono destinados a la formación de precursores de la biosíntesis, provocando una menor tasa de crecimiento. Y en (c) se destacan los impactos sistémicos, que tienen relación con la respuesta al déficit de NADPH ocasionado por el cambio de especificidad (recuadro azul). En presencia del operón *pntAB*, la transhidrogenasa es la principal fuente de producción de NADPH. Mientras que en su ausencia, ocurre una activación de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato y una reversión de la rama no-oxidativa. Los círculos coloreados representan las deshidrogenasas en la red; el color verde indica especificidad por NADP y el rojo por NAD. Sólo se muestra la enzima málica NADP-dependiente (la única activa). En naranja se destacan los cambios observados experimentalmente. Los nombres de los metabolitos se detallan en la Lista de Abreviaturas.

4.5. El aumento de producción de NADH debido al cambio de especificidad de la ICDH puede ser utilizada con fines electrogénicos

Actualmente, se conoce que los microorganismos son capaces de transportar electrones desde la célula hacia un aceptor de electrones extracelular, y viceversa. Este fenómeno fue reportado por primera vez en 1910 por M. C. Potter, quien escribió: “*La degradación de compuestos orgánicos mediada por microorganismos está acompañada de la liberación de energía eléctrica*” (Rabaey & Rozendal, 2010). Las Celdas de Combustible Microbianas (*Microbial Fuel Cells* en inglés, cuya abreviación es MFC) son dispositivos que aprovechan esto, utilizando a los microorganismos como catalizadores de la oxidación de materia orgánica e inorgánica para generar corriente eléctrica (Logan y col., 2006). A las MFC también se les denomina celdas bioelectroquímicas, pues siguen el fundamento de las celdas electroquímicas convencionales.

Como se muestra en la Figura 24, las MFCs están compuestas por dos cámaras separadas por una membrana semipermeable que permite el paso de protones y restringe el de oxígeno. En cada cámara se encuentra un electrodo: un ánodo en la cámara anódica, el cual acepta electrones desde el cultivo microbiano en condiciones de anoxia, y un cátodo en la cámara catódica, el cual transfiere los electrones provenientes del ánodo a un aceptor final, como el oxígeno (Lovley, 2006).

Puesto que los electrones transportados desde la célula provienen del suministro intracelular de electrones generados por la oxidación de nutrientes (Rabaey & Verstraete, 2005), una estrategia para mejorar la generación de electricidad en MFCs ha sido la modificación del metabolismo de los microorganismos para aumentar la cantidad de electrones que pueden ser destinados a la producción de electricidad (electrones

liberables). Existen casos como la cepa de *E. coli* que posee la delección del gen de la lactato deshidrogenasa (*ldha*), donde ocurre un aumento de la proporción NADH/NAD intracelular, y que en condiciones electrogénicas genera más electricidad que la cepa *wild type*. En esta cepa, la producción de electricidad lleva el cociente NADH/NAD a valores similares que ésta crecida en condiciones no-electrogénicas (Yong y col., 2012). Es por esto que el NADH se puede relacionar como portador de electrones liberables.

Como se apreció en los resultados de las simulaciones, el cambio de especificidad de la ICDH generará un cambio en la disponibilidad de NADH. Por esta razón, dicha modificación podría mejorar la generación de corriente eléctrica respecto a la cepa *wild type* durante el crecimiento en acetato. Por lo que finalmente, como proyección de este trabajo se propone el uso de las cepas *icd^{NAD}* como estrategia para mejorar la generación de electricidad desde material orgánico que presente acetato.

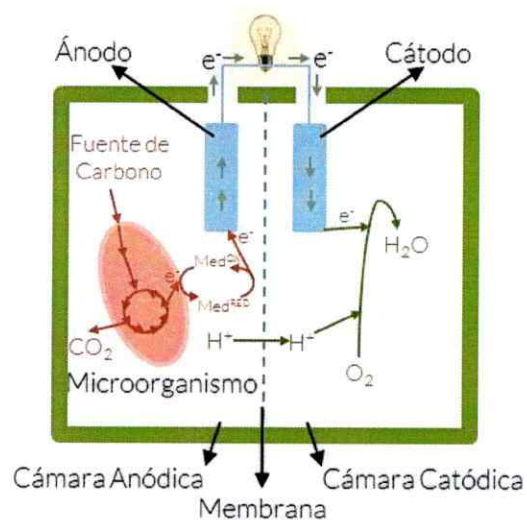


Figura 24. Esquema de una Celda de Combustible Microbiana

En la imagen se muestra una MFC de dos cámaras separadas por una membrana. En una se ubica el ánodo y en la otra el cátodo. En la cámara anódica los organismos son capaces de liberar electrones provenientes de la oxidación de la fuente de carbono. Estos finalmente llegan a un aceptor final en la cámara catódica. Esta figura fue modificada de la presente en el artículo de Rabaey y Verstraete (2005).

5. CONCLUSIONES

1. Las distribuciones de flujos simuladas para la cepa *wild type* representan correctamente los resultados experimentales descritos por otros autores.
2. La pérdida de producción de NADPH en ICDH, debido al cambio de especificidad del cofactor, tiene un impacto negativo sobre la velocidad de crecimiento y el rendimiento de *E. coli* durante su crecimiento en acetato.
3. El cambio de especificidad de la ICDH también genera un aumento del flujo relacionado al gasto energético destinado a la mantención celular.
4. La redistribución de flujos asociada al cambio de especificidad de ICDH, responde al restablecimiento de producción de NADPH, aunque no logra los niveles observados en presencia de la ICDH NADPH productora.
5. En ausencia de la transhidrogenasa PntAB, la redistribución de flujos asociada al cambio de especificidad de ICDH, permite la producción de NADPH en la vía de las pentosas.
6. Las simulaciones indican que UdhA permite mantener el balance redox en presencia de una ICDH NADPH productora, pero es prescindible ante el cambio de especificidad. Mientras que la transhidrogenasa PntAB es prescindible en la mantención del balance redox, independiente de la especificidad de la ICDH.
7. La partición de flujos a nivel de bifurcación del isocitrato se ajusta según la especificidad de la ICDH, afectando la disponibilidad de intermediarios para la biosíntesis y el balance de NADPH.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Balzer, G.J., Thakker, C., Bennett, G.N. y San, K.Y.** 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to minimize byproduct formate and improving succinate productivity through increasing NADH availability by heterologous expression of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metabolic Engineering* 20: 1-8.
- Blank, L.M., Kuepfer, L., y Sauer, U.** 2005. Large-scale ¹³C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biology* 6: R49.
- 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: 107-120.
- Canonaco, F.** 2003. The relevance of transhydrogenases and heterologous phosphagen kinases for microbial cofactor metabolism. Tesis PhD. ETH Zürich, Suiza: 12.
<http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:26402/eth-26402-02.pdf>
- 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: 38-48.
- Crown, S.B. y Antoniewicz, M.R.** 2013. Publishing ¹³C metabolic flux analysis studies: A review and future perspectives. *Metabolic Engineering* 20: 42-48.
- Datsenko, K.A. y Wanner, B.L.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 97: 6640-6645.
- Dauner, M. y Sauer, U.** 2001. Stoichiometric growth model for riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 76: 132-143.
- Edwards, J.S., Ibarra, R.U. y Palsson, B.O.** 2001. In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nature Biotechnology* 19: 125-130.
- Fan, J., Ye, J., Kamphorst, J.J., Shlomi, T., Thompson, C.B. y Rabinowitz, J.D.** 2014. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* 510: 298-302.

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.

Fischer, E. y Sauer, U. 2003. A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 46446-46451.

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.

