



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO



ESCUELA DE
INGENIERÍA
BIOQUÍMICA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Memoria de Título

REDISTRIBUCIÓN DE FLUJOS METABOLICOS DE *PICHIA PASTORIS* EN RESPUESTA A MODIFICACIONES DEL METABOLISMO DE METANOL Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

Alumno: Juan Luis Olivares Torres

Profesores Guía: Julio Berríos Araya
Claudia Altamirano Gómez

SEPTIEMBRE 2018

AGRADECIMIENTOS

Primero debo agradecer a mis padres y hermano, por inculcarme los valores y la importancia de los estudios y la educación superior. Siempre presentaron un apoyo y comprensión mientras cursaba la carrera.

Debo agradecer a Paulina por todo el apoyo brindado durante el tiempo que estudiamos y el que cursé tanto el proyecto de ingeniería como la memoria de título. También debo agradecer a Pamela por el apoyo, sobre todo porque junto con Paulina me ayudaron a darle forma a mis ideas para expresarlas de mejor manera para esta memoria.

RESUMEN

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* es un microorganismo que se ha usado ampliamente en las últimas décadas por ser un exitoso sistema de expresión para proteínas recombinantes, esto se debe al promotor alcohol oxidasa (pAOX1), promotor fuertemente regulado por metanol.

La enzima alcohol oxidasa (AOX) es clave en el metabolismo del metanol para las levaduras metilotróficas, ya que es la encargada de oxidar el metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno. El formaldehído sigue dos vías, una disimilativa, donde el carbono abandona la célula en forma de CO₂, produciendo NADH. La otra vía, la asimilativa, dirige el flujo de carbono para la formación de biomasa y metabolitos. El problema es la acumulación de intermediarios tóxicos: formaldehído, formato y peróxido de hidrógeno, todos productos derivados del metabolismo del metanol. Los intermediarios tóxicos plantean un problema para los cultivos celulares de *P. pastoris*, ya que disminuyen la velocidad de crecimiento específico y disminuyen la viabilidad celular.

En este trabajo se plantean estrategias in silico para modificar a nivel celular la levadura y así proponer la alternativa que presente mejor resultado. Se plantean cuatro distintas estrategias: (1) realizar un Knock out en la enzima Formaldehído deshidrogenasa (FLD), (2) la expresión de la enzima dihidroxiacetona sintasa (DAS) en el citosol, (3) la expresión de la enzima DAS en el citosol y un Knock out a la enzima DAS peroxisomal y (4) la expresión de la enzima DAS en el citosol, Knock out a la enzima DAS peroxisomal y un Knock out a la enzima FLD.

Las modificaciones in silico se realizan utilizando el software MATLAB, con su extensión TOOLBOX COBRA. Para poder realizar las modificaciones se decide utilizar los modelos metabólicos a escala genómica, estos modelos se reconstruyen principalmente a partir de la información que está presente en su genoma y en literatura. Permiten predecir nuevos objetivos para la ingeniería metabólica, como optimizar las condiciones de cultivo de productos bioquímicos, proteína recombinante, entre otros. De los distintos modelos publicados, se utiliza el iMT1026, capaz de producir la lipasa de *Rhizopus Oryzae* (ROL), proteína de interés industrial.

Otra parte del trabajo implica la evaluación de distintas condiciones operacionales utilizando metanol y una mezcla de metanol-glicerol como fuentes de carbono y energía, evaluando como el modelo es capaz de recrear el comportamiento celular, consumo de nutrientes y producción de proteína ROL.

Se logró una modelación exitosa de las distintas estrategias, en donde las mejores opciones son las estrategias 2 y 3, donde ambas presentan un incremento en su velocidad de crecimiento específico (μ) en un 38% respecto del control, cuando se utiliza metanol como única fuente de carbono y energía. Para la simulación utilizando una mezcla de metanol-glicerol, el efecto de las distintas estrategias da como resultado, al igual que la anterior, que las estrategias 2 y 3 fueron las de mejor resultado, aumentando el valor de μ en un 1%.

Para la evaluación de distintas condiciones operacionales, el modelo iMT1026 no mostró resultados suficientes para concluir positivamente su capacidad predictiva al momento de recrear condiciones operacionales.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>PICHIA PASTORIS</i> : ASPECTOS GENERALES.....	4
2.2 <i>PICHIA PASTORIS</i> COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN	4
2.2.1 Características que la convierten en un buen productor.....	4
2.2.2 Enzima alcohol oxidasa y promotor AOX	6
2.3 METABOLISMO.....	7
2.3.1 Metabolismo del glicerol.....	7
2.3.2 Peroxisoma.....	7
2.3.3 Metabolismo del metanol	8
2.3.4 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)	12
2.3.5 Vía de los fosfatos de pentosa	14
2.4. FENOTIPOS DE <i>PICHIA PASTORIS</i>	14
2.5 MODALIDAD DE CULTIVO.....	16
2.6 PROBLEMAS DERIVADOS DEL METABOLISMO DEL METANOL	18
2.6.1 Lento crecimiento	18
2.6.2 Acumulación de intermediarios tóxicos.....	18

2.6.3 Alto consumo de oxígeno.....	19
2.7 MODELOS METABÓLICOS A ESCALA GENÓMICA.....	20
2.8 MODELOS METABÓLICOS PARA <i>P. PASTORIS</i>	20
2.8.1 PpaMBEL1254	20
2.8.2 iPP668.....	22
2.8.3 iLC915	24
2.8.4 iMT1026	25
2.8.5. iRY1254	27
2.8.6. Kp.1.0.....	28
2.9 LIPASA DE <i>RHIZOPUS ORYZAE</i>	31
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 MATERIALES	32
3.1.1 Computador portátil	32
3.1.2 MATLAB R2015a	32
3.1.3 TOOLBOX COBRA 2.0.....	32
3.1.4 Gurobi Optimizer 6	33
3.1.5 Modelo a escala genómica iMT1026.....	33
3.2 METODOLOGÍA.....	33
3.2.1 Puesta en marcha del modelo iMT1026	35
3.2.2 Estrategias para la modificación in silico de la distribución de flujos	36
3.2.3. Modelación de las estrategias considerando gasto de ATP para el transporte de xilulosa-5-fosfato	42
3.2.4 Modelación con producción de proteína ROL.....	44
3.2.5 Estudio de condiciones operacionales relacionadas con el consumo de oxígeno	45
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	46
4.1 MODELACIÓN USANDO METANOL COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA	46

4.1.1 Modelación de las distintas estrategias	46
4.1.2 Modelación agregando el consumo de ATP para el transporte de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma.....	47
4.2 MODELACIÓN CON USO DE GLICEROL Y METANOL COMO FUENTES DE CARBONO Y ENERGÍA	52
4.2.1 Modelación de las distintas estrategias	53
4.2.2 Modelación agregando el gasto de ATP para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato al peroxisoma	54
4.3 EVALUACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES EN <i>P. PASTORIS</i> UTILIZANDO EL MODELO iMT1026	61
4.3.1 Estimación de μ utilizando datos experimentales a distintas velocidades de agitación	61
4.3.2.- Modelación de consumo de oxígeno y Producción de proteína ROL	65
4.3.3 Evaluación de las condiciones operacionales ocupando el modelo modificado con el gasto energético para el transporte de la xilulosa-5-fosfato dentro del peroxisoma.....	69
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	74
5.1 EFECTO DE LAS DIFERENTES ESTRATEGIAS PLANTEADAS SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS EN EL METABOLISMO DEL METANOL.....	74
5.1.1. Uso de metanol como única fuente de carbono y energía	75
5.1.2. Uso de metanol y glicerol como fuentes de carbono y energía.....	76
5.1.3. Consideraciones para la estrategia E2 (FLD + DASP + DASC+).....	76
5.2. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES	77
5.2.1. Medición de Metanol y Glicerol	77
5.2.2. Medición de consumo de oxígeno	78
CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN.....	79
CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES.....	81
7.1. USO DE NUEVOS MODELOS A ESCALA GENÓMICA	81
7.2. MODELACIÓN DEL METABOLISMO DEL METANOL SEGÚN PROPUESTA DE RUßMAYER	83

7.3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN FUENTE DE NITRÓGENO Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ESPECÍFICO.	83
7.4. CREACIÓN DE UNA BIBLIOTECA VIRTUAL PARA TRABAJOS DE CULTIVOS IN SILICO	85
CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3. 1 Puesta en marcha del modelo iMT1026 $\mu= 0,16[h^{-1}]$ (Tomàs-Gamisans, Ferrer & Albiol, 2016)	36
Tabla 3. 2 Puesta en marcha del modelo iMT1026 $\mu= 0,05[h^{-1}]$ (Tomàs-Gamisans, Ferrer & Albiol, 2016)	36
Tabla 3. 3 Tabla resumen de las distintas estrategias presentadas.....	42
Tabla 4. 1 Modelación de las distintas estrategias que buscan una redistribución de flujos (Consumo de metanol de 6 [mmol/g*h]).	47
Tabla 4. 2 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT 1026 sin cambios vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma.....	49
Tabla 4. 3 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT 1026 sin cambios vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma para la estrategia 2.....	51
Tabla 4. 4 Tabla resumen de las distintas estrategias considerando el gasto energético	52
Tabla 4. 5 Modelación de las distintas alternativas fijando valor de metanol y glicerol	54
Tabla 4. 6 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT 1026 sin cambios vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma para consumo de metanol y glicerol.....	56
Tabla 4. 7 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT 1026 de la estrategia 2 vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa 5 fosfato al peroxisoma para consumo de metanol y glicerol.....	58
Tabla 4. 8 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT 1026 sin cambios vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa 5 fosfato al peroxisoma para consumo de metanol y glicerol.....	60
Tabla 4. 9 Tabla resumen de las distintas estrategias considerando el gasto energético para consumo de metanol y glicerol como fuente de carbono.....	61

Tabla 4. 10 Resultados experimentales de consumo específico de Metanol, glicerol y O_2 (tesis de doctorado Christian Canales Valenzuela).....	62
Tabla 4. 11 Velocidad de crecimiento específico experimental vs simulación a distintas velocidades de agitación.....	62
Tabla 4. 12 Producción de etanol, velocidad de crecimiento vs la velocidad de agitación.	63
Tabla 4. 13 Distribución del flujo en las rutas asimilativa y disimilativa.....	64
Tabla 4. 14 Consumo específico de oxígeno experimental vs simulación	65
Tabla 4. 15 Producción de proteína ROL.....	67
Tabla 4. 16 Distribución de flujos para distintas velocidades de agitación cuando se produce ROL	68
Tabla 4. 17 Tanteo de consumo de oxígeno para llegar a la velocidad de crecimiento experimental considerando el gasto energético en el transporte de peroxisomal de xilulosa-5-fosfato.	69
Tabla 4. 18 Consumo específico de oxígeno experimental vs simulación (Considerando gasto de ATP para transportar Xu5P).....	70
Tabla 4. 19 Modelación de la producción de proteína ROL considerando los valores de consumo específico obtenidos por el tanteo considerando el gasto energético en el transporte de peroxisomal de xilulosa 5 fosfato.	71
Tabla 4. 20 Distribución de flujos para distintas velocidades de agitación (Considerando gasto de ATP para transportar Xu5P).....	72
Tabla 4. 21 Comparativa producción proteína ROL (Punto 4.3.2 vs 4.3.3)	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Fotografía de microscopia electrónica de <i>P.pastoris</i> creciendo en glucosa y creciendo en metanol (Rußmayer et al., 2015).	8
Figura 2.2 Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas (Cereghino and Cregg, 2000).	9
Figura 2. 3 Propuesta de Rußmayer vía disimilativa metabolismo de metanol (Adaptación) (Rußmayer et al., 2015)	12
Figura 2. 4 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Lehninger principios de bioquímica, 4ª ed.).....	13
Figura 2. 5 (Adaptación Sohn, et. al., 2010) Resultados de simulación que muestran el impacto de la limitación de oxígeno sobre la producción de proteína y la tasa de crecimiento.	22
Figura 2. 6 Investigación modelo iPP668. Adaptación (Chung et al., 2018).	23
Figura 2. 7 Resultados de la validación del modelo iMT1026 (Tomàs-Gamisans, Ferrer and Albiol, 2016)	27
Figura 3. 1 Estrategia 1: Knock out formaldehido dishidrogenasa (Adaptación: Cereghino and Cregg, 2000).	37
Figura 3. 2 Estrategia 2: Expresión de la enzima DAS en el citosol. (Adaptación: Cereghino and Cregg, 2000).	39
Figura 3. 3 Estrategia 3: Expresión de enzima dihidroxiacetona sintasa en el citosol y knock out a la enzima dihidroxiacetona sintasa peroxisomal. (Adaptación: Cereghino and Cregg, 2000).	40
Figura 3. 4 knock out en vía disimilativa, knock out a la enzima DAS y expresión de proteína dihidroxiacetona sintasa citoplasmática en el metabolismo del metanol en <i>P. pastoris</i>	41
Figura 3. 5Metabolismo del metanol considerando el gasto energético en el transporte de la xilulosa 5 fosfato.	44
Figura 4. 1 Distribución de los flujos modelación del control vs control incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa 5 fosfato para el control..	48

