



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Modelado metabólico de una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza xilosa y glucosa como sustrato para la producción de etanol

Jennifer Escobar Zuluaga

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Ingeniería Química
Medellín, Colombia

2016

Modelado metabólico de una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza xilosa y glucosa como sustrato para la producción de etanol

Jennifer Escobar Zuluaga

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Director:

Rigoberto Ríos Estepa Ph.D. Ingeniería Química

Línea de Investigación:

Ingeniería Metabólica

Grupo de Investigación:

Biotecnología Industrial

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento Ingeniería Química
Medellín, Colombia

2016

*Son los problemas sin resolver, no los
resueltos, los que mantienen activa la mente*

Erwin Guido Kolbenheyer

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecerle a Dios por la oportunidad de emprender este camino y darme ánimos para seguir en la lucha por alcanzar mis metas.

Al profesor Rigoberto Ríos Estepa, Director de la investigación, por sus enseñanzas, paciencia, comprensión, motivación y confianza depositada en mí.

A mi hermosa familia, que siempre estuvieron a mi lado incondicionalmente y me alentaron a seguir adelante, los amo.

Al estudiante de doctorado de la Universidad Nacional, Víctor López, por sus enseñanzas en el manejo del software COBRA y sobre ingeniería metabólica. Mis mejores deseos en su trabajo.

A la Universidad Nacional por ser mi ALMA MÁTER.

Y finalmente a todos aquellos que de alguna manera me apoyaron como amigos y que fueron de vital importancia en este trabajo.

Resumen

La producción eficiente y sustentable de biocombustibles a partir de material lignocelulósico sigue siendo un área de intensa actividad investigativa en la cual *S. cerevisiae* (Sc) continua siendo el organismo por excelencia que más se emplea. En el presente trabajo se construye el modelo metabólico i1583Je2015 de una cepa mutante de Sc que contiene el gen codificante de xilosa isomerasa, proteína de transporte de xilosa proveniente de *P. stipitis* y el gen adhII de *Z. mobilis*, con el fin de evaluar su desempeño en la producción de etanol al utilizar como sustrato xilosa y glucosa. El modelo contiene 1583 reacciones, 1228 metabolitos y 901 genes. La validación del modelo se realizó mediante la simulación de datos experimentales usando FBA, delección de genes y FVA. A partir de las simulaciones realizadas con FBA se generaron estrategias en ingeniería genética para mejorar la producción de etanol, obteniendo que mediante la inserción de la reacción catalizada por la enzima GAPN, la producción de etanol de la cepa mutante aumenta aproximadamente en un 8%.

Palabras clave: *S. cerevisiae*, Etanol, Material lignocelulósico, Metabolismo.

Abstract

Nowadays, an efficient and sustainable production of biofuels from lignocellulosic material is still an area of intense research; for this, *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) maintains its position as the most prominent organism for this purpose. This work evaluates the development and performance of the genome-scale metabolic model i1583Je2015 of Sc mutant strain which contains the xylose isomerase encoding gene, a transport protein from *P. stipitis* and the *adh11* gen from *Z. mobilis*, in the use of xylose and glucose as carbon source for ethanol production. The reconstructed metabolic model comprises 1583 reactions, 1228 metabolites, and 901 genes. The model was validated through simulation of experimental data using FBA, gene knockout and FVA. Genetic Engineering strategies aim at improving cell performance were generated by means of an FBA analysis. It was observed that, the insertion of the GAPN-catalyzed reaction would render an increment of 8% in ethanol biosynthesis, using the recombinant organism.

Keywords: *S. cerevisiae*, ethanol, lignocellulosic material, metabolism.

Contenido

1. Capítulo 1 <i>S. cerevisiae</i> como biofábrica para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico.....	22
1.1 Metabolismo de <i>S. cerevisiae</i>	23
1.1.1 Metabolismo de hexosas: Principales rutas	24
1.2 Metabolismo de otros azúcares: xilosa.....	25
1.2.1 Transporte de xilosa	27
1.2.2 Conversión de xilosa a xilulosa.....	29
1.2.3 Enzimas de la ruta no oxidativa de la pentosa fosfato.....	32
2. Capítulo 2 Biología de sistemas.....	34
2.1 Ciencias ómicas	35
2.2 Modelos metabólico a escala genómica	36
2.2.1 Modelos metabólicos de <i>S. cerevisiae</i>	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1 Reconstrucción del Modelo Metabólico i1583Je2015	40
3.1.1 Curado del modelo iMM904.....	41
3.2 Modificaciones realizadas al modelo iMM904 para dar origen al modelo i1583Je2015.....	43
3.3 Análisis de balance de flujo	45
3.3.1 Conversión de la red metabólica en un modelo matemático	45
3.3.2 Restricciones	46
3.3.3 Análisis de Balance de flujo (FBA).....	46
3.3.4 Restricciones del problema lineal	47
3.3.5 Función objetivo.....	48
3.4 Validación del modelo i1583Je2015.....	48
3.4.1 Crecimiento de la cepa en condiciones aerobias y anaerobias	48
3.4.2 Deleción de genes	52
3.4.3 Soluciones óptimas alternativas.....	53
3.5 Análisis de las limitaciones metabólicas de la cepa mutante en condiciones aerobias y anaerobias empleando FBA	55
3.5.1 Estrategias de ingeniería genética para el mejoramiento de la cepa mutante de <i>S. cerevisiae</i>	56
4. Capítulo 4 Resultados y Análisis	58
4.1 Construcción del modelo i1583Je2015.....	58
4.1.1 Reacciones adicionadas	58
4.1.2 Cambios asociación gen-proteína-reacción	59
4.1.3 Eliminación de reacciones y cambios relacionados con la direccionalidad de la reacciones.....	60
4.1.4 Descripción del modelo i1583Je2015	63
4.2 Validación del modelo i1583Je2015	64
4.2.1 Simulaciones de la velocidad de crecimiento de la cepa en condiciones aerobias y anaerobias	64
4.2.2 Deleción de genes	68
4.2.3 Análisis de variabilidad de flujo	69
4.3 Análisis de las limitaciones metabólicas de la cepa mutante	75
4.3.1 Crecimiento de la cepa mutante emplean como fuente de carbono glucosa y/o xilosa 75	

4.3.2 Distribución de fluxes de la cepa mutante empleando glucosa y xilosa	76
4.3.3 Estrategias de Ingeniería Genética para el mejoramiento de la cepa mutante	81
Conclusiones y recomendaciones	85
5.1 Conclusiones	85
5.2 Recomendaciones	86

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 Metabolismo de los azúcares para la producción de etanol.....	24
Figura 2 Ruta de consumo de xilosa en hongos y bacterias. Adaptada de (Akinori Matsushika et al., 2009)	26
Figura 3 Reconstrucción de un modelo a escala genómica	35
Figura 4 Modelos de <i>S. cerevisiae</i> - Información de (Österlund et al., 2012)Capítulo 3 Materiales y Métodos	39
Figura 5 Validación del modelo comparando los valores de predicción <i>in silico</i> de crecimiento y producción de etanol con datos experimentales. Se emplea glucosa como fuente de carbono (a) la velocidad de crecimiento <i>in silico</i> vs velocidad de crecimiento <i>in vivo</i> para condiciones aerobias y anaerobias, (b) Producción de etanol <i>in silico</i> vs producción de etanol <i>in vivo</i> para condiciones aerobias y anaerobias. Triángulo azul, anaerobio; círculo naranja, aerobio.	65
Figura 6: Validación del modelo comparando los valores de predicción <i>in silico</i> de crecimiento con datos experimentales. Se emplea glucosa como fuente de carbono Velocidad de crecimiento simulada y experimental vs flux de glucosa en condiciones anaerobias (d) Velocidad de crecimiento simulada y experimental vs flux de glucosa en condiciones aerobias.....	66
Figura 7 Resultados de FBA y FVA para las condiciones experimentales anaerobias de la Tabla 6. En la abscisa se encuentra las condiciones experimentales y en la ordena el flux de formación de los productos en mmol/gDWh (a) FBA y FVA para acetato, (b) glicerol, (c) etanol, (d) piruvato.	71
Figura 8 Resultados de FBA y FVA para las condiciones experimentales anaerobias de la Tabla 6. En la abscisa se encuentra las condiciones experimentales y en la ordena el flux de formación de los productos en mmol/gDWh (a) FBA y FVA para succinato.....	72
Figura 9 Resultados de FBA y FVA para las condiciones experimentales aerobias de la Tabla 6. En la abscisa se encuentra las condiciones experimentales y en la ordena el flux de formación de los productos en mmol/gDWh (a) FBA y FVA para acetato, (b) glicerol, (c) etanol, (d) piruvato.	73
Figura 10 Distribución de fluxes empleando glucosa y xilosa como fuente de carbono bajo condiciones aerobias y anaerobias. Primer cuadro: Glucosa (11.1 mmol/gDWh) – Aerobio. Segundo cuadro: Glucosa (11.5 mmol/gDWh) – Anaerobio. Tercer cuadro: Xilosa (11.1 mmol/gDWh) – Aerobio. Cuarto cuadro: Xilosa (11.5 mmol/gDWh) – Anaerobio.....	78

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 Modificaciones genéticas realizadas a la cepa de <i>S. cerevisiae</i>	40
Tabla 2 Base de datos empleadas para la construcción del modelo metabólico.....	42
Tabla 3 Modificaciones realizadas al modelo iMM904	44
Tabla 4 Datos experimentales en condiciones anaerobias empleados para la validación del modelo i1583Je2015	50
Tabla 5 Datos experimentales en condiciones aerobias empleados para la validación del modelo i1583Je2015	51
Tabla 6 Datos experimentales empleados para realizar FVA	54
Tabla 7 Datos experimentales empleados para realizar las simulaciones	55
Tabla 8 Estrategias para el mejoramiento genético de la cepa mutante	57
Tabla 9 Modificación del modelo base: Reacciones adicionadas	58
Tabla 10 Cambios relacionados con la asociación gen-proteína-reacción.....	59
Tabla 11 Resultados obtenidos al aplicar la herramienta computacional MC3	61
Tabla 12 Cambios realizados según los resultados obtenidos del software MC3	61
Tabla 13 Clasificación del sistema de reacciones que conforman el modelo i1581Je2015	62
Tabla 14 Localización de los metabolitos en los modelos i1583Je2015 y Yeast 6.....	63
Tabla 15 Datos experimentales e <i>in silico</i> del crecimiento de la cepa y su producción de etanol bajo diferentes fluxes de glucosa y en un medio anaerobio. Las cantidades de sustrato y etanol se encuentran en mmol/gDWh	67
Tabla 16 Datos experimentales e <i>in silico</i> del crecimiento de la cepa y su producción de etanol bajo diferentes fluxes de glucosa y en un medio aerobio. Las cantidades de sustrato y etanol se encuentran en mmol/gDWh	68
Tabla 17 Resultados obtenidos de la delección de genes	69
Tabla 18 Velocidad específica de crecimiento $h - 1$ y velocidades de consumo y formación de producto $mmol/gDWh$ bajo diferentes condiciones	75
Tabla 19 Estrategias de ingeniería genética para el mejoramiento en la producción de etanol de la cepa mutante de <i>S. cerevisiae</i> bajo condiciones anaerobias. El % de sustrato empleado, equivale a la cantidad de glucosa en el medio, es decir, 30% significa 30% glucosa y 70% xilosa.	83
Tabla 20 Estrategias de ingeniería genética para el mejoramiento en la producción de etanol de la cepa mutante de <i>S. cerevisiae</i> bajo condiciones aerobias. El % de sustrato empleado, equivale a la cantidad de glucosa en el medio, es decir, 30% significa 30% glucosa y 70% xilosa.	84

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>adhII</i>	Gen codificante de la enzima Alcohol deshidrogenasa II de <i>Zymomonas mobilis</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
E4P	Eritrosa-4-fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
FAD	Forma oxidada de Flavín Adenin Dinucleótido
FADH ₂	Forma reducida de Flavín Adenin Dinucleótido
FBA	Flux Balance Analysis
FVA	Flux Variability Analysis
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GPR	Asociación gen-proteína-reacción
HXT	Familia de 18 genes transportadores de hexosas de <i>S. cerevisiae</i>
KDG	α -ceto glutarato deshidrogenasa
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MFA	Análisis de flujo metabólico
NAD ⁺	Forma oxidada de nicotin adenin dinucleótido
NADH	Forma reducida de nicotin adenin dinucleótido
NADP ⁺	Forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH ⁺	Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
R5P	Ribosa-5-fosfato
RCC	Respuesta de represión catalítica por carbono
RPF	Ruta de la pentosa fosfato
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TAL	Transaldolasa
TCA	Ácidos tricarbóxicos
TKL	Transcetolasa
v	Vector de fluxes
v_{max}	Valor máximo de un flux
v_{min}	Valor mínimo de un flux
X5P	Xilulosa-5-fosfato
XDH	Xilosa deshidrogenasa

Abreviatura	Término
XI	Xilosa isomerasa
XR	Xilosa reductasa
<i>xyIA</i>	Gen codificante de la enzima xilosa Isomerasa procariota
XYLB	Xyluloquinasa
Z	Función objetivo

Introducción

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es una de las fuentes de carbono renovable más prometedora en la solución de los problemas actuales de generación de energía (Eliasson, Hofmeyr, Pedler, & Hahn-Hägerdal, 2001; Yong-Su Jin, Alper, Yang, & Stephanopoulos, 2005; Parachin, Bergdahl, van Niel, & Gorwa-Grauslund, 2011; Tejada et al., 2010). No obstante, a pesar de su gran potencial, el aprovechamiento exitoso de los hidrolizados del material lignocelulósico como materia prima en procesos fermentativos se ha visto reducido, principalmente, por las limitadas capacidades metabólicas de los organismos que simultáneamente pueden catabolizar hexosas (D-galactosa, D-manosa, L-ramnosa, L-fructosa) y pentosas (D-xilosa, L-arabinosa) (Meinander, Boels, & Hahn-Hägerdal, 1999; Parachin et al., 2011).

La xilosa es el segundo azúcar de mayor contenido en el material lignocelulósico después de la glucosa. Este monosacárido es el segundo azúcar más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, y su utilización, como fuente alternativa para la obtención de energía, representa un reto para la industria biotecnológica (Parachin et al., 2011).

Algunas levaduras fermentan xilosa para obtener etanol, entre ellas se encuentran *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* y *Candida saeta*; dado que estas levaduras tienen baja tolerancia a altas concentraciones de etanol, los rendimientos de producto se ven reducidos (Parachin et al., 2011; J.-P. Pitkänen, Aristidou, Salusjärvi, Ruohonen, & Penttilä, 2003). Adicionalmente, estos organismos requieren ambientes microaerobios no claramente especificados y son sensibles a inhibidores presentes en los hidrolizados de lignocelulosa sintetizados durante el proceso de pretratamiento (ácidos orgánicos y derivados fenólicos) (Chu & Lee, 2007; Parachin et al., 2011). El pretratamiento físico y/o químico para la remoción de estos contaminantes genera sobrecostos en el bioproceso para la síntesis de etanol (Meinander et al., 1999).

De otra parte, *Saccharomyces spp.* es un microorganismo ideal para la producción de etanol a nivel industrial dado que presenta un alto rendimiento de producto y tolera altas concentraciones de etanol; sin embargo, *Saccharomyces* tiene la limitación de no poder utilizar efectivamente xilosa como única fuente de carbono (Eliasson et al., 2001; Parachin et al., 2011; J.-P. Pitkänen et al., 2003). En este sentido, se han realizado diversos esfuerzos a nivel molecular para transformar *Saccharomyces cerevisiae* de manera que convierta eficientemente xilosa a etanol. De manera general, inicialmente se requiere la expresión de genes heterólogos que le permitan convertir xilosa en xilulosa y mejoren el consumo de xilulosa, dado que *S. cerevisiae* crece en este sustrato a una tasa máxima diez veces menor que en glucosa (J.-P. Pitkänen et al., 2003). En los últimos años, se han integrado dos rutas diferentes al genoma de *S. cerevisiae* buscando facultarla para la utilización de xilosa como fuente de carbono; primero, la ruta de óxido/reducción, la cual utiliza la enzima xilosa reductasa (XR) y xilosa deshidrogenasa (XDH) obtenida generalmente de *Pichia stipitis* para convertir xilosa en xilulosa, con xilitol como intermediario (Parachin et al., 2011); segundo, la ruta de isomerización en la que xilosa es convertida directamente a xilulosa por la acción de xilosa isomerasa (XI) (Parachin et al.,

2011; J.-P. Pitkänen et al., 2003). En ambas rutas, la xilulosa entra a la ruta pentosa fosfato para ser posteriormente metabolizada. A pesar de que la expresión de las enzimas XR y XDH en *S. cerevisiae* ha sido exitosa, la velocidad de consumo de xilosa continúa siendo baja y el desbalance de los cofactores NADP⁺ y NAD⁺ generado en los primeros pasos de la ruta (Hjersted, Henson, & Mahadevan, 2007; Parachin et al., 2011; J.-P. Pitkänen et al., 2003) aparentemente limita la conversión a etanol (Parachin et al., 2011; J.-P. Pitkänen et al., 2003; van Maris et al., 2006).

Un reconocido grupo de investigación en Colombia, adelanta un proyecto a nivel doctoral relacionado con el mejoramiento genético de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol, a partir de xilosa y glucosa como derivado de material lignocelulósico. Como resultado parcial, se cuenta con una cepa mutante que incluye el gen codificante de la enzima xilosa isomerasa (gen *xylA* codificante de la enzima xilosa isomerasa procarionota) y de proteína transportadora de xilosa provenientes de *Pichia stipitis*. La cepa transformada también incluye el gen *adhII*, codificante de la enzima Alcohol deshidrogenasa II de *Zymomonas mobilis*, con esta modificación se buscó redireccionar el flujo del carbono hacia la generación de etanol. Aunque de manera eficiente la cepa consume glucosa y xilosa, presenta bajos rendimientos de etanol.

Las limitaciones en la capacidad metabólica de un organismo, eventualmente pueden ser identificadas mediante un análisis sistémico del metabolismo celular, basado principalmente en el modelado y simulación de procesos metabólicos. El análisis de flujo metabólico, MFA por sus siglas en inglés, ha surgido como la herramienta más ampliamente usada en la representación y simulación del metabolismo celular (Yong-Su Jin & Jeffries, 2004; Stephanopoulos, 1999). A partir de su uso, es posible identificar la distribución de flujos metabólicos al interior del ambiente celular y con base en él, generar hipótesis de mejoramiento genético que pueden ser evaluadas experimentalmente. Este trabajo de investigación estuvo orientado a estudiar las limitaciones metabólicas de la cepa mutante de *S. cerevisiae* que emplea como fuente de carbono xilosa y glucosa simultáneamente. En primera instancia, se desarrolla el modelo metabólico i1583Je2015 de la cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de reportes de literatura y bases de datos en línea (KEGG (Ogata et al., 1999), COPASI (Biocomplexity Institute of Virginia Tech, University of Heidelberg, & University of Manchester, n.d.)), luego, empleando el modelo se simulan diversos eventos de la actividad metabólica de la cepa transformada, con el objetivo de identificar limitaciones asociadas al catabolismo de glucosa y xilosa y, generar hipótesis de mejoramiento genético factibles de ser probadas experimentalmente.

1. Capítulo 1 *S. cerevisiae* como biofábrica para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico

El índice de consumo energético muestra una fuerte tendencia al alza. Se proyecta que entre el 2014 y el 2040 la demanda de energía se incrementará en un 37% (*International Energy Agency, 2014*), lo que genera preocupación mundial sobre cómo responder a este aumento de manera sostenible, sin tener una alta dependencia de los combustibles fósiles, que son causantes del cambio climático y que han desencadenado innumerables consecuencias tanto ambientales, como económicas, sociales y políticas.

Realizar la transición de una economía basada en el petróleo, a una que explota el potencial de energías alternativas como la biomasa, requiere solucionar retos tecnológicos, ecológicos y de sostenibilidad (Arora, Behera, & Kumar, 2015; Khoo, 2015; Kumar, Singh, Baskar, & Ramakrishna, 2015). La conversión de fuentes de biomasa a combustibles como el bioetanol, ha ganado mucha importancia en los últimos años; sin embargo, lograr que el proceso sea sostenible aún requiere de estudios y desarrollo de tecnologías innovadoras que aumenten rendimientos y eficiencia (Choi, Lee, Jang, & Lee, 2014; Khoo, 2015; Kumar et al., 2015).

El incremento del uso de biomasa como sustrato para la producción de combustibles ha generado un aumento en el número de hectáreas dedicadas a este proceso, lo cual genera problemas en el ecosistema y más aún, puede llegar a competir con el suministro de alimentos en diferentes regiones del mundo. Para salvaguardar esta problemática, el material lignocelulósico, compuesto por celulosa, hemicelulosa y lignina, representa una de las alternativas más atractivas en la generación de energía renovable. Esta línea de trabajo, sigue teniendo una intensa actividad investigativa ya que su tecnología se encuentra aún en desarrollo (Wei, Oh, Million, Cate, & Jin, 2015; Zhao et al., 2011).

Uno de los tópicos de trabajo más dinámicos en el área, ha sido el buscar alternativas de solución al problema de limitaciones de tipo fisiológico que algunos microorganismos poseen, mediante mejoramiento genético, buscando aprovechar el gran contenido de sustratos que el material lignocelulósico posee. Específicamente, se viene trabajando en generar cepas modificadas de *S. cerevisiae* que puedan utilizar xilosa para producir eficientemente etanol; contrario a lo que ocurre con diversas levaduras que fermentan xilosa, *S. cerevisiae* produce altas concentraciones de etanol a partir de glucosa y puede soportar concentraciones elevadas antes de ser inhibida (Moon, Lewis Liu, Ma, & Slininger, 2013; Rozanov, Kotenko, Akberdin, & Peltek, 2015; Sakihama, Hasunuma, & Kondo, 2015), lo que la perfila como el organismo más prometedor para ser empleado en la producción de biocombustibles a partir de material lignocelulósico. Levaduras como *Candida intermedia*, *Pichia stipitis* y *Arabidopsis thaliana* pueden ser inhibidas por productos generados en la hidrólisis del material lignocelulósico o por concentraciones altas de etanol, provocando bajos rendimientos de producto y costos de operación más elevados (Akinori Matsushika, Inoue, Kodaki, & Sawayama, 2009; Sedlak & Ho, 2004).

S. cerevisiae exhibe una alta tolerancia a sustancias inhibitoras como los derivados del furano, ácidos débiles y fenoles, presentes en los hidrolizados de material lignocelulósico y es capaz de crecer a pH bajos, lo que minimiza el riesgo de contaminación y disminuye los costos asociados a procesos de esterilización a escala industrial (Hohenschuh, Hector, & Murthy, 2015). Sin embargo, la levadura no metaboliza eficientemente azúcares de cinco carbonos como xilosa, ya que a pesar de poseer una ruta metabólica específica para metabolizar xilosa, los genes involucrados presentan un nivel de expresión bajo, (Young, Lee, & Alper, 2010) ocasionando que el crecimiento de la levadura en xilosa como única fuente de carbono no se vea favorecido (Eliasson et al., 2001; Parachin et al., 2011; J.-P. Pitkänen et al., 2003; Young et al., 2010). Para que la producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico sea económicamente viable, se requiere que la levadura pueda emplear todos los azúcares presentes en el hidrolizado como fuente de carbono (Hohenschuh et al., 2015; J.-P. Pitkänen et al., 2003; Shin et al., 2015; Stephanopoulos, 2007; Walfridsson, Hallborn, Penttilä, Keränen, & Hahn-Hägerdal, 1995; Wasylenko & Stephanopoulos, 2015)

1.1 Metabolismo de *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es indudablemente el organismo eucariota mejor estudiado; su genoma fue el primer genoma eucariótico en ser totalmente secuenciado a finales de los noventa. (Bro, Birgitte, Förster, & Nielsen, 2006; Chu & Lee, 2007; Gouffier, Barrell, Bussey, & Davis, 1996; Ostergaard, Olsson, & Nielsen, 2000; Wills, 1990). *S. cerevisiae* es una importante biofábrica que se emplea para la producción biotecnológica de alimentos, cerveza, vino, nutracéuticos, farmacéuticos, químicos y combustibles (Cherry et al., 1997; Österlund, Nookaew, & Nielsen, 2012; van Gulik & Heijnen, 1995; Wasylenko & Stephanopoulos, 2015). También sirve como organismo modelo para entender cómo funciona la célula eucariótica, inclusive de organismos superiores como el ser humano, dado que a nivel genómico comparten ciertas características (Bro, Birgitte, et al., 2006; Gouffier et al., 1996).

El etanol es uno de los productos de mayor importancia biotecnológica, derivado directamente del metabolismo central de la levadura (Jochen Förster, Famili, & Fu, 2003; Meinander et al., 1999; Ostergaard et al., 2000). La producción industrial de etanol a partir de *S. cerevisiae* se realiza utilizando azúcares fermentables como la glucosa en un medio anaerobio. Este proceso presenta un alto rendimiento de producto debido a que el microorganismo tolera altas concentraciones de etanol y de inhibidores presentes en los hidrolizados de las materias primas (Parachin et al., 2011; J.-P. Pitkänen et al., 2003; Wasylenko & Stephanopoulos, 2015). A nivel teórico, *S. cerevisiae* bajo condiciones de anaerobiosis y empleando glucosa como fuente de carbono, convierte el 93% en etanol y el 7% restante lo emplea para la producción de biomasa (Kurylenko et al., 2016).

En la Figura 1 se observan los diferentes sustratos que la levadura puede emplear como fuente de carbono para la producción de etanol.

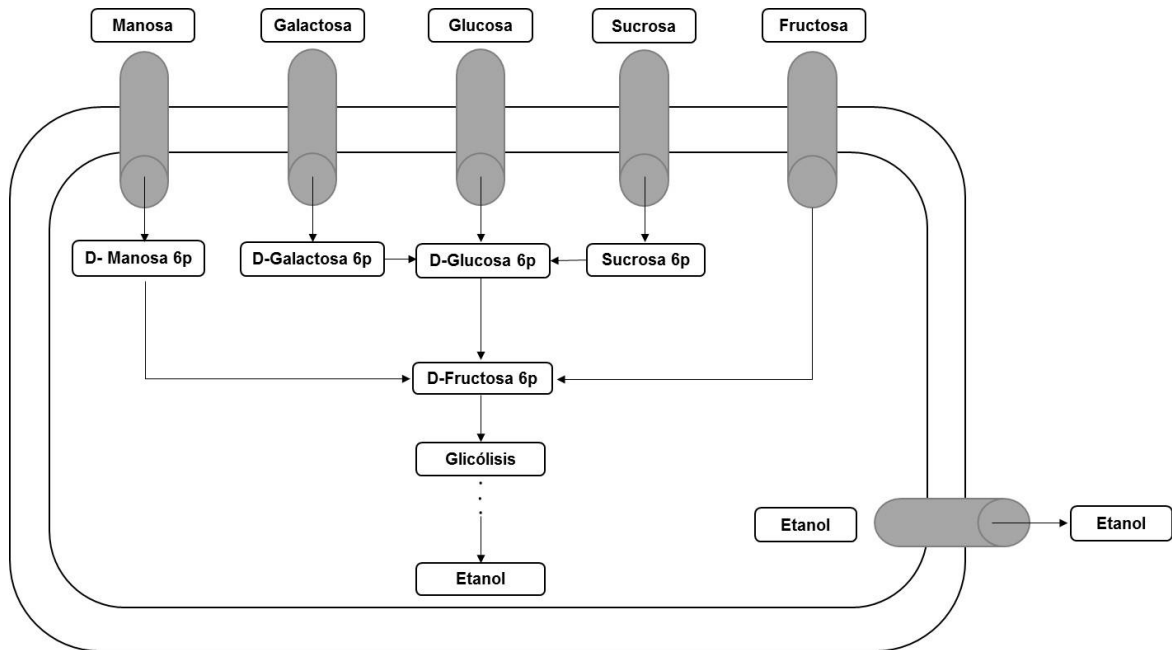


Figura 1 Metabolismo de los azúcares para la producción de etanol (Nookaew et al., 2008)

1.1.1 Metabolismo de hexosas: Principales rutas

Respiración y fermentación

La principal fuente de energía de esta levadura es la glucosa y la ruta de asimilación del azúcar comienza con la glicólisis. En esta ruta la glucosa se convierte en piruvato y la energía producida en forma de ATP, se acopla con la generación de intermediarios metabólicos y poder reductor en la forma de NADH en las rutas de biosíntesis (Feldmann, 2012; Kricka, Fitzpatrick, & Bond, 2015).