Haverkorn, B.R.B. 2012. Transcriptional regulation of central metabolism in *Escherichia coli*. Tesis PhD. ETH Zürich, Suiza: 103-104.
<http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:5477/eth-5477-02.pdf>

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.

Holms, H. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 85-116.

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.

King, Z.A. y Feist, A.M. 2014. Optimal cofactor swapping can increase the theoretical yield for chemical production in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* 24: 117-128.

Kornberg, H.L. 1966. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 99: 1-11.

LaPorte, D.C., Walsh, K. y Koshland Jr., D.E. 1984. The Branch Point Effect: Ultrasensitivity and subsensitivity to metabolic control. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 14068-14075.

LaPorte, D.C., Thorsness, P.E. y Koshland Jr., D.E. 1985. Compensatory phosphorylation of isocitrate dehydrogenase: A mechanism for adaptation to the intracellular environment. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 10563-10568.

Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J.E., Zhao, K., Jin, D.J. y Blattner, F.R. 2005. Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 15921-15927.

Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W. y Rabaey, K. 2006. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. *Environmental Science & Technology* 40: 5181-5192.

- Lovley, D.R.** 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 4: 497-508.
- Maharjan, R.P., Yu, P.L., Seeto, S. y Ferenci, T.** 2005. The role of isocitrate lyase and the glyoxylate cycle in *Escherichia coli* growing under glucose limitation. *Research in Microbiology* 156: 178-183.
- Martínez, I., Zhu, J., Lin, H., Bennett, G.N. y San, K.Y.** 2008. Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways. *Metabolic Engineering* 10: 352-359.
- Marx, A., Eikmanns, B.J., Sahm, H., de Graaf, A.A. y Eggeling, L.** 1999. Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metabolic Engineering* 1: 35-48.
- Monod, J.** 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews Microbiology* 3: 371-394.
- Murai, T., Tokushige, M., Nagai, J. y Katsuki, H.** 1971. Physiological functions of NAD- and NADP-linked malic enzymes in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical research communications* 43: 875-881.
- Nunn, W.D.** 1987. Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. *En Frederick C. Neidhardt (eds.), Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology.* pp. 296-298. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Oh, M., Rohlin, L., Kao, K. y Liao, J.** 2002. Global Expression Profiling of Acetate-grown *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 13175-13183.
- 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., Thiele, I. y Palsson, B.O.** 2010. What is flux balance analysis?. *Nature Biotechnology* 28: 245-248.
- 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—2011. *Molecular Systems Biology* 7: 535-543.
- Pirt, S.J.** 1982. Maintenance Energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. *Archives of Microbiology* 133: 300-302.
- Rabaey, K. y Verstraete, W.** 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology* 23: 291-298.
- Rabaey, K. y Rozendal, R.A.** 2010. Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology* 8: 706-716.
- Raman, K. y Chandra, N.** 2009. Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics* 10: 435-449.

- Reed, J.L. y Palsson, B.O.** 2004. Genome-scale *in silico* models of *E. coli* have multiple equivalent phenotypic states: Assessment of correlated reaction subsets that comprise network states. *Genome Research* 14: 1797-1805.
- Reich, J.G. y Sel'kov, E.E.** 1981. *Energy Metabolism of the Cell. A Theoretical Treatise*, Academic Press, London: 135.
- Russell, J.B. y Cook, G.M.** 1995. Energetics of Bacterial Growth: Balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews* 59: 48-62.
- Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A. y Fischer, E.** 2004. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 6613-6619.
- 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.** 2011a. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols* 6: 1290-1307.
- Schellenberger, J., Lewis, N.E. y Palsson B.O.** 2011b. Elimination of thermodynamically infeasible loops in steady-state metabolic models. *Biophysical Journal* 100: 544-553.
- Schuetz, R., Zamboni, N., Zampieri, M., Heinemann, M. y Sauer, U.** 2012. Multidimensional optimality of microbial metabolism. *Science* 336: 601-604.
- Taymaz-Nikerel, H., Borujeni, A.E., Verheijen, P.J.T., Heijnen, J.J. y van Gulik, W.M.** 2010. Genome-derived minimal metabolic models for *Escherichia coli* MG1655 with estimated *in vivo* respiratory ATP stoichiometry. *Biotechnology and Bioengineering* 107: 369-381.
- Tempest, D.W. y Neijssel, O.M.** 1987. Growth yield and energy distribution. *En Frederick C. Neidhardt (eds.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. pp. 797-806. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Thakur, C.S., Brown, M.E., Sama, J.N., Jackson, M.E. y Dayie, T.K.** 2010. Growth of wild type and mutant *E. coli* strains in minimal media for optimal production of nucleic acids for preparing labeled nucleotides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88: 771-779.
- Toro, C.S., Mora, G.C. y Figueroa-Bossi, N.** 1998. Gene transfer between related bacteria by electrotransformation: Mapping *Salmonella typhi* genes in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 180: 4750-4752.
- van Gulik, W.M y Heijnen, J.J.** 1995. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering* 48: 681-698.
- Varma, A., y Palsson, B.O.** 1993. Metabolic Capabilities of *Escherichia coli* II. Optimal Growth Patterns. *Journal of Theoretical Biology* 165: 503-522.

- Walsh, K. y Koshland Jr., D.E.** 1984. Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles: The tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 9646-9654.
- Walsh, K. y Koshland Jr., D.E.** 1985. Branch point control by the phosphorylation state of Isocitrate Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 8430-8437.
- Wang, B., Wang, P., Zheng, E., Chen, X., Zhao, H., Song, P., Su, R., Li, X. y Zhu, G.** 2011. Biochemical properties and physiological roles of NADP-dependent malic enzyme in *Escherichia coli*. *The Journal of Microbiology* 49: 797-802.
- Wang, Y., San, K.Y. y Bennet, G.N.** 2013. Cofactor engineering for advancing chemical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 24: 994-999.
- Yong, Y., Yu, Y., Yang, Y., Li, C.M., Jiang, R., Wang, X., Wang, J. y Song, H.** 2012. Increasing intracellular releasable electrons dramatically enhances bioelectricity output in microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications* 19: 13-16.
- Zhao, J. y Shimizu, S.** 2003. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method. *Journal of Biotechnology* 101: 101-117.
- Zhao, J., Baba, T., Mori, H. y Shimizu, S.** 2004. Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metabolic Engineering* 6: 164-174.
- Zhu, G., Golding, G.B. y Dean, A.M.** 2005. The selective cause of an ancient adaptation. *Science* 307: 1279-1282.