Figura 4. 2 Distribución de los flujos modelación de la estrategia 2 vs la estrategia 2 incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa 5 fosfato.....	50
Figura 4. 3 Distribución de los flujos modelación del control con metanol-glicerol vs control metanol-glicerol incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa 5 fosfato para el control.	55
Figura 4. 4 Distribución de los flujos modelación de la estrategia 1 vs la estrategia 1 incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato para el consumo de metanol y glicerol.	57
Figura 4. 5 Distribución de los flujos modelación de la estrategia 2 vs la estrategia 2 incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa 5 fosfato para el consumo de metanol y glicerol..	59
Figura 4. 6 Velocidad de crecimiento y producción de etanol vs la velocidad de agitación. En color anaranjado se observa la velocidad de crecimiento mientras que en azul es posible ver la producción de etanol.	63
Figura 4. 7 Relación de la velocidad de crecimiento vs el porcentaje de distribución de flujos.....	64
Figura 4. 8 Diferencia entre la medición experimental oxígeno y la modelación ($\mu=0,05h^{-1}$).....	66
Figura 4. 9 Producción de proteína ROL a distintas velocidades de agitación. ($\mu=0,05 h^{-1}$).....	67
Figura 4. 10 Relación de Producción de ROL vs el porcentaje de distribución de flujos	68
Figura 4. 11 Diferencia entre la medición experimental oxígeno y la modelación ($\mu=0,05h^{-1}$) (Considerando gasto de ATP para transportar Xu5P).	70
Figura 4. 12 Relación de Producción de ROL vs el porcentaje de distribución de flujos (Considerando gasto de ATP para transportar Xu5P).....	72
Figura 5. 1 Propuesta de Van der Klei	74
Figura 7. 1 Comparación de modelo iMT1026 versión 3.0 vs versión 2.0	82
Figura 7. 2 Comportamiento de la velocidad de crecimiento específico y el consumo de ion amonio vs la velocidad de agitación.....	84

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Las levaduras son células hospederas adecuadas para la producción de proteínas heterólogas, debido a que combinan la facilidad de manipulación genética, el rápido crecimiento en medios de cultivo relativamente baratos y la habilidad de realizar complejas modificaciones post-traduccionales (Fickers, 2014). Las herramientas para la producción de proteínas heterólogas fueron inicialmente desarrolladas en *Saccharomyces cerevisiae* alrededor del año 1980. Sin embargo, la inestabilidad plasmídica, los bajos rendimientos de producción y el fenómeno de la hiperglicosilación han limitado el desarrollo de procesos industriales rentables en este sistema (Buckholz & Gleeson, 1991). Todos estos inconvenientes condujeron al desarrollo de sistemas de expresión alternativos basados en otras levaduras como *Pichia pastoris*.

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica, es decir, es capaz de usar metanol como única fuente de carbono y energía. Este microorganismo se ha utilizado en la industria desde hace más de 40 años. Todo empezó cuando *Phillips Petroleum Company* desarrolló el proceso para la producción comercial de proteína unicelular (SCP) como aditivo de alimentos para animales basados en un proceso de fermentación de alta densidad celular utilizando metanol como fuente de carbono. Por desgracia debido a la crisis del petróleo subieron drásticamente los precios del metanol haciendo la producción del SCP económicamente inviable. A partir de finales de la década de los ochentas y principio de los noventas, *P. pastoris* es usada para la expresión de proteínas recombinantes, aprovechando el promotor AOX1 fuertemente regulado. Esta levadura ha sido ampliamente utilizada como sistema hospedero para la producción de diversas proteínas, tales como fragmentos de anticuerpos, huridina recombinante, eritropoyetina humana recombinante e insulina humana recombinante, entre otras. Su extendida aplicación se debe a la disponibilidad del promotor de la enzima alcohol oxidasa, el cual es fuertemente expresado y regulado por metanol, y a su capacidad para alcanzar altas densidades celulares en biorreactores en medios de cultivo de bajo costo.

El cultivo de esta levadura está condicionado por 2 factores claves: la concentración de metanol en el medio y la transferencia de oxígeno, siendo un desafío el aumento de la productividad de la proteína recombinante, ya que estas variables cambian según la cepa y la proteína en específico que se está

sintetizando. La disponibilidad de secuencias completas de genoma y el avance en biología de sistemas permiten el análisis de grandes conjuntos de datos, de una manera integrada para aumentar nuestra comprensión del metabolismo, y la creación de estrategias de diseño de cepas impulsadas por modelos. Los modelos metabólicos a escala del genoma (GSMM) son herramientas que permiten predecir un fenotipo a partir de un genotipo, en determinadas condiciones ambientales.

Los GSMM se han desarrollado en los últimos diez años para una amplia gama de organismos y se utilizan para múltiples propósitos, tal como descubrir nuevas propiedades de redes metabólicas, predecir nuevos objetivos para la ingeniería metabólica, así como optimizar las condiciones de cultivo de productos bioquímicos o proteína recombinante (Tomàs-Gamisans, Ferrer & Albiol, 2016). Como *P. pastoris* es uno de los organismos más ampliamente utilizados para la expresión de proteínas heterólogas, existen diferentes GSMM para esta levadura metilotrófica, de las cuales las más relevantes y completas en la literatura publicada son iPP668, PpaMBEL1254, iLC915, iMT1026, iRY1254 y Kp.1.0.

Para este trabajo se realizaron modificaciones in silico del modelo metabólico a escala genómica iMT1026 para *P. pastoris*, diseñando y evaluando distintas estrategias que permitan el mayor consumo de metanol, evitando acumulación de intermediarios tóxicos derivados del consumo de este, como lo son el formaldehído y formato. Por otra, los datos experimentales relacionados con el consumo de oxígeno fueron evaluados para observar el comportamiento celular, consumo de nutrientes y producción de proteína ROL y así determinar si el modelo es capaz de recrearlo.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer in silico la redistribución del flujo de carbono en *P. pastoris* al realizar modificaciones de las rutas asociadas al catabolismo del metanol en un modelo a escala genómica.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un modelo metabólico a escala genómica para *P. pastoris*.
2. Disponer estrategias de modificaciones a nivel celular en el metabolismo de *P. pastoris*.
3. Establecer el impacto de las modificaciones realizadas in silico, con el fin de proponer la estrategia más conveniente para realizar experimentalmente.
4. Estudiar el efecto de las condiciones operacionales relacionadas con el consumo de oxígeno.
5. Realizar la modelación de la producción de la proteína recombinante lipasa de *Rhizopus orizae*.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *PICHIA PASTORIS*: ASPECTOS GENERALES

Pichia pastoris fue descrita por primera vez en 1919 por Marie Antoine Alexandre Guilliermond, botánico y micólogo francés. Es una levadura del género *Komagataella* perteneciente a la familia *Saccharimycetaceae*, orden *Saccharimycetales*, clase *Saccharomycetes*, filo *Ascomycota*, reino *fungi* (Kurtzman, 1984). Es anaerobia facultativa de morfología variable; puede presentarse en forma esférica u oval, sola o de a pares. Es homotálica, se reproduce por gemación, permanece haploide a menos que se fuerce a lo contrario, sin embargo, las células pueden variar su forma de acuerdo con las condiciones de cultivo, frecuentemente en condiciones propicias de crecimiento, tienen forma oval, en ningún caso se presentan pseudo hifas o hifas. En medio sólido forma colonias no filamentosas de color blanco o color crema. Al microscopio se pueden observar múltiples yemas (Kurtzman, 1984).

P. pastoris es una levadura metilotrófica, es decir, capaz de usar el metanol como única fuente de carbono y energía, capacidad que poseen solo un número restringido de levaduras, las cuales son *hansenula*, *pichia*, *terulopsis* y *candida*. Para hacer posible la degradación de este compuesto, estos microorganismos realizan la oxidación dentro de los peroxisomas, organelos con forma de vesículas que en su interior alberga enzimas capaces de degradar el metanol.

2.2 *PICHIA PASTORIS* COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN

2.2.1 Características que la convierten en un buen productor

P. pastoris es una levadura que tiene diversos usos en biotecnología, y aunque sus inicios en la industria en los años setenta fueron para producir proteína unicelular (SCP) con el fin de alimentación animal, hoy está muy lejos de ese uso. Gracias a su capacidad de alcanzar altas concentraciones celulares se

realizaron estudios para la producción de proteínas heterólogas, con el fin de producir proteínas de interés para la salud humana y diversas aplicaciones industriales.

Las características que convierten a este microorganismo en un buen productor son:

- Existencia del promotor AOX1, el cual es fuertemente regulado e inducido solamente por metanol, lo que implica elevados niveles de transcripción (Cregg y Madden, 1998).
- Simplicidad de los medios de cultivo y de la infraestructura necesaria para su cultivo en relación con los necesarios para cultivos de células animales (Hartner y Glieder, 2006).
- Microorganismo capaz de alcanzar altas concentraciones celulares (*Phillips Petroleum Company*) (Wegner, 1983).
- Crecimiento a bajos valores de pH, los cuales reducen el riesgo de contaminación microbiana, lo que es considerado una de las ventajas de esta levadura para la producción de proteína celular, con el riesgo de proteólisis del producto (Wolf, 1996). *P. pastoris* tiene un buen crecimiento en un amplio rango de pH, desde 3 hasta 7, con un mínimo efecto sobre la velocidad de crecimiento.
- Posee una excelente capacidad para actuar como célula hospedera para la producción de proteínas foráneas, ya que permite el uso de técnicas simples para su manipulación genética.
- Las modificaciones post-traduccionales generadas por *P. pastoris*, a diferencia de otras levaduras altamente usadas en investigación como *S. cerevisiae*, son más parecidas a eucariontes superiores, es decir, no hipermanosila y la longitud máxima de las cadenas de oligosacáridos introducidas no supera los treinta residuos (Cereghino y Cregg, 2000). Además *P. pastoris* no posee la enzima responsable de la formación de residuos tipo α -1-3 manosa, principal causante de la naturaleza antigénica de las glicoproteínas expresadas en *S. cerevisiae*, que dificultan su uso con fines terapéuticos.

- *P. pastoris* crece en un medio que consiste en una fuente pura de carbono (glicerol o metanol), biotina, sales, trazas de elementos, agua y no secreta alta cantidad de proteínas endógenas; por consiguiente, las proteínas foráneas secretadas por el cultivo son relativamente puras, lo que facilita su separación (Lin Cereghino *et al.*, 2000).

2.2.2 Enzima alcohol oxidasa y promotor AOX

La enzima alcohol oxidasa funcional (AOX), es un homo-octámero agrupado en dos tetrámeros, en la cual cada subunidad (masa molar total de aproximadamente 74 kDa) contiene un enlace covalente con nucleótidos de flavina (FAD^+) como grupo prostético (Van Dijken *et al.*, 1996). Esta enzima codificada por el gen AOX1, presenta baja afinidad por el O_2 ; siendo la tasa de oxidación de metanol, en suspensiones celulares, linealmente proporcional a la concentración de oxígeno disuelto en el medio (Harber and Veenhuis, 1989). La actividad catalítica de esta enzima está por debajo de sus condiciones óptimas, por lo que el organismo lo compensa con un aumento de su tasa de síntesis, con la finalidad de obtener elevadas concentraciones de la enzima. Este hecho es muy importante en la expresión de proteínas heterólogas que se encuentran bajo el control del promotor del gen que codifica esta enzima. Estudios posteriores mostraron la existencia de un segundo gen de alcohol oxidasa, el gen AOX2, sin embargo, esta enzima AOX2 representa solo una pequeña parte del total de la proteína AOX producida por esta levadura. La enzima AOX es una enzima clave para la asimilación del metanol, ya que el crecimiento de las células, en un medio que contiene este substrato, depende estrictamente de la presencia de esta enzima. La expresión de este gen está fuertemente regulada; cuando la levadura crece en medio conteniendo glucosa, etanol o glicerol, la producción de alcohol oxidasa no es detectable, sin embargo, cuando el medio contiene metanol como única fuente de carbono y energía los niveles de esta enzima pueden alcanzar hasta un 30% del valor correspondiente al de las proteínas solubles totales de la célula (Harber and Veenhuis, 1989).

La expresión de AOX1 es controlada a nivel de transcripción a través de dos mecanismos: de represión/desrepresión y de inducción. Es altamente inducida en presencia de metanol y reprimida cuando crece en un medio con otra fuente de carbono (glucosa o glicerol) (Santos de Jesús, 2008).