El piruvato puede ser empleado para realizar actividades de respiración y fermentación. En respiración (con presencia de oxígeno), el piruvato entra a la matriz mitocondrial donde el complejo enzimático piruvato descarboxilasa, lo descarboxila a acetil-CoA. Esta reacción articula la glicólisis con el ciclo del ácido cítrico, ruta en la que el acetil-CoA es oxidado completamente para generar dos moléculas de dióxido de carbono y equivalente reductores en la forma de NADH y FADH₂. Es importante aclarar que el ciclo del ácido cítrico es una ruta anfibólica, es decir, combina funciones tanto catabólicas como anabólicas. Algunos de los metabolitos finales de esta ruta, se forman a partir de la producción de intermediarios en las rutas de síntesis de aminoácidos y nucleótidos. La renovación de los metabolitos requeridos para que se dé el ciclo del ácido cítrico, como el

oxaloacetato y α -cetoglutarato, se hace a través de la fijación de dióxido de carbono al piruvato por la acción de las enzimas piruvato carboxilasa, y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, y por medio del ciclo del glioxilato, el cual es importante cuando la levadura crece con dos fuentes de carbono como acetato y etanol (Feldmann, 2012; Kricka et al., 2015).

Durante la fermentación, la levadura re-oxida NADH a NAD⁺ en el proceso de descarboxilación de piruvato hasta etanol, empleando dos reacciones: primero la catalizada por piruvato descarboxilasa para convertir piruvato a acetaldehído, seguido de la reducción de acetaldehído a etanol, mediado por la enzima alcohol deshidrogenasa. De esta manera, los aceptores de los electrones transportados por la cadena de electrones durante el proceso fermentativo son metabolitos intermediarios. La regeneración del NAD⁺ se requiere para mantener el balance redox y permitir que la glicólisis siga activa (Feldmann, 2012; Kricka et al., 2015).

Ciclo de la pentosa fosfato

Conocida también como la ruta hexosa monofosfato. Esta ruta provee a la célula de azúcares de cinco carbonos y NADPH citosólico, necesarios para las reacciones biosintéticas como la producción de ácidos grasos y aminoácidos. En esta ruta metabólica se forma ribosa, la cual se emplea para la biosíntesis de precursores de ácidos nucleicos y coenzimas. El NAD⁺ y FAD, se reducen durante la ruptura de azúcares en NADH y FADH₂, respectivamente, y son reoxidados en la cadena transportadora de electrones localizada en el interior de la membrana mitocondrial. La energía liberada durante la transferencia de electrones se relaciona con el proceso de la fosforilación oxidativa (Feldmann, 2012; Kricka et al., 2015).

La ruta de la pentosa fosfato tiene dos fases oxidativa y no oxidativa. En la fase oxidativa, compuesta por reacciones irreversibles, a partir de glucosa-6-fosfato se obtiene ribulosa-5-fosfato y dos moléculas de NADPH y en la fase no oxidativa, compuesta por reacciones reversibles, se emplean tres moléculas de ribulosa-5-fosfato para formar gliceraldehído-3-fosfato y dos moléculas de Fructosa-6-fosfato (Kruger & von Schaewen, 2003).

1.2 Metabolismo de otros azúcares: xilosa

La xilosa puede ser metabolizada vía fermentativa usando bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Hinman, Wright, Hoagland, & Wyman, 1989; Akinori Matsushika et al., 2009). En bacterias y algunas levaduras como *Pyromices sp.* y *Orpinomyces sp.* (Wasylenko & Stephanopoulos, 2015; Weyda, Lübeck, Ahring, & Lübeck, 2014), el primer paso luego del consumo de xilosa es su isomerización a xilulosa utilizando la enzima xilulosa isomerasa (XI) (ver Figura 2).

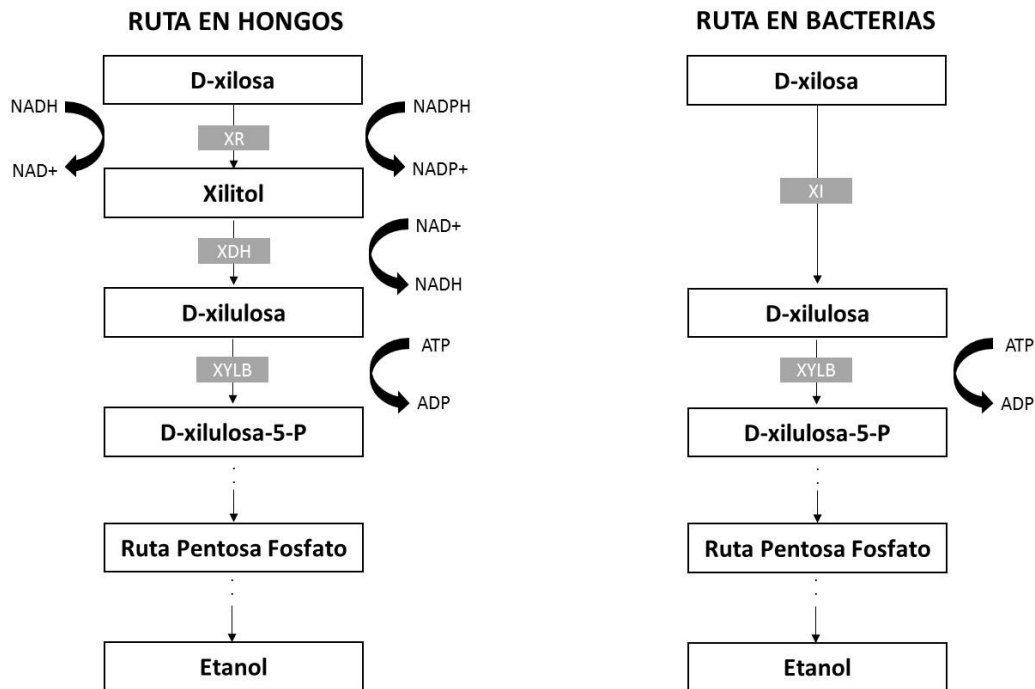


Figura 2 Ruta de consumo de xilosa en hongos y bacterias. Adaptada de (Akinori Matsushika et al., 2009)

En la mayoría de hongos filamentosos y levaduras fermentadoras de xilosa como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus*, la xilosa es reducida inicialmente a xilitol mediante XR, enzima que puede emplear tanto NADH como NADPH; posteriormente, el xilitol es oxidado a xilulosa mediante la enzima xilulosa deshidrogenasa (XDH) dependiente de NAD⁺ (Karhumaa, Garcia Sanchez, Hahn-Hägerdal, & Gorwa-Grauslund, 2007; Weyda et al., 2014). Finalmente, la xiluloquinasa fosforila la xilulosa en xilulosa-5-fosfato, que luego es metabolizada a través de la vía pentosa fosfato (ver). Esta reacción requiere de ATP, lo cual ocasiona que la velocidad de reacción dependa de la carga energética y del potencial de fosforilación de la célula. Aunque *S. cerevisiae* no puede utilizar xilosa, los genes que codifican para XR (GRE3) (Träff, Jönsson, & Hahn-Hägerdal, 2002), XDH (YLR070c, ScXYL2) y XK (XKS1) están presentes en su genoma; sin embargo, los niveles de expresión de estos genes son muy bajos para que puedan dar lugar a una actividad metabólica que permita utilizar la xilosa de manera eficiente (Hahn-Hägerdal et al., 2001; J.-P. Pitkänen et al., 2003). En el estudio de Toivari et al., (2004) se observó que, en un medio con glucosa y xilosa, al sobreexpresar los genes que codifican para XR, XDH y XK en una cepa de *S. cerevisiae* se presenta una reducción en la velocidad específica de crecimiento y una acumulación de xilitol (Toivari, Salusjärvi, Ruohonen, & Penttilä, 2004).

Existen tres etapas reaccionantes que son consideradas como controlantes del proceso de fermentación con *S. Cerevisiae* usando xilosa como sustrato. La primera de ellas es la conversión de xilosa a xilulosa. Para que el carbono presente en la xilosa llegue a la ruta pentosa fosfato, luego a glicólisis y finalmente se produzca etanol, debe convertirse primero en xilulosa. Para ello se han estudiado dos alternativas, la primera es el uso de las enzimas XR (Xilosa reductasa) y XDH (Xilitol deshidrogenasa) de levaduras y la segunda es la enzima XI (Xilosa isomerasa) de origen procariote o eucariote. Las enzimas XR y XDH desencadenan un desbalance de los cofactores NADH y NADPH que la célula no es capaz de compensar, dando lugar a la acumulación de xilitol debido a la dificultad para regenerar la forma oxidada del transportador NAD⁺ (Chu & Lee, 2007; Akinori Matsushika et al., 2009; Parachin et al., 2011; J.-P. Pitkänen et al., 2003). La enzima XI no afecta el balance redox de la célula; sin embargo, los estudios iniciales de su aplicación no generaron resultados positivos, principalmente debido al carácter inactivo de la proteína obtenida. El descubrimiento de la enzima XI asociada a nuevas bacterias como *C. phytofermentans*, *Burkholderia cenocepacia* y levaduras como *Piromyces* sp. E2 han generado un nuevo interés en el uso de esta alternativa (Brat, Boles, & Wiedemann, 2009a; Kuyper et al., 2005; Vilela et al., 2015; Wasylenko & Stephanopoulos, 2015).

La segunda limitante son las enzimas que participan en la ruta no oxidativa de la pentosa fosfato, específicamente, transcetolasa (TKL) y transaldolasa (TAL). Esta ruta es la única entrada por la cual la xilulosa llega a la glicólisis, sin embargo, en *S. cerevisiae* el flux de carbono es insuficiente comparado con otras especies, lo que genera una acumulación de metabolitos y bajos rendimientos de fermentación cuando se emplea xilosa como sustrato. (Chu & Lee, 2007; Akinori Matsushika et al., 2009).

Finalmente, la etapa más crítica en el uso de xilosa como sustrato es su asimilación, dado que la levadura carece de transportadores específicos de xilosa. *S. cerevisiae* usa los transportadores de hexosas para transportar xilosa al interior de la célula, usando un mecanismo de difusión facilitada. El transporte de xilosa es inhibido competitivamente por glucosa, provocando que en un medio con glucosa y xilosa, *S. cerevisiae* presente un crecimiento diaúxico al metabolizar xilosa luego que la glucosa haya sido consumida (Akinori Matsushika et al., 2009; Sedlak & Ho, 2004).

1.2.1 Transporte de xilosa

S. cerevisiae crece débilmente en presencia de xilosa como única fuente de carbono y bajo condiciones anaeróbicas (Attfield & Bell, 2006; Chu & Lee, 2007; Toivari et al., 2004).

El primer paso en la fermentación de xilosa, es su transporte a través de la membrana plasmática. En su estructura, esta membrana posee enzimas permeasas que permiten el paso de hexosas y pentosas mediante un mecanismo de difusión facilitada; estos

transportadores presentan constantes de afinidad más altos por glucosa que por xilosa (Hahn-Hägerdal et al., 2001).

La mayoría de las levaduras que fermentan xilosa tienen al menos dos sistemas de transporte de xilosa cinéticamente diferentes. El transporte de baja afinidad, que generalmente es utilizado para análogos estructurales de la glucosa, mientras que el transporte de alta afinidad es específico para xilosa. El mecanismo de simporte de protones con alta afinidad por xilosa, usa la diferencia en la concentración de protones como fuerza motriz. Por otra parte, los sistemas de transporte de baja afinidad, transportan xilosa por difusión facilitada utilizando un gradiente de concentración como fuerza motriz (Büttner & Sauer, 2000; Chu & Lee, 2007; Hahn-Hägerdal et al., 2001; Hamacher, Becker, Gárdonyi, Hahn-Hägerdal, & Boles, 2002).

El sistema de transporte de hexosas de *S. cerevisiae* se da por difusión facilitada. La difusión facilitada de xilosa en *S. cerevisiae* ocurre a través de los transportadores de hexosas, es decir, no existe un mecanismo de transporte específico para este azúcar (Chu & Lee, 2007). Este sistema de transporte de azúcares está compuesto por una familia de 18 genes llamados HXT (Transportadores de hexosas) (Chu & Lee, 2007; Hamacher et al., 2002).

La familia HXT está formada por genes cuyos productos de expresión presentan alta, moderada y baja afinidad por la glucosa y se activan bajo condiciones de alta, moderada y baja concentración de glucosa, respectivamente (Chu & Lee, 2007; W.-J. Lee, Kim, Ryu, Bisson, & Seo, 2002; Sedlak & Ho, 2004)

Los transportadores HXT de alta y baja afinidad tienen valores de K_m para xilosa de aproximadamente 137-190 mM y 1.5M, respectivamente. Estos valores tan altos indican que el consumo de xilosa mediado por estos transportadores es significativamente menos eficiente comparado con el de glucosa (Chu & Lee, 2007; Hamacher et al., 2002).

Dado que el transporte de xilosa es significativamente menos eficiente cuando se compara con el transporte de glucosa mediado por la familia de transportadores HXT, (Hamacher et al., 2002; Vilela et al., 2015), se han desarrollado varias estrategias para solventar este problema; el enfoque principal es el aislamiento de transportadores heterólogos de azúcar con buenas propiedades de transporte de xilosa. Sin embargo, hasta el momento se han caracterizado pocos transportadores heterólogos en *S. cerevisiae*; recientemente se ha comprobado que de los 34 transportadores heterólogos conocidos de siete organismos diferentes, solo la mitad de las permeasas expresadas permiten un uso significativo de xilosa (Chu & Lee, 2007; de Sales et al., 2015).

P. stipitis ha sido por excelencia la fuente principal de genes para el uso de xilosa en cepas modificadas de *S. cerevisiae*, no solo de genes para llevar xilosa a xilulosa sino también para el transporte intermembranal. Hasta ahora 15 transportadores de monosacáridos de este microorganismo han sido identificados y analizados en *S. cerevisiae*, entre ellos se encuentran transportadores de hexosas como SUT1-SUT4, y se han identificado genes con carácter putativo que codifican para transportadores como XUT1-XUT7, AUT1, HGT2, RGT2 y STL1. A pesar de que el uso de estas proteínas ha mostrado un transporte

favorable de xilosa, aún se requieren más estudios que permitan la caracterización de nuevos transportadores de xilosa y un mejor conocimiento de los procesos de transformación efectiva de cepas de *S. cerevisiae*, facultándolas para el transporte y asimilación de pentosas (de Sales et al., 2015).

1.2.2 Conversión de xilosa a xilulosa

S. cerevisiae puede metabolizar efectivamente xilulosa; así, la conversión de xilosa a xilulosa es una etapa de suma importancia para la producción de etanol. Actualmente se tiene conocimiento de dos alternativas para inducir la conversión de xilosa a xilulosa, el uso de las enzimas XR y XDH o la enzima XI. Ambas alternativas presentan ventajas y desventajas.

El uso de las enzimas XR y XDH en cepas modificadas, genera un desbalance de cofactores que para muchos autores constituye la etapa controlante en el proceso de fermentación de xilosa usando organismos (levaduras) genéticamente modificados (Chu & Lee, 2007; J.-P. Pitkänen et al., 2003). Ante la dificultad de la célula de regenerar la forma oxidada del transportador NAD⁺, esta experimenta un desbalance energético serio en la ruta metabólica oxido-reductiva que no es capaz de compensar, dando lugar a la acumulación de xilitol (J.-P. Pitkänen et al., 2003).

En levaduras que fermentan naturalmente xilosa y que consumen el azúcar empleando la ruta XR y XDH, no se presenta desbalance de cofactores bajo condiciones aerobias (Hector, Qureshi, Hughes, & Cotta, 2008), pero bajo condiciones de oxígeno limitado el desbalance aparece. En ausencia de O₂ como aceptor de electrones, el NADPH puede ser regenerado vía fructosa-6-fosfato en la ruta pentosa fosfato, y el NADP⁺ es usado por las enzimas isocitrato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, lo que ocasiona que se minimice la acumulación de NADP⁺ (Matsushika et al., 2009; Nissen, Anderlund, Nielsen, Villadsen, & Kielland-Brandt, 2001). Sin embargo, las bajas cantidades de NAD⁺ son recicladas para la reacción catalizada por XDH, lo cual trae como consecuencia que haya más disponibilidad de NADPH con respecto a NAD⁺ para las enzimas XR y XDH, respectivamente.

P. stipitis es única entre las levaduras que metabolizan xilosa, dado que bajo condiciones microaerobias puede fermentar xilosa sin que se produzca el desbalance de cofactores; esta facultad específica de *P. stipitis* se debe a la propiedad de su enzima xilosa reductasa de utilizar indistintamente NADH y NADPH (Hector et al., 2008; Skoog & Hahn-Hägerdal, 1990).

Levaduras como *Candida tropicalis* y *Candida guilliermondii*, acumulan grandes cantidades de xilitol debido al desbalance de cofactores (Lin et al., 2010). Guo, (2006) observó que *Candida maltosa* acumula xilitol cuando se encuentra en un medio con condiciones limitadas de oxígeno y altas concentraciones de xilosa (280 g/L). Aunque la enzima XR de

Candida maltosa es exclusivamente dependiente de NADPH, se detectó que XDH utiliza NADP⁺. Además, se encontró que *Candida maltosa* presenta características metabólicas similares a las de *S. cerevisiae* para fermentar glucosa y obtener etanol bajo condiciones aerobias; este gran potencial metabólico convierte a esta especie en candidata para estudios de producción de etanol a escala industrial, (Lin et al., 2010).

En *S. cerevisiae*, la enzima xilosa reductasa es específica para NADPH, más que para NADH. La afinidad de esta enzima por xilosa presenta un Km de 14.8–27.9 mM (Ford & Ellis, 2001; Jeong, Sopher, Kim, & Lee, 2001) valor muy similar a otras XR de levaduras como *P. tannophilus* CBS 4044 (Km igual a 14mM). Aunque la afinidad de XR de *S. cerevisiae* es similar a la de otras levaduras, no es claro si la xilosa induce la expresión de XR o si es reconocida por *S. cerevisiae* como un sustrato potencial (Yong-Su Jin & Jeffries, 2004; Akinori Matsushika et al., 2009; J.-P. Pitkänen et al., 2003). La enzima xilitol deshidrogenasa (XDH), requiere como cofactor específico el NAD⁺. Las constantes cinéticas aparentes de XDH son Km (xilitol)=25 mM, Km(NAD⁺)=240 μM, Km (xilulosa)=1.1mM y Km NADH=55 μM (Hamacher et al., 2002; Akinori Matsushika et al., 2009). Estas constantes cinéticas sugieren que la reacción favorecida por la enzima es la reducción de xilulosa a xilitol, lo cual podría no soportar un alto flujo de xilosa a través del metabolismo central de carbono evitando que se alcance altas concentraciones de etanol (Akinori Matsushika et al., 2009).

Saleh et al (2006) construyó una cepa recombinante de *S. cerevisiae* la cual expresa la enzima XDH y XR (específica para el cofactor NADH) de *P. stipitis*. La especificidad del cofactor de la enzima XR fue dirigida hacia NADH para aliviar el desbalance de cofactores, utilizando mutagénesis dirigida. Los resultados mostraron que la cepa modificada fue capaz de fermentar la xilosa a etanol en un cultivo batch bajo condiciones anaeróbicas y la cepa mutante R276H, produjo un máximo de 5.94g/l de etanol cuando el medio de cultivo contiene xilosa al 1.5% y glucosa al 0.5% (Akinori Matsushika et al., 2009; Saleh, Watanabe, Annaluru, Kodaki, & Makino, 2006).

El estudio de Lee et al (2012) emplea la cepa de *S. cerevisiae* D452-2 fue transformada para sobre-expresar los genes de *P. stipitis* que codifican para la XR que presenta mayor afinidad por NADH (XR^{MUT}) y la XDH dependiente de NAD⁺ y la xiluloquinasa endógena (XK). A nivel *in vitro* se confirmó la expresión funcional de XR^{MUT}, XDH y XK. Esta transformación permitió que en un medio de cultivo microaerobio la acumulación de xilitol disminuyera y en consecuencia la producción de etanol aumentara (S.-H. Lee, Kodaki, Park, & Seo, 2012).

El desbalance de cofactores ocasionado al emplear las enzimas XR y XDH genera un aumento en la producción de xilitol y por ende una disminución en la producción de etanol en cepas modificadas de *S. cerevisiae*. Este aspecto es común para la mayoría de levaduras fermentadoras de xilosa, excepto en algunas como *Pichia stipitis* y *Pachysolen tannophilus* en donde la XR bajo condiciones anaerobias presenta una especificidad por el cofactor NADH, lo que evita el desbalance. Aparentemente *S. cerevisiae* no posee los mecanismos de regulación presentes en *Pichia stipitis* para evitar que el desbalance se presente. Sin embargo, la alta producción de xilitol en cepas genéticamente modificadas

de *S. cerevisiae* no está asociada exclusivamente al desbalance de cofactores, ya que en *Pichia stipitis* no se forman altas concentraciones de xilitol al fermentar xilosa, generando un interrogante adicional acerca de cómo este microorganismo metaboliza xilosa.

Lo anterior, deja ver el limitado alcance que a la fecha se tiene sobre las posibles estrategias que se deben emplear para sobrellevar el desbalance de cofactores, ya que a pesar de que se han empleado diversas metodologías, como alterar la afinidad de la XR o XDH a los cofactores o regular el metabolismo de los cofactores para balancear el reciclo de cofactores y disminuir la formación de xilitol, no siempre se ha logrado alcanzar una producción eficiente de etanol a partir de xilosa; de esta manera, el desbalance de cofactores no es la única limitación que existe en la ruta de la XR y XDH (Stefan Krahulec et al., 2010; Zha, Shen, Hu, Song, & Yuan, 2014) o *P. stipitis* posee mecanismos que aún no se conocen y que compensan el desbalance ocasionado por las enzimas XR y XDH.

Con respecto a la inserción de la enzima XI de bacterias y hongos para solucionar las consecuencias generadas por el desbalance de cofactores en *S. cerevisiae*, los resultados no han sido contundentes ya que cuando los genes heterólogos que codifican para la xilosa isomerasa son expresados en *S. cerevisiae*, las proteínas sintetizadas no se pliegan correctamente (S Krahulec, Klimacek, & Nidetzky, 2009; Verho, Putkonen, Londesborough, Penttilä, & Richard, 2004; Wasylenko, 2014).

La expresión de los genes heterólogos de *Actinoplanes missouriensis* y *Clostridium thermosulfurogenes* en *S. cerevisiae* genera proteínas inactivas. La expresión del gen heterólogo xylA de *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces rubiginosus* en *S. cerevisiae* sintetiza proteínas insolubles que son catalíticamente inactivas (Brat, Boles, & Wiedemann, 2009b; Wasylenko, 2014).

La primera XI funcional expresada en *S. cerevisiae* provino de *Thermus thermophilus* (Walfridsson et al., 1996). Esta enzima requiere de temperaturas de aproximadamente 85°C para alcanzar su máxima actividad, por lo que los rendimientos relacionados con la fermentación de la xilosa fueron bajos dado que la levadura no crece bajo esas condiciones de temperatura.

Por otra parte, se han desarrollado estudios con los genes XI de los hongos *Piromyces* y *Orpinomyce* (Madhavan et al., 2009) que aunque se ha logrado su expresión de manera funcional a niveles altos en *S. cerevisiae*, la velocidad de crecimiento y formación de etanol es baja (Brat et al., 2009b; Wasylenko, 2014).

En el estudio de Kuyper *et al* (2005) se emplea una cepa mutante que expresa la xilosa isomerasa del hongo *Piromyces sp.* E2 y se sobre-expresan los genes de todas las enzimas involucradas en la conversión de xilulosa a los intermediarios de la ruta de la glicólisis. Las enzimas sobre-expresadas fueron la xiluloquinasa, ribulosa-5-fosfato isomerasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa y transaldolasa. Adicionalmente se eliminó el gen GRE3 que codifica para la aldosa reductasa con el objetivo de disminuir la producción de xilitol.

Se observó que la cepa crece anaeróbicamente en xilosa, y no se detecta formación de xilulosa ni xilitol (Kuyper et al., 2005).

Por lo tanto, a pesar de que se ha expresado correctamente la XI de levaduras y bacterias, la proteína recombinante no se pliega correctamente (Kim, Park, Jin, & Seo, 2013a) o no se alcanzan velocidades de crecimiento y formación de etanol requeridas para que la cepa pueda ser empleada a nivel industrial. El uso de técnicas como la optimización de codones constituye otra alternativa en evaluación (Kim et al., 2013a); esta se lleva a cabo cambiando los codones originales de los genes heterólogos por aquellos genes que tienen una alta expresión en *S. cerevisiae* como pueden ser los genes que hacen parte de la ruta de la glicólisis (Kim et al., 2013a).

Comparando las dos estrategias antes mencionadas, no se puede afirmar que hay una mejor que otra, porque en ambas se observa que aún existen barreras que se deben solventar para que la conversión de xilosa a xilulosa sea exitosa y no genere repercusiones a nivel energético en la célula. Empleando las enzimas XR y XDH, el consumo y producción de etanol es mayor que empleando la XI, pero hay producción de xilitol que es un producto que disminuye la cantidad de etanol que se forma y se presenta el desbalance de cofactores.

No obstante, se requieren más estudios dirigidos a entender el papel del oxígeno cuando se emplea la ruta XR y XDH; se ha observado que el desbalance de cofactores puede verse disminuido al controlar la cantidad de oxígeno en el medio. Entre las estrategias que pueden emplearse, se encuentra el uso de modelos metabólicos que mediante simulaciones permitan evaluar el papel del oxígeno, como factor controlante del desbalance de cofactores. Con respecto a la enzima XI, es recomendable realizar un estudio sistémico que permita evaluar la variabilidad de los fluxes intracelulares de las rutas metabólicas más representativas que participan en la asimilación de la xilosa para la formación de etanol, con el fin de identificar puntos de bifurcación y re-direccionamiento del flux de carbono, originalmente dirigido a la síntesis de producto.

1.2.3 Enzimas de la ruta no oxidativa de la pentosa fosfato

En los estudios de (Fiaux et al., 2003; KUYPER et al., 2005a; Akinori Matsushika et al., 2009; Rozanov et al., 2015).se ha encontrado que en las cepas de *S. cerevisiae* con mutaciones para emplear xilosa como sustrato, el flux de carbono a través de la ruta pentosa fosfato, comparado con el de otras levaduras como *P. stipitis*, es insuficiente y causa la acumulación de metabolitos en la ruta de la pentosa fosfato, disminuyendo la fermentación de xilulosa

Se ha encontrado que las enzimas transcetolasa (TKL) y transaldolasa (TAL), limitan la fermentación de la xilosa, ya que participan en la acumulación del intermediario

seudoheptulosa-7-fosfato de la vía pentosa fosfato durante la fermentación de xilulosa (Chu & Lee, 2007; Akinori Matsushika et al., 2009). La transcetolasa cataliza la conversión de xilulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato a pseudoheptulosa-7-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, mientras que la transaldolasa cataliza la conversión de pseudoheptulosa-7-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y de fructosa-6-fosfato (F6P) a eritrosa-5-fosfato. Los intermediarios GAP y F6P se encuentran presentes tanto en la ruta de la pentosa fosfato como en la glicólisis, y la no formación de alguno de los dos puede generar una fermentación ineficiente de xilosa (Chu & Lee, 2007; Akinori Matsushika et al., 2009).