7. ANEXOS

7.1. Diferencias entre gen *icd* silvestre y el gen *icd^{NAD}*

<i>icd</i> gene	1	ATGGAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATCACCCCTGCAAAACGGCAA	60
<i>icdNAD</i> gene	1	ATGGAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAAGGCAAGAAGATCACCCCTGCAAAACGGCAA	60
<i>icd</i> gene	61	CTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGAT	120
<i>icdNAD</i> gene	61	CTCAACGTTCCCTGAAAATCCGATTATCCCTTACATTGAAGGTGATGGAATCGGTGTAGAT	120
<i>icd</i> gene	121	GTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCATAAAGGCGAG	180
<i>icdNAD</i> gene	121	GTAACCCAGCCATGCTGAAAGTGGTCGACGCTGCAGTCGAGAAAGCCATAAAGGCGAG	180
<i>icd</i> gene	181	CGTAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAG	240
<i>icdNAD</i> gene	181	CGTAAATCTCCTGGATGGAATTTACACCGGTGAAAAATCCACACAGGTTTATGGTCAG	240
<i>icd</i> gene	241	GACGTCGGCTGCCTGCTGAACTCTTGATCTGATTTCGTGAATATCGCGTTGCCATTTAA	300
<i>icdNAD</i> gene	241	GACGTCGGCTGCCTGCTGAACTCTTGATCTGATTTCGTGAATATCGCGTTGCCATTTAA	300
<i>icd</i> gene	301	GGTCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTGAACGTTGCCCTGCGCCAG	360
<i>icdNAD</i> gene	301	GGTCCGCTGACCACTCCGGTTGGTGGCGGTATTTCGCTCTCTGAACGTTGCCCTGCGCCAG	360
<i>icd</i> gene	361	GAACTGGATCTTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGCCCG	420
<i>icdNAD</i> gene	361	GAACTGGATCTTACATCTGCCTGCGTCCGGTACGTTACTATCAGGGCACTCCAAGCCCG	420
<i>icd</i> gene	421	GTTAAACACCCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACTCGGAAGACATTTAT	480
<i>icdNAD</i> gene	421	GTTAAACACCCCTGAACTGACCGATATGGTTATCTTCCGTGAAAACTCGGAAGACATTTAT	480
<i>icd</i> gene	481	GCGGGTATCGAATGGAAGCAGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAATTCCTGCGT	540
<i>icdNAD</i> gene	481	GCGGGTATCGAATGGAAGCAGACTCTGCCGACGCCGAGAAAGTGATTAATTCCTGCGT	540
<i>icd</i> gene	541	GAAGAGATGGGGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGGTATCGGTATTAGCCG	600
<i>icdNAD</i> gene	541	GAAGAGATGGGGTGAAGAAAATTCGCTTCCCGAACATTGGTATCGGTATTAGCCG	600
<i>icd</i> gene	601	TGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACTGCTGGTTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAAC	660
<i>icdNAD</i> gene	601	ATGTTCCGGAAGAAGGCACCAAACTGCTGGTTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAAC	660
<i>icd</i> gene	661	GATCGTGACTCTGTGACTCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGAGCG	720
<i>icdNAD</i> gene	661	GATCGTGACTCTGTGACTCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGAGCG	720
<i>icd</i> gene	721	TTTAAAGACTGGGGCTACCAGCTGGCGGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGT	780
<i>icdNAD</i> gene	721	TTTAAAGACTGGGGCTACCAGCTGGCGGTGAAGAGTTTGGCGGTGAACTGATCGACGGT	780
<i>icd</i> gene	781	GGCCCGTGGCTGAAAGTTAAAAACCCGAACACTGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTG	840
<i>icdNAD</i> gene	781	GGCCCGTGGCTGAAAGTTAAAAACCCGAACACTGGCAAAGAGATCGTCATTAAAGACGTG	840
<i>icd</i> gene	841	ATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATCCTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCC	900
<i>icdNAD</i> gene	841	ATTGCTGATGCATTCTGCAACAGATCCTGCTGCGTCCGGCTGAATATGATGTTATCGCC	900
<i>icd</i> gene	901	TGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCAGCGCAGGTTGGCGGTATC	960
<i>icdNAD</i> gene	901	TGTATGAACCTGAACGGTGACTACATTTCTGACGCCCTGGCAGCGCAGGTTGGCGGTATC	960
<i>icd</i> gene	961	GGTATCGCCCTGGTGCAAAATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTGAAGCCACCCACGGT	1020
<i>icdNAD</i> gene	961	GGTATCGCCCTGGTGCAAAATCGGTGACGAATGCGCCCTGTTGAAGCCACCCACGGT	1020
<i>icd</i> gene	1021	ACTGCGCCGAAATATGCGCGTCAAGGCAAAAGTAAATCCTGGCTCTATTATCTCTCCGCT	1080
<i>icdNAD</i> gene	1021	ACTGCGCCGATATGCGCGTCAAGGCAAAAGCAATCCTGGCTCTATTATCTCTCCGCT	1080
<i>icd</i> gene	1081	GAGATGATGCTGCGCCACATGGGTTGGACCGAAGCGGCTGACTTAATTGTTAAAGGTATG	1140
<i>icdNAD</i> gene	1081	GAGATGATGCTGCGCCACATGGGTTGGACCGAAGCGGCTGACTTAATTGTTAAAGGTATG	1140
<i>icd</i> gene	1141	GAAGGCGAATCAACGCGAAAACCGTAACCTATGACTTCGAGCGTCTGATGGATGGCGCT	1200
<i>icdNAD</i> gene	1141	GAAGGCGAATCAACGCGAAAACCGTAACCAAGGACTTCGAGTCCCTGATGGATGGCGCT	1200
<i>icd</i> gene	1201	AAACTGCTGAAATGTTTCAGAGTTGGTGACGCGATCATCGAAAACATGTAA	1251
<i>icdNAD</i> gene	1201	AAACTGCTGAAATGTTTCAGAGTTGGTGACGCGATCATCGAAAACATGTAA	1251

Figura A1. Alineamiento de secuencias del gen *icd* y del gen *icd^{NAD}*

En amarillo se muestran las diferencias de nucleótidos entre ambos genes. A nivel de aminoácidos corresponden a: Cys201Met, Cys332Tyr, Lys344Asp, Tyr345Ile, Val351Ala, Tyr391Lys y Arg395Ser.

7.2. Códigos de Programación para los modelamientos metabólicos

En verde y luego del signo % se representan los comentarios de los comandos. Estos códigos se ejecutaron en el orden que se muestra en la Figura 6. Se generan los modelos y después se calcula el ATPM. Luego de este paso se pueden realizar los análisis de sensibilidad o calcular la distribución de flujos (siempre ejecutar alguno de estos dos luego una ejecución desde cero de (a) y (b) de la Figura 6).

7.2.1. Generación de modelos

```
%% Cargar modelos
if exist('modelo') ~= 1;
    modelo = readCbModel();
end;

ecoli = modelo;      % Ceba Wild type

ecoli_pntAB = ecoli      %Ceba delta pntAB
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'THD2pp', 0,'b');      %Delección gen pntAB

ecoli_icdNAD = ecoli;      %Ceba icd-NAD
ecoli_icdNAD = changeRxnMets(ecoli_icdNAD, {'nadp[c]', 'nadph[c]'}, {'nad[c]',
'nadh[c]'},'ICDHyr', [-1; 1]);      %Reemplazar especificidad NADP-dependiente de ICDH por
NAD-dependiente

ecoli_IP = ecoli      %Ceba icd-NAD delta pntAB
ecoli_IP = changeRxnMets(ecoli_IP, {'nadp[c]', 'nadph[c]'}, {'nad[c]',
'nadh[c]'},'ICDHyr', [-1; 1]);      %Reemplazar especificidad NADP-dependiente de ICDH por
NAD-dependiente
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'THD2pp', 0,'b');      %Delección gen pntAB
```