2.3 METABOLISMO

2.3.1 Metabolismo del glicerol

Una vez que el glicerol entra a la célula es fosforilado por la enzima glicerol quinasa para formar glicerol 3-fosfato (GTP), posteriormente ocurre la oxidación del GTP a dihidroxiacetonafosfato (DHAP) debido a la acción de la enzima FAD-dependiente glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Posteriormente, la DHAP continúa a la segunda fase de la vía glicolítica y se obtiene el ácido pirúvico. Finalmente, el piruvato es oxidado a acetil-CoA y alimenta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) de donde se obtienen GTP, NADH + H y FADH₂, estos dos últimos serán utilizados posteriormente para generar ATP a través de la cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa. (Poutou *et al.*, 2005).

2.3.2 Peroxisoma

Los peroxisomas son organelos citoplasmáticos en forma de vesículas muy comunes presentes en todas las células eucariotas que contienen enzimas como la catalasa y al menos una enzima oxidasa generadora de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Estos organelos están constituidos por una membrana simple y pueden variar considerablemente de tamaño, cantidad y contenido enzimático dependiendo del organismo, tipo de célula y las condiciones ambientales como por ejemplo contener metanol en el medio, como muestra la Figura 2.1. En levaduras la biogénesis del peroxisoma es inducida marcadamente por la utilización de ciertas fuentes de carbono tales como el metanol. (Poutou *et al.*, 2005)

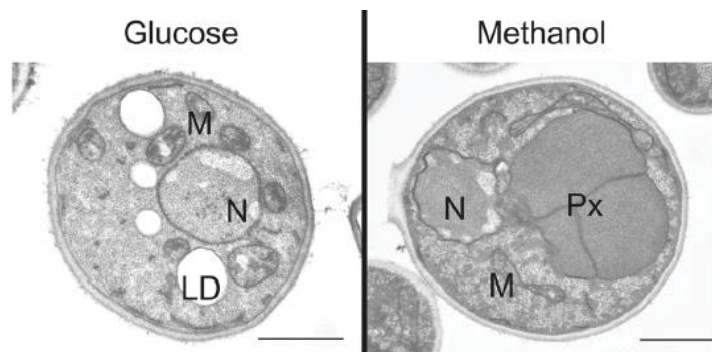
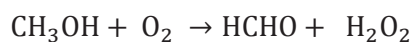


Figura 2.1 Fotografía de microscopía electrónica de *P.pastoris* creciendo en glucosa y creciendo en metanol (Rußmayer et al., 2015). Las células fueron cultivadas en un medio que solo contiene una sola fuente de carbono. N: Nucleo, M: Mitocondria, LD: gota de lípido, Px: peroxisoma. Escala bar: 1µm

2.3.3 Metabolismo del metanol

El metabolismo del metanol inicia al momento en que este entra por difusión al peroxisoma, organelo que aumenta considerablemente su tamaño, hasta el 90% del volumen celular al ser usado el metanol como fuente de carbono y energía. El metanol al estar en el interior del peroxisoma es oxidado por la enzima alcohol oxidasa (AOX), enzima clave para la asimilación del metanol, ya que, el crecimiento de las células que consumen este sustrato depende estrictamente de la presencia de esta enzima. El resultado de la reacción es la producción de formaldehído (CH_3OH) y H_2O_2 , en esta reacción es fundamental la presencia de oxígeno molecular (O_2), ya que, actúa como aceptor final de electrones y además estequiométricamente es necesaria una molécula de oxígeno por cada molécula de metanol que es oxidada. La ecuación para la reacción se presenta a continuación:



El peróxido de hidrogeno es un producto tóxico para la célula, por esto se sintetiza altos niveles de la enzima catalasa, la cual actúa transformándolo en una molécula de agua (H_2O) y media molécula de oxígeno (ver Figura 2.2).

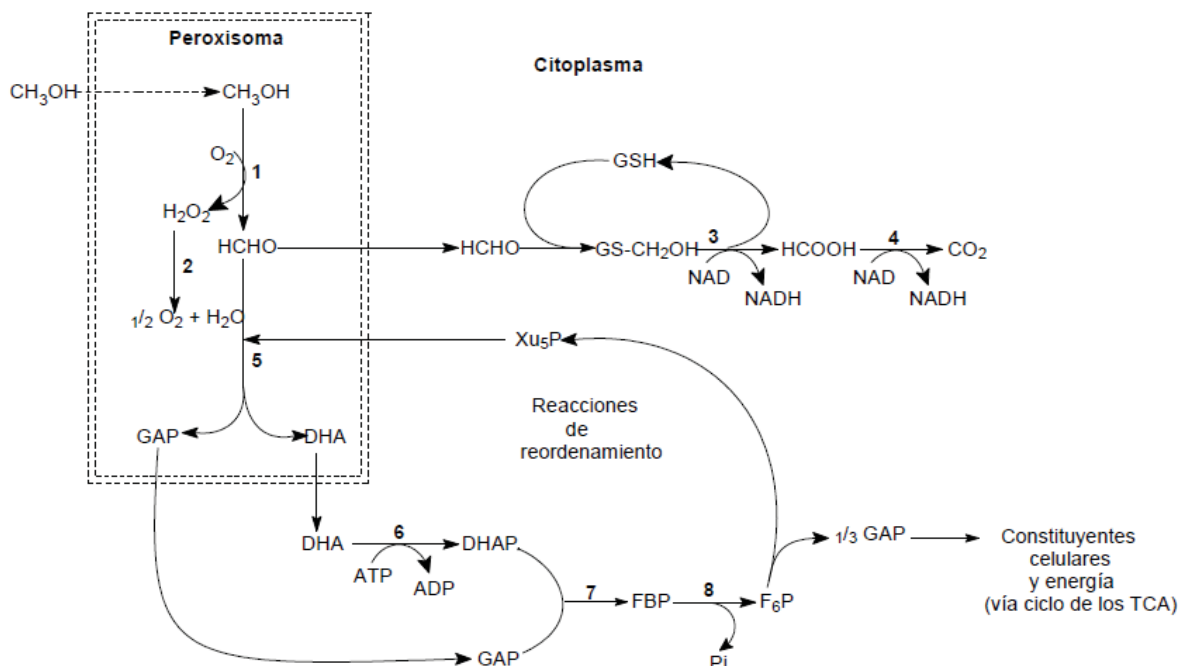


Figura 2.2 Metabolismo del metanol en levaduras metilotróficas. Notaciones de las enzimas involucradas: 1) alcohol oxidasa; 2) catalasa; 3) formaldehído deshidrogenasa; 4) formato deshidrogenasa; 5) dihidroxiacetona sintasa; 6) dihidroxiacetona quinasa; 7) fructosa 1,6 bifosfato aldolasa; 8) fructosa 1,6 bifosfatasa. (Cereghino and Cregg, 2000).

Ruta disimilativa del metanol

Esta ruta empieza cuando el formaldehído deja el peroxisoma, como se puede ver en la Figura 2.2, esta molécula sale a través de difusión simple (Kimbell et al., 2001; Schroeter et al., 2014), un transporte sin gasto de energía. El formaldehído debe ser oxidado por la enzima formaldehído deshidrogenasa, enzima que solo se activa en presencia de glutatión (GSH), que es un tiol tripéptido que forma parte de los sistemas de protección frente a determinadas condiciones de estrés nutricional, en este caso elevadas concentración de metanol o formaldehído. Para que la oxidación ocurra, el glutatión debe antes reaccionar con el formaldehído produciendo hidroximetilglutatión ($\text{GS-CH}_2\text{OH}$). La reacción anterior es catalizada por la formaldehído deshidrogenasa obteniendo glutatión, formato y una molécula de NADH . Seguido de esta reacción el formato pasa a dióxido de carbono (CO_2) gracias a la enzima formato deshidrogenasa produciendo otra molécula de NADH . La oxidación del NADH ,

generado en esta ruta, podría realizarse a través de la NADH deshidrogenasa localizada en la parte externa de la membrana mitocondrial interna que incorporaría equivalentes reductores a la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona (Harber & Veenhuis, 1989).

Ruta Asimilativa del metanol (propuesta clásica)

Esta ruta se caracteriza por la asimilación del carbono, ya que, en la disimilativa el carbono abandona la célula en forma de CO_2 , en esta ruta el carbono es dirigido hasta el ciclo de Krebs para que forme parte de la estructura celular o parte de algún metabolito.

Cuando se utiliza metanol como fuente de carbono la enzima transquetolasa se presenta en altas concentraciones celulares, esta enzima cataliza la reacción de la xilulosa 5-fosfato (Xu5P) con formaldehído, la reacción se basa en la transferencia del grupo glucolaldehído de Xu5P y así formar gliceraldehido fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona (DHA), ver Figura 2.2. Seguido de esto, tanto GAP como DHA salen al exterior del peroxisoma, donde DHA es fosforilada por la enzima tioquinasa, o también llamada dihidroxiacetona quinasa, obteniéndose dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Siguiendo el ciclo de la Xu5P, DHAP y GAP sufren una transformación gracias a la enzima fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, formando la molécula 1,6-bifosfato (FBP), el producto de la reacción anterior es desfosforilada por la enzima 1,6-bifosfatasa para formar fructosa-6-fosfato (F6P). Para finalizar esta ruta dos moléculas de F6P y una molécula de DHAP sufren un reordenamiento para formar tres moléculas de Xu5P a través de la catálisis de las enzimas transaldolasa, transquetolasa, pentosa fosfato isomerasa y epimerasa, dando como resultado la formación de un mol de triosa fosfato por cada tres moles de formaldehído y un gasto de tres moles de ATP (Santos de Jesús, 2008).

Ruta Asimilativa del metanol (Propuesta Rußmayer)

Contrario a las suposiciones clásicas, se plantea que la vía completa de la asimilación de metanol se localiza en los peroxisomas, en lugar de emplear parte de la vía citosólica de los fosfatos de pentosa

para la regeneración de xilulosa-5-fosfato. La asimilación con metanol emplea una ruta alternativa de formación de Xu5P a través de la formación de la sedoheptulosa-1,7-bisfosfato (S1,7BP) (Rußmayer et al., 2015).

La Figura 2.3 muestra la ruta propuesta por los investigadores para las reacciones de reordenamiento, con una molécula de GAP por tres moléculas de metanol como resultado neto. De este modo la F6P, generada a partir de GAP y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), por la acción de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBA1) y fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP1); otra molécula de GAP se convierte a eritrosa-4-fosfato (E4P) y Xu5P en una reacción de transcetolasa (TKL1). Eritrosa-4-fosfato luego se condensa con DHAP para formar S1,7BP, una reacción que se demuestra que es catalizada por la aldolasa FBA1 en levaduras y plantas (Clasquin et al., 2011). Se propone que FBA1-2 o transaldolasa (TAL1-2) peroxisomal, podría ser la enzima responsable de esta reacción en *P. pastoris*. Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SHB1-7) cataliza la desfosforilación de S1,7BP a sedoheptulosa-7-fosfato (S7P), que finalmente se convierte en dos Xu5P por transcetolasa, ribosa-5-fosfato ketol-isomerasa (RKI1-2) y D-ribulosa-5-fosfato-3-isomerasa (RPE1-2). Como en *P. pastoris* la producción TKL1 es citosólica y no se induce en presencia de metanol, se propone que DAS1 y/o DAS2, ambas homólogas de TKL1, catalizan esta reacción. En general, en un proceso impulsado por la pérdida neta de un enlace de fosfato de alta energía, SHB1-7, junto con transaldolasa y transcetolasa, convierten cinco moles de triosa fosfato en tres moles de Xu5P requeridos para la fijación de tres moles de formaldehído por DAS. La localización de esta vía completa en el mismo compartimento hace que la importación de Xu5P en los peroxisomas sea obsoleta, de acuerdo con el modelo clásico de asimilación de metanol. Por lo tanto, el flujo peroxisomal neto de carbono sería un mol de DHAP o GAP del peroxisoma por tres moles de metanol (Rußmayer et al., 2015).

Las reacciones del ciclo de Krebs se producen en la matriz mitocondrial, este ciclo consiste en una serie de nueve reacciones mediadas por enzimas específicas que actúan secuencialmente, como se puede ver en la Figura 2.3, y lo hacen de modo tal que el último de sus productos es el ácido oxalacético, el cual al combinarse con el grupo acetilo del acetilCoA, genera ácido cítrico iniciándose un nuevo ciclo mientras haya O_2 y grupos acetilos disponibles.

Las moléculas de CO_2 formadas por el ciclo de Krebs pasan al citoplasma y de este se eliminan al espacio extracelular en forma gaseosa.