Para evitar que estas enzimas dificulten la fermentación de xilosa, se han diseñado diversas estrategias que comprenden la sobreexpresión de los genes TAL1 y/o TKL1 de *S. cerevisiae*.

En las publicaciones relacionadas con la sobreexpresión del gen TAL1 de *S. cerevisiae* se han encontrado resultados inconsistentes. En el estudio de Walfridsson *et al.*, (1995) en el cual XYL1 y XYL2 de *Pichia stipitis* CBS6054 (genes que codifican para la síntesis de XR y XDH respectivamente), fueron clonados en *S. cerevisiae* y los genes endógenos TAL1 y TKL1 fueron sobreexpresados. Se encontró que la cepa mejoraba significativamente su crecimiento en xilosa; sin embargo, Johansson y Hahn- Hägerdal (2002) reportaron que la sobreexpresión de ScTAL1 no afecta la velocidad de fermentación, ni la velocidad de crecimiento en la cepa TMB3001. Jin y colaboradores (2005) mostraron que, a diferencia de lo observado en el estudio de Johansson y Hahn-Hägerdal (2002), la sobreexpresión del gen TAL1 en una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente trae beneficios tanto en la velocidad de crecimiento como en la producción de etanol a partir de xilosa.

Las diferencias en estos estudios radican en las cepas utilizadas en la investigación. En la investigación de Johansson y Hahn-Hägerdal la cepa modificada de *S. cerevisiae* contiene los genes XYL1 y XYL2 de *Pichia stipitis* y sobreexpresa el gen endógeno XKS1, diferente a lo que presenta Jin *et al.* (2005) en la cual, la cepa utilizada presenta una ruta metabólica funcional para la xilosa debido a que expresa los genes heterólogos XYL1, XYL2, XYL3 (xiluquinasa) y TAL1 de *Pichia stipitis*.

Entender como las enzimas de la ruta no oxidativa de la pentosa fosfato pueden favorecer la velocidad de fermentación de la xilosa juega un papel importante en el diseño de una cepa recombinante capaz de metabolizar eficientemente xilosa. La optimización de las reacciones presentes en la vía metabólica para metabolizar xilosa, requiere que técnicas clásicas y de nueva generación como el análisis del transcriptoma, proteoma, metaboloma, fluxoma y la ingeniería metabólica, se combinen para generar estrategias que permitan desarrollar cepas de *S. cerevisiae* que puedan fermentar xilosa a nivel industrial con altos rendimientos.

2. Capítulo 2 Biología de sistemas

El advenimiento de nuevas tecnologías experimentales, ha motivado a los biólogos a ver la célula como un sistema, en vez de enfocarse en sus componentes celulares particulares. Entender completamente el comportamiento de un sistema complejo, requiere que se estudie como un todo, más que la suma de sus componentes. Las propiedades sistémicas incluyen la conectividad del sistema y como los componentes interactúan uno con otro. Comprender esas propiedades sistémicas, ayuda a entender la complejidad de los sistemas biológicos (Österlund, 2014; Palsson, 2006).

La biología de sistemas estudia los sistemas biológicos desde una perspectiva holística, monitoreando genes, proteínas y la respuesta de las rutas metabólicas a cambios en el ambiente extracelular. Para ello, la biología de sistemas integra datos y formula modelos matemáticos que describen la estructura del sistema biológico y su respuesta a diversas perturbaciones individuales (Åkesson, Förster, & Nielsen, 2004; Ideker, Galitski, & Hood, 2001; Nielsen & Jewett, 2008; Österlund et al., 2012; Österlund, 2014; Sauer U. & Zamboni, 2007).

La biología de sistemas nace gracias a tecnologías que han permitido a los investigadores la habilidad de generar listas detalladas de los componentes biológicos, determinar las interacciones y generar conjuntos de datos genómicos. Estos sistemas son complejos e involucran procesos como el metabolismo, crecimiento celular, división celular y mecanismos de regulación, entre otros. La complejidad de estos procesos surge de la interacción entre muchos componentes, como genes, proteínas y metabolitos (Åkesson et al., 2004; Ideker et al., 2001; Nielsen & Jewett, 2008; Österlund et al., 2012; Österlund, 2014; Palsson, 2006; Sauer U. & Zamboni, 2007).

La implementación de un sistema biológico comprende cuatro pasos principales, primero, generar la lista de los componente biológicos que participan en el proceso de interés; segundo, estudiar las interacciones entre los componentes para realizar la reconstrucción de la red metabólica, tercero, la red reconstruida se traduce a un lenguaje matemático para generar un modelos que se emplea para analizar, interpretar y predecir las funciones biológicas que puedan surgir de la red reconstruida y cuarto, el modelo matemático se usa para analizar, interpretar y predecir resultados experimentales. Las predicciones ayudan a generar hipótesis específicas que puedan ser evaluadas experimentalmente (ver Figura 3). Estos modelos *in silico* se mejoran de una manera iterativa (Ideker et al., 2001; Österlund, 2014; Palsson, 2006; Sauer, Heinemann, & Zamboni, 2007).

En pocas palabras, modelar y predecir el desempeño del metabolismo celular es el objetivo de la Biología de sistemas (Ideker et al., 2001; Österlund, 2014; Palsson, 2006; Sauer et al., 2007).

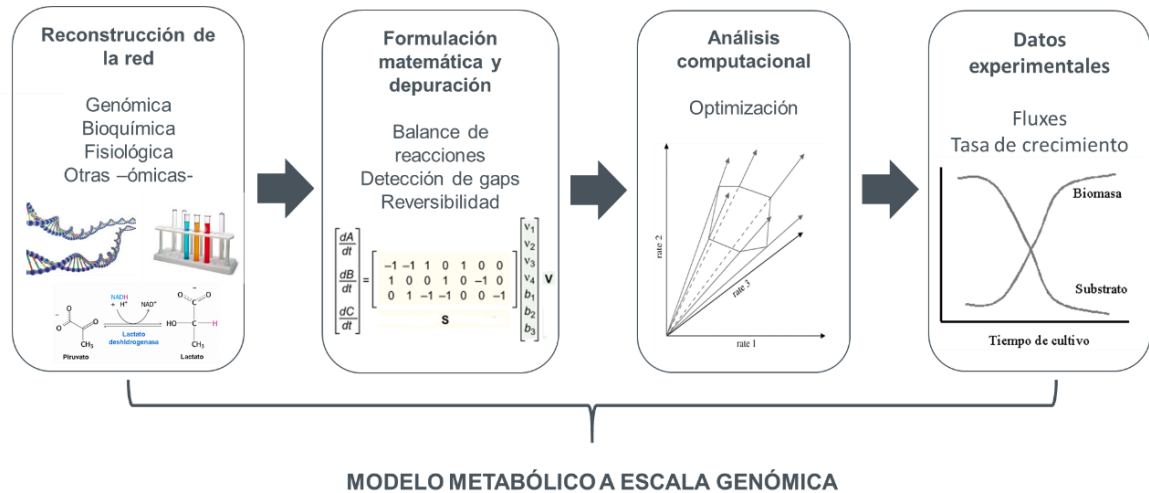


Figura 3 Reconstrucción de un modelo a escala genómica Información de: (Österlund, 2014; Palsson, 2006)

2.1 Ciencias ómicas

Las ciencias ómicas analizan un gran número de datos relacionados con los niveles de información biológica: genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma (Lindon, Holmes, & Nicholson, 2007; Ostankovitch & Stagljar, 2015). La gran cantidad de datos a nivel genómico ha promovido el crecimiento exponencial de literatura y bases de datos encargadas de condensar esta información para su uso en el estudio de sistemas biológicos; el uso racional de estos contenidos ha permitido desarrollar herramientas computacionales que permiten predecir el comportamiento de la célula bajo diferentes condiciones ambientales y genéticas (Mo, Palsson, & Herrgård, 2009b; Österlund, Nookaew, Bordel, & Nielsen, 2013; Saha, Chowdhury, & Maranas, 2014; Van Assche et al., 2015).

La integración de la información puede realizarse mediante la construcción de modelos metabólicos. Estos modelos exhiben la información biológica del organismo mediante una representación matemática de sus componentes bioquímicos y cómo interactúan entre sí (Heux, Meynial-Salles, O'Donohue, & Dumon, 2015; Kauffman, Prakash, & Edwards, 2003; Wittmann, 2014). Inicialmente se comenzó con el desarrollo de modelos cinéticos, pero la falta de una considerable cantidad de parámetros cinéticos de los procesos celulares generó la necesidad de desarrollar un nuevo tipo de aproximación (Famili, Forster, Nielsen, & Palsson, 2003; J. M. Lee, Gianchandani, & Papin, 2006; Raman & Chandra, 2009; Saha et al., 2014).

La reconstrucción a escala genómica o GENRE por sus siglas en inglés, da lugar a representaciones de datos bioquímicos y genéticos que puede ser analizadas empleando métodos *in silico*. Al imponer restricciones a las GENRE, ya sean las relaciones

estequiométricas y direccionalidad de las reacciones, consumo de sustrato, presencia de mutaciones, entre otras, se construye un modelo a escala genómica o GEM (Becker & Palsson, 2005; Nookaew et al., 2008b; Österlund et al., 2013; Van Assche et al., 2015; C. A. Vargas García, García Sánchez, Arguello Fuentes, & Gonzalo Torres Sáez, 2013).

Los GEM son modelos predictivos que permiten estimar fluxes o velocidades de las reacciones que conforman la red metabólica, y la tasa de crecimiento de un organismo, bajo diferentes condiciones medioambientales y de cultivo. Estos hacen uso de hipótesis para estudiar cómo responde el metabolismo de un organismo específico expuesto a diversos ambientes y a partir de ahí, identificar puntos de mejoramiento genético que permitan potenciar la producción de un metabolito de interés, aumentar la tasa de crecimiento, estudiar de genes que desencadenan en el desarrollo de enfermedades, entre otros aspectos (Karhumaa et al., 2007; Österlund, 2014; Smith & Robinson, 2011).

2.2 Modelos metabólico a escala genómica

Un modelo metabólico a escala genómica es una colección de reacciones metabólicas, metabolitos y genes que se interconectan para simular el comportamiento de la célula (Aung, Henry, & Walker, 2013; Bordbar, Monk, King, & Palsson, 2014; Österlund et al., 2012; Österlund, 2014; Sauer U. & Zamboni, 2007).

Estos modelos son construidos empleando la información del genoma del organismo, y correspondientemente, la información de las reacciones catalizadas por el grupo de enzimas que codifica el genoma. Estos modelos predicen la distribución de fluxes de carbono en la célula, bajo diferentes perturbaciones y han sido exitosamente empleados en ingeniería metabólica para incrementar la producción de metabolitos de interés industrial o para la generación de biomasa. La congruencia entre el comportamiento metabólico simulado y el experimental recae en la precisión de la representación de la red metabólica en el modelo (Aung et al., 2013; Österlund et al., 2012; Österlund, 2014).

El principal desafío al realizar una representación del sistema biológico de un organismo empleando un modelo metabólico a escala genómica, es la capacidad de predecir de forma precisa cuáles serán los efectos metabólicos generados al realizar una manipulación genética. Esto se debe a la complejidad de las redes metabólicas, ya que pueden ser redundantes, tener altos niveles de interconexión, presencia de rutas metabólicas alternativas y mecanismos de control. Por lo tanto es recomendable tener una visión sistémica para eventualmente entender cómo funcionan las células (Österlund, 2014; Sauer U. & Zamboni, 2007; C. A. Vargas García, Arguello Fuentes, & Torres Sáez, 2012).

Entre las aplicaciones de los modelos metabólicos a escala genómica se encuentran:

- *Ingeniería metabólica*: Antes de la llegada de los modelos metabólicos, la ingeniería metabólica se enfocaba en realizar cambios intuitivos en las rutas metabólicas que estaban conectadas con el producto de interés, un enfoque que fue exitoso para ciertas aplicaciones. Sin embargo, este enfoque no permitió la identificación de otros tipos de cambios. A partir de los modelos metabólicos, la ingeniería metabólica comenzó a estudiar los organismos desde una perspectiva sistémica permitiendo generar una nueva lista de potenciales manipulaciones (Sang Yup Lee et al., 2009; Vemuri & Nielsen, 2009; Walhout, Vidal, & Dekker, 2012).
- *Descubrimientos biológicos*: Al presentarse inconsistencias entre las predicciones del modelo y los datos experimentales las hipótesis generadas para dar posibles explicaciones a las discrepancias, pueden desembocar en nuevas invenciones (Vemuri & Nielsen, 2009; Walhout et al., 2012).

Predicción de fenotipos y evaluación: Un uso común de los modelos metabólicos es la evaluación y predicción de fenotipos bajo diferentes estados (cepa salvaje vs manipulación genética). Este proceso es cíclico, los "fracasos" guían experimentos que resultan en modificaciones iterativas en el modelo, lo cual mejora la precisión para seguir desarrollando experimentos. Áreas adicionales de enfoque en esta categoría incluye la incorporación de datos del tipo termodinámico, metabolómico y de fluxoma para generar límites a las restricciones y así identificar componentes esenciales como genes, metabolitos y reacciones (Vemuri & Nielsen, 2009; Walhout et al., 2012).

- *Análisis de gran cantidad de datos*: la interpretación de grandes cantidades de datos obtenidos de técnicas de alto-rendimiento presenta un creciente desafío para las ciencias naturales. Estos datos pueden emplearse para restringir los modelos, o los modelos pueden usarse para la visualización de estos datos (Walhout et al., 2012).

2.2.1 Modelos metabólicos de *S. cerevisiae*

El uso de modelos matemáticos para entender el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* comenzó con la reconstrucción realizada por van Gulik & Heijnen en 1995 (van Gulik & Heijnen, 1995), la cual se realizó a partir de la información disponible de las rutas bioquímicas consignada en la literatura científica. El modelo construido permitía predecir el crecimiento de la levadura en un medio de cultivo con dos sustratos glucosa y etanol. En 1996, Vanrolleghem *et al*, construyó un modelo mejorado que fue validado a partir de datos experimentales (Ver Fig. 4).

En 2003 se publica el primer modelo a escala genómica (J. Förster, Famili, Fu, Palsson, & Nielsen, 2003). El modelo llamado iFF708, donde FF hace referencia a los nombres de los creadores Förster y Famili, consiste de 708 genes, 1175 reacciones y 733 metabolitos;

el modelo consideró tres compartimentos celulares, citosol, mitocondria y espacio extracelular. El modelo hizo uso del método de análisis de balance de flujo (FBA por sus siglas en inglés); la validación y el carácter predictivo del modelo presentaron una buena aproximación al comportamiento de los datos experimentales (J. Förster et al., 2003; Österlund et al., 2012).

Desde la publicación del modelo iFF708 se han desarrollado otros modelos que difieren en alcance y objetivo, pero que tienen como base la misma información. El modelo iLL672 se caracteriza por la eliminación de reacciones con metabolitos dead-ends y adición de reacciones con isoenzimas y de transporte (Kuepfer, Sauer, & Blank, 2005). iND750 contiene cinco compartimentos adicionales (peroxisoma, núcleo, aparato de golgi, vacuola, retículo endoplasmático), mayor cantidad de genes y nuevas asociaciones gen-proteína (Duarte, Herrgard, & Palsson, 2004). Además de tener más genes y reacciones que los anteriores, el modelo iIN800 contiene una descripción más detallada del metabolismo de los lípidos, síntesis de ARN_t, procesos de transporte y una nueva ecuación de biomasa (Nookaew et al., 2008a).

Los modelos mencionados se construyeron de manera independiente lo que generó inconsistencias y poco carácter predictivo (Aung et al., 2013; Kim, Park, Jin, & Seo, 2013; S. Y Lee, Nielsen, & Stephanopoulos, 2015; Österlund et al., 2012). Para resolver este problema, varios grupos de investigación en el campo de Biología de sistemas se unieron para construir el modelo *yeast 1* (Herrgård et al., 2008), el cual se ha convertido en el modelo estándar (Aung et al., 2013; Österlund et al., 2012; Varios, 2015). El modelo contiene 857 genes, 1857 reacciones y 1168 metabolitos (Herrgård et al., 2008; Österlund et al., 2012). Cada metabolito en la red fue escrito empleando la nomenclatura *InChi* (Identificador Químico Internacional) y los identificadores de la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG); esta estandarización permitió conectar redes con datos metabólicos. El modelo se ha mejorado y actualizado hasta llegar la versión *yeast 7.0* (S. Y Lee et al., 2015; Österlund et al., 2012; Varios, 2015).

El modelo iMM904 tiene ocho compartimentos, lo que representa menos compartimentos con respecto al modelo *yeast 5*, que tiene 15 (Zomorodi & Maranas, 2010). En este se incluye nueva información relacionada con genes y reacciones. iTO977 contiene cuatro compartimentos y mayor cantidad de reacciones y genes (Österlund, 2014).

S. cerevisiae es una levadura de interés industrial y gracias al surgimiento de nuevas técnicas que permiten generar datos sobre el genoma de un organismo, los modelos metabólicos se actualizan constantemente a partir de esta información.

El objetivo final de los modelos a escala genómica es construir una red metabólica estructurada correctamente que incluya todos los elementos que hacen parte del metabolismo del organismo; sin embargo, para el caso de *S. cerevisiae* todavía no es posible dado el limitado conocimiento acerca de su metabolismo (Aung et al., 2013; S. Y Lee et al., 2015).

En la Figura 4 se muestra a manera de esquema algunos de los modelos metabólicos de *S. cerevisiae* que se han construido desde 1995.

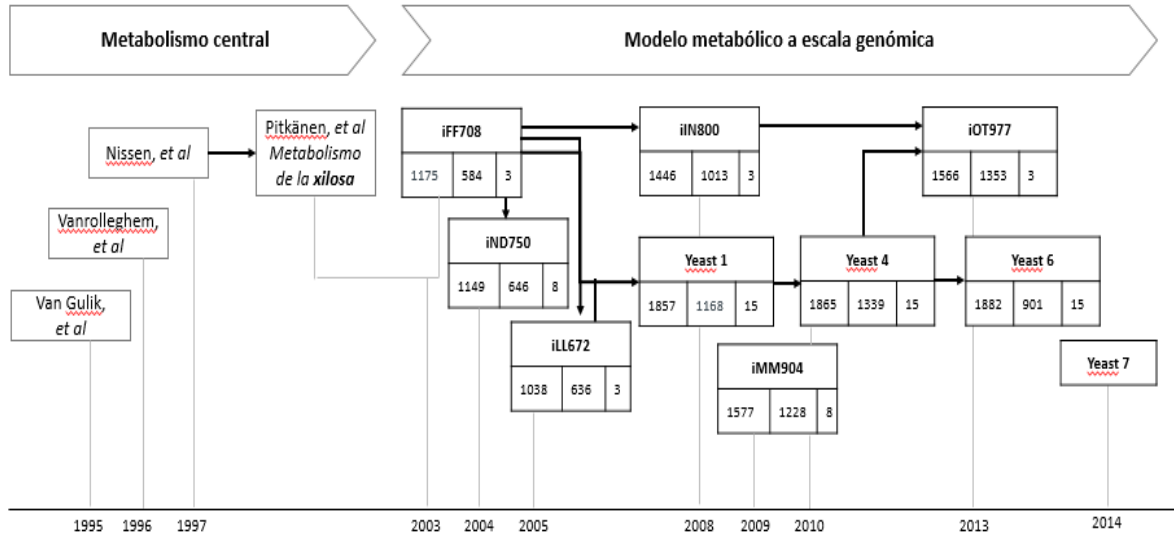


Figura 4 Modelos de *S. cerevisiae* - Información de (Österlund et al., 2012)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reconstrucción del Modelo Metabólico i1583Je2015

El primer insumo para la reconstrucción de un modelo metabólico es un borrador de la red metabólica que describa la relación entre genes, reacciones y metabolitos de microorganismo de interés. En este trabajo se utilizó una cepa mutante la cual contiene tres mutaciones dirigidas a atacar las limitaciones metabólicas que se han identificado a partir de la literatura. La primera es la introducción del transportador Sut1 de *P. stitipis* el cual se ha reportado tiene una buena afinidad por la glucosa comparado con otros transportadores del mismo organismo (Katahira et al., 2008). Segundo, la enzima XI que permite la asimilación de xilosa a xilulosa sin generar desbalance de cofactores y la introducción del gen *adhII*, codificante de la enzima Alcohol deshidrogenasa II de *Zymomonas mobilis* para mejorar la producción de etanol (ver Tabla 1).

Tabla 1 Modificaciones genéticas realizadas a la cepa de *S. cerevisiae*

Nombre de la reacción	Descripción de la reacción
<i>xyIA</i>	Isomerización de xilosa
<i>XYLt</i>	Transporte de xilosa
<i>PSETHANOL</i>	Alcohol deshidrogenasa II

Para tener un borrador de la red metabólica de un organismo se pueden emplear diversas alternativas, como el uso de un software para la construcción automática de la red o partir de un modelo metabólico desarrollado previamente. Existen herramientas computacionales como RAVEN (Agren et al., 2013), SEED (DeJongh et al., 2007), AUTOGRAPH (Notebaart, van Enkevort, Francke, Siezen, & Teusink, 2006), IdentiCS (Sun & Zeng, 2004), los cuales hacen uso de modelos metabólicos existentes y base de datos como KEEG para diseñar una red metabólica (Cazzaniga et al., 2014a; E. Pitkänen et al., 2014a). Estas reconstrucciones automáticas presentan algunas limitaciones principalmente relacionadas con errores en la estequiometría de las reacciones y la inclusión de genes cuya función aún no se encuentra validada. No obstante, constituyen una gran herramienta cuando no se cuenta con modelos metabólicos preexistentes (Cazzaniga et al., 2014b; E. Pitkänen et al., 2014b). Para el desarrollo del modelo i1583Je2015 se empleó como punto de partida el modelo iMM904 (Mo et al., 2009b); este modelo presenta una descripción detallada del metabolismo de *S. Cerevisiae*, reproduce de manera confiable condiciones experimentales y contiene abundante información bioquímica.

El modelo iMM904 (Mo et al., 2009b) toma como referente las reconstrucciones iND750 (Duarte et al., 2004) e iFF750 (J. Förster et al., 2003), pero incluye información actualizada y una reacción de síntesis de biomasa modificada que mejora el carácter predictivo del

modelo (Mo et al., 2009b; C. A. Vargas García et al., 2013). El modelo incluye 904 genes, 1228 metabolitos, 1577 reacciones y 8 compartimentos (mitocondria, citosol, peroxisoma, núcleo, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, vacuola y espacio extracelular). El modelo iMM904 en formato SBML fue suministrado por el estudiante de doctorado de la Universidad de Delaware, César Augusto Vargas (Fuente: <http://hdspgroup.com/cesar-vargas/>).

3.1.1 Curado del modelo iMM904

Para conocer mejor el tipo de información que se encuentra consignado en el modelo metabólico de partida y realizar las modificaciones pertinentes, se hace una revisión por niveles del modelo:

Nivel 1 Entradas y Salidas: Inicialmente se hace una revisión global del modelo, es decir, se identifican cuáles son los sustratos, productos metabólicos y ecuación de biomasa.

Nivel 2 Rutas metabólicas asociadas al catabolismo y anabolismo: Se hace una revisión detallada de los grupos de reacciones que hacen parte de los procesos catabólicos (degradación de sustratos a través de rutas metabólicas que convergen y producen precursores biosintéticos) y anabólicos (grupo de reacciones divergentes que a partir de los precursores biosintéticos forman monómeros o bloques de construcción para la biosíntesis de macromoléculas) (Palsson, 2006).

Nivel 3 Reacciones individuales: Es el nivel dónde se concentra el mayor esfuerzo, ya que se estudian todas las transformaciones bioquímicas que incluye el modelo. Una reacción metabólica es un proceso de conversión de sustrato a producto, frecuentemente mediado por una enzima. Cada reacción debe cumplir con las leyes fundamentales de la física y química, por lo tanto, deben balancearse en términos de carga y composición elemental (Palsson, 2006; Varios, 2009; Walhout et al., 2012).

Para cada reacción se verifica el sustrato, producto y cofactor.

La localización o compartimento donde ocurre la reacción, se verifica, y si no se cuenta con información certera, se asume que ocurre en el citosol. Este paso es de suma importancia, ya que la localización precisa de las reacciones incrementa el poder predictivo del modelo (Palsson, 2006; Varios, 2009).

La asociación gen-proteína para cada reacción también se verifica. Estas se describen como relaciones booleanas entre genes o proteínas, e incluyen información de isoenzimas, actividades enzimáticas secundarias y participación de complejos proteínicos. Es necesario prestar especial atención a tal asociación dado que esta información afecta la confiabilidad de las simulaciones, más específicamente las relacionadas con delección de genes (Österlund, 2014; Palsson, 2006; Varios, 2009).

Una vez se ha corroborado la información anterior y se tienen todas las reacciones, se verifica que estas estén correctamente balanceadas. Si se cometen errores en el balance de masa se puede bloquear el funcionamiento de las rutas y predecir por ejemplo, una producción infinita de ATP.

La revisión de los niveles se realiza cotejando la información del modelo metabólico de partida iMM904, con la consignada en la literatura (Aung et al., 2013; Heavner, Smallbone, Barker, Mendes, & Walker, 2012; Heavner, Smallbone, Price, & Walker, 2013; Nookaew et al., 2008a; Österlund, 2014) y las bases de datos listadas en la Tabla 2. En esta etapa se presta una atención especial a los temas relacionados con compartimentalización, reacciones de transporte, especificidad de cofactores y asociación gen-proteína-reacción (GPR). Se emplean varias bases de datos con el propósito de garantizar que la información consignada es correcta.

Se emplea la función *writeCbModel* de MATLAB, la cual permite convertir el archivo SBML del modelo iMM904 a Excel, para facilitar la evaluación y análisis del modelo.

Tabla 2 Base de datos empleadas para la construcción del modelo metabólico

BASES DE DATOS	
Rutas Metabólicas	
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/
MetaCyd	http://metacyc.org/
Enzimas	
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/
BRENDA	http://www.brenda-enzymes.org/
<i>S. cerevisiae</i>	
SGD (<i>Saccharomyces Genome Database</i>)	http://www.yeastgenome.org/
CYGD	http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis/institute/groups/fungal-microbial-genomics/resources/index.html
Genomas Microbianos	
GenBank (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Para continuar con el proceso de análisis del modelo iMM904, se emplea la herramienta computacional MC3 (Model and Constraint Consistency Checker) (Yousofshahi, Ullah, Stern, & Hassoun, 2013) para la identificación de otras inconsistencias en la red metabólica. Esta permite hacer un análisis de topología de la red evaluando los siguientes aspectos:

Metabolitos finales (dead-end metabolite): Estos pueden ser de dos clases, SCM (*Single Connected Metabolite*), metabolitos internos que participan en una sola reacción como metabolitos finales, y DEM (*Dead end metabolite*), metabolitos internos que se solo se consumen o solo se producen, pero no ambas circunstancias (Klamt, Stelling, Ginkel, & Gilles, 2003).

Reacciones en bloque: Reacciones cuyos fluxes bajo cualquier condición son cero. Este problema puede ser causado por varias razones, por ejemplo, la reacción puede estar directamente conectada a un metabolito final o a una reacción de flux cero o la especificación de reversibilidad de la reacción es incorrecta. Estas reacciones se detectan analizando el espacio nulo para asegurarse que cada fila tiene al menos una entrada que no es cero (Terzer, 2009).