7.2.2. Incorporar parámetros experimentales

```
%% Tasas Experimentales
mu_wt = 0.196;      %Tasa de crecimiento experimental Ceba Wild type
mu_pntAB = 0.191;      %Tasa de crecimiento experimental Ceba delta pntAB
mu_icdNAD = 0.135;      %Tasa de crecimiento experimental Ceba icd-NAD
mu_IP = 0.1203;      %Tasa de crecimiento experimental Ceba icd-NAD delta pntAB

Ac_wt = -7.88;      %Tasa de consumo de acetato experimental Ceba Wild type
Ac_pntAB = -7.6;      %Tasa de consumo de acetato experimental Ceba delta pntAB
Ac_icdNAD = -8.0;      %Tasa de consumo de acetato experimental Ceba icd-NAD
Ac_IP = -7.0;      %Tasa de consumo de acetato experimental Ceba icd-NAD delta pntAB

%% Condiciones de cultivo
%Ceba Wild type
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'EX_glc(e)', 0,'b');      %Fijar glucosa en cero para que
acetato sea la única fuente de carbono
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'EX_o2(e)',-20,'l');      %Límite inferior de consumo de
oxígeno
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'EX_ac(e)',Ac_wt,'b');      %Consumo de Acetato
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'POR5',0,'l');      %Bloqueo sentido inverso de POR5
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',mu_wt,'b');      %Fijar tasa
de crecimiento a valor experimental
```

```

%Cepa delta pntAB
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'EX_glc(e)', 0,'b');    %Fijar glucosa en cero
para que acetato sea la única fuente de carbono
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'EX_o2(e)',-20,'l');    %Limite inferior de
consumo de oxígeno
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'EX_ac(e)',Ac_pntAB,'b');    %Consumo de
Acetato
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'POR5',0,'l');    %Bloqueo sentido inverso de
POR5
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',mu_pntAB,'b');
%Fijar tasa de crecimiento a valor experimental

%Cepa icd-NAD
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'EX_glc(e)', 0,'b');    %Fijar glucosa en
cero para que acetato sea la única fuente de carbono
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'EX_o2(e)',-20,'l');    %Limite inferior de
consumo de oxígeno
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'EX_ac(e)',Ac_icdNAD,'b');    %Consumo de
Acetato
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'POR5',0,'l');    %Bloqueo sentido inverso de
POR5
ecoli_icdNAD =
changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',mu_icdNAD,'b');    %Fijar
tasa de crecimiento a valor experimental

%Cepa icd-NAD delta pntAB
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'EX_glc(e)', 0,'b');    %Fijar glucosa en cero para
que acetato sea la única fuente de carbono
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'EX_o2(e)',-20,'l');    %Limite inferior de consumo
de oxígeno
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'EX_ac(e)',Ac_IP,'b');    %Consumo de Acetato
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'POR5',0,'l');    %Bloqueo sentido inverso de POR5
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',mu_IP,'b');
%Fijar tasa de crecimiento a valor experimental

```

7.2.3. Calcular ATP de mantención (ATPM)

```

%% Cambiar función objetivo a ATPM
ecoli = changeObjective(ecoli, 'ATPM');
ecoli_pntAB = changeObjective(ecoli_pntAB, 'ATPM');
ecoli_icdNAD = changeObjective(ecoli_icdNAD, 'ATPM');
ecoli_IP = changeObjective(ecoli_IP, 'ATPM');

%% Liberar limite inferior de ATPM y acotar el superior
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'ATPM',50,'u');
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'ATPM',0,'l');

ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'ATPM',50,'u');
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'ATPM',0,'l');

ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'ATPM',50,'u');
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'ATPM',0,'l');

ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'ATPM',50,'u');
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'ATPM',0,'l');

%% Calcular flujo de ATPM
FBAsolution = optimizeCbModel(ecoli,'max');    %Calcular ATP de Mantención de Cepa Wild
type
FBAsolution_pntAB = optimizeCbModel(ecoli_pntAB,'max');    %Calcular ATP de Mantención de
Cepa delta pntAB
FBAsolution_icdNAD = optimizeCbModel(ecoli_icdNAD,'max');    %Calcular ATP de Mantención
de Cepa icd-NAD
FBAsolution_IP = optimizeCbModel(ecoli_IP,'max');    %Calcular ATP de Mantención de Cepa
icd-NAD delta pntAB

```



```

%%Fijar ATPM
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'ATPM',FBAsolution.f,'1');
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'ATPM',FBAsolution_pntAB.f,'1');
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'ATPM',FBAsolution_icdNAD.f,'1');
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'ATPM',FBAsolution_IP.f,'1');

```

7.2.4. Análisis de robustez del crecimiento respecto al consumo de acetato

```

ecoli = changeObjective(ecoli,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M');
ecoli_icdNAD = changeObjective(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M');
ecoli_pntAB = changeObjective(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M');
ecoli_IP = changeObjective(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M');

ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'1');
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'1');
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'1');
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'1');

ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',1000,'u');
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',1000,'u');
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',1000,'u');
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',1000,'u');

a = 1;
for j = 0.0:0.1:10; %Rango de consumo de Acetato, desde 0.0 a 10.0 variando cada 0.1
    ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'EX_ac(e)',-j,'b'); %Variar Consumo de Acetato Cepa
    Wild type
    ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'EX_ac(e)',-j,'b'); %Variar Consumo de
    Acetato Cepa delta pntAB
    ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'EX_ac(e)',-j,'b'); %Variar Consumo de
    Acetato Cepa icd-NAD
    ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'EX_ac(e)',-j,'b'); %Variar Consumo de Acetato
    Cepa icd-NAD delta pntAB

    FBAsolution = optimizeCbModel(ecoli,'max'); %Calcular Tasa de Crecimiento Máxima
    Cepa Wild type
    FBAsolution_pntAB = optimizeCbModel(ecoli_pntAB,'max'); %Calcular Tasa de
    Crecimiento Máxima Cepa delta pntAB
    FBAsolution_icdNAD = optimizeCbModel(ecoli_icdNAD,'max'); %Calcular Tasa de
    Crecimiento Máxima Cepa icd-NAD
    FBAsolution_IP = optimizeCbModel(ecoli_IP,'max'); %Calcular Tasa de Crecimiento
    Máxima Cepa icd-NAD delta pntAB

    if (FBAsolution.stat == 0) %Descartar error cuando no exista solución.
        FBAsolution.x = zeros(3000,1);
        FBAsolution.x(36) = -j;
    end;

    if (FBAsolution_pntAB.stat == 0)
        FBAsolution_pntAB.x = zeros(3000,1);
        FBAsolution_pntAB.x(36) = -j;
    end;

    if (FBAsolution_icdNAD.stat == 0)
        FBAsolution_icdNAD.x = zeros(3000,1);
        FBAsolution_icdNAD.x(36) = -j;
    end;

    if (FBAsolution_IP.stat == 0)
        FBAsolution_IP.x = zeros(3000,1);
        FBAsolution_IP.x(36) = -j;
    end;

    datosmu(a,1) = j;
    datosmu(a,2) = FBAsolution.f;
    datosmu(a,3) = FBAsolution_pntAB.f;

```

```

    datosmu(a,4) = FBAsolution_icdNAD.f;
    datosmu(a,5) = FBAsolution_IP.f;
    a = a + 1;
end;