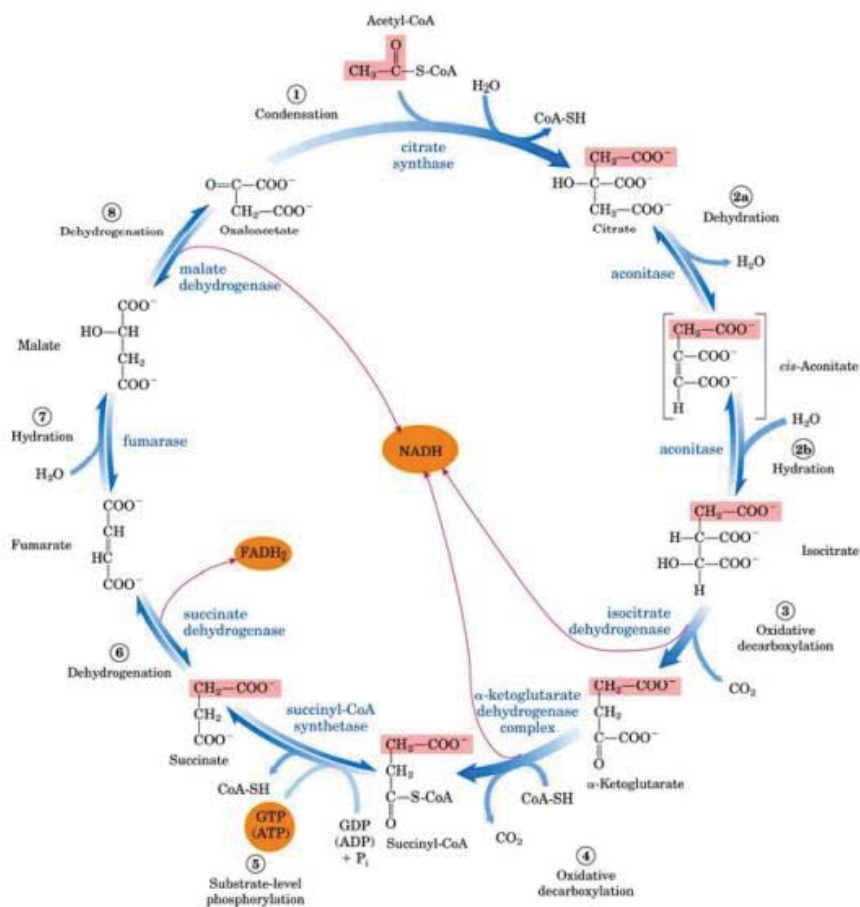


Figura 2. 4 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Lehninger principios de bioquímica, 4ª ed.)

2.3.5 Vía de los fosfatos de pentosa

Muchos organismos incluyendo las levaduras disponen además de otra ruta para degradar la glucosa, esta es la vía de las pentosas de fosfato. Esta vía desempeña tres actividades principales, en relación con el organismo y su estado metabólico. En la mayoría de las células su objetivo primordial es el generar el potencial de reducción en el citoplasma en forma de NADPH, necesario en la biosíntesis reductora de los ácidos grasos y esteroides. La segunda función especial de esta ruta es la conversión de hexosas en pentosas, particularmente en la D-ribosa-5-fosfato, necesaria para la síntesis de ácidos nucleicos. La tercera función consiste en la degradación oxidante completa de las pentosas mediante su conversión en hexosas, las cuales pueden entrar en secuencias de reacciones de la vía Embden-Meyerhof-Parnas. Este ciclo permite la conversión de varios azúcares de tres, cuatro, seis y siete átomos de carbono, y ser conectados con la vía EMP. Además, provee de eritrosa-4-fosfato para la síntesis de aminoácidos aromáticos.

2.4. FENOTIPOS DE *PICHIA PASTORIS*

Una de las características que hacen que *P. pastoris* sea considerada una buena alternativa como sistema de expresión heterólogo es su factibilidad de ser manipulada genéticamente con procedimientos de ingeniería genética sencillos. Se debe destacar la gran estabilidad genética de las modificaciones efectuadas, por la capacidad de integración del DNA foráneo al genoma de la levadura (Cereghino & Cregg, 2000).

En el proceso de modificación, el promotor AOX1 se une a un gen de interés, en un vector de clonación, quedando la expresión de la proteína heteróloga transcripcionalmente controlada por el promotor inducible por metanol. En la transformación el vector que contiene el gen de interés, asociado al promotor AOX1, se integra en el genoma en sectores específicos según las regiones de homología entre el vector de clonación y el cromosoma de *P. pastoris*, siendo posible que la integración se realice en el locus del gen AOX1 por eventos genéticos como reemplazo de genes o inserción del vector en el extremo 3' (Daly y Hearn, 2004). Cuando ocurre el reemplazo se elimina la expresión del gen AOX1, en

tanto por inserción, el gen estructural no se ve afectado. La integración también puede efectuarse por inserción en el locus del gen HIS4 (Daly y Hearn, 2005) codificante de histidinol deshidrogenasa, enzima de la ruta de síntesis de histidina. Estos eventos de integración genética determinan el fenotipo que exhiben las cepas transformadas en relación con su capacidad de utilización de metanol.

Las cepas de *P. pastoris* son clasificadas de acuerdo a su capacidad de metabolizar el metanol:

- X-33: Es una cepa nativa sin auxotrofía, capaz de consumir altas cantidades de metanol.
- Mut_s: En el caso de reemplazo, y la consiguiente pérdida de la expresión, de AOX1, la actividad de alcohol oxidasa queda sustentada por el gen AOX2, de bajo nivel de expresión, por lo que la cepa transformada muestra una baja velocidad de metabolización de metanol.
- Mut⁺: En caso de integración por inserción, ya sea en el locus AOX1 o HIS4, la cepa mantiene intacta la expresión de AOX1 por lo que la cepa transformada muestra alta velocidad de consumo de metanol.
- Mut⁻: Es obtenido a partir del fenotipo Mut_s, sin actividad de alcohol oxidasa, por mutación en el gen AOX2, por lo que este fenotipo no tiene capacidad alguna de metabolizar metanol (Chiruvolu, *et al.*, 1998; Chiruvolu *et al.*, 1997).
- GS115: Se introduce el gen estructural de HIS4 contenido en el plásmido de clonación, lo que produce reversión de la condición auxótrofa, que permite posteriormente una fácil selección de las cepas transformadas por su capacidad de crecer en medio sin histidina. Con este procedimiento se obtiene la cepa Mut⁺ GS115 HIS⁺, una de las más usadas como sistema de expresión.

Existen también otras cepas Mut⁺ y Mut_s, especialmente desarrolladas a las que se les ha eliminado por mutación la capacidad de expresión de proteasas a fin de eliminar la posibilidad de degradación enzimática del producto recombinante (Macauley- Patrick *et al.*, 2005).

2.5 MODALIDAD DE CULTIVO

En la actualidad, el sistema de expresión completo, cepas, vectores de clonación, protocolos de manipulación genética y protocolos de fermentación pueden obtenerse en kits comerciales de Invitrogen Corporation, para aplicaciones en producción de diversas proteínas heterólogas ("Invitrogen™ Pichia Expression Kit, original kit", 2018).

En este caso, empleando el kit recomendado por Invitrogen, la fermentación se lleva en un proceso de tres etapas:

- En la primera etapa se ejecuta un batch durante 18 a 24 horas con glicerol como fuente de carbono y energía para la producción de biomasa y que mantiene reprimida la expresión de AOX1. El glicerol se usa generalmente como fuente de carbono porque reprime pAOX1 en menor medida que otras fuentes de carbono, como la glucosa, y permite una mayor tasa de crecimiento específico máximo que el metanol (0,18 [h⁻¹] vs 0,14 [h⁻¹], (Cos *et al.*, 2006)).
- En la segunda etapa, una vez agotado el glicerol de la etapa batch, se inicia una alimentación de glicerol en condición de crecimiento limitado para incrementar la biomasa mientras se desreprime el promotor AOX1 preparando el cultivo para el cambio de sustrato, por lo que a esta etapa también se le denomina de transición, y cuya duración es de 8-10 horas. Se han propuesto algunas modificaciones generales a este proceso básico. Por ejemplo, se ha observado que la etapa de transición puede ser reducida y conseguir una mucho mejor adaptación celular si el glicerol se acompaña por metanol en una corriente de alimentación mixta (Katakura *et al.*, 1998).

- En la tercera etapa denominada de inducción, la alimentación es cambiada a metanol, etapa en la cual se realiza la síntesis de la proteína de interés, con alta productividad debido a la alta concentración celular, y con duración de dos días. Durante esta última etapa el metanol actúa como una doble función, como fuente de carbono y energía para sustentar el crecimiento y como inductor del promotor AOX1 para la expresión de la proteína heteróloga. Sin embargo, se ha reportado la existencia de un efecto tóxico del metanol a alta concentración, el cual puede llegar a afectar la replicación del DNA y la síntesis de la membrana (Katakura *et al.*, 1998), y en niveles moderados, sobre 4 [g/L], exhibe efecto inhibitorio del crecimiento celular (Zhang, *et al.*, 2000a), por lo que la operación de inducción debe procurar evitar acumulación de metanol en el medio. Por lo anterior, se trata de una operación de alta complejidad y para realizarla se han evaluado diversas opciones operacionales (Cos, *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2000b).

La velocidad de suministro de metanol se debe realizar de manera que intencionadamente se logre el ajuste al consumo, con el posterior control de la velocidad específica de crecimiento y de esta manera favorecer la síntesis del producto recombinante. Este ajuste es dependiente de diversos factores tales como fenotipo de *P. pastoris*, proteína heteróloga de interés y condiciones generales de proceso, por lo que cada caso requiere una optimización particular.

2.5.1. Aireación y control del oxígeno disuelto

Para la fermentación, el oxígeno disuelto debe permanecer en todo momento por sobre el 20%-30% (Cereghino *et al.*, 2002), esto se debe a que durante el crecimiento de *P. pastoris* en metanol, el oxígeno es utilizado no solo como aceptor de electrones para la generación de energía en el metabolismo aerobio, sino que también como sustrato para la reacción de conversión del metanol en formaldehído y peróxido de hidrógeno. Por esta razón, el oxígeno es uno de los factores más determinantes de la cinética del proceso por sus relaciones con fenómenos como la actividad de la enzima AOX1 y por consiguiente en la velocidad de consumo de metanol, efecto en μ , por su relación con el metabolismo energético y por su efecto en la velocidad de síntesis de la proteína recombinante.

2.6 PROBLEMAS DERIVADOS DEL METABOLISMO DEL METANOL

Al usar metanol como fuente de carbono se pueden llegar a producir ciertos problemas en el cultivo, entre ellos podemos mencionar un lento crecimiento, la acumulación de intermediarios tóxicos y alto consumo de oxígeno.

2.6.1 Lento crecimiento

Aunque el crecimiento de *P. pastoris* en glucosa como fuente de carbono y energía, tiene una tasa máxima de crecimiento específico $\mu_{m\acute{a}x} = 0,32 [h^{-1}]$ (Heyland *et al.*, 2011), el uso de este sustrato no permite la expresión del promotor AOX. Por otro lado, cuando el metanol es la única fuente de carbono, el $\mu_{m\acute{a}x}$ (aparente) oscila entre 0,08 - 0,11 $[h^{-1}]$. Esta tasa de crecimiento es considerablemente menor ya que existe un efecto inhibitor del metanol sobre el crecimiento celular (Zhang *et al.*, 2000). El uso de un co-sustrato tal como glicerol junto con metanol puede ayudar a aumentar la tasa de crecimiento específico, μ ($\mu_{m\acute{a}x}$ en glicerol = 0,26 h^{-1} , (Jahic *et al.*, 2002) reduciendo al mismo tiempo el requisito de metanol. La baja μ cuando *P. pastoris* crece en metanol puede ser causada por la acumulación de metabolitos tóxicos, o una menor tasa de producción de biomasa.

2.6.2 Acumulación de intermediarios tóxicos

Al producirse la oxidación del metanol podemos observar la presencia de 2 compuestos tóxicos: el peróxido de hidrogeno y el formaldehído.

En las células que crecen en metanol como fuente de carbono y energía, alcohol oxidasa y dihidroxiacetona sintasa pueden llegar a representar el 70% del total de la expresión de proteínas. Por causa de esta gran expresión, la enzima alcohol oxidasa forma cristaloides, de ahí la forma cubica de los peroxisomas en las levaduras metilotróficas. La catalasa, enzima encargada de transformar el H_2O_2 , se encuentra en la periferia del organelo, entre cristaloides y la membrana peroxisomal, impidiendo así la fuga del peróxido de hidrogeno hacia el citosol (Van der klei *et al.*, 2006). EL peróxido de hidrogeno

puede inducir una respuesta al estrés oxidativo ya sea por sí mismo o generando otras moléculas peroxidadas (Vanz, *et al.*, 2012).