Reacciones que no satisfacen la condición de reversibilidad: Existen reacciones que en el modelo aparecen como reversibles, pero que según la herramienta computacional MC3 (Model and Constraint Consistency Checker), solo tienen lugar en una única dirección; una vez identificadas las reacciones, se hace una revisión de sus propiedades termodinámicas, a partir de la literatura, para confirmar su verdadera direccionalidad.

Reacciones acopladas: Permiten la identificación de reacciones faltantes.

Para solucionar las discrepancias se emplearon fuentes bibliográficas (Aung et al., 2013; Heavner et al., 2012, 2013; Nookaew et al., 2008; Österlund, 2014) y bases de datos (ver Tabla 2) para validar la información arrojada por la herramienta.

Las funciones de COBRA - MATLAB empleadas para realizar los fueron las siguientes:

changeGeneAssociation: se emplea para rectificar falsas asociaciones gen-reacción.

model.changeRxnBounds: cambia los límites superior e inferior de los fluxes. *addReaction:* adición de reacciones faltantes o para eliminar reacciones bloque.

removeRxns: remoción de reacciones que no se validan con la información existente.

3.2 Modificaciones realizadas al modelo iMM904 para dar origen al modelo i1583Je2015

La reconstrucción del modelo i1583Je2015 se hizo a partir del modelo iMM904, un modelo a base genómica compartimentalizado para *Saccharomyces cerevisiae*.

Los cambios realizados al modelo base consistieron en dos instancias: la primera se relaciona con la adición de las reacciones bioquímicas responsables de mutaciones genéticas de la cepa para el transporte, consumo de xilosa y mejoramiento de la producción de etanol y la segunda, toma como referente los hallazgos observados al realizar el proceso de curado manual y los resultados arrojados por el software MC3. En la segunda parte se adicionaron al modelo reacciones faltantes, se cambió la direccionalidad de algunas reacciones, se eliminaron reacciones que no se integraban a la red y a partir del nuevo conocimiento bioquímico y genético del microorganismo, se actualizaron las asociaciones gen-proteína-reacción (GPR).

En la Tabla 3 se encuentran consignados las modificaciones realizadas al modelo base.

Tabla 3 Modificaciones realizadas al modelo iMM904

REACCIONES ADICIONADAS	
Reacción	Descripción de la reacción
<i>PPItp</i>	Transporte de ppi
<i>AKGtm</i>	Transporte de citrato-oxaloacetato
<i>EX_fola(e)</i>	Transporte de Folato al exterior
<i>FOLAt</i>	Transporte de folato: citosol - espacio extracelular
CAMBIOS RELACIONADOS CON LA ASOCIACIÓN GEN-PROTEÍNA	
Gen	Descripción
<i>YAR073W YAR075W</i>	Los genes YAR073W y YAR075W se retiran de la reacción IMPD porque codifican para una proteína no funcional.
<i>YHL012W</i>	YHL012W es una proteína putativa cuya función se desconoce y se asignó a la reacción GALU por su secuencia similar, por lo tanto se retira.
<i>YJL200C</i>	YJL200C se retira de la reacción ACONTm porque es una isoenzima aconitasa mitocondrial putativa y se asignó a esta reacción solo porque su secuencia es similar. Además actualmente no existe evidencia relacionada con la supresión de este gen.
<i>YML096W</i>	YML096 se retira de la reacción ASNS1 porque es un gen putativo del cual se desconoce su función y se asignó a esa reacción solo por su secuencia similar.
Gen	Descripción
<i>YMR278W</i>	Se asocia a la reacción PGM3
<i>YMR241W (YHM2)</i>	Se asocia a la reacción AKGtm
<i>YGR012W</i>	YGR012W se elimina de la reacción CYSS ya que es una proteína putativa cuya función se desconoce y se asignó a esta reacción solo por su secuencia similar. La reacción CYSS también se elimina.

CAMBIOS RELACIONADOS SEGÚN EL SOFTWARE MC3	
Reacción reversible a irreversible	
Reacción	Descripción de la reacción
ACCOACrm	Acetyl-Coa carboxylase, mitochondrial
ACGAM6PS	N-acetylglucosamine-6-phosphate synthase
ACONT3m	aconitase, mitochondrial
AKGtm	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)
ALATA_Lm	L-alanine transaminase, mitochondrial
AMAOTr	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase
BTSr	biotin synthase
DBTSr	dethiobiotin synthase
Metabolito final	
23CAPPD	ADP-ribose 2,3-cyclic phosphodiesterase cysteine synthase

Los cambios mencionados dan origen al modelo i1583Je2015, el cual cuenta con 1583 reacciones, 1228 metabolitos, 901 genes y 8 compartimentos (citósol, mitocondria, retículo endoplasmático, núcleo, aparato de Golgi, vacuola, peroxisoma y espacio extracelular). El modelo se encuentra en formato SBLM y esta disponible a solicitud del interesado.

3.3 Análisis de balance de flujo

3.3.1 Conversión de la red metabólica en un modelo matemático

Para que el modelo metabólico generado, pueda emplearse como una herramienta con potencial predictivo, los datos se llevan a un lenguaje matemático mediante una representación en forma matricial. Las reacciones y los metabolitos que componen la red se representan en la matriz **S**, o matriz de coeficientes estequiométricos y, en el vector **v** los fluxes metabólicos tanto internos como externos (Kauffman et al., 2003; Palsson, 2006; Walhout et al., 2012). Cada elemento S_{ij} de la matriz corresponde al coeficiente estequiométrico del metabolito *i* en la reacción *j*. Los metabolitos que son consumidos en las reacciones tienen valores negativos, los que se producen, positivos y los que no participan en una reacción determinada, se les asigna el valor de cero. Por lo tanto, si en la reacción *j*, el metabolito *i* es consumido y tiene un coeficiente estequiométrico de 1, entonces $S_{ij} = -1$. La matriz **S** tiene dimensiones **MxN**, donde **M** es el número de metabolitos y **N**, el número de reacciones (Kauffman et al., 2003; Palsson, 2006; Walhout et al., 2012).

La matriz **S** se organiza de forma tal, que cada una de las columnas corresponde a una reacción y cada fila es un metabolito, es decir, en una matriz donde se describen cuantas reacciones participan y cómo se encuentran interconectadas o en pocas palabras una

representación en dos dimensiones de lo que sucede en una célula (Kauffman et al., 2003; Palsson, 2006; Walhout et al., 2012).

3.3.2 Restricciones

Al realizar la representación matemática de la red metabólica en forma de matriz **S**, el siguiente paso es identificar las restricciones e imponerlas en el modelo. Las células están sujetas a una variedad de restricciones desde ambientales, fisicoquímicas, evolutivas y regulatorias. Estas restricciones estequiométricas generan un espacio de posibles soluciones (Kauffman et al., 2003; Llaneras & Picó, 2008; Palsson, 2006; Walhout et al., 2012).

La restricción más importante que debe satisfacer el modelo es la relacionada con el balance de masa, que en forma matricial se escribirse como:

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot v \quad (1)$$

Donde cada elemento x_i del vector x corresponde a la concentración intracelular del metabolito i , y cada elemento v_j del vector v corresponde a la velocidad neta de conversión en la reacción j .

A continuación y de manera específica, se definen restricciones individuales relacionadas con la velocidad de consumo de sustratos, reversibilidad e irreversibilidad de las reacciones y procesos de transporte. Estas restricciones tienen como objetivo limitar aún más el espacio de posibles soluciones.

3.3.3 Análisis de Balance de flujo (FBA)

Dado que el número de reacciones es mayor al número de metabolitos (N: 1577 >M: 1228), el sistema es subdeterminado y para solucionarlo se requiere plantear un problema de optimización lineal previa definición una función objetivo. El problema de programación lineal (PL) se formula de la siguiente manera (Kauffman et al., 2003; Llaneras & Picó, 2008; Palsson, 2006; Walhout et al., 2012):

$$\begin{array}{l}
 \text{Maximizar: } Z = c^T v \\
 \text{Sujeto a: } S \cdot v = 0 \\
 v_{min} \leq v \leq v_{max}
 \end{array} \quad (2)$$

En esta representación \mathbf{Z} es la función objetivo, \mathbf{c}^T es el vector que define el objetivo del sistema, \mathbf{v} son los fluxes, \mathbf{S} es la matriz de coeficientes estequiométricos y \mathbf{v}_{min} y \mathbf{v}_{max} son los valores mínimos y máximos de los fluxes de cada reacción. La solución del problema no solo arroja el valor de Z sino que también se obtiene la distribución óptima de fluxes que permiten maximizar o minimizar la función objetivo \mathbf{Z} (Kauffman et al., 2003; Llaneras & Picó, 2008; Palsson, 2006; Walhout et al., 2012).

3.3.4 Restricciones del problema lineal

Como se mencionó anteriormente, la matriz \mathbf{S} define las restricciones por balance de masa que debe cumplir el modelo. Para estimar el comportamiento de un sistema biológico empleando un modelo metabólico basado en restricciones, se asume que dado el alto valor del número de recambio para la conversión de metabolitos intracelulares, la escala de tiempo de las reacciones metabólicas intracelulares, es relativamente corta comparada con otras reacciones celulares (Palsson, 2006). De esta manera es posible aplicar la consideración de estado *pseudo* estable para el balance de materia, dando lugar a:

$$S \cdot v = 0 \quad (3)$$

La segunda restricción que se impone en el modelo se hace sobre los valores de los fluxes de cada reacción así:

$$v_{min} \leq v \leq v_{max} \quad (4)$$

Las restricciones de los valores de fluxes se determinan calculando el rendimiento teórico máximo para un metabólico. Si las reacciones son irreversibles \mathbf{v}_{min} es cero. Similarmente, si la capacidad enzimática se encuentra definida experimentalmente, \mathbf{v}_{max} sería ese número. Si no existe información consolidada para imponer una restricción a un flux \mathbf{v} , entonces \mathbf{v}_{min} y \mathbf{v}_{max} son -1000 y +1000, respectivamente, esto permite que puedan tomar todos los valores de fluxes posibles.

Bajo condiciones anaerobias las restricciones de los fluxes cambian para algunas reacciones, dado que *S. cerevisiae* no sintetiza algunas moléculas que son esenciales para sus supervivencia (Fornairon-Bonnefond, Demaretz, Rosenfeld, & Salmon, 2002; Heavner et al., 2012; C. a. Vargas García, Arguello Fuentes, & Torres Sáez, 2012), es decir, las restricciones relacionadas con v_{min} de las reacciones de transporte desde la membrana extracelular de ergosterol, zymosterol, octadecenoato, octadecenoato, hexadecenoato y octadecadienoato se modifican. Estas reacciones de intercambio de metabolitos pasan de ser irreversibles a ser reversibles, lo que es equivalente a decir, que el límite inferior es $v_{min} = -1000$ en cada una de las velocidades de reacción de estos componentes. Las restricciones de entrada de sustrato varían de acuerdo al estudio que se va a realizar. Estas restricciones se especifican en los siguientes apartados.

3.3.5 Función objetivo

Como función objetivo se selecciona la velocidad específica de crecimiento de biomasa porque es la que se ha encontrado predice con mayor exactitud los datos experimentales (Nookaew et al., 2008; Wintermute, Lieberman, & Silver, 2013). En los estudios de (Edwards, Ibarra, & Palsson, 2001; García Sánchez, Vargas García, & Torres Sáez, 2012; Wintermute et al., 2013) se ha evaluado la pertinencia de emplear otras funciones objetivos, diferentes como las velocidades de reacción correspondientes a la producción y/o consumo de ATP, NADH, NADPH, dióxido de carbono, entre otros, pero se ha encontrado que las mejores predicciones se obtienen al emplear velocidad específica de crecimiento como función objetivo.

La reacción de biomasa empleada en el modelo es una versión modificada de la contenida en el modelo iND750 (Ver Anexo A). Esta ecuación se basa en resultados experimentales de los principales constituyentes celulares encontrados en la fase de crecimiento de la levadura y se incluyen cantidades traza de cofactores adicionales y metabolitos (Mo, Palsson, & Herrgård, 2009a).

3.4 Validación del modelo i1583Je2015

3.4.1 Crecimiento de la cepa en condiciones aerobias y anaerobias

La capacidad metabólica de *S. cerevisiae* se evalúa empleando el modelo metabólico y FBA para simular la velocidad de crecimiento bajo condiciones aerobias y anaerobias. Como función objetivo se usó la maximización de la biomasa. Los datos experimentales empleados para la validación del modelo se presentan en Tabla 4 y Tabla 5; esta

información es extraída de artículos científicos en los cuales se realizaron estudios en quimiostato a diferentes tasas de dilución bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Las simulaciones bajo condiciones anaerobias, requieren que el modelo sea modificado para incluir esteroides y algunos ácidos grasos que la célula que no puede producir bajo esas condiciones; experimentalmente se ha comprobado que las levaduras que crecen en un medio estrictamente anaerobio no tienen la capacidad metabólica para sintetizar estos compuestos que son esenciales para la integridad de la membrana plasmática (Fornairon-Bonnefond et al., 2002; Heavner et al., 2012; C. a. Vargas García et al., 2012). Por lo anterior fue necesario modificar las restricciones relacionadas con v_{min} de las reacciones que involucran transporte de ergosterol, zymosterol, octadecanoato, octadecenoato, hexadecenoato y octadecadienoato, desde la membrana extracelular. Estas reacciones de intercambio de metabolitos pasan de ser irreversibles a ser reversibles, lo que es equivalente a decir, que el límite inferior es $v_{min} = -1000$ en cada una de las velocidades de reacción de estos componentes.

En las simulaciones aerobias se modifica el flux de oxígeno de acuerdo a los datos experimentales presentados en la Tabla 5. Para todas las condiciones experimentales se fijó el valor de consumo de glucosa de acuerdo al valor experimental (ver Tabla 4 y Tabla 5)

Tabla 4 Datos experimentales en condiciones anaerobias empleados para la validación del modelo i1583Je2015

ANAEROBIO									
μ in vivo	Sustrato	O2	Etanol	CO2	Glicerol	Acetato	Succinato	Piruvato	Referencia
0,03	2,3	0	3	0,38	0	0	0	nd	(Tai et al., 2007)
0,047	2,86	0	3,74	4,78	0,26	0	0,02	nd	(Nissen, Schulze, Nielsen, & Villadsen, 1997)
0,1	5,555	0	8,2825	9,0658	0,0768	0,0333	0,025	0,0111	(Nissen et al., 1997)
0,1	6,3	0	9,05	nd	1,05	0	Nd	nd	(Jouhten et al., 2008)
0,1	6,58	0	9,47	nd	1,11	0	Nd	nd	(Jouhten et al., 2008)
0,19	11,31	0	16,84	18,53	2,06	0,1	0,05	0,05	(Nissen et al., 1997)
0,2	11,5022	0	17,1153	18,8406	2,0934	0,1035	0,0518	0,046	(Nissen et al., 1997)
0,281	16,75	0	24,82	26,83	3,18	0,3	0,05	0,1	(Nissen et al., 1997)
0,3	17,3667	0	25,7374	27,8214	3,2997	0,3126	0,0521	0,1042	(Nissen et al., 1997)
0,369	22,18	0	33,07	34,73	4,83	0,67	0,07	nd	(Nissen et al., 1997)
0,4	23,6541	0	35,2682	37,0423	5,1566	0,7096	0,071	0,1892	(Nissen et al., 1997)

La velocidad específica de crecimiento μ , se encuentra en h^{-1} . Los fluxes se encuentran en unidades de $mmol((gPS \cdot h)$. Los flujos de sustrato y O_2 corresponden a metabolitos de entrada, los demás corresponden a los fluxes de los metabolitos excretados. nd: Dato no disponible.

Tabla 5 Datos experimentales en condiciones aerobias empleados para la validación del modelo i1583Je2015

AEROBIO									
μ <i>in vivo</i>	Sustrato	O ₂	Etanol	CO ₂	Glicerol	Acetato	Succinato	Piruvato	Referencia
0,1	1,15	2,74	nd	2,85	nd	nd	Nd	nd	(Daran-Lapujade et al., 2004)
0,1	1,28	2,7	0	nd	0	0	Nd	nd	(Jouhten et al., 2008)
0,1	1,97	1,7	1,56	nd	0	0	Nd	nd	(Jouhten et al., 2008)
0,1	2,78	1,2	2,91	nd	0	0	Nd	nd	(Jouhten et al., 2008)
0,3	4,5	6,1	2,3	8,8	0	0,41	Nd	0,01	(Van Hoek, Van Dijken, & Pronk, 1998)
0,33	6,2	7	5	12	0	0	0	nd	(Papin, Price, Wiback, Fell, & Palsson, 2003a)
0,35	8,6	5,1	9,5	14,9	0,05	0,62	Nd	0,03	(Jouhten et al., 2008)
0,4	11,1	3,7	13,9	18,9	0,15	0,6	Nd	0,05	(Jouhten et al., 2008)
0,38	13,39	3	18	22	0,65	0	0	nd	(Papin, Price, Wiback, Fell, & Palsson, 2003b)

La velocidad específica de crecimiento μ , se encuentra en h⁻¹. Los fluxes se encuentran en unidades de mmol((gPS*h). Los flujos de sustrato y O₂ corresponden a metabolitos de entrada, los demás corresponden a los fluxes de los metabolitos excretados. nd: Datos no disponible

3.4.2 Delección de genes

Continuando con el proceso de validación del modelo i1583Je2015 se determinan los fenotipos de crecimiento bajo condiciones definidas empleando delección de genes. Las simulaciones *in silico* para la delección de genes se realizan a 694 de los 901 genes que componen el modelo y en un medio mínimo con glucosa. Para este propósito, se restringe a cero el flux de todas las reacciones asociadas a cada uno de los genes y luego se estima la velocidad de crecimiento empleando FBA. Para este análisis, se emplea la herramienta COBRA, específicamente la función *singleGeneDeletion*.

La evaluación de la letalidad de la mutación se evalúa realizando el cálculo de la relación entre la velocidad de crecimiento de la mutante sobre la velocidad de crecimiento de la cepa salvaje, si el valor es menor a 0.9, la mutación es considerada letal (Österlund et al., 2013).

Los datos de los fenotipos de crecimiento obtenidos a partir de las simulaciones con FBA se comparan con los datos experimentales obtenidas de (Kuepfer et al., 2005) y (Jochen Förster, Famili, Palsson, & Nielsen, 2003). A partir de los datos experimentales se obtiene una lista de genes que se consideran esenciales y aquellos que causan auxotrofías bajo condiciones de glucosa mínima en el medio. La lista completa considera 4856 genes (Österlund et al., 2013).

La capacidad de predicción del modelo empleando delección de genes se evalúa con los parámetros usados en (Nookaew et al., 2008) de la siguiente manera:

$$\text{Precisión: } \frac{(VP + VN)}{(VP + VN + FP + FN)} \quad (5)$$

$$\text{Sensibilidad: } \frac{VP}{(VP + FN)} \quad (6)$$

$$\text{Especificidad: } \frac{VN}{(VN + FP)} \quad (7)$$

$$\text{Predicción de valores positivos: } \frac{VP}{(VP + FP)} \quad (8)$$

$$\text{Predicción de valores negativos: } \frac{VN}{(VN + FN)} \quad (9)$$

Donde **VN**: Verdadero Negativo, **VP**: Verdadero positivo, **FP**: Falso Positivo, **FN**: Falso Negativo.

3.4.3 Soluciones óptimas alternativas

Dado que el problema a solucionar es lineal, la distribución de fluxes generada por el FBA generalmente no es la única solución óptima que existe ya que puede suceder que el modelo metabólico alcance el mismo valor de la función objetivo empleando ruta metabólicas alternativas, es decir, se pueden obtener soluciones óptimas alternativas con fenotipos diferentes. El análisis de variabilidad de fluxes o FVA por sus siglas en inglés, es un método que identifica los posibles fluxes máximos y mínimos para una reacción en particular cuando el valor de la función objetivo se restringe a su valor óptimo. Para realizar este análisis se hace uso de las herramientas de COBRA, específicamente de la función FluxVariability.

Este análisis consiste en optimizar el valor de v_i mediante dos problemas de optimización, el primero consiste en minimizar v_i

$$\begin{array}{l}
 \text{Minimizar } v_i \\
 \text{Sujeto a: } S \cdot v = 0 \\
 v_i \geq v_{min} \\
 v_i \leq v_{max} \\
 Z = c^T v
 \end{array} \quad (10)$$

Y el segundo consiste en maximizar v_i

$$\begin{array}{l}
 \text{Maximizar } v_i \\
 \text{Sujeto a: } S \cdot v = 0 \\
 v_i \geq v_{min} \\
 v_i \leq v_{max} \\
 Z = c^T v
 \end{array} \quad (11)$$

Los datos empleados para realizar FVA se describen en la Tabla 6.

Tabla 6 Datos experimentales empleados para realizar FVA

ANAEROBIO										
Condición	μ in vivo	Sustrato	O ₂	Etanol	CO ₂	Glicerol	Acetato	Succinato	Piruvato	Referencia
1	0,1	5,555	0	8,2825	9,0658	0,0768	0,0333	0,025	0,0111	(Nissen et al., 1997)
2	0,1	6,3	0	9,05	nd	1,05	0	nd	nd	(Jouhten et al., 2008)
3	0,19	11,31	0	16,84	18,53	2,06	0,1	0,05	0,05	(Nissen et al., 1997)
4	0,281	16,75	0	24,82	26,83	3,18	0,3	0,05	0,1	(Nissen et al., 1997)
AEROBIO										
Condición	μ in vivo	Sustrato	O ₂	Etanol	CO ₂	Glicerol	Acetato	Succinato	Piruvato	Referencia
2	0,1	1,97	1,7	1,56	nd	0	0	nd	nd	(Jouhten et al., 2008)
3	0,4	11,1	3,7	13,9	18,9	0,15	0,6	nd	0,05	(Jouhten et al., 2008)

La velocidad específica de crecimiento μ , se encuentra en h^{-1} . Los fluxes se encuentran en unidades de $mmol/(gPS \cdot h)$. Los flujos de sustrato y O₂ corresponden a metabolitos de entrada, los demás son los fluxes de los metabolitos excretados. nd: Datos no reportados.

3.5 Análisis de las limitaciones metabólicas de la cepa mutante en condiciones aerobias y anaerobias empleando FBA

Para estudiar las limitaciones metabólicas de la cepa mutante de *S. cerevisiae* al emplear xilosa y/o glucosa como fuentes de carbono para la producción de etanol, se simula el crecimiento del organismo en un medio que contiene glucosa, xilosa y la combinación de ambas bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Los datos experimentales empleados para realizar las simulaciones se describen en la Tabla 7

Tabla 7 Datos experimentales empleados para realizar las simulaciones

Porcentaje %	AEROBIO - ANAEROBIO	
	Glucosa (mmol/gPSh)	Xilosa (mmol/gPSh)
100	11,1	0
70	7,77	3,33
50	5,55	5,55
30	3,33	7,77

Las simulaciones se realizaron empleando FBA (Flux balance Analysis).

Para simular las condiciones experimentales empleando el modelo i1583Je2015 se realizan cambios en las restricciones relacionadas con v_{min} y v_{max} en reacciones específicas de acuerdo a las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis. La condición anaerobia significa que el medio en el que crece el microorganismo no hay flux de entrada de oxígeno, empleando FBA, lo anterior equivale a decir que $v_{min} EX_O2(e)$ y $v_{max} EX_O2(e)$, siendo EX_O2 el flux de entrada de oxígeno, son cero. Adicionalmente bajo estas condiciones es necesario que el modelo tenga acceso a ácidos grasos y esteroides que en ausencia de oxígeno no se producen, por lo tanto se modifican también las restricciones relacionadas con v_{min} de las reacciones relacionadas con el transporte desde la membrana extracelular de ergosterol, zymosterol, octadecanoato, octadecenoato, hexadecenoato y octadecadienoato. Estas reacciones de intercambio de metabolitos pasan de ser irreversibles a ser reversibles, lo que es equivalente a decir, que el límite inferior es $v_{min} = -1000$ en cada una de las velocidades de reacción de estos componentes.

El flux de entrada de glucosa, xilosa y la combinación de ambas se establece para cada simulación. Esta entrada es representada fijando $v_{min} EX_glc(e)$ y $v_{max} EX_glc(e)$ a cada uno de los valores experimentales.

Para los ensayos de simulación se empleó un computador Dell con 8GB de memoria, y procesador Intel® Core i7. Matlab R2012b (MathWorks, Natick MA) y COBRA 2.0.5.

3.5.1 Estrategias de ingeniería genética para el mejoramiento de la cepa mutante de *S. cerevisiae*

A partir del análisis de las limitaciones metabólicas de la cepa mutante en condiciones aerobias y anaerobias empleando FBA (ver página 55) se generan estrategias de ingeniería genética susceptibles de ser validadas experimentalmente para la construcción de una cepa de *S. cerevisiae* hiperproductora de etanol.

Los resultados del FBA (Sección 3.5) muestran que en condiciones aerobias y anaerobias se generan productos diferentes al etanol como el glicerol, cuyo flux de formación es sustancialmente mayor (más del 75%) que el de otros productos como acetato o CO₂ (ver Tabla 18). Además se observa que cuando se emplea xilosa como sustrato, la enzima fosfoglucoasa isomerasa (PGI) favorece la formación de G6P lo que disminuye el flux aguas debajo en la ruta de la glicólisis.

De lo anterior, las estrategias se concentran en dos objetivos, disminuir la producción de glicerol (se hace uso de los datos de (Bro, Regenber, Förster, & Nielsen, 2006; Hjersted et al., 2007)) y favorecer la producción de F6P (Fructosa-6-fosfato) sobre G6P (Glucosa-6-fosfato).

Para disminuir la producción de glicerol, se hace uso de las estrategias planteadas en (Bro, Regenber, et al., 2006; Hjersted et al., 2007) las cuales se enfocan en:

- Cambiar los requerimientos de los cofactores que se emplean en la síntesis de biomasa, dado que en la ruta de formación de glicerol bajo condiciones anaerobias, el NADH originado de la formación de biomasa es reoxidado a NAD⁺.
- Sustituir las reacciones de formación de glicerol por las de formación de etanol.

Para favorecer el flux de formación de F6P sobre G6P se restringe v_{\min} a cero, lo que implica que la reacción reversible catalizada por la enzima fosfoglucoasa isomerasa (PGI) pase a ser irreversible.

Las estrategias de ingeniería genética propuestas involucran la inserción de genes, sobre-expresión de genes y cambio en las restricciones sobre reacciones específicas del modelo. En la Tabla 8, se describen las estrategias que se evaluaron empleando el modelo i1583Je2015. El flux de glucosa y xilosa empleado se encuentra descritos en la Tabla 7.

A partir de los resultados se cuantifica el porcentaje de incremento en la producción de Biomasa y etanol y el porcentaje de reducción en la producción de glicerol.

Tabla 8 Estrategias para el mejoramiento genético de la cepa mutante

Estrategia	Reacción Insertada
Delección de <i>GLUDy</i> y sobre-expresión de <i>GLUSx</i>	
Inserción <i>Glicina deshidrogenasa dependiente de NAD+</i>	Glioxilato + NH ₃ + NADH -> glicina + NAD+ + H ₂ O
Inserción <i>orotate reductasa dependiente de NADP+</i>	S-Dihidro-orotate + NADP+ -> Orotate + NADPH
Inserción <i>transhidrogenasa</i>	NADH + NADP+ -> NADPH + NAD+
Estrategia	Reacción Insertada
Inserción <i>NADH Quinasa</i>	NADH + ATP -> NADPH + ADP
Inserción de <i>glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP+</i>	Glicerol-3-fosfato + NADP+ -> Gliceraldehído-3-fosfato + NADPH
<i>liceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP+</i>	Gliceraldehído-3-fosfato + NADP+ -> 3-fosfoglicerato + NADPH
<i>PGI (Irreversible)</i>	

Las estrategias se evalúan haciendo uso de FBA. La sobre-expresión de genes consiste en retirar las restricciones sobre la reacción, es decir, v_{min} es -1000 y v_{max} es 1000.