```

7.2.5. Phenotype Phase Plane: Rendimiento respecto al flujo de producción de isocitrato y a la partición hacia la vía del glioxilato

```

ecoli = changeObjective(ecoli,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
ecoli_icdNAD = changeObjective(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
ecoli_pntAB = changeObjective(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');
ecoli_IP = changeObjective(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M');

ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',0,'1');
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',0,'1');
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',0,'1');
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',0,'1');

ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',1000,'u');
ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',1000,'u');
ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',1000,'u');
ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJO1366_core_53p95M',1000,'u');

for i = 0.0:0.01:1.0;    %Rango de flujo de consumo de acetato (0 a 100%)
    ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'ACONTb',-i*Ac_wt,'b');    %Variar Flujo de ACONTb Cepa
    Wild type
    ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'ACONTb',-i*Ac_pntAB,'b');    %Variar Flujo
    de ACONTb Cepa delta pntAB
    ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'ACONTb',-i*Ac_icdNAD,'b');    %Variar
    Flujo de ACONTb Cepa icd-NAD
    ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'ACONTb',-i*Ac_IP,'b');    %Variar Flujo de
    ACONTb Cepa icd-NAD delta pntAB
    for j = 0.0:0.01:1.0;    %Rango de particion a ICL (0 a 100%)
        flux = j*-i*Ac_wt;
        flux_pntAB = j*-i*Ac_pntAB;
        flux_icdNAD = j*-i*Ac_icdNAD;
        flux_IP = j*-i*Ac_IP;

        ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'ICL',flux,'b');    %Variar Flujo de ICL Cepa Wild
        type
        ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'ICL',flux_pntAB,'b');    %Variar Flujo
        de ICL Cepa delta pntAB
        ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'ICL',flux_icdNAD,'b');    %Variar
        Flujo de ICL Cepa icd-NAD
        ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'ICL',flux_IP,'b');    %Variar Flujo de ICL
        Cepa icd-NAD delta pntAB

        ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'MALS',flux,'b');    %Variar Flujo de MALS Cepa
        Wild type
        ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'MALS',flux_pntAB,'b');    %Variar
        Flujo de MALS Cepa delta pntAB
        ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'MALS',flux_icdNAD,'b');    %Variar
        Flujo de MALS Cepa icd-NAD
        ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'MALS',flux_IP,'b');    %Variar Flujo de MALS
        Cepa icd-NAD delta pntAB

        FBAsolution = optimizeCbModel(ecoli,'max');    %Calcular Tasa de Crecimiento
        Máxima Cepa Wild type
        FBAsolution_pntAB = optimizeCbModel(ecoli_pntAB,'max');    %Calcular Tasa de
        Crecimiento Máxima Cepa delta pntAB
        FBAsolution_icdNAD = optimizeCbModel(ecoli_icdNAD,'max');    %Calcular Tasa de
        Crecimiento Máxima Cepa icd-NAD
    end
end

```

```

FBAsolution_IP = optimizeCbModel(ecoli_IP,'max');    %Calcular Tasa de
Crecimiento Máxima Cepa icd-NAD delta pntAB

if (FBAsolution.stat == 0)    %Descartar error cuando no exista solución.
    FBAsolution.x = zeros(3000,1);
    FBAsolution.x (36) = -j;
end;

if (FBAsolution_pntAB.stat == 0)
    FBAsolution_pntAB.x = zeros(3000,1);
    FBAsolution_pntAB.x (36) = -j;
end;

if (FBAsolution_icdNAD.stat == 0)
    FBAsolution_icdNAD.x = zeros(3000,1);
    FBAsolution_icdNAD.x (36) = -j;
end;

if (FBAsolution_IP.stat == 0)
    FBAsolution_IP.x = zeros(3000,1);
    FBAsolution_IP.x (36) = -j;
end;

datosGliox(a,1) = i*100;
datosGliox(a,2) = j*100;
datosGliox(a,3) = -FBAsolution.f/Ac_wt;
datosGliox(a,4) = -FBAsolution_pntAB.f/Ac_pntAB;
datosGliox(a,5) = -FBAsolution_icdNAD.f/Ac_icdNAD;
datosGliox(a,6) = -FBAsolution_IP.f/Ac_IP;

a = a + 1;
end;
end;

```

7.2.6. Calcular distribución de flujos

```

%% Procedimiento de optimización
obj = {'ATPM'};
fluxEcoli = IterativeOpt(ecoli,obj);    %Función IterativeOpt
fluxEcoli_pntAB = IterativeOpt(ecoli_pntAB,obj);    %Función IterativeOpt
fluxEcoli_icdNAD = IterativeOpt(ecoli_icdNAD,obj);    %Función IterativeOpt
fluxEcoli_IP = IterativeOpt(ecoli_IP,obj);    %Función IterativeOpt
fluxDistributions = [fluxEcoli, fluxEcoli_pntAB, fluxEcoli_icdNAD, fluxEcoli_IP];

```

7.2.7. Calcular producción de metabolitos

```

%% Cálculo de Producción/Consumo de cada metabolito en las distintas cepas
ProdEcoli = MetsProduction(ecoli,fluxEcoli);    %Función MetsProduction
ProdEcoli_pntAB = MetsProduction(ecoli_pntAB,fluxEcoli_pntAB);    %Función MetsProduction
ProdEcoli_icdNAD = MetsProduction(ecoli_icdNAD,fluxEcoli_icdNAD);    %Función
MetsProduction
ProdEcoli_IP = MetsProduction(ecoli_IP,fluxEcoli_IP);    %Función MetsProduction
metProduction = ProdEcoli;
metProduction(:,4) = ProdEcoli_pntAB(:,3);
metProduction(:,5) = ProdEcoli_icdNAD(:,3);
metProduction(:,6) = ProdEcoli_IP(:,3);

```

7.2.8. Análisis de robustez del flujo de UdhA respecto a la partición de isocitrato

```

% Se utilizó la distribución de lflujo calculadas para los flujos óptimos fijados
%Fijar Flujo óptimo de ACONTb (producción de Isocitrato) para cada cepa
ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'ACONTb',fluxEcoli(findRxnIDs(ecoli,'ACONTb')),'b');
ecoli_pntAB =
changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'ACONTb',fluxEcoli_pntAB(findRxnIDs(ecoli_pntAB,'ACONTb')),'b');
ecoli_icdNAD =
changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'ACONTb',fluxEcoli_icdNAD(findRxnIDs(ecoli_icdNAD,'ACONTb')),'b');
ecoli_IP =
changeRxnBounds(ecoli_IP,'ACONTb',fluxEcoli_IP(findRxnIDs(ecoli_IP,'ACONTb')),'b');

a = 1;
for j = 0.0:0.01:1.0; %Rango de particion a ICL (0 a 100%)
    flux = j*fluxEcoli(findRxnIDs(ecoli,'ACONTb'));
    flux_pntAB = j*fluxEcoli_pntAB(findRxnIDs(ecoli_pntAB,'ACONTb'));
    flux_icdNAD = j*fluxEcoli_icdNAD(findRxnIDs(ecoli_icdNAD,'ACONTb'));
    flux_IP = j*fluxEcoli_IP(findRxnIDs(ecoli_IP,'ACONTb'));

    ecoli = changeObjective(ecoli,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M');
    ecoli_icdNAD = changeObjective(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M');
    ecoli_pntAB = changeObjective(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M');
    ecoli_IP = changeObjective(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M');

    ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'l');
    ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'l');
    ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'l');
    ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',0,'l');

    ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',1000,'u');
    ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',1000,'u');
    ecoli_icdNAD =
changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',1000,'u');
    ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',1000,'u');

    %Variar Flujo de vía del glioxilato de cada Cepa
    ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'ICL',flux,'b');
    ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'ICL',flux_pntAB,'b');
    ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'ICL',flux_icdNAD,'b');
    ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'ICL',flux_IP,'b');

    ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'MALS',flux,'b');
    ecoli_pntAB = changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'MALS',flux_pntAB,'b');
    ecoli_icdNAD = changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'MALS',flux_icdNAD,'b');
    ecoli_IP = changeRxnBounds(ecoli_IP,'MALS',flux_IP,'b');

    %Calcular Tasa de Crecimiento Óptima de cada cepa
    FBAsolution = optimizeCbModel(ecoli,'max');
    FBAsolution_pntAB = optimizeCbModel(ecoli_pntAB,'max');
    FBAsolution_icdNAD = optimizeCbModel(ecoli_icdNAD,'max');
    FBAsolution_IP = optimizeCbModel(ecoli_IP,'max');

    %Fijar Tasa de Crecimiento Máxima de cada cepa
    ecoli = changeRxnBounds(ecoli,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',FBAsolution.f,'b');
    ecoli_pntAB =
changeRxnBounds(ecoli_pntAB,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',FBAsolution_pntAB.f,'b');
    ecoli_icdNAD =
changeRxnBounds(ecoli_icdNAD,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',FBAsolution_icdNAD.f,'b');
    ecoli_IP =
changeRxnBounds(ecoli_IP,'Ec_biomass_iJ01366_core_53p95M',FBAsolution_IP.f,'b');

    %Maximizar flujo de UdhA ante la tasa de crecimiento óptima
    obj = {'NADTRHD'};
    ecoli = changeObjective(ecoli,obj);