Por otro lado, tenemos la acumulación de formaldehído, este compuesto puede acumularse hasta niveles tóxicos debido a que su tasa de producción es mayor que su tasa de consumo (Jungo, *et al.*, 2007b). De hecho, en cultivos por lote alimentado se ha descrito que hay un aumento tardío de las enzimas de procesamiento de formaldehído (es decir, DAS y FLD) en comparación con la acumulación más rápida de AOX, lo que sugiere un importante impacto negativo de la acumulación de formaldehído en las células de este tipo de cultivos (Vanz, *et al.*, 2012). Esta situación es más probable que ocurra en cultivos de biorreactores donde la disponibilidad de oxígeno es normalmente alta ($DOT > 30\%$) con altas tasas de transferencia de oxígeno, ya que AOX requiere O_2 para la reacción. También se ha sugerido que el efecto inhibitor del metanol es fuertemente potenciado por la acumulación de formaldehído (Trotsenko & Bystrykh, 1983).

2.6.3 Alto consumo de oxígeno

Al usarse metanol como única fuente de carbono y energía el consumo de oxígeno es alto, esto se debe a que el oxígeno no actúa solamente como aceptor final de electrones en la respiración, sino que también se requiere una molécula de oxígeno para poder oxidar una molécula de metanol a una molécula formaldehído, ósea el oxígeno además es necesario como un sustrato más en estos cultivos.

El NADH producido en la ruta disimilativa, se oxida junto con el NADH producido en el ciclo TCA y otras fuentes en la cadena respiratoria en las mitocondrias. Así, el oxígeno total consumido bajo esta condición es la suma de los requerimientos tanto de la oxidación del metanol como de la respiración típica en las mitocondrias.

2.7 MODELOS METABÓLICOS A ESCALA GENÓMICA

La gran cantidad de bases de datos de secuencias genómicas disponibles, el desarrollo de la bioinformática de alto rendimiento y las técnicas experimentales han llevado a intensos esfuerzos para caracterizar los genomas y construir conjuntos de datos a escala genómica para una gran variedad de organismos.

La red metabólica a escala genómica de reacciones químicas que ocurren dentro de un organismo vivo se reconstruyen principalmente a partir de la información que está presente en su genoma y en literatura, e implica pasos como la anotación funcional del genoma, la identificación de las reacciones asociadas, la determinación de su estequiometría, asignación de localización, determinación de la composición de la biomasa, estimación de requerimientos energéticos y definición de restricciones de modelos. Esta información se puede integrar en un modelo estequiométrico de metabolismo que puede ser utilizado para el análisis detallado del potencial metabólico del organismo utilizando métodos de modelado basados en restricciones y por lo tanto es valioso para comprender sus capacidades metabólicas.

2.8 MODELOS METABÓLICOS PARA *P. PASTORIS*

2.8.1 PpaMBEL1254

Es el primer modelo metabólico realizado para *P. pastoris*, desarrollado por Seung Bum Sohn y su equipo en el año 2010. Este modelo consta de 1254 reacciones metabólicas, 1147 metabolitos, 9 compartimentos y 540 genes. Se basa en las cepas DSMZ70382 y GS115. Su construcción se realizó utilizando el conjunto de reacciones bioquímicas anotadas del genoma basadas en la relación del gen a la proteína a la reacción (GPR). Se asignaron funciones bioquímicas a proteínas funcionalmente ambiguas basadas en la homología de secuencias de proteínas con funciones conocidas encontradas en otras especies (*E. coli* y *S. cerevisiae*). El modelo se complementó con información, encontrada en

bases de datos, bioquímicas y genéticas, como KEGG y la base de datos de *P. pastoris*, así como información bioquímica obtenida de estudios experimentales.

Las capacidades de crecimiento in silico de *P. pastoris* representadas por PpaMBEL1254 fueron examinadas, se probaron 25 fuentes de carbono diferentes, donde solo 7 de ellas mostraron formación de biomasa, entre ellas se pueden nombrar D- Glucosa, DL- Lactato, etanol, glicerol, sorbitol, succinato y trehalosa.

En este trabajo se investigó la producción de dos proteínas heterólogas: albumina sérica humana (HSA) y super óxido dismutasa humana (hSOD). El análisis de variabilidad de flujo se llevó a cabo para investigar el impacto que tiene la tasa de absorción de oxígeno sobre la producción de proteínas para distintos estados fisiológicos. Los resultados de las simulaciones se observan en la Figura 2.5, siendo la tasa de absorción de oxígeno y la tasa de producción de proteínas los ejes horizontal y vertical respectivamente. La gráfica muestra que la tasa de crecimiento específico disminuye a medida que la tasa de absorción de oxígeno disminuye. Del mismo modo, la tasa de crecimiento específico también disminuye a medida que aumenta la tasa de producción de proteínas para altos niveles de absorción de oxígeno (mayor a 5 mmol/gDCW/h). Sin embargo, cuando la tasa de absorción de oxígeno es inferior a 5 mmol/gDCW/h, la tasa de crecimiento específico aumenta o permanece igual a medida que aumenta la producción de proteína para una tasa de absorción de oxígeno dada, hasta un punto óptimo. Este punto óptimo muestra la tasa máxima de producción de proteína que se puede lograr para obtener sin retardar la tasa de crecimiento a una tasa de absorción de oxígeno establecida (Sohn et. al., 2010).

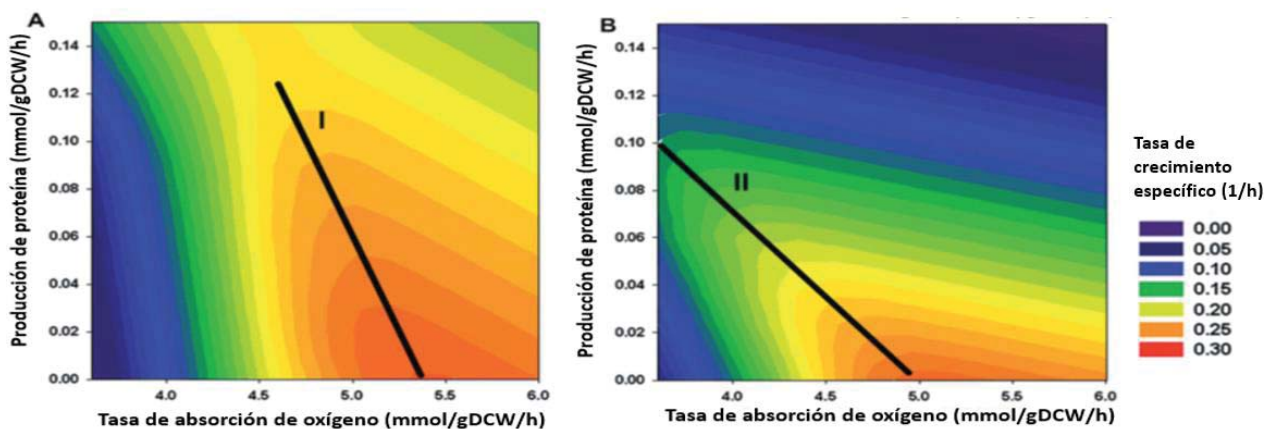


Figura 2. 5 (Adaptación Sohn, et. al., 2010) Resultados de simulación que muestran el impacto de la limitación de oxígeno sobre la producción de proteína y la tasa de crecimiento. La línea negra sólida representa los puntos a lo largo de los cuales se produce la tasa óptima de producción de proteínas para una tasa de absorción de oxígeno dada. (A) Análisis de variabilidad de flujo de producción de HSA y tasa de crecimiento específico a diferentes tasas de absorción de oxígeno, y (B) análisis de variabilidad de flujo de producción de hSOD y tasa de crecimiento específico a diferentes tasas de absorción de oxígeno.

2.8.2 iPP668

Este modelo es nombrado así debido a la cantidad de genes que tiene (668), posee 1361 reacciones, 1177 metabolitos y 9 compartimentos. El trabajo realizado por Chung y su equipo fue elaborado a través de información bibliográfica, base de datos metabólicas (KEGG y METACYC) y datos experimentales (Chung et al., 2018).

El análisis in silico exploró el efecto de diversas fuentes de carbono (alanina, glucosa, glicerol, metanol, sorbitol y trehalosa) sobre el metabolismo celular de *P.pastoris* para identificar los mejores candidatos para la producción de proteína recombinante. Se sabe que el metanol es el inductor del promotor AOX que se usa comúnmente para la producción de proteína, por lo tanto, el análisis se enfoca en la fuente de carbono para la fase inicial de su crecimiento, con la finalidad de alcanzar una alta densidad celular. Basado en lo anterior, el glicerol es el mejor candidato considerado por el estudio para la producción de proteína, seguido del sorbitol (ver Figura 2.6 A). En general, la alta utilización del metabolismo central puede conducir a una mayor producción de varios precursores, pudiendo sintetizar aún más los

componentes necesarios para la biomasa. Sin embargo, las distribuciones de flujo resultantes indicaron que la utilización del metabolismo central de carbono es la más alta para la captación de metanol, a pesar de producir la tasa de crecimiento más baja (ver Figura 2.6 B). Podemos entender esta observación al examinar las tasas de intercambio gaseoso y la suma de flujo de ATP para la utilización de metanol. Las tasas de intercambio gaseoso y de ATP sugiere que gran parte de los recursos se han desviado a la generación de energía durante la utilización del metanol. El bajo cociente respiratorio resultante de esta desviación de recursos es consistente con los hallazgos de varios estudios experimentales. Por lo tanto, la mayor utilización del metabolismo central es una consecuencia del alto requerimiento de energía del metabolismo del metanol en *P. pastoris* (Chung et al., 2018).

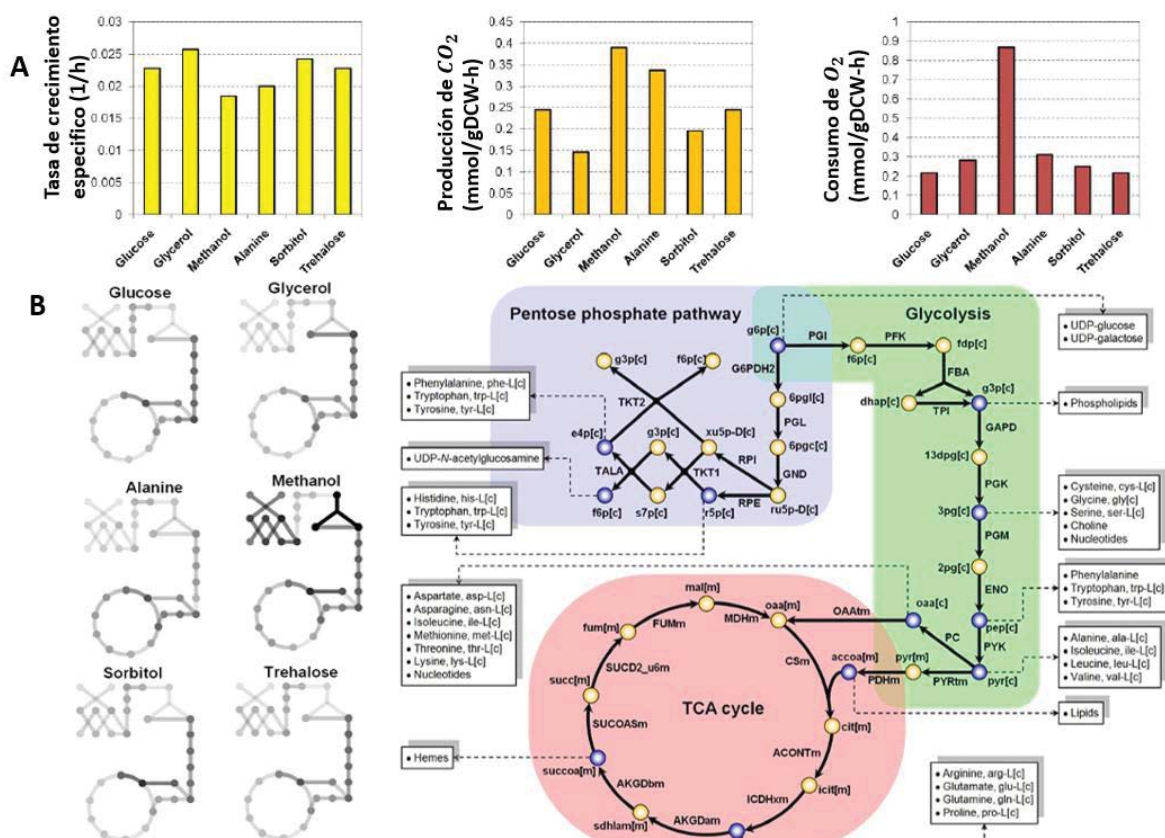


Figura 2. 6 Investigación modelo iPP668. Adaptación (Chung et al., 2018). A) Análisis de fuentes de carbono para la producción de proteína heteróloga. B) Distribuciones de flujo y suma de flujo para diferentes fuentes de carbono. La intensidad de color de las líneas en la red metabólica central de carbono corresponde a los valores de flujo.