4. Capítulo 4 Resultados y Análisis

4.1 Construcción del modelo i1583Je2015

El modelo iMM904 sirve como punto de partida para la reconstrucción del modelo metabólico de una cepa mutante de *S. cerevisiae* que emplea como fuente de carbono xilosa y glucosa para la obtención de etanol.

A partir del curado manual se realizaron cuatro tipos de modificaciones, adición de reacciones, eliminación de reacciones, cambios en la asociación-gen-proteína y cambios en la dirección de las reacciones.

4.1.1 Reacciones adicionadas

Las modificaciones relacionadas con la adición de reacciones se presentan en la Tabla 9:

Tabla 9 Modificación del modelo base: Reacciones adicionadas

Reacción	Descripción de la reacción	Reacción	Referencia
PPItp	Transporte de ppi	ppi[x] -> ppi[c]	(Visser et al., 2005a)
AKGtm	Transporte de citrato-oxaloacetato	akg[c] + cit[m] -> akg[m] + cit[c]	(Castegna et al., 2010a)
EX_fola(e)	Transporte de Folato al exterior	fola[e] <=>	(Iliades, Meshnick, & Macreadie, 2004a)
FOLAt	Transporte de folato desde el espacio extracelular al citosol	fola[e] <=> fola[c]	

Metabolismo del Folato

Según la literatura (Iliades, Meshnick, & Macreadie, 2004b), una cepa que contenga la delección del gen FOL1 (YNL256W), el cual participa en la ruta metabólica de biosíntesis del folato, puede crecer si el medio de cultivo se encuentra suplementado con ácido fólico. En el modelo iMM904 el ácido fólico no hace parte del grupo de metabolitos involucrados; por lo tanto se adicionan las reacciones EX_fola(e) y FOLAt que dan cuenta del intercambio/transporte del citosol al ambiente extracelular. No fue necesario adicionar otras reacciones para conectar el ácido fólico con la red metabólica dado que en el modelo se encuentra el gen DFR1, relacionado con la síntesis de las enzimas 5,6,7,8-

tetrahidrofolato:NAD⁺ oxidoreductasa y dihidrofolate:NADP⁺ oxidoreductasa, las cuales participan en la producción de folato.

Transporte de fosfatos en la membrana peroxisomal

La membrana peroxisomal no es permeable a pequeñas moléculas *in vivo*, lo que implica que deben existir transportadores específicos (Visser et al., 2005b). En el estudio de *Visser et al* se demuestra que la membrana peroxisomal tiene transportadores que facilitan el transporte de pirofosfato, el cual se requiere para apoyar las reacciones de activación de ácidos grasos intraperoxisomal. Por lo anterior, el modelo mejorado incluyó la reacción de transporte de pirofosfato del peroxisoma al citoplasma.

Transporte citrato – oxoglutarato

Los transportadores mitocondriales son una familia de proteínas que facilitan el transporte de metabolitos, nucleótidos y coenzimas a través de la membrana mitocondrial (Castegna et al., 2010b). La literatura disponible en relación con la función y el sustrato asociado de algunos de transportadores mitocondriales de *Saccharomyces cerevisiae* permanecen sin ser estudiados. Castegna *et al* (2010), reporta que Yhm2p es una proteína transportadora de citrato-oxoglutarato; lo anterior sustenta la inclusión de Yhm2p en el modelo

4.1.2 Cambios asociación gen-proteína-reacción

Los cambios relacionados con la asociación gen-proteína-reacción se presentan en la Tabla 10:

Tabla 10 Cambios relacionados con la asociación gen-proteína-reacción

Gen	Descripción	Reacción	Referencia
YAR073W y YAR075W	Los genes YAR073W y YAR075W se retiran de la reacción IMPD porque codifican para una proteína no funcional.	h2o[c] + imp[c] + nad[c] -> h[c] + nadh[c] + xmp[c] IMP	(Hyle, Shaw, & Reines, 2003)
YHL012W	YHL012W es una proteína putativa cuya función se desconoce y se asignó a la reacción GALU por su secuencia similar, por lo tanto se retira.	dehydrogenase] g1p[c] + h[c] + utp[c] <=> ppi[c] + udp[c] UTP-glucose-1- phosphate	(Hashimoto, Sakakibara, Yamasaki, & Yoda, 1997)

Gen	Descripción	Reacción	Referencia
		uridylyltransferase	
YJL200C	YJL200C se retira de la reacción ACONTm porque es una isoenzima aconitasa mitocondrial putativa y se asignó a esta reacción solo porque su secuencia es similar. Además por el momento no existe evidencia relacionada con la supresión de este gen.	cit[m] <=> icit[m] Aconitate hydratase	(Przybyla-Zawislak, Gadde, Ducharme, & McCammon, 1999; Sickmann et al., 2003)
YML096W	YML096 se retira de la reacción ASNS1 porque es un gen putativo del cual se desconoce su función y se asignó a esa reacción solo por su secuencia similar.	asp-L[c] + atp[c] + gln-L[c] + h2o[c] -> amp[c] + asn-L[c] + glu-L[c] + h[c] + ppi[c] asparagine synthase (glutamine-hydrolysing)	(Giaever et al., 2002)
YMR278W	Se asocia a la reacción PGM3		(Tiwari & Bhat, 2008)
YMR241W (YHM2)	Se asocia a la reacción AKGtm	akg[e] + h[e] <=> akg[c] + h[c]	(Castegna et al., 2010b)
YGR012W	YGR012W se elimina de la reacción CYSS ya que es una proteína putativa cuya función se desconoce y se asignó a esta reacción solo por su secuencia similar. La reacción CYSS también se elimina.	acser[c] + h2s[c] -> ac[c] + cys-L[c] + h[c] cysteine synthase	(Zahedi et al., 2006)

4.1.3 Eliminación de reacciones y cambios relacionados con la direccionalidad de las reacciones

Luego de realizar los cambios anteriormente mencionados se aplica la herramienta computacional MC3. Los resultados se encuentran consignados en la Tabla 11:

Tabla 11 Resultados obtenidos al aplicar la herramienta computacional MC3

<p>Connectivity Checks: 186 dead-end metabolites (SCM) 197 dead-end metabolites (DEM)</p> <p>Basis-based checks: 275 coupled Reactions (CR) 30 inconsistent coupling (RCR)</p> <p>FVA-based checks: 327 zero flux reactions (ZFR) 363 unsatisfied reversible reactions (UR)</p>
--

A partir de estos resultados se hizo uso de la literatura (Heavner et al., 2013; Nookaew et al., 2008; Österlund et al., 2013) y base de datos (Ver Tabla 2) para cotejar la información dada por la herramienta y hacer los cambios necesarios. En la Tabla 12 se muestran los cambios realizados a las reacciones que se encontraron no satisfacen el criterio de reversibilidad y para las que dan origen a metabolitos finales con flux cero.

Tabla 12 Cambios realizados según los resultados obtenidos del software MC3

CAMBIOS EN LA DIRECCIÓN DE LA REACCIÓN			
Reacción	Descripción de la reacción	Fórmula	Referencia
ACCOACrm	Acetil-Coa carboxilasa mitocondrial	accoa[m] + atp[m] + hco3[m] -> adp[m] + h[m] + malcoa[m] + pi[m]	
ACGAM6PS	N-acetilglucosamina-6-fosfato sintasa	accoa[c] + gam6p[c] -> acgam6p[c] + coa[c] + h[c]	
ACONT3m	Aconitasa mitocondrial	2mci[m] -> micit[m]	
AKGtm	oxoglutarato deshidrogenasa (lipoamida)	akg[m] + h[m] + lpam[m] -> co2[m] + sdh1am[m]	Base de datos KEEG y <i>Saccharomyces</i> Genome Database
ALATA_Lm	L-alanina transaminasa mitocondrial	akg[m] + ala-L[m] -> glu-L[m] + pyr[m]	
AMAOTr	adenosilmetionina-8-amino-7-oxononanoato transaminasa	8aonn[c] + amet[c] -> amob[c] + dann[c]	
BTSr	biotina sintasa	dtbt[c] + s[c] -> btn[c] + 2 h[c]	
DBTSr	detiobiotina sintasa	atp[c] + co2[c] + dann[c] -> adp[c] + dtbt[c] + 3 h[c] + pi[c]	
REACCIÓN ELIMINADA POR SER METABOLITO FINAL			
23CAPPD	ADP-ribosa 2,3-fosfodiesterasa cíclica cisteína sintasa	23camp[c] + h[c] + h2o[c] -> amp2p[c]	

Los cambios mencionados permiten obtener el modelo i1583Je2015, el cual contiene 1583 reacciones que se dividen en varios subsistemas como se observa en la Tabla 13.

Tabla 13 Clasificación del sistema de reacciones que conforman el modelo i1581Je2015

REACCIONES DEL MODELO i1581Je2015 CLASIFICADAS POR SUBSISTEMA			
SUBSISTEMA	# Reacciones	SUBSISTEMA	# Reacciones
<i>Aspartato y alanina</i>	9	<i>Tirosina, Triptofano y Fenilalanina</i>	44
<i>Metabolismo de carbón alternativo</i>	27	<i>Otro metabolismo de amino ácidos</i>	13
<i>Reacciones anapleróticas</i>	11	<i>Fosforilación oxidativa</i>	19
<i>Arabinosa</i>	3	<i>Pantotenato y Biosíntesis de CoA</i>	21
<i>Arginina y Prolina</i>	33	<i>Pentosa Fosfato</i>	13
<i>Asparagina</i>	2	<i>Biosíntesis de fosfolípidos</i>	44
<i>Ciclo del ácido tricarboxílico</i>	13	<i>Fosfolípidos</i>	8
<i>Metabolismo complejo de etanol</i>	27	<i>Porfirina y clorofila</i>	13
<i>Cisteína</i>	9	<i>Biosíntesis de purina y pirimidina</i>	52
<i>Transporte extracelular</i>	166	<i>Piridoxina</i>	9
<i>Biosíntesis de ácidos grasos</i>	63	<i>Piruvato</i>	19
<i>Degradación de ácidos grasos</i>	44	<i>Biosíntesis de Quinona</i>	17
<i>Ácidos grasos</i>	3	<i>Riboflavina</i>	14
<i>Folato</i>	30	<i>Esfingolípidos</i>	63
<i>Fructosa y Manosa</i>	6	<i>Almidón y sucrosa</i>	2
<i>Galactosa</i>	13	<i>Esterol</i>	49
<i>Glutamato</i>	17	<i>Taurina</i>	1
<i>Glutamina</i>	4	<i>Tiamina</i>	14
<i>Glicerolípidos</i>	12	<i>Treonina y Lisina</i>	19
<i>Glisina y Serina</i>	19	<i>Transporte al retículo endoplasmático</i>	16
<i>Glicólisis/Gluconeogénesis</i>	21	<i>Transporte extracelular</i>	155
<i>Glicoproteína</i>	7	<i>Transporte al aparato de golgi</i>	6
<i>Histidina</i>	14	<i>Transporte a la mitocondria</i>	122
<i>Metano</i>	2	<i>Transporte al núcleo</i>	28
<i>Metionina</i>	20	<i>Transporte al peroxisoma</i>	45
<i>Biosíntesis de NAD</i>	24	<i>Transporte a la vacuola</i>	26
<i>Nitrógeno</i>	3	<i>tRNA</i>	35
<i>Nucleótidos</i>	83	<i>Otras</i>	9
<i>Valina, Leucina e Isoleucina</i>	19	<i>Xilosa</i>	4

El modelo a escala genómica i1583Je2015 es una versión actualizada del modelo de partida iMM904 que tiene como propósito brindar una completa descripción del metabolismo de la cepa mutante de *S. cerevisiae* que utiliza xilosa y glucosa para producir etanol. En su actualización, modelo fue modificado para incluir la adición de reacciones relacionadas con mutaciones que habilitan a la célula para emplear xilosa y transportar metabolitos a través de los diversos compartimentos; de igual forma, en el modelo se eliminaron genes asociados a proteínas putativas cuya función se desconoce o no son funcionales. Finalmente, se consideró la direccionalidad de importantes reacciones de manera que se atiende a los principios termodinámicos que rigen las reacciones biológicas. A continuación se hace una descripción detallada del modelo obtenido.

4.1.4 Descripción del modelo i1583Je2015

Los cambios realizados al modelo base consistieron en dos etapas, la primera relacionada con las mutaciones a la cepa salvaje que consisten en la adición de la ruta metabólica para el uso de la xilosa y la segunda, son resultado de las observaciones halladas al realizar el curado manual del modelo. Estas últimas generaron la adición de reacciones a la ruta metabólica del folato y de transporte de metabolitos a través de los compartimentos, eliminación de reacciones que no se conectaban con la red metabólica y cambio de direccionalidad de reacciones reversibles que según datos bioquímicos son irreversibles. También se actualizaron algunas asociaciones GPR (*Gene-protein-reactions*) de acuerdo a la nueva literatura con el objetivo de generar una representación más completa y acertada.

Al comparar el número de metabolitos, se observa que el modelo i1583Je2015 tiene menos que el modelo *Yeast 6*, esto se debe a que este tiene diez compartimentos, es decir, dos compartimentos más, envoltura celular y partícula lipídica, de los que se propone en esta nueva reconstrucción, lo que conlleva a que un mismo metabolito se presente en varios compartimentos (ver Tabla 14). Debido a la forma en que se estructura una red metabólica, cuando un mismo metabolito se encuentra localizado en varios compartimentos se cuenta como especies diferentes, por ejemplo, fosfoenolpiruvato mitocondrial y citosólico cuentan como dos metabolitos diferentes, a pesar que en un estudio metabolómico solo es considerado como una especie dado que no se puede distinguir de que compartimento proviene.

Por lo tanto, al aumentar el número de metabolitos en el modelo *Yeast 6* debido a la cantidad de compartimentos, el número de reacciones también se ve incrementado.

Tabla 14 Localización de los metabolitos en los modelos i1583Je2015 y *Yeast 6*

Metabolito	i1583Je2015	Yeast 6
<i>Zimosterol</i>	c - e	c - e - l - r - ce
<i>Ergosterol</i>	c - e - r	c - e - l - ce
<i>Triglicérido</i>	c	c - l
<i>Glicerol-3-Fosfato</i>	c - m	c - m - r - l

c: citoplasma, e: espacio extracelular, r: retículo endoplasmático, m: mitocondria, l: partícula lipídica, ce: envoltura celular.

El modelo con el mayor número de genes es el modelo iTO977, esto se debe a que en este se adicionan dos nuevas rutas metabólicas relacionadas con la biosíntesis de oligosacáridos y Glicosilfosfaditilinositol, dos moléculas que se emplean en la modificación de proteínas, lo que le brinda al modelo iOT977 dar un paso adelante en conectar un modelo metabólico con un modelo para la secreción de proteína.

Las modificaciones realizadas al modelo i1583Je2015 generan una versión actualizada del modelo iMM904 que a diferencia de otros modelos, permite estudiar las limitaciones metabólicas de una cepa de *S. cerevisiae* que puede utilizar como sustrato xilosa ya que contiene el gen *xyIA* codificante de la enzima XI y proteína transportadora de xilosa proveniente de *Pichia stipitis*. Los modelos metabólicos donde se estudian las modificaciones genéticas para conferirle a *S. cerevisiae* la posibilidad de emplear xilosa como fuente de carbono, se enfocan principalmente en la inserción de las enzimas XR y XDH (Ruta de las levaduras) dado que a nivel de laboratorio fue la primera estrategia que dio resultado pero, los bajos rendimientos asociados a la producción de etanol, generó la búsqueda de otras rutas como la de la xilosa isomerasa (XI). La inserción de la enzima XI en cepas de *S. cerevisiae* logró realizarse exitosamente a nivel de laboratorio hace un poco más de 10 años (KUYPER et al., 2005a). Sin embargo, estas cepas mutantes a pesar de poder emplear xilosa como sustrato, tienen rendimientos bajos en la producción de etanol. De ahí la importancia de tener un modelo como el i1583Je2015 para entender e identificar las limitantes metabólicas relacionadas de estas cepas.

4.2 Validación del modelo i1583Je2015

4.2.1 Simulaciones de la velocidad de crecimiento de la cepa en condiciones aerobias y anaerobias

La validación del modelo se realiza mediante tres métodos, primero, comparando la velocidad de crecimiento *in silico* con datos experimentales bajo condiciones aerobias y anaerobias, segundo, comparando los datos *in silico* de viabilidad celular al realizar single gene knockouts con datos experimentales de crecimiento de mutantes con delección de genes y tercero haciendo FVA.

Los datos de las simulaciones de crecimiento bajo condiciones aerobias y anaerobias se encuentran en la Figura 5 y Figura 6.

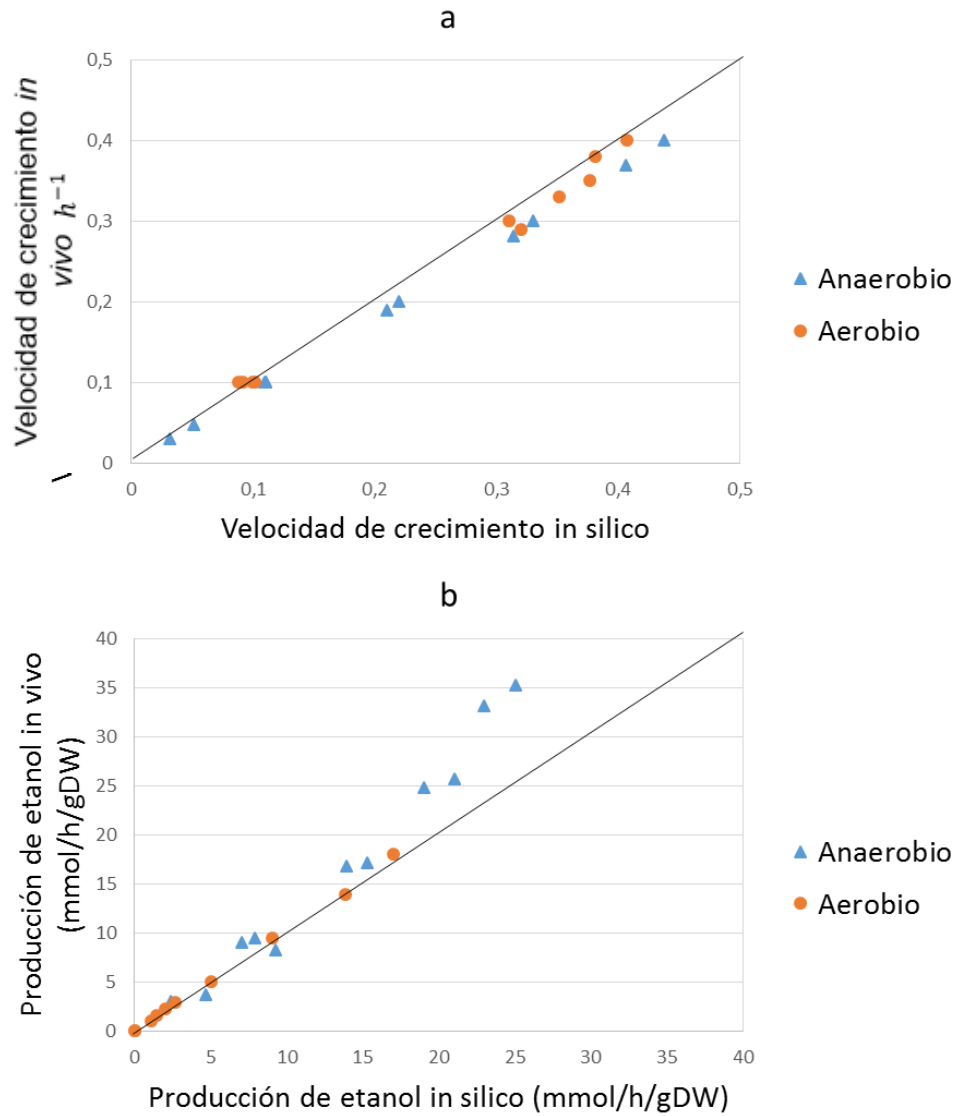


Figura 5 Validación del modelo comparando los valores de predicción *in silico* de crecimiento y producción de etanol con datos experimentales. Se emplea glucosa como fuente de carbono (a) la velocidad de crecimiento *in silico* vs velocidad de crecimiento *in vivo* para condiciones aerobias y anaerobias, (b) Producción de etanol *in silico* vs producción de etanol *in vivo* para condiciones aerobias y anaerobias. Triángulo azul, anaerobio; círculo naranja, aerobio.

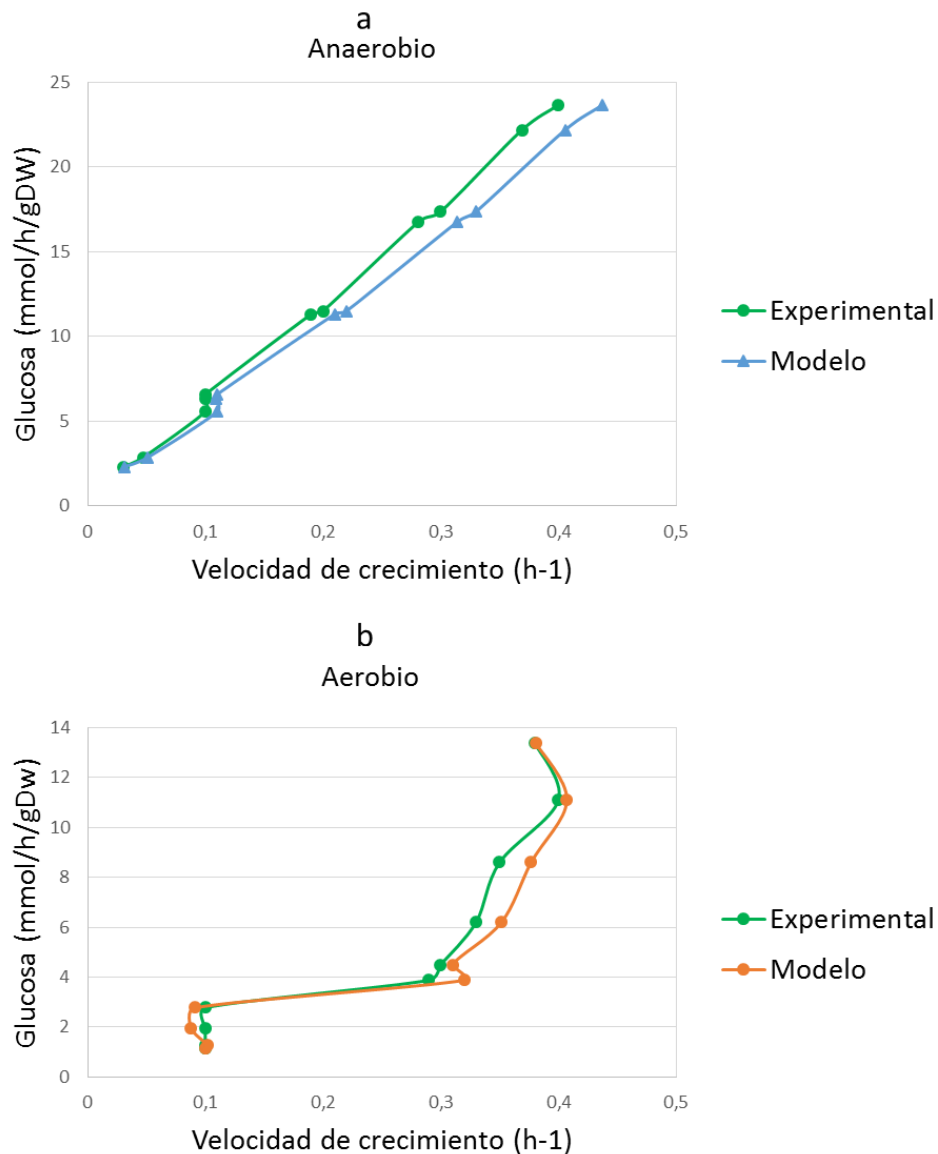


Figura 6: Validación del modelo comparando los valores de predicción *in silico* de crecimiento con datos experimentales. Se emplea glucosa como fuente de carbono. Velocidad de crecimiento simulada y experimental vs flux de glucosa en condiciones anaerobias (d) Velocidad de crecimiento simulada y experimental vs flux de glucosa en condiciones aerobias.

El modelo predice de forma adecuada el crecimiento de la cepa bajo condiciones aerobias y anaerobias, el porcentaje de error, medido como $\left| \left(\frac{\text{valor experimental} - \text{valor simulado}}{\text{valor experimental}} \right) * 100 \right|$ no supera el 12%, como se observa en la Tabla 15 y Tabla 16.

Con respecto a la producción de etanol, que es el producto de interés en el estudio, se encontró que bajo condiciones de aerobiosis, el porcentaje de error varía generalmente entre el 0.5 – 14% (ver Tabla 16). En anaerobiosis, el porcentaje de error varía entre 10 - 22% y cuando se emplean cantidades superiores a 22,18 mmol/gDWh de glucosa, el porcentaje de error es mayor al 40% (ver Tabla 15). Por lo tanto, el modelo tiene limitaciones en la predicción de fluxes cuando se emplean cantidades superiores a 22,18 mmol/gDWh de glucosa en un medio anaerobio. Esto puede deberse a que según el estudio de (Vargas et al., 2011) el ciclo del ácido cítrico en condiciones anaeróbicas presenta dos rutas, la oxidativa y la reductiva, ocasionando que los fluxes de succinil-CoA ligasa y del complejo succinato deshidrogenasa se deban restringir a cero para que el modelo metabólico pueda simular esta condición y los resultados sean más cercanos a los valores experimentales.

En los estudios de (Nookaew et al., 2008) y (Österlund et al., 2013), los porcentajes de error de las simulaciones empleando FBA con velocidad de crecimiento de biomasa como función objetivo y bajo condiciones aerobias y anaerobias, se tiene que el porcentaje de error relacionado con el crecimiento de biomasa para el primer estudio no supera el 10% (Nookaew et al., 2008), contrario a lo que sucede para el segundo, en donde se alcanzan errores mayores al 30% (Österlund et al., 2013). A partir de estos resultados se concluye que el modelo i1583Je2015 predice de forma adecuada los fenotipos de crecimiento de la cepa bajo diferentes fluxes de glucosa y oxígeno en el medio.

Referente a los porcentajes de error relacionados con la producción de etanol, el modelo predice de forma adecuada los niveles de producción; los porcentajes de error no superan el 25%. No obstante la alta reproducibilidad el modelo respecto de reportes experimentales, presenta limitaciones de predicción a altos niveles de concentración de glucosa; en medio anaerobio los niveles máximos tolerables se acercan a 22,18 mmol/gDWh.