```

```

ecoli_icdNAD = changeObjective(ecoli_icdNAD,obj);
ecoli_pntAB = changeObjective(ecoli_pntAB,obj);
ecoli_IP = changeObjective(ecoli_IP,obj);

FBAsolution = optimizeCbModel(ecoli,'max');
FBAsolution_pntAB = optimizeCbModel(ecoli_pntAB,'max');
FBAsolution_icdNAD = optimizeCbModel(ecoli_icdNAD,'max');
FBAsolution_IP = optimizeCbModel(ecoli_IP,'max');

if (FBAsolution.stat == 0) %Descartar error cuando no exista solución.
    FBAsolution.x = zeros(3000,1);
    FBAsolution.x(36) = -j;
end;
if (FBAsolution_pntAB.stat == 0)
    FBAsolution_pntAB.x = zeros(3000,1);
    FBAsolution_pntAB.x(36) = -j;
end;
if (FBAsolution_icdNAD.stat == 0)
    FBAsolution_icdNAD.x = zeros(3000,1);
    FBAsolution_icdNAD.x(36) = -j;
end;
if (FBAsolution_IP.stat == 0)
    FBAsolution_IP.x = zeros(3000,1);
    FBAsolution_IP.x(36) = -j;
end;

RobUdha(a,1) = j*100; %Flujo via glioxilato (% de consume de isocitrato)
RobUdha(a,2) = FBAsolution.f; %Flujo UdhA
RobUdha(a,3) = FBAsolution_pntAB.f;
RobUdha(a,4) = FBAsolution_icdNAD.f;
RobUdha(a,5) = FBAsolution_IP.f;
RobUdha(a,6) = FBAsolution.x(8); %Tasa de crecimiento
RobUdha(a,7) = FBAsolution_pntAB.x(8);
RobUdha(a,8) = FBAsolution_icdNAD.x(8);
RobUdha(a,9) = FBAsolution_IP.x(8);
a = a + 1;
end;

```

7.2.9. Funciones utilizadas en los comandos anteriores

IterativeOpt

```

function fluxDistribution = IterativeOpt(model,objective)
%INPUTS
% model = Modelo
% objective = Reacción objetivo a optimizar
%OUTPUTS
% Distribución de flujos obtenida de la optimización iterativa

%% FBA y cálculo del consume de oxígeno óptimo
%Establecer reacción objetivo a optimizar
model = changeObjective(model,objective);

%Optimizar
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max');

%Restringir la reacción objetivo con el flujo óptimo obtenido en el paso anterior
model = changeRxnBounds(model,objective,FBAsolution.f,'b');

%Establecer la reacción de intercambio de oxígeno como la función objetivo
model = changeObjective(model,'EX_o2(e)');

%Calcular la tasa de consumo de oxígeno óptima ante el flujo calculado para la reacción
objetivo
FBAsolution = optimizeCbModel(model,'max');

```

```

%Restringir la tasa de consume de oxígeno al valor obtenido en el paso previo
model = changeRxnBounds(model,'EX_o2(e)',FBAsolution.f,'b');

%Establecer nuevamente la reacción objetivo para optimizar
model = changeObjective(model,objective);

%% Minimizar la suma de los cuadrados de los flujos
minmodel = minSum(model); %Función minSum
%% Minimizar Loops (aqueellos flujos con valores sobre 500), minimizando la suma de los
cuadrados de flujos
for i = 1:length(minmodel);
    if abs(minmodel(i)) < 500
        model = changeRxnBounds(model,model.rxns(i),minmodel(i),'b');
    end;
end;

fluxDistribution = minSum(model);

```

minSum

```

function result = minSum(model)
    % Muestrear optimos
    soluts = enumerateOptimalSolutions(model);
    % Encontrar óptimo de la muestra con menor suma de flujos
    SumaMin = 1000000*length(soluts.fluxes(:,1));
    for i = 1:length(soluts.fluxes(1,:));
        Suma = 0;
        for ii = 1:length(soluts.fluxes(:,1));
            Suma = Suma + (soluts.fluxes(ii,i))^2;
        end;
        MinSum(i,1) = Suma;
        if Suma < SumaMin;
            SumaMin = Suma;
            NuSumaMin = i;
        end;
    end;
    result = soluts.fluxes(:,NuSumaMin);
end

```

MetsProduction

```

function Production = MetsProduction(model,fluxDistribution)
%INPUTS
% model = Modelo
% fluxDistribution = Distribución de flujos
%OUTPUTS
% Tasas de Consumo/Producción de metabolitos

%% Calcular el Consumo/Producción de metabolitos
for i = 1:length(model.mets);
    sum_model = 0;
    for j = 1:length(model.rxns);
        aux_model = abs(fluxDistribution(j)*model.S(i,j));
        sum_model = sum_model + aux_model;
    end;
    sum_model = 0.5*sum_model;

    Production(i,1) = model.mets(i);
    Production(i,2) = model.metNames(i);
    Production(i,3) = {sum_model};
end;

```

7.3. Material Suplementario del análisis *Flux-Array*

7.3.1. Abreviaciones de los nombres de cada columna

Tabla A1. Abreviaciones de los subsistemas o vías metabólicas del modelo iJO1366

Abreviación	Subsistema
Ala-Asp	<i>Alanine and Aspartate Metabolism</i>
AltCar	<i>Alternate Carbon Metabolism</i>
Anaple	<i>Anaplerotic Reactions</i>
Arg-Pro	<i>Arginine and Proline Metabolism</i>
CellEnv	<i>Cell Envelope Biosynthesis</i>
CitricAc	<i>Citric Acid Cycle</i>
Cofact	<i>Cofactor and Prosthetic Group Biosynthesis</i>
Cys	<i>Cysteine Metabolism</i>
Exch	<i>Exchange</i>
Folate	<i>Folate Metabolism</i>
Glu	<i>Glutamate Metabolism</i>
GIPlipid	<i>Glycerophospholipid Metabolism</i>
Gly-Ser	<i>Glycine and Serine Metabolism</i>
GlycoGluco	<i>Glycolysis/Gluconeogenesis</i>
Glyoxy	<i>Glyoxylate Metabolism</i>
His	<i>Histidine Metabolism</i>
Inorglon	<i>Inorganic Ion Transport and Metabolism</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide Biosynthesis / Recycling</i>
MbLipid	<i>Membrane Lipid Metabolism</i>
Abreviación	<i>Subsistema</i>
Met	<i>Methionine Metabolism</i>
Methylglyo	<i>Methylglyoxal Metabolism</i>
MureinBio	<i>Murein Biosynthesis</i>
MureinRec	<i>Murein Recycling</i>
Nitrogen	<i>Nitrogen Metabolism</i>
Nucleotide	<i>Nucleotide Salvage Pathway</i>
OxPhospho	<i>Oxidative Phosphorylation</i>
PPP	<i>Pentose Phosphate Pathway</i>
PuPy	<i>Purine and Pyrimidine Biosynthesis</i>
Pyruv	<i>Pyruvate Metabolism</i>
Thr-Ser	<i>Threonine and Lysine Metabolism</i>
TransInn	<i>Transport, Inner Membrane</i>
TransOut	<i>Transport, Outer Membrane</i>
TransPorin	<i>Transport, Outer Membrane Porin</i>
tRNA	<i>tRNA Charging</i>
Tyr-Trp-Phe	<i>Tyrosine, Tryptophan, and Phenylalanine Metabolism</i>
Val-Leu-Ile	<i>Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism</i>
Unassigned	<i>Unassigned</i>