2.8.3 iLC915

Este modelo desarrollado en 2012 por Luis Caspeta y su equipo, posee 1423 reacciones, 899 metabolitos y 7 compartimentos (no incluye núcleo ni reacciones extracelulares). En comparación a los modelos pasados este contiene más genes y funciones metabólicas, así como una mejor capacidad predictiva. La reconstrucción del GEM se realizó mediante un enfoque semiautomático enriquecido con análisis funcional y un arreglo manual extenso basado en la literatura disponible. RAVEN TOOLBOX de Matlab se utilizó para generar borradores de modelos y usar la base de datos del KEGG para inferir reacciones que pueden faltar o ser incorrectas en los modelos de plantilla. *P. pastoris* GS115 es la cepa en la cual se basó el trabajo.

Para el análisis in silico se evaluaron diversas fuentes de carbono: glucosa, metanol, xilosa, ácido oleico, glicerol, sorbitol, glucosa, trehalosa y alanina. El modelo cuenta con reacciones para la producción de proteína recombinantes anticuerpo monoclonal humano 3H6 fragmento FAB.

Los resultados obtenidos por Caspeta para este trabajo, reprodujeron de mejor manera la tasa de consumo para distintos estados fisiológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris* comparado al trabajo de sus antecesores.

Fue en 2015 cuando Zahra AZimzadeh Irani produjo una modificación al GEM iLC915, este nuevo trabajo fue llamado ihGlycopastoris, y en él se agregan las N-glicosilaciones humanas y nativas. Esta nueva versión proporciona una mejor predicción del rendimiento de proteína y puede usarse para predecir objetivos potenciales para la mejora de la cepa (Caspeta et al., 2012).

En la Tabla 2.1 se realiza un análisis comparativo de los primeros 3 modelos elaborados para *P. pastoris*.

Tabla 2. 1 Comparación de primeros modelos metabólicos a escala genómica.

	PpaMBEL1254	IPP668	iLC915
Año de Publicación	2010	2010	2012
Genes	540	668	915
Metabolitos	1058	1177	1302
Reacciones	1254	1354	1423
Compartimentos (organelos)	9	9	7 (No incluye núcleo, ni reacciones extracelulares)
Cepa(s)	-DSMZ70382 -GS115	-	GS115
Proteínas Recombinantes	-Albumina Serica Humana (HSA) -Super oxido dismutasa humana (hSOD)	-	Anticuerpo Monoclonal Humano 3H6
Software	RAVEN	Gameside	RAVEN
Observaciones	Análisis de la fisiología celular bajo condiciones de limitación de oxígeno y como afecta la producción de proteína heteróloga.	Análisis del efecto de diversas fuentes de carbono sobre el crecimiento celular	-Estudio de la tasa de absorción de oxígeno sobre estados fisiológicos de <i>P. pastoris</i> que expresan una proteína recombinante. -En la modificación realizada por Irani et al., 2015 se realizó estudio de las N-glycosilaciones.

2.8.4 iMT1026

Modelo realizado por el departamento de ingeniería química, biológica y ambiental de la Universidad Autónoma de Barcelona, sus realizadores fueron Màrius Tomàs-Gamisans, Pau Ferrer y Joan Albiol.

Este modelo consenso integra las vías metabólicas incluidas en los tres modelos anteriores (PpaMBEL1254, iPP668 e iLC915), además incluye nueva información surgida de bibliografía respecto al metabolismo de ácidos grasos, esfingolípidos, glicosilación y la energética celular. También se agregan ecuaciones para la expresión de dos proteínas recombinantes: el fragmento del anticuerpo 2F5 (FAB), expresado bajo el promotor GAP, y la proteína lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) regulada por el promotor AOX inducible por metanol. Además, se evaluaron un total de 47 fuentes de carbono, donde 13 mostraron crecimiento.

Para la validación del modelo se compararon los valores pronosticados con un conjunto adicional de datos experimentales que incluyen diversas combinaciones de quimiostatos de glucosa, glicerol y metanol.

Para los quimiostatos con glucosa, las simulaciones se realizaron con distintas disponibilidades de oxígeno, las tasas de crecimiento y producción de CO₂ se predijeron con éxito, con errores inferiores al 6%, tanto para cepas que expresan FAB como para las que no lo expresan. Cuando la disponibilidad de oxígeno disminuye, el etanol y otros metabolitos son secretados. Los resultados predicen valores levemente mayores de producción de etanol y ningún otro subproducto, como arabitol y piruvato, cuando los valores de oxígeno son bajos. Por otro lado, cuando se limitan los valores de secreción de etanol a los valores medidos experimentalmente, la modelación genera arabitol y piruvato.

Para un segundo conjunto de datos (mezcla glicerol-metanol), se predijo una tasa de crecimiento específica, junto con el consumo específico de O₂ y las tasas de producción de CO₂ arrojando valores con una desviación de un 11%, como muestra la Figura 2.7. De forma similar a las pruebas de glucosa descritas anteriormente, el arabitol solo se produce cuando el etanol estaba restringido a los datos experimentales. Los resultados apuntan a otro posible nivel de regulación para la producción de arabitol, que no se encuentra incluido en el modelo, ya que, sin él la producción de etanol aparece como la forma más eficiente de regenerar *NAD*⁺ para la máxima producción de biomasa (Tomàs-Gamisans, Ferrer and Albiol, 2016).

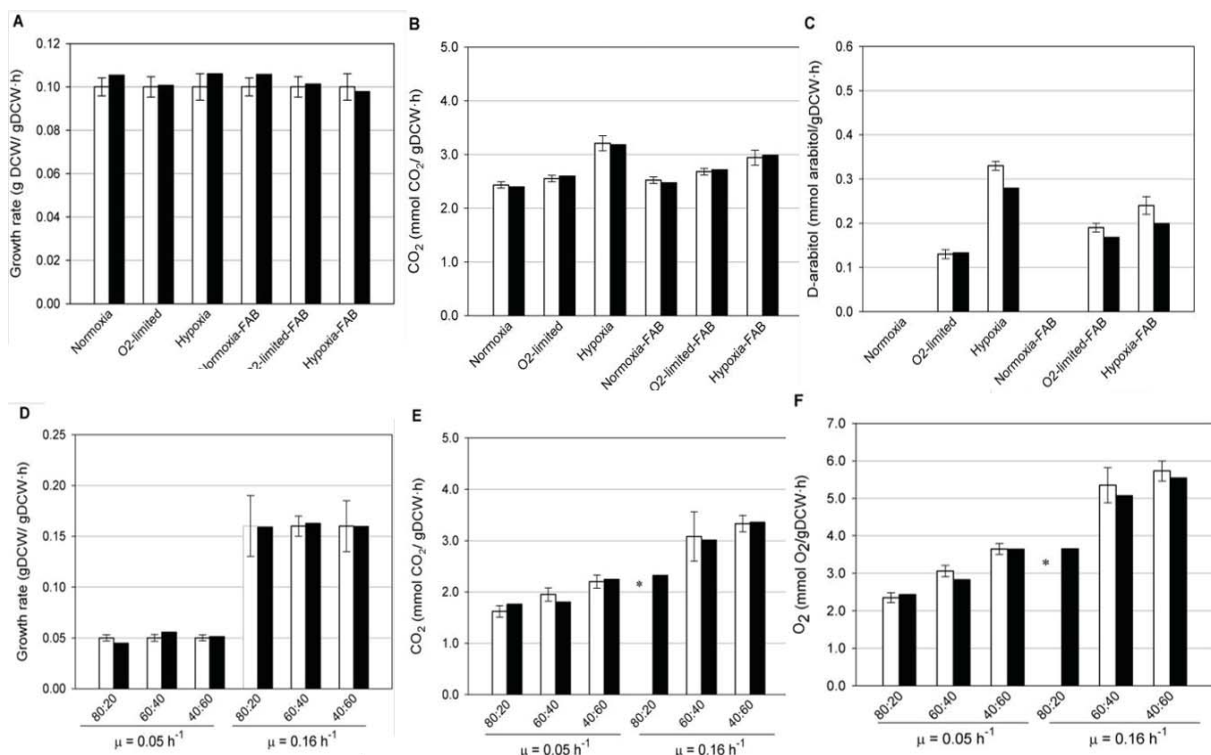


Figura 2. 7 Resultados de la validación del modelo iMT1026: Gráficos con (A) tasa de crecimiento (B) CO₂ y (C) predicciones de producción de D-arabitol al simular glucosa chemostatos en diferentes condiciones de oxígeno, con y sin producción de proteína recombinante con glucosa, O₂ y flujos de etanol restringidos a los valores experimentales. (D) Tasa de crecimiento (E) Producción de CO₂ y (F) O₂ predicciones de consumo al simular diferentes quimiostatos de glicerol: metanol. Las barras blancas y negras corresponden a los datos experimentales y predichos, respectivamente. (Tomàs-Gamisans, Ferrer and Albiol, 2016)

En conclusión, los resultados fueron valores más cercanos a los experimentales que los modelos anteriores, además posee la cualidad de tener una mayor cantidad disponible de fuentes de carbono y energía para usar que los demás modelos.

2.8.5. iRY1254

Modelo metabólico a escala genómica realizado el año 2017. Su construcción se basa en primer lugar en la unión de los cuatro modelos anteriores, revisando los metabolitos en las bases de datos del KEGG

y BiGG, para asegurar su correcta estructura. Posteriormente se utilizó y fusionó la información del genoma de las bases de datos de KEGG, UniProtKB e IMG. Para establecer las nuevas asociaciones de reacción proteína gen (GPR), los genes se recogieron de cada base de datos. Con la ayuda de las bases de datos KEGG y Enzyme, se verificó adicionalmente la relación entre las proteínas y las reacciones para garantizar la alta calidad de los GPR en el nuevo GSMM de *P. pastoris*. El resultado es un modelo que contiene 2407 reacciones, 1243 genes, 9 compartimentos y 1740 metabolitos (Ye et al., 2017).

Se investigó la capacidad de predicción de iRY1254 probando 30 fuentes de carbono y 21 de nitrógeno, obteniendo mejores predicciones respecto a los modelos anteriores. También se usaron los datos de Carnicer (2012) para verificar la función predictiva de los modelos. Se utilizó análisis de balance de flujos (FBA) para comparar la capacidad predictiva de cada modelo con la maximización de la tasa de crecimiento celular como función objetivo. Los resultados mostraron que iRY1243 e iMT1026 podrían predecir la tasa de crecimiento específico de *P. pastoris* y la tasa de consumo específico de CO₂ (Ye et al., 2017).

2.8.6. Kp.1.0

Este GSMM se realizó en el año 2017 en la universidad de Cambridge, Reino Unido. Sus autores son Ayca Cankorur-Centinkaya, Duygu Dikicioglu y Stephen G. Oliver. Este trabajo buscó unificar los modelos PpaMBEL1254, iPP668 e iLC915, inicialmente empleando las mismas nomenclaturas para compartimentos celulares y metabolitos. Para los metabolitos, se detectaron todas las asociaciones de identidades disponible en el KEGG y ChEBI. Para las instancias donde el nombre del metabolito utilizado en el modelo no se encontró en ninguna base de datos, las reacciones involucradas se agregaron (introdujeron) de forma manual y se asignaron las identidades apropiadas. El trabajo de Centinkaya complementó los modelos anteriores añadiendo mejoras en el metabolismo lipídico y transporte. Para el metabolismo de los esfingolípidos se agregaron las modificaciones implementadas en el modelo iMT1026 de Tomàs-Gamisams y colaboradores.

El estudio evaluó la capacidad del modelo Kp.1.0 para predecir el rendimiento fisiológico de *P. pastoris*, para contrastar la predicción se utilizaron los datos encontrados sobre las características de crecimiento a diferentes niveles de absorción de oxígeno (Carnicer et al., 2009), para células de tipo nativa y las que producen la proteína recombinante (Cankorur-Cetinkaya, Dikicioglu & Oliver, 2017).

Tabla 2. 2 Evaluación de distintos estados fisiológicos modelo Kp.1.0 (Cankorur-Cetinkaya, Dikicioglu & Oliver, 2017).