Tabla 15 Datos experimentales e *in silico* del crecimiento de la cepa y su producción de etanol bajo diferentes fluxes de glucosa y en un medio anaerobio. Las cantidades de sustrato y etanol se encuentran en mmol/gDWh

MEDIO ANAEROBIO						
Sustrato	μ <i>in vivo</i> (h ⁻¹)	μ <i>in silico</i> (h ⁻¹)	Error (%)	Etanol <i>(in vivo)</i>	Etanol <i>(in silico)</i>	Error (%)
2,3	0,03	0,031	3,33	3	2,388	20,4
2,86	0,047	0,051	8,51	3,74	4,682	25,19
5,555	0,1	0,11	10	8,2825	9,28	10,75
6,3	0,1	0,1095	9,5	9,05	7,02	18,92
6,58	0,1	0,11	10	9,47	7,89	20,03
11,31	0,19	0,21	10,53	16,84	13,92	20,98
11,5022	0,2	0,22	10	17,1153	15,28	12,01
16,75	0,281	0,314	8,29	24,82	19,03	14,80
17,367	0,3	0,33	10	25,7374	21,07	22,15
22,18	0,369	0,4056	9,92	33,07	23	43,78
23,654	0,4	0,4374	9,35	35,2682	25,06	40,74

Tabla 16 Datos experimentales e *in silico* del crecimiento de la cepa y su producción de etanol bajo diferentes fluxes de glucosa y en un medio aerobio. Las cantidades de sustrato y etanol se encuentran en mmol/gDWh

MEDIO AEROBIO						
Sustrato	<i>in vivo</i> (h-1)	<i>in silico</i> (h-1)	Error	Etanol (in vivo)	Etanol (in silico)	Error
1,15	0,1	0,0997	0,3	nd	0,0078	nd
1,28	0,1	0,1017	1,7	0	0,002	nd
1,97	0,1	0,0878	12,2	1,56	1,41	9,62
2,78	0,1	0,0915	8,5	2,91	2,6873	7,65
3,88	0,29	0,32	10,34	1	1,059	5,90
4,5	0,3	0,31	3,33	2,3	1,99	13,48
6,2	0,33	0,3516	6,55	5	5,0519	1,04
8,6	0,35	0,3768	7,66	9,5	9,079	4,43
11,1	0,4	0,4072	1,80	13,9	13,83	0,50
13,39	0,38	0,3806	0,16	18	16,99	5,61

El modelo i1583Je2015 permite predecir de forma adecuada valor experimentales relacionados con la velocidad de crecimiento y producción de etanol bajo diferentes condiciones en medio aerobio y anaerobio.

4.2.2 Delección de genes

Para determinar la capacidad del modelo de predecir genes esenciales, se realizaron simulaciones para evaluar si existe crecimiento del organismo cuando se eliminan genes específicos. La delección se realizó sobre los genes que contaban con información bajo las condiciones mencionadas en la sesión 3.4.2, los cuáles en total fueron 644 genes. La viabilidad de las mutantes se contrasta con la información experimental consignada en (Kuepfer et al., 2005) y (Jochen Förster, Famili, Palsson, et al., 2003).

Los resultados de las simulaciones realizando *single gene deletion* empleando FBA en un medio mínimo que contiene glucosa (10 mmol/h/gDW), amonio, oxígeno, sulfato y fosfato, se encuentra en la Tabla 17. El modelo predice que existe crecimiento en 629 de los 644 fenotipos que se evaluaron. Se presentaron 15 falsos negativos, es decir, se predice no crecimiento a pesar de que el gen eliminado no es esencial. Por lo tanto el modelo tiene un 97.7% sensibilidad relacionado con la predicción de genes esenciales.

La precisión del modelo i1583Je2015 92.7% al contrastarla con las de los modelos iIN800 (Nookaew et al., 2008) de 90.59% y iTO977 de 82.06% (Österlund et al., 2013) mejora en aproximadamente de 2% a 10% respectivamente. Este resultado puede explicarse debido a que el modelo i1583Je2015 cuenta con una reacción de formación de biomasa modificada que mejora las predicciones de letalidad con respecto a los modelos antecesores (Mo et al., 2009a) y además, el número de compartimentos es mayor, lo que permite tener una descripción más cercana al verdadero comportamiento de la actividad metabólica de la levadura. Las predicciones negativas pueden ser ocasionadas por información faltante relacionada con la regulación de genes, reacciones con metabolitos finales o composición de la biomasa.

Tabla 17 Resultados obtenidos de la delección de genes

Análisis genes esenciales	
Precisión	92.7%
Sensibilidad	97.7%
Especificidad	48.6%
Predicción de valores positivos	94.4%
Predicción de valores negativos	70%
629 VP: Verdadero Positivo (El modelo predice que existe crecimiento cuando un gen no esencial es eliminado)	35 VN: Verdadero Negativo (El modelo predice no crecimiento cuando se elimina un gen esencial)
35 FP: Falso Positivo (El modelo predice crecimiento cuando un gen esencial es eliminado)	15 FN: Falso Negativo (El modelo predice no crecimiento cuando genes no esenciales son eliminados)

Categoría	Porcentaje
VP (Verdadero Positivo)	88%
VN (Verdadero Negativo)	5%
FP (Falso Positivo)	5%
FN (Falso Negativo)	2%

4.2.3 Análisis de variabilidad de flujo

Flux Variability Analysis (FVA por sus siglas en inglés) permite conocer estructura de la red metabólica con mayor profundidad. Los resultados obtenidos (Anexo C) se pueden dividir en 5 grupos: (1) Reacciones con flux igual a cero, (2) Reacciones con flux no variable y diferente de cero, (3) Reacciones en el que el flux varía, pero no es cero, (4) Reacciones

que pueden tener un flux igual a cero, (5) reacciones que pueden tener fluxes positivos, negativos o igual a cero (Solo las reacciones que son reversibles pueden corresponder a este grupo). Se realizaron dos tipos de FVA, el primero fijando el valor de la velocidad de crecimiento óptima (100%) y el segundo, se fija un valor subóptimo de la velocidad de crecimiento que equivale al 95% del valor.

Las simulaciones del FVA fueron realizadas empleando la función *FluxVariability* del software COBRA.

Analizando el tamaño de los grupos, las reacciones que contienen un flux igual a cero son el grupo más grande con 48,19%; este grupo de reacciones pueden ser sustituidas por otras con igual eficiencia. Este alto porcentaje es consecuencia de la existencia de reacciones bloque en el modelo. Al realizarse el FVA con el valor subóptimo de la velocidad de crecimiento, el número de reacciones disminuye en un 15%, a causa principalmente de las limitaciones en las restricciones impuestas sobre el FVA.

En el grupo de reacciones en el que el flux puede variar pero es diferente de cero, está compuesto por reacciones que participan en diversas rutas como la glicólisis, fosforilación oxidativa y síntesis de aminoácidos, algunas de ellas pueden ser sustituidas por otras que pueden trabajar con la misma eficiencia. El grupo (5) contiene reacciones que pueden ser sustituidas por otras con eficiencia similar.

En la Figura 7, Figura 8, Figura 9 y Anexo B y C se muestran los resultados del FVA comparado con las soluciones de FBA para cuatro condiciones a nivel anaerobio y dos para condiciones aerobias, empleando glucosa como fuente de carbono.

Cuando se hace FVA con el valor óptimo, los fluxes máximo y mínimo de etanol para las condiciones en un medio anaerobio no delimitan el intervalo donde se encuentra el valor experimental, a diferencia de lo que sucede cuando se realiza FVA con un valor subóptimo. Esto implica que fijar el crecimiento en un valor subóptimo, permite que la diferencia entre la predicción del FBA de crecimiento y su respectivo valor experimental pueda ser empleada en la producción de etanol ($v_{\text{etoh}(e)}$).

Para los fluxes de acetato, succinato, glicerol, piruvato el intervalo contiene el valor experimental.

Para las condiciones aerobias, los intervalos de los fluxes de FVA óptimo y subóptimo delimitan las condiciones experimentales, por lo que el modelo predice de manera precisa los fluxes de los metabolitos de acetato, glicerol, etanol, succinato y piruvato

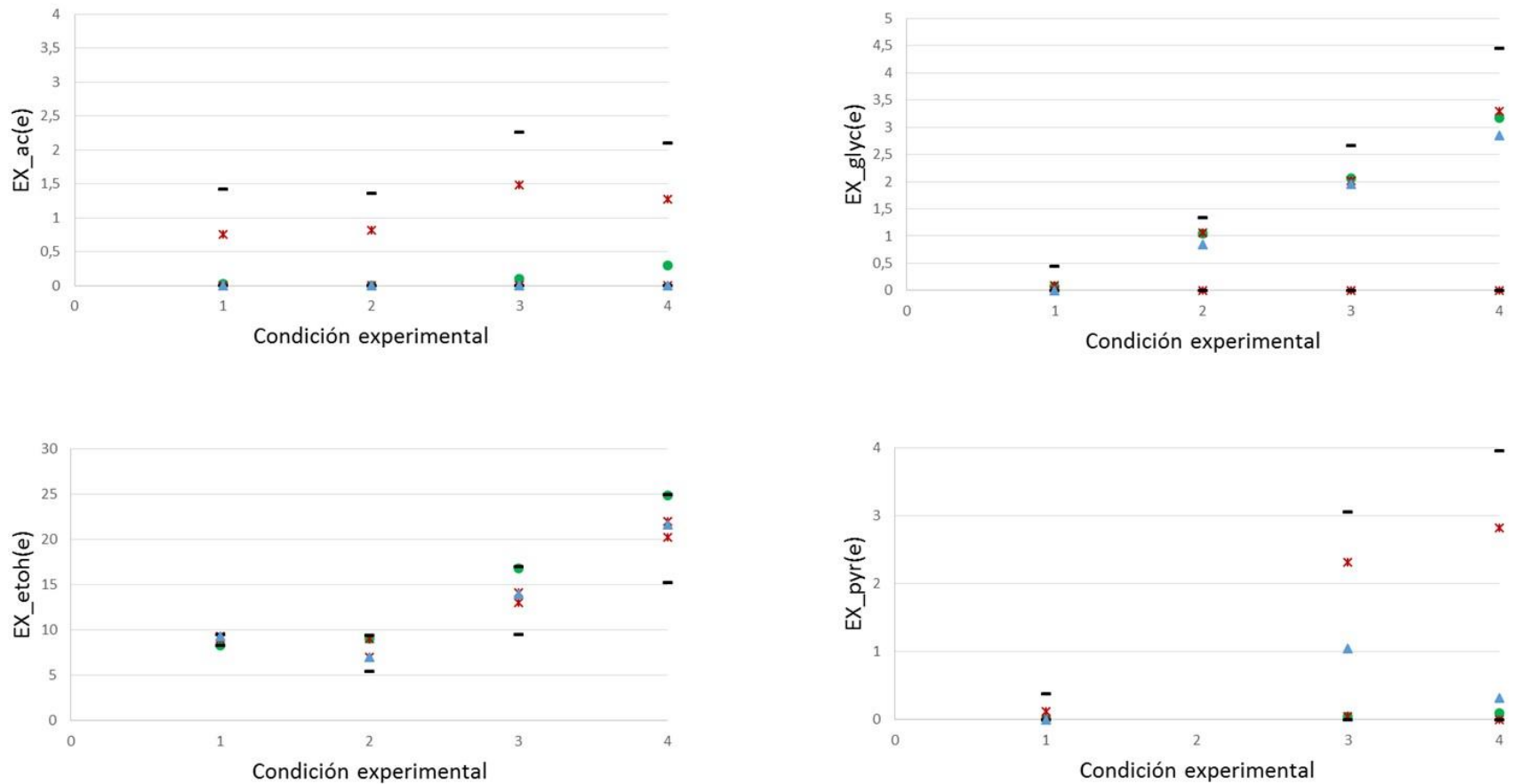


Figura 7 Resultados de FBA y FVA para las condiciones experimentales anaerobias de la Tabla 6. En la abscisa se encuentra las condiciones experimentales y en la ordena el flux de formación de los productos en mmol/gDW/h (a) FBA y FVA para acetato, (b) glicerol, (c) etanol, (d) piruvato.

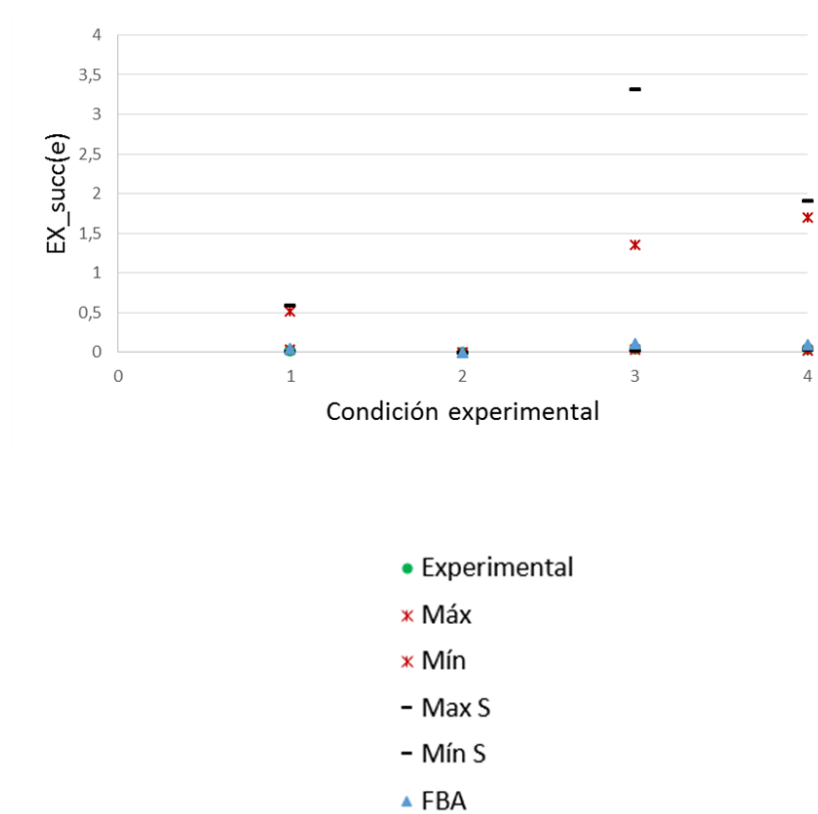


Figura 8 Resultados de FBA y FVA para las condiciones experimentales anaerobias de la Tabla 6. En la abscisa se encuentra las condiciones experimentales y en la ordena el flux de formación de los productos en mmol/gDW/h (a) FBA y FVA para succinato.

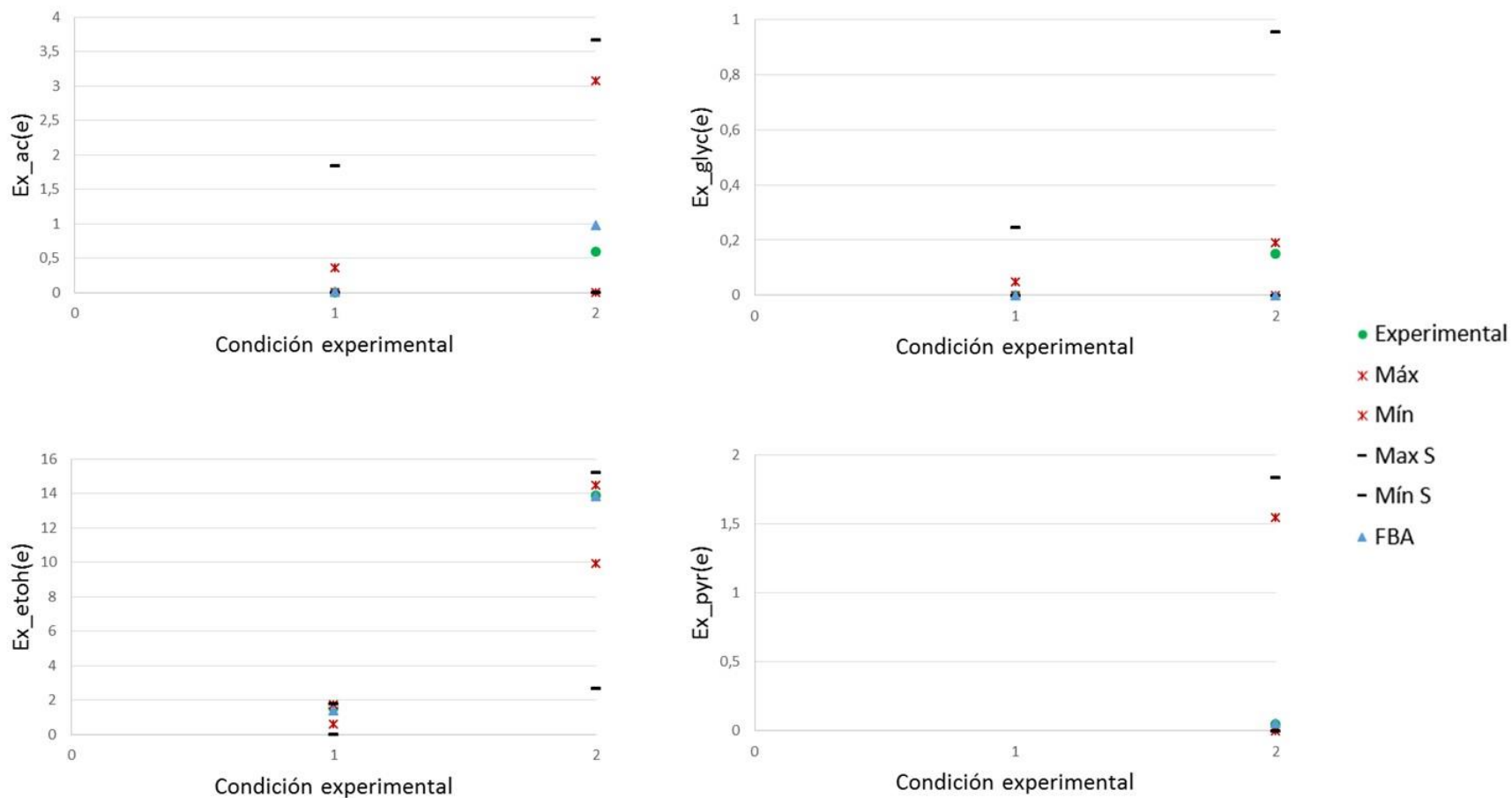


Figura 9 Resultados de FBA y FVA para las condiciones experimentales aerobias de la Tabla 6. En la abscisa se encuentra las condiciones experimentales y en la ordena el flux de formación de los productos en mmol/gDWh (a) FBA y FVA para acetato, (b) glicerol, (c) etanol, (d) piruvato.

4.3 Análisis de las limitaciones metabólicas de la cepa mutante

4.3.1 Crecimiento de la cepa mutante emplean como fuente de carbono glucosa y/o xilosa

La cepa mutante de *S. cerevisiae* se somete a diferentes cantidades de glucosa y xilosa en el medio bajo condiciones aerobias y anaerobias para evaluar el efecto de la fuente de carbono en el metabolismo. Los fluxes de glucosa y xilosa empleados, los fluxes de formación de etanol, glicerol y acetato y la velocidad de crecimiento se encuentran descritos en la Tabla 18.

Crecimiento y producción de etanol mediante co-fermentación de glucosa y xilosa

Tabla 18 Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) y velocidades de consumo y formación de producto ($mmol/gDWh$) bajo diferentes condiciones

<i>Condición</i>	<i>Entrada de sustrato</i>	<i>Etanol</i>	<i>Glicerol</i>	<i>Acetato</i>	<i>Velocidad de crecimiento</i>
<i>Glucosa-Aerobio (GA)</i>	11.1	15,52	1,4	0.20	0.40
<i>Glucosa-Anaerobio (GAN)</i>	11.5	17,22	1,8	0.03	0.23
<i>Xilosa-Aerobio (XA)</i>	11.1	12,35	0,7	0.18	0.37
<i>Xilosa-Anaerobio (XAN)</i>	11.5	15,18	1	0.04	0.18
<i>G-X Aerobio (70%)</i>	7.7	14,58	1,3	0.18	0,39
<i>G-X Aerobio (50%)</i>	5,55	13,93	1,3	0,17	0,38
<i>G-X Aerobio (30%)</i>	3,33	13,31	1,2	0,17	0,37
<i>G-X Anaerobio (70%)</i>	7.7	16,88	1,5	0,02	0,22
<i>G-X Anaerobio (50%)</i>	5,55	16,72	1,6	< 0.01	0,22
<i>G-X Anaerobio (30%)</i>	3,33	16,53	1,4	< 0.01	0,19

En la Tabla 18 se observa que el mayor crecimiento de la cepa se da cuando se emplea glucosa como fuente de carbono bajo condiciones aerobias, seguido de XA y GAN. La velocidad de crecimiento bajo condiciones XAN fue significativamente menor, es decir 55% menos con respecto a GA. El consumo específico de la fuente de azúcar y la producción de etanol fue mayor con glucosa como fuente de carbono (en relación a la xilosa) y bajo condiciones anaerobias (en relación a las condiciones aerobias). La producción de glicerol se incrementa significativamente bajo condiciones anaerobias para ambas fuentes de carbono. Esto no sorprende dado que el glicerol actúa como un sumidero de electrones y su producción permite la regeneración de NAD⁺ cuando el oxígeno no se encuentra disponible como aceptor final de electrones. La formación de acetato fue bajo para las condiciones evaluadas.

En los estudios de co-fermentación, la mayor velocidad de crecimiento se presenta cuando hay mayor porcentaje de glucosa en el medio y bajo condiciones aerobias. Bajo condiciones de glucosa (30%), xilosa (70%) en condiciones anaerobias, se presentó el menor crecimiento de la cepa. El consumo específico de la fuente de carbono y la producción de etanol es mayor cuando hay mayor cantidad de glucosa, en relación con la xilosa y en condiciones anaerobias, factor positivo dado que en el material lignocelulósico la principal fuente de azúcar es la glucosa seguido de xilosa. La producción de glicerol, se ve favorecida cuando hay condiciones de anaerobiosis y la producción de acetato se ve favorecido en condiciones aerobias.

El transporte de xilosa es fundamental para garantizar que no se produzca un crecimiento diaúxico cuando se co-fermenta glucosa y xilosa, por lo tanto, se necesita de un estudio a nivel cinético que permita analizar las limitaciones del transportador Sut1 de *P. stipitis* empleado y de otras como Gxf1 y At5g59250 de *Candida intermedia* y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente, para conocer las limitaciones que se tiene. Es importante recordar que a nivel industrial se requiere el consumo al mismo tiempo de glucosa y xilosa para garantizar un buen flux a través del metabolismo central de carbono que se traduce en alta producción de etanol que es un metabolito de gran interés.

4.3.2 Distribución de fluxes de la cepa mutante empleando glucosa y xilosa

Los resultados de las simulaciones de la cepa mutante bajo condiciones aerobias y anaerobias y empleando glucosa y xilosa como fuente de carbono se presentan en la Figura 10.

Ruta Pentosa Fosfato

Dado que *S. cerevisiae* prefiere emplear glucosa antes que xilosa, la modificación genética realizada a la cepa mutante con el transportador Sut1 de *P. stipitis* le confiere la habilidad de transportar este monosacárido, el cual entra por la vía de la ruta de la pentosa fosfato (RPF).

El flujo de carbono a través de la RPF no oxidativa cuando se emplea xilosa como fuente de carbono es aproximadamente siete veces más grande que al usar glucosa (ver Figura 10), resultado que se relaciona directamente con la topología de la red, puesto la entrada de xilosa es a través de esta ruta. Además, en condiciones fermentativas y cuando se emplea glucosa, el flux de carbono va principalmente hacia la formación de etanol, generando que el flux a través de la RPF sea menor, como se observa en la Figura 10.

El carbono obtenido de la xilosa entra a la ruta de la pentosa fosfato no oxidativa a través de X5P para luego pasar a la glicólisis, caso contrario a lo que sucede con la glucosa donde el flujo de carbono va directamente al metabolismo central y una pequeña fracción, entre 1-2 mmol/gDWh (ver Figura 10), va a la ruta de la RPF para producir NADPH para la biosíntesis y formación de ribosa-5-fosfato (R5P) y eritrosa-4-fosfato (E4P) los cuales son precursores de aminoácidos como la histidina y nucleótidos.

En contraste, para todas las simulaciones realizadas (ver Figura 10) se observa que el flux a través de la RPF oxidativa es bajo, dado que cuando se emplea xilosa el flux de carbono no necesita pasar por esta ruta para ser asimilado sino que se va al metabolismo central. En estudios donde la ruta para la asimilación de xilosa empleada no es la XI sino que es la catalizada por las enzimas XR – XDH (Grotkjaer, Christakopoulos, Nielsen, & Olsson, 2005; J.-P. Pitkänen et al., 2003), se ha evidenciado que el flujo en la RPF oxidativa es alto (aproximadamente 10 veces más) cuando se usa xilosa, esto podría explicarse por el desbalance de cofactores que aumenta la demanda del NADPH. Este alto flujo a través de la ruta disminuye la cantidad de etanol que puede producirse (Grotkjaer et al., 2005; J.-P. Pitkänen et al., 2003).

Una ventaja importante de emplear la XI para realizar la conversión de xilosa a xilulosa es que además de que el balance redox no se ve perturbado, puesto la enzima XI no necesita cofactores, se requiere de un flux mínimo en la RPF oxidativa para satisfacer las necesidades de NADPH, lo que se traduce en la producción de una mayor cantidad de etanol.

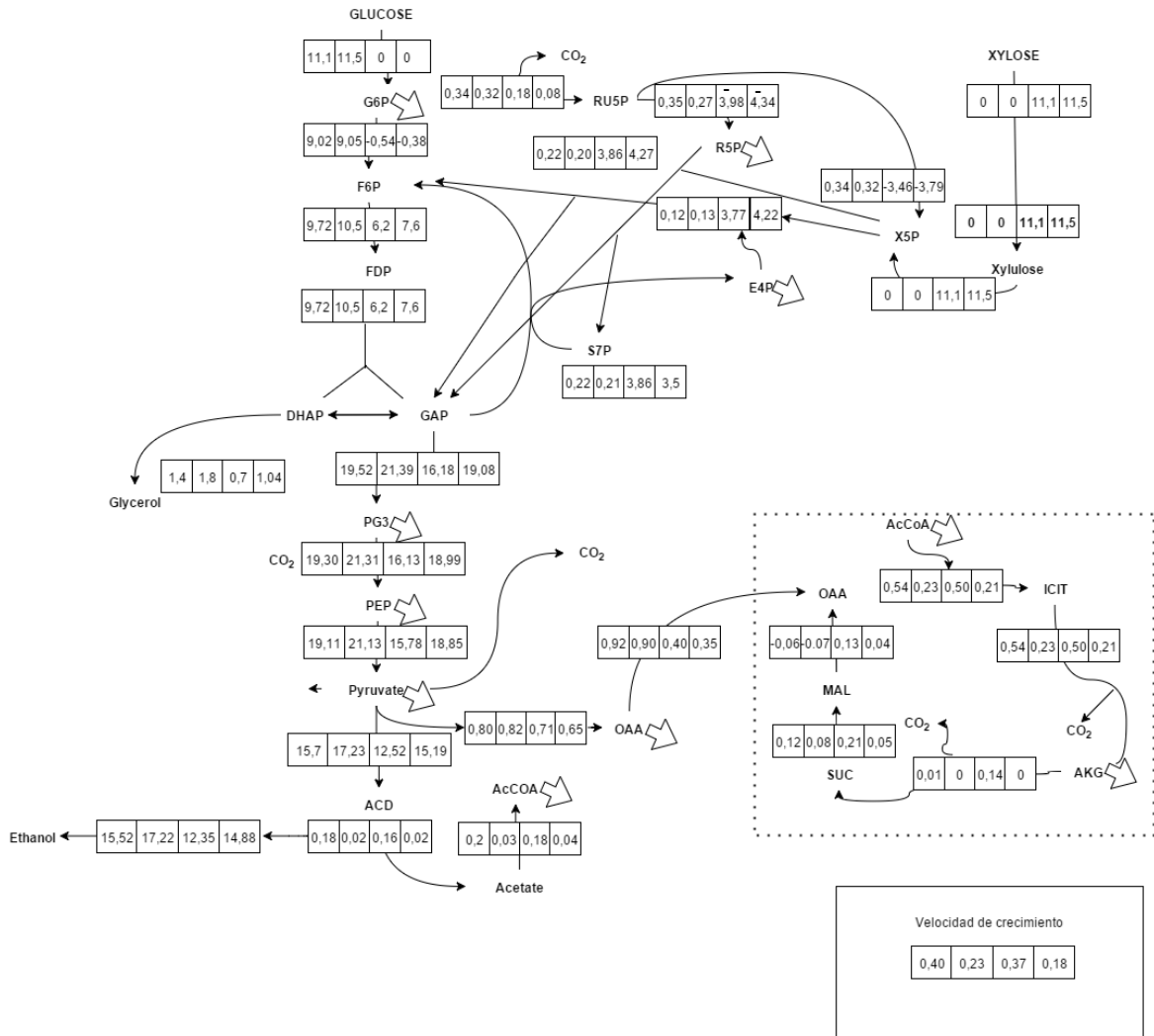


Figura 10 Distribución de fluxes empleando glucosa y xilosa como fuente de carbono bajo condiciones aerobias y anaerobias. Primer cuadro: Glucosa (11.1 mmol/gDWh) – Aerobio. Segundo cuadro: Glucosa (11.5 mmol/gDWh) – Anaerobio. Tercer cuadro: Xilosa (11.1 mmol/gDWh) – Aerobio. Cuarto cuadro: Xilosa (11.5 mmol/gDWh) – Anaerobio.