7.3.2. Principales cambios entre cepas: *icd*^{NAD} versus *icd*^{NADP}Tabla A2. Cambios principales de la cepa *icd*^{NAD} respecto de la *wild type*

Reacción	Enzima	Subsistema	Proporción
NDPK1	nucleoside-diphosphate kinase (ATP:GDP)	Nucleotide Salvage Pathway	1,00
PPM	phosphopentomutase	Alternate Carbon Metabolism	1,00
R15BPK	ribose-1,5-bisphosphokinase	Alternate Carbon Metabolism	1,00
R1PK	ribose 1-phosphokinase	Alternate Carbon Metabolism	1,00
THD2pp	NAD(P) transhydrogenase (periplasm)	Oxidative Phosphorylation	1,00
SUCOAS	succinyl-CoA synthetase (ADP-forming)	Citric Acid Cycle	0,65
AKGDH	2-Oxoglutarate dehydrogenase	Citric Acid Cycle	0,64
ICDHyr	isocitrate dehydrogenase (NADP)	Citric Acid Cycle	0,63
ATPS4rpp	ATP synthase (four protons for one ATP) (periplasm)	Oxidative Phosphorylation	0,60
CYTBO3_4pp	cytochrome oxidase bo3 (ubiquinol-8: 4 protons) (periplasm)	Oxidative Phosphorylation	0,60
FUM	fumarase	Citric Acid Cycle	0,55
CS	citrate synthase	Citric Acid Cycle	0,55
ACONTa	aconitase (half-reaction A, Citrate hydro-lyase)	Citric Acid Cycle	0,55
ACONTb	aconitase (half-reaction B, Isocitrate hydro-lyase)	Citric Acid Cycle	0,55
ME2	malic enzyme (NADP)	Anaplerotic Reactions	0,39
ICL	isocitrate lyase	Anaplerotic Reactions	0,38
MALS	malate synthase	Anaplerotic Reactions	0,38
ACL5	acetolactate synthase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,38
DHAD1	dihydroxy-acid dehydratase (2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate)	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,38
KARA1	ketol-acid reductoisomerase (2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate)	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,38
VALTA	valine transaminase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,38
PI2rpp	phosphate reversible transport via symport (periplasm)	Inorganic Ion Transport and Metabolism	0,38
ASPK	aspartate kinase	Threonine and Lysine Metabolism	0,38
ASAD	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Threonine and Lysine Metabolism	0,38
PGCD	phosphoglycerate dehydrogenase	Glycine and Serine Metabolism	0,38
PSERT	phosphoserine transaminase	Glycine and Serine Metabolism	0,38
PSP_L	phosphoserine phosphatase (L-serine)	Glycine and Serine Metabolism	0,38
HSDy	homoserine dehydrogenase (NADPH)	Threonine and Lysine Metabolism	0,38
GHMT2r	glycine hydroxymethyltransferase, reversible	Glycine and Serine Metabolism	0,38
PPKr	polyphosphate kinase	Oxidative Phosphorylation	0,38
FADRx	FAD reductase	Cofactor and Prosthetic Group Biosynthesis	0,38
CBMKr	Carbamate kinase	Unassigned	0,38
GLNS	glutamine synthetase	Glutamate Metabolism	0,38
MTHFC	methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	Folate Metabolism	0,38
MTHFD	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP)	Folate Metabolism	0,38
RPI	ribose-5-phosphate isomerase	Pentose Phosphate Pathway	0,38
PPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase	Anaplerotic Reactions	0,38
PGM	phosphoglycerate mutase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,38
ENO	enolase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,38
RPE	ribulose 5-phosphate 3-epimerase	Pentose Phosphate Pathway	0,38
PGK	phosphoglycerate kinase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,38
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,38
TPI	triose-phosphate isomerase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,38
FBP	fructose-bisphosphatase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,38
FBA	fructose-bisphosphate aldolase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,38
GLUDy	glutamate dehydrogenase (NADP)	Glutamate Metabolism	0,38
ASPTA	aspartate transaminase	Alanine and Aspartate Metabolism	0,38
NADTRHD	NAD transhydrogenase	Oxidative Phosphorylation	0,00
ADK1	adenylate kinase	Nucleotide Salvage Pathway	0,00
PRPPS	phosphoribosylpyrophosphate synthetase	Histidine Metabolism	0,00
HSK	homoserine kinase	Threonine and Lysine Metabolism	0,00
THRS	threonine synthase	Threonine and Lysine Metabolism	0,00
AICART	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
HCO3E	HCO3 equilibration reaction	Unassigned	0,00
IPMD	3-isopropylmalate dehydrogenase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
IPPS	2-isopropylmalate synthase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
LEUTAi	leucine transaminase (irreversible)	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
OMCDC	2-Oxo-4-methyl-3-carboxypentanoate decarboxylation	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
GARFT	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
GLUPRT	glutamine phosphoribosylidiphosphate amidotransferase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
PRAGSf	phosphoribosylglycinamide synthase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
PRAIS	phosphoribosylaminoimidazole synthase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
PRFGS	phosphoribosylformylglycinamide synthase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
ADSL2r	adenylosuccinate lyase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
AIRC2	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
PRASCsi	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
AIRC3	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (mutase rxn)	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
IPPMia	3-isopropylmalate dehydratase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
IPPMib	2-isopropylmalate hydratase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
IMPC	IMP cyclohydrolase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
TKT2	transketolase	Pentose Phosphate Pathway	0,00
VPAMTr	Valine-pyruvate aminotransferase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
ADK3	adenylylate kinase (GTP)	Nucleotide Salvage Pathway	0,00

Los valores de proporción se calcularon de la normalización de la proporción de los flujos respecto al consumo de acetato en un rango de 0 a 1. Verde indica aumento y rojo disminución.

7.3.3. Principales cambios entre cepas: *icd*^{NAD} Δ *pntAB* versus *icd*^{NADP} Δ *pntAB*Tabla A3. Cambios principales de la cepa *icd*^{NAD} Δ *pntAB* respecto de la Δ *pntAB*