		Valores experimentales		Valores predicción	
		Velocidad de crecimiento específico [hr ⁻¹]	CER** [mmol/gCDW/h]	Velocidad de Crecimiento específico [hr ⁻¹]	CER** [mmol/gCDW/h]
Cepa Nativa					
	Normoxia	0.1	2.43	0.10	2.62
	Limitación de oxígeno	0.1	2.55	0.09	2.71
	Hipoxia	0.1	3.21	0.09	3.37
Producción de FAB					
	Normoxia	0.1	2.52	0.09	2.70
	Limitación de oxígeno	0.1	2.68	0.09	2.88
	Hipoxia	0.1	2.94	0.09	3.16
Cepa Nativa*					
	Crecimiento en glucosa	0.1	2.11	0.10	2.66
	Crecimiento en glicerol-metanol	0.1	1.86	0.10	2.15

*Valores predichos bajo condiciones de normoxia para cepa nativa

** CER: CO₂ Exchange Ratio

Se realizaron experimentos in silico en los que las células de tipo nativa se cultivaron en metanol:glicerol (8,5:49 g/g) en un quimiostato a una tasa de dilución de 0,1 h⁻¹. Las tasas de absorción de glicerol, metanol y oxígeno se vieron limitadas de acuerdo con los datos de Rußmayer (2015), las simulaciones se repitieron utilizando 12 representaciones diferentes de composición de biomasa. Tanto la tasa de

crecimiento como las predicciones de tasa de intercambio de CO₂ se utilizaron para evaluar la precisión predictiva del modelo Kp.1.0. El porcentaje de error en la predicción del intercambio de CO₂ y las tasas de crecimiento fueron, en todos los casos, inferiores al 25% y 15% respectivamente.

En la Tabla 2.3 se puede apreciar un resumen en donde se hace una comparación acerca de los 3 modelos que denominaremos como “modelos consenso”, ya que son unificaciones de modelos anteriores, con sus respectivas mejoras.

Tabla 2. 3 Comparación de modelos consenso *P. pastoris*

	iMT1026		iRY1254	Kp.1.0
Año de Publicación	2016		2017	2017
Genes	1026		1243	720
Metabolitos	1689		1740	1221
Reacciones	2035		2407	1424
Compartimentos (organelos)	9		9	9
Cepa(s)	DSMZ70382	GS115	GS115 G1HL DSMZ70382	DSMZ70382 GS115
Proteínas Recombinantes	lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL) fragmento del anticuerpo 2F5 (FAB)		-	FAB
Software	COBRA TOOLBOX		COBRA TOOLBOX	COBRA TOOLBOX
Observaciones	Modelo consenso, primero en agregar metabolismo de esfingolípidos, ácidos grasos y glicosilación. Mejora la capacidad predictiva de <i>pichia</i> para quimiostatos usando glucosa, metanol y glicerol.		Modelo consenso, con mejoradas capacidades de crecimiento en fuentes de carbono y nitrógeno.	Modelo consenso, que mejora la capacidad predictiva a distintos estados fisiológicos. (Hipoxia, limitación de oxígeno y normoxia).

2.9 LIPASA DE *RHIZOPUS ORYZAE*

Las lipasas microbianas son enzimas de uso industrial de renovado interés en los últimos años por su aplicación en la tecnología de producción de biocombustibles y en síntesis de compuestos quirales en la industria farmacéutica. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del enlace éster de triacilglicerolos, se encuentran en todas las especies del reino animal, así como en plantas y microorganismos tales como bacterias de levadura y hongos.

En este trabajo se utilizará un modelo metabólico a escala genómica basado en una cepa de *P. pastoris* capaz de producir lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL). Esta proteína actúa solamente en los lugares sn-1 y sn-3 porque pertenece a un grupo de lipasas que son activas contra ésteres de alcoholes primarios (Guillén *et al.*, 2011). La estructura nativa de la enzima es una proteína de 392 aminoácidos. Los 26 primeros pertenecen a una secuencia señal (pre-región), los siguientes 97 aminoácidos pertenecen a la pro-región y los últimos 269 forman la secuencia de proteínas maduras.

ROL ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli* (Di Lorenzo *et al.*, 2005), *Saccharomyces cerevisiae* (Takahashi *et al.*, 1998) y en la levadura metilotrófica *P. pastoris* (Cos *et al.* 2005b).

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Computador portátil

Como herramienta principal de trabajo se utilizará un computador personal Acer Aspire ES 14, de características: procesador Intel Core™ i3-7100U CPU 2.4 GHz, 4 GB de RAM, 500 GB de ROM y sistema operativo Windows 10 Home de 64 bits.

3.1.2 MATLAB R2015a

MATLAB (abreviatura de MATrix LABoratory, "laboratorio de matrices") es una herramienta de software matemático que ofrece un entorno de desarrollo integrado (IDE) con un lenguaje de programación propio (lenguaje M).

MATLAB es un entorno de cálculo técnico de altas prestaciones para cálculo numérico y visualización, que integra; análisis numérico, cálculo matricial, procesamiento de señales y desarrollo de gráficos, entre otros. Este programa es un sistema interactivo cuyo elemento básico de datos es una matriz que no requiere dimensionamiento, esto permite resolver muchos problemas numéricos en una fracción del tiempo que llevaría hacerlo en lenguajes como C, BASIC o FORTRAN. (Mathworks.com, 2018)

3.1.3 TOOLBOX COBRA 2.0

Es un paquete para el software MATLAB, usado para la predicción cuantitativa de la bioquímica de las redes celulares y multicelulares con el modelado basado en restricciones. Este paquete implementa una colección completa de métodos de modelado básico y avanzado, incluyendo la reconstrucción y la

generación de modelos, así como los métodos de análisis basados en modelos parciales e imparciales. Es ampliamente utilizado para modelar, analizar y predecir una variedad de fenotipos metabólicos utilizando redes bioquímicas a escala genómica. (Schellenberger et al., 2011).

3.1.4 Gurobi Optimizer 6

Gurobi Optimizer fue diseñado para ser el motor de optimización rápido y potente, este software se añadirá a MATLAB como un “solucionador” para programación lineal (LP), programación lineal entera mixta (MILP), programación cuadrática (QP) y programación cuadrática entera mixta (MIQP) (Gurobi.com, 2018).

3.1.5 Modelo a escala genómica iMT1026

Se utilizará el modelo a escala genómica iMT1026, modelo Tomàs-Gamisans para *P. pastoris*. La decisión de porqué utilizar este modelo es debido a que es el más completo al momento de iniciar el proyecto, ya que integra los tres modelos anteriores (PpaMBEL12545, iPP668 e iLC915), posee terminología simple, agrega nuevas reacciones, se puede considerar el uso de distintas fuentes de carbono y es posible la modelación de la proteína ROL.

3.2 METODOLOGÍA

Para el trabajo se considerará la metodología de Análisis de Balance de Flujo o FBA, por sus siglas en inglés, es un método que evalúa la distribución del flujo metabólico y es uno de los enfoques de modelo más utilizados para los sistemas metabólicos.

Las aplicaciones de FBA para la biología de sistemas moleculares incluyen la predicción de las tasas de crecimiento, las tasas de absorción, la letalidad de eliminación y la secreción del producto. En FBA, el espacio de la solución está restringido por la suposición de un estado estable, en virtud del cual cada metabolito interno se consume a la misma velocidad que se produce.

Para la estimación cuantitativa de los flujos metabólicos, la programación lineal (LP) se puede usar para resolver la matriz estequiométrica para una función objetivo dada bajo diferentes restricciones. Las limitaciones del problema representan el espacio de todas las posibilidades elegibles a partir de las cuales se puede seleccionar una solución óptima (Opencobra.github.io, 2018).

Los límites son:

$$\begin{array}{ll} \min_{\boldsymbol{v}} & \boldsymbol{c}^T \boldsymbol{v} \\ \text{s. t.} & \boldsymbol{S} \boldsymbol{v} = \boldsymbol{b}, \\ & \boldsymbol{l} \leq \boldsymbol{v} \leq \boldsymbol{\mu}, \end{array}$$

Donde:

- $\boldsymbol{c} \in \mathfrak{R}^n$ es un vector de parámetros que combina linealmente uno o más flujos de reacción para formar lo que se denomina la función objetivo, y donde $b_i > 0$, o, $b_i < 0$, representa algún resultado fijo, o entrada, de la i -ésima especie molecular.
- $\boldsymbol{S} \in \mathfrak{R}^{m \times n}$ es una matriz estequiométrica para \boldsymbol{m} especies moleculares y \boldsymbol{n} reacciones, y \boldsymbol{b} es un vector de intercambios metabólicos conocidos.
- La salida de FBA es una distribución de flujo particular, \boldsymbol{v} , que maximiza o minimiza la función objetivo y se ubica entre los límites superior e inferior, \boldsymbol{u} y \boldsymbol{l} , respectivamente.

3.2.1 Puesta en marcha del modelo iMT1026

Para la puesta en marcha del modelo metabólico se busca alcanzar los valores descritos por los autores para el crecimiento con metanol y glicerol como sustratos, esto se logra estableciendo como objetivo el valor de velocidad de crecimiento específico (μ), fijando los valores de consumo de ambas fuentes de carbono y dejando libre los valores de consumo de oxígeno.

Para lograr la simulación del crecimiento celular de *P. pastoris* el medio debe tener presente los siguientes nutrientes; NH_4^+ (ion amonio), PO_4^{3-} (fosfato), O_2 (oxígeno molecular), Fe^{2+} (ion Ferroso), SO_4 (Sulfato) y una fuente de carbono.

Para hacer uso de la fuente de carbono se restringe la glucosa (fuente de carbono por defecto del modelo) llevando su valor a cero y se permite el consumo de metanol y glicerol. El consumo de metanol y glicerol son tomados de datos experimentales, tomando valores de 4 y 3 [mmol/ gDCW* h] respectivamente, como máximo consumibles por el microorganismo en un cultivo continuo.

En la Tabla 3.1 y 3.2 se muestran los datos experimentales (μ , consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono), los valores obtenidos de la modelación realizada por los autores, la cual no entrega información sobre el consumo de metanol y glicerol, por lo que se realiza nuevamente la modelación iMT1026, fijando la velocidad de crecimiento específico (μ) como función objetivo y probando con distintos valores de consumo de metanol y glicerol, hasta alcanzar los correspondientes al consumo de O_2 y producción de CO_2 entregados por los autores.

Tabla 3. 1 Puesta en marcha del modelo iMT1026 $\mu=0,16[h^{-1}]$ (Tomàs-Gamisans, Ferrer & Albiol, 2016)

	Datos Experimental	Valores modelación iMT1026 (autores)	Valores modelación iMT1026 obtenidos	Unidad
μ	0,16	0,155 a 0,165	0,164	$[h^{-1}]$
Consumo metanol	sin información	sin información	3,60	[mmol/g DCW *h]
Consumo glicerol	sin información	sin información	1,75	[mmol/g DCW *h]
Consumo O₂	5,2 a 5,8	5 a 5,6	5,40	[mmol/g DCW *h]
Producción CO₂	3,2 a 3,5	3 a 3,4	2,95	[mmol/g DCW *h]

Tabla 3. 2 Puesta en marcha del modelo iMT1026 $\mu=0,05[h^{-1}]$ (Tomàs-Gamisans, Ferrer & Albiol, 2016)

	Datos Experimental	Valores modelación iMT1026 (autores)	Valores modelación iMT1026 obtenidos	Unidad
μ	0,05	0,04 a 0,055	0,055	$[h^{-1}]$
Consumo metanol	sin información	sin información	2,13	[mmol/g DCW *h]
Consumo glicerol	sin información	sin información	0,45	[mmol/g DCW *h]
Consumo O₂	2,3 a 3,5	2,8 a 3,5	2,7	[mmol/g DCW *h]
Producción CO₂	1,6 a 2,3	1,7 a 3,4	1,5	[mmol/g DCW *h]

3.2.2 Estrategias para la modificación in silico de la distribución de flujos

Para evaluar una redistribución de flujos en *P. pastoris* se propone 4 posibles soluciones con el fin de evitar la acumulación de intermediarios tóxicos producidos en el metabolismo del metanol, que disminuyan la viabilidad de la célula. También se busca redistribuir el flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs.

Estrategia 1: Knock out a la enzima formaldehído deshidrogenasa $E1(FLD^- DAS_p^+ DAS_c^-)$

La intención de bloquear esta ruta, es para que el formaldehído no llegue a convertirse en CO_2 , dirigiendo todo el flujo de carbono hacia la vía asimilativa. Para que esto ocurra se debe eliminar la expresión de la proteína formaldehído deshidrogenasa (FLD). Es de recordar que la ruta disimilativa provee 2 NADH como poder reductor en el citosol. Se estima que este NADH contribuye a satisfacer los requerimientos energéticos de la célula formando ATP en las mitocondrias. No tener esta ruta podría afectar negativamente a la célula, pero la apuesta es el aumento del flujo de carbono que ingresa al ciclo de Krebs, este debiera producir la cantidad de energía necesaria para los requerimientos energéticos celulares. En la Figura 3.1 es posible apreciar donde se hará el knock out en el metabolismo del metanol (ver ruta original en Figura 2.2).