Ruta de la glicólisis

El flujo de carbono proveniente de xilosa luego de pasar por la RPF no oxidativa entra a la glicólisis a contribuir en la producción de Fructosa-6-fosfato (F6P) y Gliceraldehído-3-fosfato (GAP); estequiometricamente se producen 2 moles de F6P por cada mol de GAP. Como el flux de carbono ingresa a la glicólisis aguas debajo de la reacción de síntesis de glucosa-6-fosfato, el flux a través de la enzima fosfoglucosa isomerasa (PGI) cuando se emplea xilosa favorece la conversión de F6P a G6P, este flux permite la síntesis de carbohidratos y aumenta el flux a la RPF oxidativa.

El flujo reversible de F6P a G6P se ha encontrado que genera una disminución de la cantidad de G6P cuando hay xilosa en el medio (Wasylenko, 2014). La mayor parte de la F6P generada en presencia de xilosa se emplea para la formación de GAP, aunque este flux se ve atenuado en presencia de xilosa porque algo del carbono que viene de la RPF no oxidativa se convierte a GAP directamente

El flujo reversible de F6P a G6P se ha encontrado que genera una disminución de la cantidad de G6P cuando hay xilosa en el medio (Wasylenko, 2014). La mayor parte de la F6P generada en presencia de xilosa se emplea para la formación de GAP, aunque este flux se ve atenuado en presencia de xilosa porque algo del carbono (aproximadamente 3 mmol/gDWh) que viene de la RPF no oxidativa se convierte a GAP directamente.

Una vez se forma GAP, el metabolismo de glucosa y la xilosa es el mismo.

Ácidos tricarboxílicos (TCA)

Los fluxes a través del TCA son pequeños, entre 0 y 0,5 mmol/gDWh, comparados con los de la glicólisis, RPF y fermentación, en todas las condiciones, ya que la mayoría del carbono de piruvato se convierte a etanol en vez de ser transportado a la mitocondria y oxidado para formar CO₂.

Bajo condiciones anaerobias el TCA es prácticamente inactivo y las reacciones de la red solo sirven para brindar carbono para biosíntesis. La falta de flux a través del TCA en condiciones anaerobias es de esperarse ya que no se cuenta con oxígeno como aceptor terminal de electrones para la re-oxidación del NADH en la mitocondria.

Cuando se emplea glucosa en condiciones aeróbicas, el flux a través de KDG (α -ceto glutarato deshidrogenasa) es pequeño, casi cero. Este flux mínimo a través del TCA puede deberse a la represión por sustrato y es consistente con lo que se ha visto en trabajos experimentales previos (Gombert, Moreira dos Santos, Christensen, & Nielsen, 2001).

En aerobiosis y empleando xilosa como sustrato, el pequeño (entre 0,01 a 0,54 mmol/gDWh) pero significativo flux a través del TCA, sugiere una inducción incompleta de la respuesta de represión catalítica por carbono (RCC), que se ha observado también en otros trabajos científicos durante el uso de la xilosa como fuente de carbono (Y.-S. Jin & Jeffries, 2004).

Por lo tanto, cuando se usa glucosa en condiciones aerobias, hay una represión por sustrato del metabolismo respiratorio, mientras que en presencia de xilosa bajo las mismas condiciones el metabolismo respiratorio está activo, dado que se dispone de flux de carbono en el TCA, donde en presencia de glucosa habría represión; cuando la cepa

mutante crece con xilosa en el medio cambia del metabolismo fermentativo al respiratorio, lo que disminuye los fluxes en la ruta de la glicólisis (ver Figura 10).

Crecimiento de la cepa mutante

De acuerdo a las simulaciones (ver Figura 10), cuando se emplea xilosa como sustrato bajo condiciones anaerobias se experimenta el menor crecimiento (0.18 h^{-1}), lo que lleva a pensar que existe una limitante a nivel metabólico.

Esa limitación puede estar directamente ligada con las reacciones de la glicólisis luego de la formación de GAP, evidenciando que pueda existir una activación incompleta del metabolismo fermentativo, porque como se mencionó anteriormente, puede que exista una disminución en la expresión de los genes relacionados con las reacciones de la glicólisis existentes después de la producción de GAP inducido por el hecho que la enzima PGI favorece la formación de G6P.

En el metabolismo fermentativo, el NADH citosólico producido en la reacción catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es re-oxidado a través de la formación de etanol. Por lo tanto, limitaciones metabólicas en las etapas aguas abajo de la glicólisis pueden llevar a la regeneración ineficiente de NAD^+ en el citosol. En condiciones aeróbicas, este problema puede ser sobrellevado al llevar el NADH a la mitocondria donde puede ser reoxidado en la cadena transportadora de electrones con oxígeno como aceptor final de electrones.

Tomando en consideración los resultados del análisis de balance de flujo de la cepa mutante de *S. cerevisiae* y estudios que se han realizado sobre el tema (Wasylenko & Stephanopoulos, 2015), se sugiere que en presencia de xilosa como única fuente de carbono existe una limitación metabólica en las reacciones que hacen parte de la glicólisis desde GAP, pasando por la formación de piruvato y finalmente etanol. También se observa que existe una re-oxidación ineficiente de NADH generado en la glicólisis, donde no hay oxígeno como aceptor de electrones. Estos hallazgos no se tenían identificados a partir de la literatura, sugiriendo que a pesar de tratar, mediante las mutaciones realizadas, que el flux de carbono que se forma a partir de xilosa potenciara la formación de etanol, aún siguen existiendo otras limitantes que se deben sanear para generar una cepa hiperproductora de etanol

Lo anterior se complementa con el hecho que el transporte de xilosa a través de la membrana plasmática continúa siendo una limitante, ya que a pesar de que la introducción de genes heterólogos le confieran la capacidad de emplear este azúcar como fuente de carbono, se encuentra que el mayor consumo de xilosa se presenta como hay poca cantidad de glucosa en el medio (Katahira et al., 2008), y cuando hay poca glucosa en el medio, según se evidencia en la Tabla 18 hay menor producción de etanol.

4.3.3 Estrategias de Ingeniería Genética para el mejoramiento de la cepa mutante

En condiciones anaerobias, la cepa mutante de *S. cerevisiae* produce principalmente cuatro productos cuando emplea glucosa y/o xilosa como sustrato: CO₂, etanol, biomasa y glicerol (Tabla 18 y Figura 10). Para mejorar la producción de etanol se debe buscar estrategias que permitan direccionar el flux de carbono que va a biomasa y/o glicerol a la producción de etanol.

El flujo de formación de glicerol es mayor que el de otros productos como acetato. En condiciones anaerobias y empleando glucosa y xilosa como sustrato (Tabla 18), se genera un flux de 1.8 y 1 mmol/gDWh de glicerol respectivamente y 0.03 y 0.04 mmol/gDWh respectivamente de acetato. Bajo aerobiosis y empleando las mismas fuentes de carbono, se tiene un flux de formación de glicerol 1.4 mmol/gDWh cuando se usa glucosa y 0.7 mmol/gDWh para xilosa y 0.2 y 0.18 mmol/gDWh respectivamente de acetato. Según el estudio de (Nissen, Hamann, Kielland-Brandt, Nielsen, & Villadsen, 2000) si se logra direccionar el flux de carbono a etanol, según estudios pueden aumentar la producción de etanol en un 10%.

Delecionar los genes involucrados en la biosíntesis de glicerol no es una estrategia que pueda llevarse a cabo, dado que la velocidad específica de crecimiento disminuye fuertemente (Nissen et al., 2000). Además, en condiciones anaerobias, la formación de glicerol es necesaria para el crecimiento de *S. cerevisiae*, ya que este producto juega un rol importante en mantener el balance redox dentro de la célula puesto que el NADH originado de la producción de ácidos orgánicos y biomasa, puede ser re-oxidado a NAD⁺ por la formación de glicerol, ya que la respiración no se puede dar y la producción de etanol es un proceso de redox-neutral.

En el estudio de *Bro et al*, 2006 se especifican cuatro estrategias para redireccionar el flujo de carbono del glicerol hacia la formación de etanol:

1. Sustitución de las reacciones oxidantes de NADPH.
2. Sustitución de las reacciones de reducción de NAD⁺ en la formación de biomasa.
3. Inclusión de reacciones que convierten NADH en NADPH.
4. Sustitución de las reacciones de síntesis de glicerol por las de formación de etanol, empleando NADH.

Además de aplicar estrategias para la reducción de la formación de glicerol, a partir del análisis de los resultados de la Figura 10 se observa que al emplear xilosa como fuente de carbono para la producción de etanol, el flux para la glicólisis entra debajo del nodo de G6P y el flux a través de la enzima que cataliza la reacción reversible que convierte G6P a F6P, denominada fosfoglucosa isomerasa (PGI), tiene un flux neto de F6P a G6P, lo que no ocurre cuando se emplea glucosa como única fuente de carbono. Por lo tanto, se

propone ampliar las restricciones de la enzima PGI a una reacción irreversible, es decir, $v_{min} = 0$ y $v_{max} = 1000$.

En la Tabla 19 y Tabla 20 se muestran las estrategias que se evalúan y se cuantifica el porcentaje de mejoramiento en la velocidad de crecimiento, producción de etanol y disminución de la producción de glicerol bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Según la Tabla 19, se encuentra que las estrategias empleadas permitieron el aumento en la producción de etanol y la disminución en la producción de glicerol bajo condiciones anaerobias y empleando glucosa y xilosa como fuentes de carbono. El aumento en el porcentaje de la producción de etanol se evidencia más sobre las simulaciones en la cuales se emplea glucosa en un 70% y 30%.

La mejor estrategia en ingeniería genética para aumentar la producción de etanol en más del 8% bajo condiciones anaerobias y de co-fermentación (glucosa/xilosa) es la inserción de la reacción heteróloga catalizada por la enzima GAPN. La inserción de la reacción genera una reducción del 100% en la producción de glicerol y permite aumentar la formación de biomasa.

En la cepa de *S. cerevisiae* mutante, la conversión de gliceraldehído-3-fosfato (g3p) en 3-fosfoglicerato es una reacción de dos pasos, catalizada por una deshidrogenasa y una quinasa, la GAPN heteróloga permite que esta reacción se de en un solo paso y es dependiente de NADP+. Esta estrategia pertenece al grupo de estrategias que buscan la sustitución de las reacciones de síntesis de glicerol por las de formación de etanol.

En el estudio de (Bro, Birgitte, et al., 2006) se encuentra que al emplear una cepa mutante de *S. cerevisiae* que expresa las enzimas XR y XDH para emplear xilosa y la GAPN heteróloga en un medio anaerobio y empleando 20 g/L glucosa y 50 g/L xilosa, se reduce la formación de glicerol en 58% e incrementa la producción de etanol en 24%. Según las simulaciones (ver Tabla 19) el aumento en el porcentaje de producción de etanol para la cepa de estudio, comparada con este, es tres veces menor. Esta estrategia no se llevado a laboratorio en cepas que contenga la XI para asimilar xilosa, y como actualmente la expresión de XI en las cepa de *S. cerevisiae* ha sido exitosa (KUYPER et al., 2005b; Wasylenko & Stephanopoulos, 2015), se recomienda evaluar esta estrategia.

Según la Tabla 20, sólo una de las estrategias permite aumentar en más de un 5% la producción de etanol bajo condiciones aerobias. Esta estrategia genera que el aumento del flux de etanol sea a expensas de la producción de biomasa.

La estrategia que genera el mejoramiento de la producción de etanol es la delección de GLUDy1 y sobre-expresión de GLUSx, la cual pertenece al grupo de sustitución de las reacciones oxidantes de NADPH. No hay estudios que permitan comparar esta estrategia a nivel de laboratorio y bajo condiciones aerobias. Los estudios en los que se evalúan estrategias de ingeniería genética para mejorar la producción de etanol empleando *S. cerevisiae* y glucosa y xilosa como fuente de carbono se realizan bajo condiciones anaerobias ya que son las que mejores rendimientos tiene.

Tabla 19 Estrategias de ingeniería genética para el mejoramiento en la producción de etanol de la cepa mutante de *S. cerevisiae* bajo condiciones anaerobias. El % de sustrato empleado, equivale a la cantidad de glucosa en el medio, es decir, 30% significa 30% glucosa y 70% xilosa (Adaptada de Bro, Birgitte, et al., 2006).

Estrategia	Reacción insertada	% de incremento en la producción de Biomasa			% de incremento en la producción de Etanol			% de reducción de la producción de glicerol		
		30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
1. Delección de GLUDy y sobre-expresión de GLUSx		10,53	0,00	4,55	4,17	3,11	4,27	59	59	60
1. Inserción Glicina deshidrogenasa dependiente de NAD+	Glioxilato + NH ₃ + NADH -> glicina + NAD ⁺ + H ₂ O	15,79	-2,50	4,55	4,48	3,11	4,15	57	57	58
2. Inserción orotate reductasa dependiente de NADP+	S-Dihidro-orotate + NADP ⁺ -> Orotate + NADPH	13,05	0,45	4,55	6,59	5,20	6,07	100	100	100
3. Inserción transhidrogenasa	NADH + NADP ⁺ -> NADPH + NAD ⁺	19,32	1,45	11,55	8,17	7,06	6,46	100	100	100
3. Inserción NADH Quinasa	NADH + ATP -> NADPH + ADP	12,63	0,00	4,55	6,53	5,20	6,34	100	100	100
4. Inserción de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP+	Glicerol-3-fosfato + NADP ⁺ -> Gliceraldehído-3-fosfato + NADPH	16,32	4,09	11,55	4,48	4,49	3,50	100	100	100
4. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP+ (GAPN)	Gliceraldehído-3-fosfato + NADP ⁺ -> 3-fosfoglicerato + NADPH	17,89	0,91	4,55	8,23	8,01	8,41	100	100	100
PGI (Irreversible)		16,22	4,07	11,56	4,49	4,39	3,50	32	30	31

Tabla 20 Estrategias de ingeniería genética para el mejoramiento en la producción de etanol de la cepa mutante de *S. cerevisiae* bajo condiciones aerobias. El % de sustrato empleado, equivale a la cantidad de glucosa en el medio, es decir, 30% significa 30% glucosa y 70% xilosa (Adaptada de Bro, Birgitte, et al., 2006).

Estrategia	Reacción insertada	% de incremento en la producción de Biomasa			% de incremento en la producción de Etanol			% de reducción de la producción de glicerol		
		30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
1. Delección de <i>GLUDy1</i> y sobre-expresión de <i>GLUSx</i>		-2,70	-2,89	-3,33	5,58	5,65	5,44	69	68	71
1. Inserción <i>Glicina deshidrogenasa dependiente de NAD+</i>	Glioxilato + NH ₃ + NADH -> glicina + NAD ⁺ + H ₂ O	2,16	1,79	1,44	-2,10	0,00	0,00	55	61	58
2. Inserción <i>orotate reductasa dependiente de NADP+</i>	S-Dihidro-orotate + NADP ⁺ -> Orotate + NADPH	2,16	1,84	1,49	0,00	0,00	-0,14	100	100	100
		% de incremento en la producción de Biomasa			% de incremento en la producción de Etanol			% de reducción de la producción de glicerol		
		30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
3. Inserción <i>transhidrogenasa</i>	NADH + NADP ⁺ -> NADPH + NAD ⁺	3,32	2,97	3,59	-0,45	nd	nd	100	100	100
3. Inserción <i>NADH Quinasa</i>	NADH + ATP -> NADPH + ADP	6,92	1,79	1,44	9,47	0,00	0,00	100	100	100
4. Inserción de <i>glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP+</i>	Glicerol-3-fosfato + NADP ⁺ -> Gliceraldehído-3-fosfato + NADPH	3,32	2,89	2,56	-0,45	-0,36	-0,48	100	100	100
4. <i>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP+</i>	Gliceraldehído-3-fosfato + NADP ⁺ -> 3-fosfoglicerato + NADPH	2,16	1,79	1,28	0,00	0,00	0,00	100	100	100
	<i>PGI (Irreversible)</i>	2,16	1,79	1,28	0,00	0,00	-0,07	100	100	100

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Los modelos metabólicos a escala genómica son una herramienta valiosa en el área de las ciencias biológicas que permiten plasmar el comportamiento celular mediante la construcción de una red metabólica en la que se hace una descripción de las reacciones bioquímicas, metabolitos y genes que conforman un organismo. A partir de esta red se pueden analizar las limitaciones metabólicas de un organismo y proponer estrategias en ingeniería metabólica para su mejoramiento.
- La reconstrucción del modelo metabólico de un organismo requiere tiempo y esfuerzo ya que el proceso es altamente complejo. Se debe estar conscientes que las bases de datos sobre las cuales se construyen estas redes pueden presentar errores, inconsistencias o falta de actualización, por tal motivo se debe trabajar de la mano con literatura confiable. Estas inconsistencias pueden seguir por mucho tiempo, al menos que se dedique tiempo en evaluar y analizar cuidadosamente la red metabólica. Una de las formas de lograrlo, es el curado manual de rutas metabólicas de mucho interés, proceso que a pesar de requerir tiempo y esfuerzo, permite mejorar la precisión de las predicciones del modelo y alertar acerca de las limitaciones de este.
- A partir del curado manual del modelo iMM904 se identificaron inconsistencias al comparar la información contenida en el modelo y la literatura. Estas inconsistencias incluyen asociaciones erróneas gen-proteína-reacción, reacciones que no satisfacen la restricción de reversibilidad, reacciones de metabolito final con flux cero y reacciones de transporte de metabolitos internos faltantes.
- La validación del modelo metabólico i1583Je2015 de *S. cerevisia* se realizó mediante tres estrategias, simulación de condiciones experimentales, delección de genes y variabilidad de fluxes. Se concluye que el modelo simula la formación de biomasa con un porcentaje de error menor al 12% para condiciones aerobias y anaerobias. Con respecto a la producción de etanol se obtiene un error menor del 14% para condiciones aerobias y de aproximadamente 22% para condiciones anaerobias, aunque al emplear condiciones mayores al 22,18 mmol/gDWh de glucosa bajo esta condición el error aumenta a más del 40%, lo cual debe mejorarse en estudios futuros. La precisión del modelo i1583Je2015 mejora en un 2% con respecto a otros estudios.
- Las estrategias de mejoramiento genético se enfocaron en la disminución de la formación de glicerol y llevar el flux de la enzima PGI a la formación de F6P. La mejor estrategia, inserción de la reacción heteróloga catalizada por la enzima GAPN,

incrementó en más del 8% la producción de etanol y redujo en 100% la formación de glicerol.

5.2 Recomendaciones

- El curado del modelo se hizo uso de la herramienta computacional MC3, metodología que permite analizar los problemas más comunes que hacen que en el modelo se presenten inconsistencias como metabolitos finales, reacciones acopladas, reacciones que no satisfacen la reversibilidad, reacciones de flux cero, entre otros. Además de emplear herramientas computacionales es interesante el desarrollo de una metodología global que permita documentar y reportar los errores de los modelos con el objetivo de que todos hablemos el mismo idioma y se pueda realizar el proceso de curado y mejoramiento de la precisión de las simulaciones en menos tiempo.
- Para mejorar los valores de predicción relacionados con la producción de etanol bajo condiciones anaerobias, se puede emplear la metodología de FBA empleando funciones objetivo basado en compartimentos, la cual busca dividir la célula en diversos compartimentos para seleccionar en cada uno potenciales funciones objetivo que se analizan para obtener la mejor combinación.
- Todo los años sale más información acerca del metabolismo de las levaduras, por lo que estos modelos pueden nutrirse a partir de estos datos, generando un mejoramiento continuo en el entendimiento de los sistemas biológicos, pero se recomienda tener presente que incrementar el número de genes no implica mejorar la precisión de los modelos.
- Se recomienda llevar a laboratorio la estrategia de mejoramiento genético encontrada en este estudio para verificar su funcionamiento y mejorar las opciones de cepas que se encuentran a nivel industrial para la producción de etanol. En caso que se compruebe que la estrategia funciona, se haría un aporte a las estrategias de obtención de biocombustibles que buscan disminuir el cambio climático.

A. Anexo: Ecuación de biomasa del modelo i1583Je2015

1.1348 13BDglicn[c] + 0.4588 ala-L[c] + 0.046 amp[c] + 0.1607 arg-L[c] + 0.1017 asn-L[c] + 0.2975 asp-L[c] + 59.276 atp[c] + 0.0447 cmp[c] + 0.0066 cys-L[c] + 0.0036 damp[c] + 0.0024 dcmp[c] + 0.0024 dgmp[c] + 0.0036 dtmp[c] + 0.0007 ergst[c] + 0.1054 gln-L[c] + 0.3018 glu-L[c] + 0.2904 gly[c] + 0.5185 glycogen[c] + 0.046 gmp[c] + 59.276 h2o[c] + 0.0663 his-L[c] + 0.1927 ile-L[c] + 0.2964 leu-L[c] + 0.2862 lys-L[c] + 0.8079 mannan[c] + 0.0507 met-L[c] + 6e-06 pa_SC[c] + 6e-05 pc_SC[c] + 4.5e-05 pe_SC[c] + 0.1339 phe-L[c] + 0.1647 pro-L[c] + 1.7e-05 ps_SC[c] + 5.3e-05 ptd1ino_SC[c] + 0.00099 ribflv[c] + 0.1854 ser-L[c] + 0.02 so4[c] + 0.1914 thr-L[c] + 0.0234 tre[c] + 6.6e-05 triglyc_SC[c] + 0.0284 trp-L[c] + 0.102 tyr-L[c] + 0.0599 ump[c] + 0.2646 val-L[c] + 0.0015 zymst[c] -> 59.276 adp[c] + 58.7 h[c] + 59.305 pi[c]

B. FVA (Condiciones anaerobias)

Datos FVA para condiciones anaerobias, los fluxes se encuentran en unidades de mmol/gDWh.

Condición experimental				
Glicerol	1	2	3	4
Experimental	0,08	1,05	2,06	3,18
Máx	0,09	1,07	2,01	3,29
Mín	0,00	0,00	0,00	0,00
Max S	0,45	1,34	2,67	4,45
Mín S	0,00	0,00	0,00	0,00
Glu	5,56	6,30	11,31	16,75
FBA	0,00	0,85	1,96	2,85

Condición experimental				
Succinato	1	2	3	4
Experimental	0,03	nd	0,05	0,05
Máx	0,52	nd	1,35	1,70
Mín	0,03	nd	0,03	0,03
Max S	0,59	nd	3,32	1,91
Mín S	0,01	nd	0,02	0,04
Glu	5,56	6,30	11,31	16,75
FBA	0,05	nd	0,11	0,10

Condición experimental				
Etanol	1	2	3	4
Experimental	8,2825	9,05	16,84	24,82
Máx	9,3592664	9,01524249	14,1509304	21,9636125
Mín	9,07257803	7,01071861	13,0488307	20,2692245
Max S	9,54399762	9,42876805	17,02	24,9120418
Mín S	8,27590821	5,46871395	9,53372641	15,2065916
Glu	5,56	6,3	11,31	16,75
FBA	9,28	7,02	13,93	21,62

Condición experimental				
Piruvato	1	2	3	4
Experimental	0,01	nd	0,05	0,10
Máx	0,12	nd	2,32	2,82
Mín	0,00	nd	0,05	0,00
Max S	0,38	nd	3,06	3,95
Mín S	0,00	nd	0,00	0,00
Glu	5,56	6,30	11,31	16,75
FBA	0,00	nd	1,05	0,32

Condición experimental				
Acetato	1	2	3	4
Experimental	0,0333	0	0,1	0,3
Máx	0,75435247	0,81579753	1,47906041	1,27410113
Mín	0	0	0	0
Max S	1,41994862	1,35802246	2,26309604	2,1046336
Mín S	0	0	0	0
Glu	5,56	6,3	11,31	16,75
FBA	0	0	0	0

C. FVA (Condiciones aerobias)

Datos FVA para condiciones aerobias, los fluxes se encuentran en unidades de mmol/gDWh.