Reacción	Enzima	Subsistema	Proporción
G6PDH2r	glucose 6-phosphate dehydrogenase	Pentose Phosphate Pathway	1,00
GND	phosphogluconate dehydrogenase	Pentose Phosphate Pathway	1,00
PGI	glucose-6-phosphate isomerase	Glycolysis/Gluconeogenesis	1,00
PGL	6-phosphogluconolactonase	Pentose Phosphate Pathway	1,00
TALA	transaldolase	Pentose Phosphate Pathway	1,00
TKT1	transketolase	Pentose Phosphate Pathway	1,00
RPI	ribose-5-phosphate isomerase	Pentose Phosphate Pathway	0,76
FBA	fructose-bisphosphate aldolase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,72
FBP	fructose-bisphosphatase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,72
TPI	triose-phosphate isomerase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,69
NADH16pp	NADH dehydrogenase (ubiquinone-8 & 3 protons) (periplasm)	Oxidative Phosphorylation	0,63
SUCOAS	succinyl-CoA synthetase (ADP-forming)	Citric Acid Cycle	0,61
ATPS4rpp	ATP synthase (four protons for one ATP) (periplasm)	Oxidative Phosphorylation	0,61
AKGDH	2-Oxoglutarate dehydrogenase	Citric Acid Cycle	0,61
CYTBO3_4pp	cytochrome oxidase bo3 (ubiquinol-8: 4 protons) (periplasm)	Oxidative Phosphorylation	0,60
ICDHyr	isocitrate dehydrogenase (NADP)	Citric Acid Cycle	0,60
PGK	phosphoglycerate kinase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,55
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis/Gluconeogenesis	0,55
ICL	isocitrate lyase	Anaplerotic Reactions	0,43
MALS	malate synthase	Anaplerotic Reactions	0,43
ME2	malic enzyme (NADP)	Anaplerotic Reactions	0,39
NDPK1	nucleoside-diphosphate kinase (ATP:GDP)	Nucleotide Salvage Pathway	0,38
VALTA	valine transaminase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,38
ACLS	acetolactate synthase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,38
DHAD1	dihydroxy-acid dehydratase (2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate)	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,38
KARA1	ketol-acid reductoisomerase (2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate)	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,38
GLUDy	glutamate dehydrogenase (NADP)	Glutamate Metabolism	0,38
ASPK	aspartate kinase	Threonine and Lysine Metabolism	0,38
ASAD	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	Threonine and Lysine Metabolism	0,38
PGCD	phosphoglycerate dehydrogenase	Glycine and Serine Metabolism	0,38
PSERT	phosphoserine transaminase	Glycine and Serine Metabolism	0,38
PSP_L	phosphoserine phosphatase (L-serine)	Glycine and Serine Metabolism	0,38
ASPTA	aspartate transaminase	Alanine and Aspartate Metabolism	0,38
HSDy	homoserine dehydrogenase (NADPH)	Threonine and Lysine Metabolism	0,38
GHMT2r	glycine hydroxymethyltransferase, reversible	Glycine and Serine Metabolism	0,38
PI2rpp	phosphate reversible transport via symport (periplasm)	Inorganic Ion Transport and Metabolism	0,38
PRPPS	phosphoribosylpyrophosphate synthetase	Histidine Metabolism	0,38
CBMKr	Carbamate kinase	Unassigned	0,38
PPM	phosphopentomutase	Alternate Carbon Metabolism	0,38
GLNS	glutamine synthetase	Glutamate Metabolism	0,38
MTHFC	methyltetrahydrofolate cyclohydrolase	Folate Metabolism	0,38
MTHFD	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP)	Folate Metabolism	0,38
R15BPK	ribose-1,5-bisphosphokinase	Alternate Carbon Metabolism	0,38
R1PK	ribose 1-phosphokinase	Alternate Carbon Metabolism	0,38
PPKr	polyphosphate kinase	Oxidative Phosphorylation	0,38
FADRx	FAD reductase	Cofactor and Prosthetic Group Biosynthesis	0,38
NADTRHD	NAD transhydrogenase	Oxidative Phosphorylation	0,00
HSK	homoserine kinase	Threonine and Lysine Metabolism	0,00
THRS	threonine synthase	Threonine and Lysine Metabolism	0,00
AICART	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
HCO3E	HCO3 equilibration reaction	Unassigned	0,00
IPMD	3-isopropylmalate dehydrogenase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
IPPS	2-isopropylmalate synthase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
LEUTAi	leucine transaminase (irreversible)	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
OMCDC	2-Oxo-4-methyl-3-carboxypentanoate decarboxylation	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
GLUPRT	glutamine phosphoribosylidiphosphate amidotransferase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
PRAGSr	phosphoribosylglycinamide synthase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
PRAIS	phosphoribosylaminoimidazole synthase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
PRFGS	phosphoribosylformylglycinamide synthase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
ADSL2r	adenylosuccinate lyase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
AIRC2	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
PRASCSi	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
GARFT	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
NDPK2	nucleoside-diphosphate kinase (ATP:UDP)	Nucleotide Salvage Pathway	0,00
AIRC3	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (mutase rxn)	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
IPPMia	3-isopropylmalate dehydratase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
IPPMib	2-isopropylmalate hydratase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
IMPC	IMP cyclohydrolase	Purine and Pyrimidine Biosynthesis	0,00
TKT2	transketolase	Pentose Phosphate Pathway	0,00
VPAMTr	Valine-pyruvate aminotransferase	Valine, Leucine, and Isoleucine Metabolism	0,00
RPE	ribulose 5-phosphate 3-epimerase	Pentose Phosphate Pathway	0,00

Los valores de proporción se calcularon de la normalización de la proporción de los flujos respecto al consumo de acetato en un rango de 0 a 1. Verde indica aumento y rojo disminución.

7.4. Expresión de genes en *E. coli* durante el crecimiento en acetato

FIG. 2. The expression levels of central metabolic pathway genes in acetate compared with those in glucose. The numbers beside gene names represent the expected -fold changes of expression levels calculated from six repetitions of experiments. The red arrows represent the induced genes, and green arrows represent the repressed genes in acetate compared with in glucose with more than 95% confidence. The thicker the arrows, the higher the genes were regulated. G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; F1,6P, fructose 1,6-phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; PYR, pyruvate; AcCoA, acetyl-CoA; Ac-P, acetylphosphate; ICT, isocitrate; SUC, succinate; OAA, oxaloacetate; 6PGnt, 6-phosphogluconate; Ru5P, ribulose 5-phosphate; R5P, ribose 5-phosphate; X5P, xylulose 5-phosphate. The gene names followed the *E. coli* K-12 linkage map in Ref. 50.

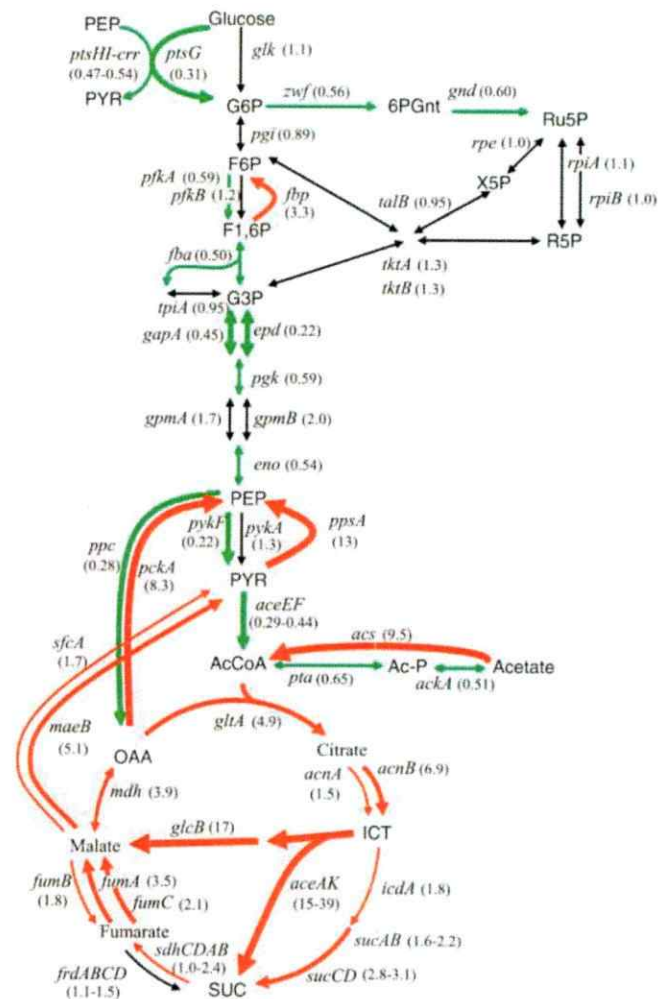


Figura A2. Comparación de la expresión de genes de las vías centrales de *E. coli* en condiciones de crecimiento en acetato y en glucosa

Esta figura fue extraída del artículo de Oh y col. (2002). Aquí se muestra en verde aquellos genes que se expresaron más durante el crecimiento en glucosa, mientras que en rojo cuando lo hicieron mayoritariamente en el crecimiento en acetato. El grosor de las flechas se relaciona con el nivel de expresión.