Condición experimental		
Acetato	1,00	2,00
Experimental		0,05
Máx		1,54
Mín		0,00
Max S		1,84
Mín S		0,00
Glu	1,97	11,10
FBA		0,06

Condición experimental		
Glicerol	1	2
Experimental	0	0,15
Máx	0,05	0,19
Mín	0,00	0,00
Max S	0,25	0,95
Mín S	0,00	0,00
Glu	1,97	11,10
FBA	0,00	0,00

Condición experimental		
Etanol	1	2
Experimental	1,56	13,9
Máx	1,75	14,47
Mín	0,64	9,92
Max S	1,80	15,24
Mín S	0,00	2,70
Glu	1,97	11,1
FBA	1,412	13,83

Condición experimental		
Piruvato	1	2
Experimental		0,05
Máx		1,54
Mín		0,00
Max S		1,84
Mín S		0,00
Glu	1,97	11,10
FBA		0,06

Bibliografía

- Agren, R., Liu, L., Shoaie, S., Vongsangnak, W., Nookaew, I., & Nielsen, J. (2013). The RAVEN Toolbox and Its Use for Generating a Genome-scale Metabolic Model for *Penicillium chrysogenum*. *PLoS Computational Biology*, *9*(3), e1002980. doi:10.1371/journal.pcbi.1002980
- Åkesson, M., Förster, J., & Nielsen, J. (2004). Integration of gene expression data into genome-scale metabolic models. *Metabolic Engineering*, *6*(4), 285–293. doi:10.1016/j.ymben.2003.12.002
- Arora, R., Behera, S., & Kumar, S. (2015). Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: A future perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *51*, 699–717. doi:10.1016/j.rser.2015.06.050
- Attfield, P. V., & Bell, P. J. L. (2006). Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. *FEMS Yeast Research*, *6*(6), 862–8. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00098.x
- Aung, H. W., Henry, S. a., & Walker, L. P. (2013). Revising the Representation of Fatty Acid, Glycerolipid, and Glycerophospholipid Metabolism in the Consensus Model of Yeast Metabolism. *Industrial Biotechnology*, *9*(4), 215–228. doi:10.1089/ind.2013.0013
- Becker, S. A., & Palsson, B. Ø. (2005). Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Staphylococcus aureus* N315: an initial draft to the two-dimensional annotation. *BMC Microbiology*, *5*(1), 8. doi:10.1186/1471-2180-5-8
- Biocomplexity Institute of Virginia Tech, University of Heidelberg, & University of Manchester. (n.d.). COPASI. Retrieved from <http://copasi.org/>
- Bordbar, A., Monk, J. M., King, Z. A., & Palsson, B. O. (2014). Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nature Reviews. Genetics*, *15*(2), 107–20. doi:10.1038/nrg3643
- Brat, D., Boles, E., & Wiedemann, B. (2009a). Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(8), 2304–2311. doi:10.1128/AEM.02522-08
- Bro, C., Birgitte, R., Förster, J., & Nielsen, J. (2006). In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metabolic Engineering*, *8*, 102–111.
- Büttner, M., & Sauer, N. (2000). Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1465*(1-2), 263–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10748259>
- Castegna, A., Scarcia, P., Agrimi, G., Palmieri, L., Rottensteiner, H., Spera, I., ... Palmieri, F. (2010b). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17359–70. doi:10.1074/jbc.M109.097188
- Cazzaniga, P., Damiani, C., Besozzi, D., Colombo, R., Nobile, M., Gaglio, D., ... Vanoni, M. (2014a). Computational Strategies for a System-Level Understanding of Metabolism. *Metabolites*, 4(4), 1034–1087. doi:10.3390/metabo4041034
- Cherry, J. M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., ... Botstein, D. (1997). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 387(6632 Suppl), 67–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169866>
- Choi, Y. J., Lee, J., Jang, Y.-S., & Lee, S. Y. (2014). Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Higher Alcohols. *American Society for Microbiology*, 5(5), e01524–14–e01524–14. doi:10.1128/mBio.01524-14
- Chu, B. C. H., & Lee, H. (2007). Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances*, 25(5), 425–41. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.04.001
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M. L. A., Daran, J.-M., van Gulik, W., de Winde, J. H., & Pronk, J. T. (2004). Role of Transcriptional Regulation in Controlling Fluxes in Central Carbon Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: A CHEMOSTAT CULTURE STUDY. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9125–9138. doi:10.1074/jbc.M309578200
- de Sales, B. B., Scheid, B., Gonçalves, D. L., Knychala, M. M., Matsushika, A., Bon, E. P. S., & Stambuk, B. U. (2015). Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing d-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 37(10), 1973–1982. doi:10.1007/s10529-015-1893-2
- DeJongh, M., Formsma, K., Boillot, P., Gould, J., Rycenga, M., & Best, A. (2007). Toward the automated generation of genome-scale metabolic networks in the SEED. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 139. doi:10.1186/1471-2105-8-139
- Duarte, N. C., Herrgard, M. J., & Palsson, B. (2004). Reconstruction and Validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a Fully Compartmentalized Genome-Scale Metabolic Model. *Genome Research*, (14), 1298–1309.
- Edwards, J. S., Ibarra, R. U., & Palsson, B. O. (2001). In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nature Biotechnology*, 19(2), 125–30. doi:10.1038/84379
- Eliasson, A., Hofmeyr, J.-H. S., Pedler, S., & Hahn-Hägerdal, B. (2001). The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(4-5), 288–297. doi:10.1016/S0141-0229(01)00386-6
- Famili, I., Forster, J., Nielsen, J., & Palsson, B. O. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13134–9. doi:10.1073/pnas.2235812100

- Feldmann, H. (Ed.). (2012). *Yeast molecular and cell biology*.
- Fiaux, J., Cakar, Z. P., Sonderegger, M., Wüthrich, K., Szyperski, T., & Sauer, U. (2003). Metabolic-flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Eukaryotic Cell*, 2(1), 170–80. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=141173&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ford, G., & Ellis, E. M. (2001). Three aldo-keto reductases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132(1-3), 685–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306086>
- Fornairon-Bonnefond, C., Demaretz, V., Rosenfeld, E., & Salmon, J.-M. M. (2002). Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(2), 176–182. doi:10.1016/S1389-1723(02)80011-1
- Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B. Ø., & Nielsen, J. (2003). Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. *Genome Research*, 13(2), 244–253. doi:10.1101/gr.234503
- García Sánchez, C. E., Vargas García, C. A., & Torres Sáez, R. G. (2012). Predictive potential of flux balance analysis of *Saccharomyces cerevisiae* using as optimization function combinations of cell compartmental objectives. *PLoS ONE*, 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043006
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., ... Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387–91. doi:10.1038/nature00935
- Gofieau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., & Davis, R. W. (1996). Life with 6000 genes. *Science Classic*, 274(5287), 546 – 567.
- Gombert, A. K., Moreira dos Santos, M., Christensen, B., & Nielsen, J. (2001). Network Identification and Flux Quantification in the Central Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under Different Conditions of Glucose Repression. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1441–1451. doi:10.1128/JB.183.4.1441-1451.2001
- Grotkjaer, T., Christakopoulos, P., Nielsen, J., & Olsson, L. (2005). Comparative metabolic network analysis of two xylose fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metabolic Engineering*, 7(5-6), 437–44. doi:10.1016/j.ymben.2005.07.003
- Hahn-Hägerdal, B., Wahlbom, C. F., Gárdonyi, M., van Zyl, W. H., Cordero Otero, R. R., & Jönsson, L. J. (2001). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 73, 53–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806613>
- Hamacher, T., Becker, J., Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal, B., & Boles, E. (2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 9),

- 2783–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213924>
- Hashimoto, H., Sakakibara, A., Yamasaki, M., & Yoda, K. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(26), 16308–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9195935>
- Heavner, B. D., Smallbone, K., Barker, B., Mendes, P., & Walker, L. P. (2012). Yeast 5 – an expanded reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *BMC Systems Biology*, *6*(1), 55. doi:10.1186/1752-0509-6-55
- Heavner, B. D., Smallbone, K., Price, N. D., & Walker, L. P. (2013). Version 6 of the consensus yeast metabolic network refines biochemical coverage and improves model performance. *Database*, *2013*, 1–5. doi:10.1093/database/bat059
- Hector, R. E., Qureshi, N., Hughes, S. R., & Cotta, M. A. (2008). Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(4), 675–84. doi:10.1007/s00253-008-1583-2
- Herrgård, M. J., Swainston, N., Dobson, P., Dunn, W. B., Arga, K. Y., Arvas, M., ... Kell, D. B. (2008). A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. *Nature Biotechnology*, *26*(10), 1155–60. doi:10.1038/nbt1492
- Heux, S., Meynial-Salles, I., O'Donohue, M. J., & Dumon, C. (2015). White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.08.004
- Hinman, N. D., Wright, J. D., Hoagland, W., & Wyman, C. E. (1989). Fermentation: An Economic Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *20*, 391–401.
- Hjersted, J. L., Henson, M. A., & Mahadevan, R. (2007). Genome-scale analysis of *Saccharomyces cerevisiae* metabolism and ethanol production in fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, *97*(5), 1190–204. doi:10.1002/bit.21332
- Hohenschuh, W., Hector, R., & Murthy, G. S. (2015). A dynamic flux balance model and bottleneck identification of glucose, xylose, xylulose co-fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, *188*, 153–160. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.015
- Hyle, J. W., Shaw, R. J., & Reines, D. (2003). Functional distinctions between IMP dehydrogenase genes in providing mycophenolate resistance and guanine prototrophy to yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(31), 28470–8. doi:10.1074/jbc.M303736200
- Ideker, T., Galitski, T., & Hood, L. (2001). A new approach to decoding life: systems biology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *2*(3), 343–72. doi:10.1146/annurev.genom.2.1.343
- Iliades, P., Meshnick, S. R., & Macreadie, I. G. (2004a). Dihydropteroate Synthase

- Mutations in *Pneumocystis jirovecii* Can Affect Sulfamethoxazole Resistance in a *Saccharomyces cerevisiae* Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2617–2623. doi:10.1128/AAC.48.7.2617-2623.2004
- International Energy Agency. (2014). *World Energy Outlook*. Retrieved from <http://www.iea.org/textbase/npsum/weo2014sum.pdf>
- Jeong, E. Y., Sopher, C., Kim, I. S., & Lee, H. (2001). Mutational study of the role of tyrosine-49 in the *Saccharomyces cerevisiae* xylose reductase. *Yeast (Chichester, England)*, 18(11), 1081–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481678>
- Jin, Y.-S., Alper, H., Yang, Y.-T., & Stephanopoulos, G. (2005). Improvement of xylose uptake and ethanol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an inverse metabolic engineering approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8249–56. doi:10.1128/AEM.71.12.8249-8256.2005
- Jin, Y.-S., & Jeffries, T. W. (2004). Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 6(3), 229–238. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-3242658291&partnerID=40&md5=9e7105b10cef984246f4691b93bce26d>
- Jin, Y.-S., & Jeffries, T. W. (2004). Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 6(3), 229–38. doi:10.1016/j.ymben.2003.11.006
- Jouhten, P., Rintala, E., Huuskonen, A., Tamminen, A., Toivari, M., Wiebe, M., ... Maaheimo, H. (2008). Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. *BMC Systems Biology*, 2(1), 60. doi:10.1186/1752-0509-2-60
- Karhumaa, K., Garcia Sanchez, R., Hahn-Hägerdal, B., & Gorwa-Grauslund, M.-F. (2007). Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 6, 5. doi:10.1186/1475-2859-6-5
- Katahira, S., Ito, M., Takema, H., Fujita, Y., Tanino, T., Tanaka, T., ... Kondo, A. (2008). Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter *Sut1*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 115–119. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.03.001
- Kauffman, K. J., Prakash, P., & Edwards, J. S. (2003). Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), 491–496. doi:10.1016/j.copbio.2003.08.001
- Khoo, H. H. (2015). Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 46, 100–119. doi:10.1016/j.rser.2015.02.027
- Kim, S. R., Park, Y.-C., Jin, Y.-S., & Seo, J.-H. (2013). Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnology Advances*, 31(6), 851–61. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.03.004

- Klamt, S., Stelling, J., Ginkel, M., & Gilles, E. (2003). FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps. *Bioinformatics*, *19*(2), 261–9. doi:10.1093/bioinformatics/19.2.261
- Krahulec, S., Klimacek, M., & Nidetzky, B. (2009). Engineering of a matched pair of xylose reductase and xylitol dehydrogenase for xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal*, *4*(5), 684–694. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-68049091805&partnerID=40&md5=a1df1bbef7fa0179bbb52b15540703bf>
- Krahulec, S., Petschacher, B., Wallner, M., Longus, K., Klimacek, M., & Nidetzky, B. (2010). Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microbial Cell Factories*, *9*(1), 16. doi:10.1186/1475-2859-9-16
- Kricka, W., Fitzpatrick, J., & Bond, U. (2015). Challenges for the Production of Bioethanol from Biomass Using Recombinant Yeasts (pp. 89–125). doi:10.1016/bs.aambs.2015.02.003
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(3), 236–246. doi:10.1016/S1369-5266(03)00039-6
- Kuepfer, L., Sauer, U., & Blank, L. M. (2005). Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Research*, *15*(10), 1421–1430. doi:10.1101/gr.3992505
- Kumar, A., Singh, J., Baskar, C., & Ramakrishna, S. (2015). Bioenergy: Biofuels Process Technology. In *Advances in Bioprocess Technology* (pp. 165–207). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-17915-5_10
- Kurylenko, O., Semkiv, M., Ruchala, J., Hryniv, O., Kshanovska, B., Abbas, C., ... Sibirny, A. (2016). New approaches for improving the production of the 1st and 2nd generation ethanol by yeast. *Acta Biochimica Polonica*, *63*(1), 31–38. doi:10.18388/abp.2015_1156
- Kuyper, M., Hartog, M. M. P., Toirkens, M. J., Almering, M. J. H., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2005). Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, *5*(4-5), 399–409. doi:10.1016/j.femsyr.2004.09.010
- Lee, J. M., Gianchandani, E. P., & Papin, J. A. (2006). Flux balance analysis in the era of metabolomics. *Briefings in Bioinformatics*, *7*(2), 140–150. doi:10.1093/bib/bbl007
- Lee, S. Y., Kim, J. S., Yun, H., Kim, T. Y., Sohn, S. B., & Kim, H. U. (2009). Construction and Applications of Genome-Scale in silico Metabolic Models for Strain Improvement. In *Systems Biology and Synthetic Biology* (pp. 355–385). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9780470437988.ch10
- Lee, S. Y., Nielsen, J., & Stephanopoulos, G. (2015). *Fundamental Bioengineering*. (J.

- Villadsen, Ed.). WILEY-VCH.
- Lee, S.-H., Kodaki, T., Park, Y.-C., & Seo, J.-H. (2012). Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, *158*(4), 184–191. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.005
- Lee, W.-J., Kim, M.-D., Ryu, Y.-W., Bisson, L. F., & Seo, J.-H. (2002). Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(1-2), 186–91. doi:10.1007/s00253-002-1085-6
- Lin, Y., He, P., Wang, Q., Lu, D., Li, Z., Wu, C., & Jiang, N. (2010). The alcohol dehydrogenase system in the xylose-fermenting yeast *Candida maltosa*. *PLoS One*, *5*(7), e11752. doi:10.1371/journal.pone.0011752
- Lindon, J. C., Holmes, E., & Nicholson, J. K. (2007). Global Systems Biology Through Integration of “Omics” Results. In *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics* (pp. 533–555). Elsevier. doi:10.1016/B978-044452841-4/50020-5
- Llaneras, F., & Picó, J. (2008). Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *105*(1), 1–11. doi:10.1263/jbb.105.1
- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., & Sawayama, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*, *84*, 37–53.
- Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., & Sawayama, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*(1), 37–53. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-68349109625&partnerID=40&md5=72e8c1b16731218c115e0da9fc36a553>
- Meinander, N. Q., Boels, I., & Hahn-Hägerdal, B. (1999). Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *XYL1* and *XYL2* from *Pichia stipitis* with and without overexpression of *TAL1*. *Bioresource Technology*, *68*(1), 79–87. doi:10.1016/S0960-8524(98)00085-6
- Mo, M. L., Palsson, B. O., & Herrgård, M. J. (2009a). Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. *BMC Systems Biology*, *3*, 37. doi:10.1186/1752-0509-3-37
- Moon, J., Lewis Liu, Z., Ma, M., & Slininger, P. J. (2013). New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with *YXI* and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *2*(3), 247–254. doi:10.1016/j.bcab.2013.03.005
- Nielsen, J., & Jewett, M. C. (2008). Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *8*(1), 122–131. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00302.x
- Nissen, T. L., Anderlund, M., Nielsen, J., Villadsen, J., & Kielland-Brandt, M. C. (2001).

- Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast (Chichester, England)*, 18(1), 19–32. doi:10.1002/1097-0061(200101)18:1<19::AID-YEA650>3.0.CO;2-5
- Nissen, T. L., Hamann, C. W., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J., & Villadsen, J. (2000). Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast (Chichester, England)*, 16(5), 463–74. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(20000330)16:5<463::AID-YEA535>3.0.CO;2-3
- Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J., & Villadsen, J. (1997). Flux Distributions in Anaerobic, Glucose-Limited Continuous Cultures of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology*, 143(1), 203–218. doi:10.1099/00221287-143-1-203
- Nookaew, I., Jewett, M. C., Meechai, A., Thammarongtham, C., Laoteng, K., Cheevadhanarak, S., ... Bhumiratana, S. (2008a). The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism. *BMC Systems Biology*, 2(1), 71. doi:10.1186/1752-0509-2-71
- Notebaart, R. A., van Enckevort, F. H., Francke, C., Siezen, R. J., & Teusink, B. (2006). Accelerating the reconstruction of genome-scale metabolic networks. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 296. doi:10.1186/1471-2105-7-296
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., & Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 29–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148090&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ostankovitch, M., & Stagljar, I. (2015). Omics Approaches Deciphering Molecular Function in Large Biological Systems. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3351–3355. doi:10.1016/j.jmb.2015.09.017
- Ostergaard, S., Olsson, L., & Nielsen, J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology*, 64, 34–50.
- Österlund, T. (2014). *Reconstruction of Biological Networks for Integrative analysis Network in Yeast*. Chalmers University of Technology.
- Österlund, T., Nookaew, I., Bordel, S., & Nielsen, J. (2013). Mapping condition-dependent regulation of metabolism in yeast through genome-scale modeling. *BMC Systems Biology*, 7, 36. doi:10.1186/1752-0509-7-36
- Österlund, T., Nookaew, I., & Nielsen, J. (2012). Fifteen years of large scale metabolic modeling of yeast: Developments and impacts. *Biotechnology Advances*, 30(5), 979–988. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.021
- Palsson, B. (2006). *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*. doi:10.2277/0521859034
- Papin, J. A., Price, N. D., Wiback, S. J., Fell, D. A., & Palsson, B. O. (2003a). Metabolic pathways in the post-genome era. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), 250–258.

doi:10.1016/S0968-0004(03)00064-1

- Papin, J. A., Price, N. D., Wiback, S. J., Fell, D. A., & Palsson, B. O. (2003b). Metabolic pathways in the post-genome era. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), 250–258. doi:10.1016/S0968-0004(03)00064-1
- Parachin, N. S., Bergdahl, B., van Niel, E. W. J., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2011). Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 13(5), 508–17. doi:10.1016/j.ymben.2011.05.005
- Pitkänen, E., Jouhten, P., Hou, J., Syed, M. F., Blomberg, P., Kludas, J., ... Arvas, M. (2014a). Comparative Genome-Scale Reconstruction of Gapless Metabolic Networks for Present and Ancestral Species. *PLoS Computational Biology*, 10(2), e1003465. doi:10.1371/journal.pcbi.1003465
- Pitkänen, E., Jouhten, P., Hou, J., Syed, M. F., Blomberg, P., Kludas, J., ... Arvas, M. (2014b). Comparative Genome-Scale Reconstruction of Gapless Metabolic Networks for Present and Ancestral Species. *PLoS Computational Biology*, 10(2), e1003465. doi:10.1371/journal.pcbi.1003465
- Pitkänen, J.-P., Aristidou, A., Salusjärvi, L., Ruohonen, L., & Penttilä, M. (2003). Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. *Metabolic Engineering*, 5(1), 16–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749841>
- Przybyla-Zawislak, B., Gadde, D. M., Ducharme, K., & McCammon, M. T. (1999). Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes. *Genetics*, 152(1), 153–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224250>
- Raman, K., & Chandra, N. (2009). Flux balance analysis of biological systems: Applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics*, 10(4), 435–449. doi:10.1093/bib/bbp011
- Rožanov, A. S., Kotenko, A. V., Akberdin, I. R., & Peltek, S. E. (2015). Recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from plant biomass. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 5(4), 375–382. doi:10.1134/S2079059715040139
- Saha, R., Chowdhury, A., & Maranas, C. D. (2014). Recent advances in the reconstruction of metabolic models and integration of omics data. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 39–45. doi:10.1016/j.copbio.2014.02.011
- Sakihama, Y., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2015). Improved ethanol production from xylose in the presence of acetic acid by the overexpression of the HAA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(3), 297–302. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.09.004
- Saleh, A. A., Watanabe, S., Annaluru, N., Kodaki, T., & Makino, K. (2006). Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass

- to ethanol. *Nucleic Acids Symposium Series (2004)*, (50), 279–80.
doi:10.1093/nass/nrl139
- Sauer U., H. M., & Zamboni, N. (2007). Getting Closer to the Whole Picture. *Science*, 316(5824), 550–551. doi:10.1126/science.1142502
- Sauer, U., Heinemann, M., & Zamboni, N. (2007). GENETICS: Getting Closer to the Whole Picture. *Science*, 316(5824), 550–551. doi:10.1126/science.1142502
- Sedlak, M., & Ho, N. W. Y. (2004). Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast (Chichester, England)*, 21(8), 671–84. doi:10.1002/yea.1060
- Shin, H. Y., Nijland, J. G., de Waal, P. P., de Jong, R. M., Klaassen, P., & Driessen, A. J. M. (2015). An engineered cryptic Hxt11 sugar transporter facilitates glucose–xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 176. doi:10.1186/s13068-015-0360-6
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., ... Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13207–12. doi:10.1073/pnas.2135385100
- Skoog, K., & Hahn-Hägerdal, B. (1990). Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3389–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Smith, A. C., & Robinson, A. J. (2011). A metabolic model of the mitochondrion and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle. *BMC Systems Biology*, 5(1), 102. doi:10.1186/1752-0509-5-102
- Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 1(1), 1–11. doi:10.1006/mben.1998.0101
- Stephanopoulos, G. (2007). Challenges in Engineering Microbes for Biofuels Production. *Science*, 315(5813), 801–804. doi:10.1126/science.1139612
- Sun, J., & Zeng, A.-P. (2004). IdentiCS – Identification of coding sequence and in silico reconstruction of the metabolic network directly from unannotated low-coverage bacterial genome sequence. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 112. doi:10.1186/1471-2105-5-112
- Tai, S. L., Daran-Lapujade, P., Luttkik, M. A. H., Walsh, M. C., Diderich, J. A., Krijger, G. C., ... Daran, J.-M. (2007). Control of the glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature: a multi-level analysis in anaerobic chemostat cultures. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10243–51. doi:10.1074/jbc.M610845200
- Tejeda, L. P., Tejeda, C., Alvear, M. R., Castillo, C. R., Henao, D. L., Madariaga, N., &

- Indias, C. De. (2010). PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE JARABES GLUCOSADOS DERIVADOS DE CÁSCARAS DE NARANJA Y PIÑA. *Educación En Ingeniería*, (1), 120–125.
- Terzer, M. (2009). Large scale methods to enumerate extreme rays and elementary modes, (18538), 105. doi:10.3929/ethz-a-005945733
- Tiwari, A., & Bhat, J. P. (2008). Molecular characterization reveals that YMR278w encoded protein is environmental stress response homologue of *Saccharomyces cerevisiae* PGM2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(2), 340–5. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.065
- Toivari, M. H., Salusjärvi, L., Ruohonen, L., & Penttilä, M. (2004). Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3681–6. doi:10.1128/AEM.70.6.3681-3686.2004
- Träff, K. L., Jönsson, L. J., & Hahn-Hägerdal, B. (2002). Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 19(14), 1233–41. doi:10.1002/yea.913
- Van Assche, R., Broeckx, V., Boonen, K., Maes, E., De Haes, W., Schoofs, L., & Temmerman, L. (2015). Integrating -Omics: Systems Biology as Explored Through *C. elegans* Research. *Journal of Molecular Biology*, 427(21), 3441–3451. doi:10.1016/j.jmb.2015.03.015
- van Gulik, W. M., & Heijnen, J. J. (1995). A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 48(6), 681–98. doi:10.1002/bit.260480617
- Van Hoek, P., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1998). Effect of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4226–33.
- van Maris, A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A. H., ... Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(4), 391–418. doi:10.1007/s10482-006-9085-7
- Vargas García, C. A., Arguello Fuentes, H., & Torres Sáez, R. (2012). Predicción a escala genómica de Componentes de *Saccharomyces cerevisiae* mediante Análisis de Balance de Flujos. *Revista de Biotecnología*, XIV(1), 93–107.
- Vargas García, C. A., García Sánchez, C. E., Arguello Fuentes, H., & Gonzalo Torres Sáez, R. (2013). Balance de Flujos Metabólicos en *Saccharomyces cerevisiae* basado en Compartimentalización Intracelular. *Metabolic Flows Balance in Saccharomyces Cerevisiae Based on Intracellular Compartmentalization. (English)*, 15(2), 18–28. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=94332678&lang=es&site=ehost-live>
- Vargas et al.: Expanding a dynamic flux balance model of yeast fermentation to genome-

- scale. *BMC Systems Biology* 2011 5:75
- Varios. (2009). *Systems biology and synthetic biology* (Pengch Fu).
- Varios. (2015). YEASTNET: A consensus reconstruction of yeast metabolism. Retrieved from <http://www.comp-sys-bio.org/yeastnet/>
- Vemuri, G., & Nielsen, J. (2009). Yeast as a Prototype for Systems Biology. In *Systems Biology and Synthetic Biology* (pp. 287–353). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9780470437988.ch9
- Verho, R., Putkonen, M., Londesborough, J., Penttilä, M., & Richard, P. (2004). A novel NADH-linked l-xylulose reductase in the l-arabinose catabolic pathway of yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14746–51. doi:10.1074/jbc.M312533200
- Vilela, L. de F., de Araujo, V. P. G., Paredes, R. de S., Bon, E. P. da S., Torres, F. A. G., Neves, B. C., & Eleutherio, E. C. A. (2015). Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *AMB Express*, 5(1), 16. doi:10.1186/s13568-015-0102-y
- Visser, W. F., Van Roermund, C. W., Ijlst, L., Hellingwerf, K. J., Wanders, R. J. A., & Waterham, H. R. (2005a). Demonstration and characterization of phosphate transport in mammalian peroxisomes. *The Biochemical Journal*, 389(Pt 3), 717–22. doi:10.1042/BJ20041846
- Visser, W. F., Van Roermund, C. W., Ijlst, L., Hellingwerf, K. J., Wanders, R. J. A., & Waterham, H. R. (2005b). Demonstration and characterization of phosphate transport in mammalian peroxisomes. *The Biochemical Journal*, 389(Pt 3), 717–22. doi:10.1042/BJ20041846
- Walfridsson, M., Bao, X., Anderlund, M., Lilius, G., Bulow, L., & Hahn-Hagerdal, B. (1996). Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Envir. Microbiol.*, 62(12), 4648–4651. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/62/12/4648>
- Walhout, Vidal, & Dekker (Eds.). (2012). *Handbook of Systems Biology*.
- Wasylenko, T. M. (2014). *13C- Metabolic Flux Analysis of Recombinant Yeast for Biofuels Applications*. Massachusetts Institute of Technology.
- Wasylenko, T. M., & Stephanopoulos, G. (2015). Metabolomic and 13 C-metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(3), 470–483. doi:10.1002/bit.25447
- Wei, N., Oh, E. J., Million, G., Cate, J. H. D., & Jin, Y.-S. (2015). Simultaneous Utilization of Cellobiose, Xylose, and Acetic Acid from Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production by an Engineered Yeast Platform. *ACS Synthetic Biology*, 4(6), 707–713. doi:10.1021/sb500364q
- Weyda, I., Lübeck, M., Ahring, B. K., & Lübeck, P. S. (2014). Point mutation of the xylose

- reductase (XR) gene reduces xylitol accumulation and increases citric acid production in *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(4), 733–739. doi:10.1007/s10295-014-1415-6
- Wills, C. (1990). Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 25(4), 245–280. doi:10.3109/10409239009090611
- Wintermute, E. H., Lieberman, T. D., & Silver, P. A. (2013). An objective function exploiting suboptimal solutions in metabolic networks. *BMC Systems Biology*, 7(1), 98. doi:10.1186/1752-0509-7-98
- Wittmann, C. (2014). Making use of metabolic models – in silico driven design and engineering of industrial microorganisms. *New Biotechnology*, 31, S28. doi:10.1016/j.nbt.2014.05.1675
- Young, E., Lee, S.-M., & Alper, H. (2010). Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 24. doi:10.1186/1754-6834-3-24
- Yousofshahi, M., Ullah, E., Stern, R., & Hassoun, S. (2013). MC3: a steady-state model and constraint consistency checker for biochemical networks. *BMC Systems Biology*, 7(1), 129. doi:10.1186/1752-0509-7-129
- Zahedi, R. P., Sickmann, A., Boehm, A. M., Winkler, C., Zufall, N., Schönfisch, B., ... Meisinger, C. (2006). Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Molecular Biology of the Cell*, 17(3), 1436–50. doi:10.1091/mbc.E05-08-0740
- Zha, J., Shen, M., Hu, M., Song, H., & Yuan, Y. (2014). Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(1), 27–39. doi:10.1007/s10295-013-1350-y
- Zhao, X.-Q., Zi, L.-H., Bai, F.-W., Lin, H.-L., Hao, X.-M., Yue, G.-J., & Ho, N. W. Y. (2011). Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 25–51. doi:10.1007/10_2011_129
- Zomorodi, A. R., & Maranas, C. D. (2010). Improving the iMM904 *S. cerevisiae* metabolic model using essentiality and synthetic lethality data. *BMC Systems Biology*, 4(1), 178. doi:10.1186/1752-0509-4-178