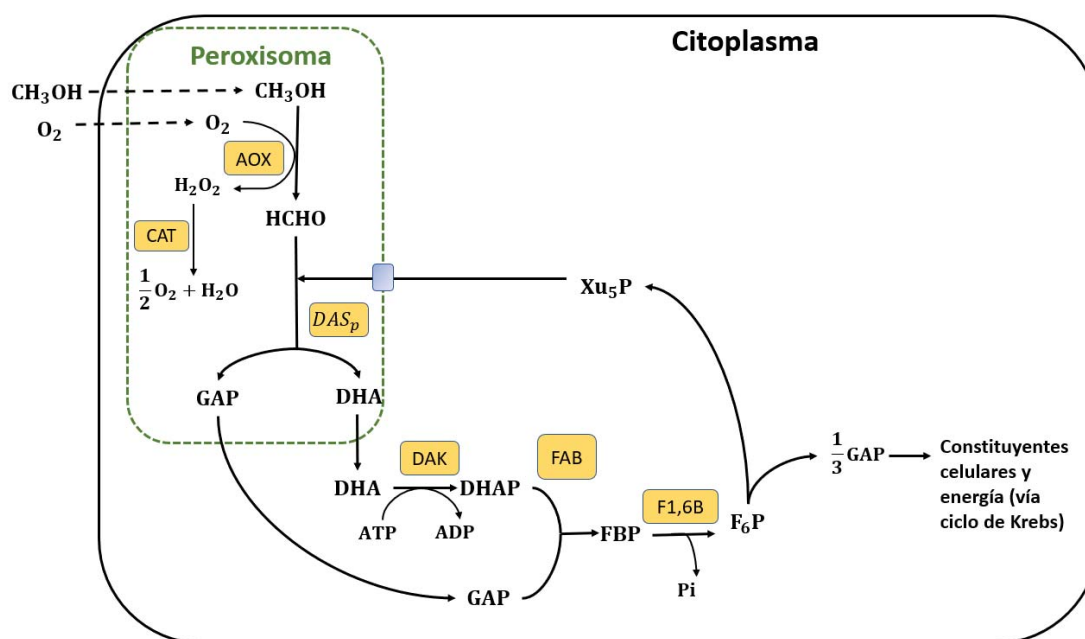


Figura 3. 1 Estrategia 1: Knock out formaldehído deshidrogenasa (Adaptación: Cereghino and Cregg, 2000).

Para llevar a cabo esta modificación en el modelo iMT1026 se realiza un knock out usando el comando “changeRxnBounds” del TOOLBOX COBRA, haciendo cero el límite de la reacción de la enzima formaldehído deshidrogenasa, la instrucción completa utilizada en el programa se encuentra en el anexo A.2 para el uso de metanol como única fuente de carbono y energía, y en el anexo B.2 para el uso de metanol y glicerol como fuentes de carbono y energía.

Estrategia 2: Expresión de enzima dihidroxiacetona sintasa $E2$ ($FLD^+DAS_p^+DAS_c^+$)

Para la ruta asimilativa se presenta el siguiente problema: la enzima dihidroxiacetona sintasa (DAS) transforma el formaldehído en GAP y DHA, pero para esto es necesario que el formaldehído reaccione con la xilulosa-5-fosfato (Xu5p). Esta molécula es producida en el citosol y para generar su traspaso hacia la membrana peroxisomal es probable que deba ser ingresado por medio de una proteína de membrana, aún desconocida, por un transporte posiblemente activo (Van der Klei et al., 2006). Se deduce que el transporte de la Xu5p requiere gasto energético, ya que cuando el estado de energía de las células es alto, se aumenta la velocidad de suministro de Xu5p para la reacción con DHA localizado dentro del peroxisoma.

La propuesta de la estrategia 2 es la expresión de la enzima DAS en el citosol, evitando el gasto energético que puede conllevar el transporte de la Xu5p al interior del peroxisoma y el transporte de los productos de la reacción catalizada por la enzima hacia el citosol.

Esta propuesta se fundamenta primero en que la expresión de las enzimas peroxisomales se sintetizan en el citosol y luego son llevadas al peroxisoma por un organelo transportador de membrana especializado (Ma & Subramani., 2009). La actividad máxima de DAS se ha obtenido entre pH 6,8 y 7,1 (Verachtert & De Mot., 1990), por lo que el pH 7,0 (Sauer et al., 2004) del citosol no causaría problemas. En la figura de 3.2 es posible ver cómo afecta la expresión de la enzima DAS en el citosol, reforzando el flujo de carbono hacia la vía disimilativa.

La instrucción completa utilizada para esta estrategia se encuentra en el anexo A.3 para el consumo de metanol como fuente de carbono y en el anexo B.3 para el consumo de metanol y glicerol como fuente de carbono.

Estrategia 3: Expresión de enzima dihidroxiacetona sintasa en el citosol y knock out a la enzima dihidroxiacetona sintasa peroxisomal. $E3(FLD^+ DAS_p^- DAS_c^+)$

Esta estrategia, al igual que la estrategia 2, se basa en la expresión de la enzima DAS en el citosol, buscando favorecer el flujo hacia la vía asimilativa. Se diferencia de la estrategia anterior, ya que en esta se elimina la producción de la enzima DAS en el interior del peroxisoma, similar a otras levaduras metilotróficas, como las mutantes pex de *H. polymorfa* (Van der klei., et al 2006). Así como se puede ver en la Figura 3.3 el formaldehído difunde por la membrana peroxisomal, este intermediario tóxico para la célula, se convierte en CO_2 por la vía disimilativa, y por la vía asimilativa, se aprecia que la xilulosa-5-fosfato no debe entrar al peroxisoma, ni DHA y GAP salir de este organelo, evitando realizar el gasto energético para su transporte.

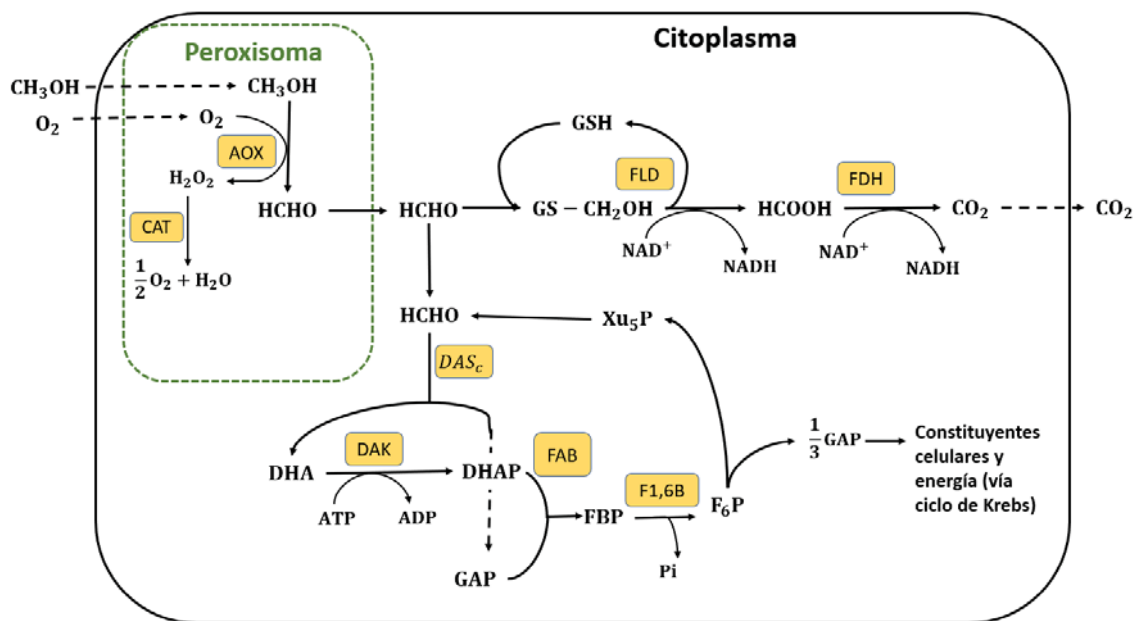


Figura 3. 3 Estrategia 3: Expresión de enzima dihidroxiacetona sintasa en el citosol y knock out a la enzima dihidroxiacetona sintasa peroxisomal. (Adaptación: Cereghino and Cregg, 2000).

Para trabajar esta estrategia en el modelo iMT1026, al igual que en la estrategia anterior, se agrega la enzima DAS en el citosol con el comando “addReaction” y se realiza un knock out a la enzima DAS en el peroxisoma con el comando “changeRxnBounds”. La instrucción completa utilizada para esta estrategia se encuentra en anexo A.4 para el consumo de metanol como única fuente de carbono y en el anexo B.4 para el consumo de metanol y glicerol como fuente de carbono.

Estrategia 4: Expresión de enzima dihidroxiacetona sintasa en el citosol, knock out a la enzima dihidroxiacetona sintasa peroxisomal y knock out enzima formaldehído deshidrogenasa $E4(FLD^- DAS_p^- DAS_c^+)$

Esta alternativa busca reunir las ventajas de todas las opciones anteriores, no producir CO_2 por la vía disimilativa, eliminar la enzima DAS en el peroxisoma y producir la enzima citosólica DAS evitando el gasto energético para el transporte peroxisomal de xilulosa-5-fosfato, GAP y DHA. Con esto se busca la maximización del flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs. En la figura 3.4. se pueden observar los cambios realizados.

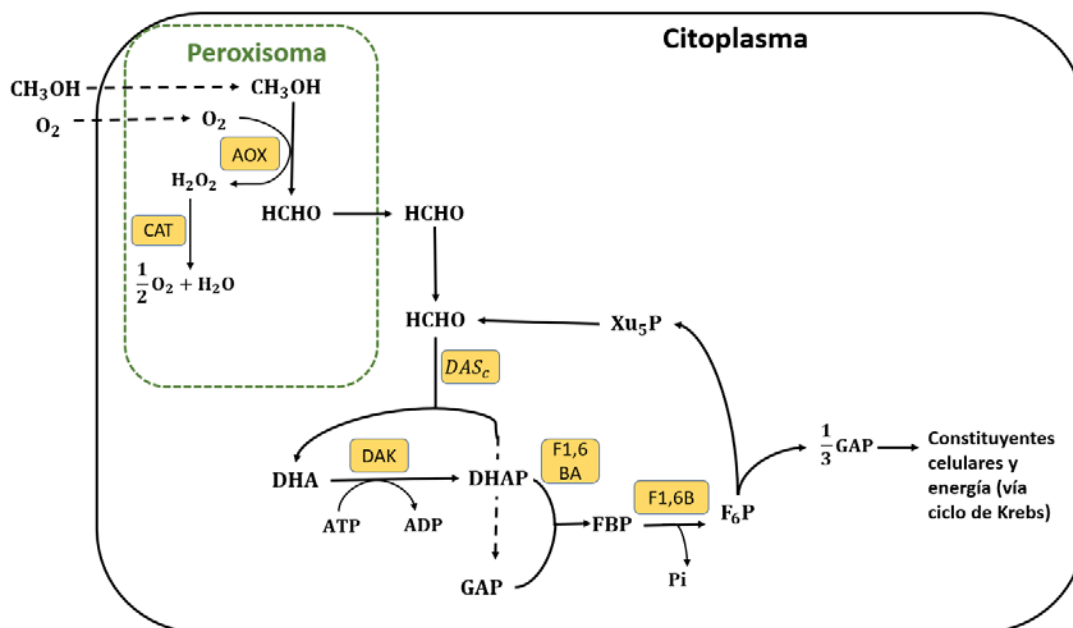


Figura 3. 4 knock out en vía disimilativa, knock out a la enzima DAS y expresión de proteína dihidroxiacetona sintasa citoplasmática en el metabolismo del metanol en *P. pastoris*.

Para trabajar esta estrategia en el modelo iMT1026, al igual que en las estrategias anteriores, se agrega la enzima DAS en el citosol con el comando “addReaction”, se realiza un knock out a la enzima DAS en el peroxisoma y otro knock out a la enzima formaldehído deshidrogenasa, ambas con el comando “changeRxnBounds”. La instrucción completa utilizada para esta estrategia se encuentra en anexo A.5 para el consumo de metanol como única fuente de carbono y en el anexo B.5 para el consumo de metanol y glicerol como fuente de carbono.

De manera de facilitar la comprensión de las distintas estrategias se presenta la tabla 3.3.

Tabla 3. 3 Tabla resumen de las distintas estrategias presentadas

Cepa	Expresión FLD	Expresión DAS peroxisomal	Expresión DAS en citosol
Control	+	+	-
E1	-	+	-
E2	+	+	+
E3	+	-	+
E4	-	-	+

3.2.3. Modelación de las estrategias considerando gasto de ATP para el transporte de xilulosa-5-fosfato

Si se considera lo que dice dentro de los códigos del modelo genómico iMT1026, es posible apreciar entre sus reacciones de transporte que la correspondiente a llevar a la xilulosa-5-fosfato dentro del peroxisoma no incluye ningún tipo de gasto energético. Para llevar a cabo la modificación, tomaremos los antecedentes ya antes mencionados en las distintas estrategias:

- La enzima DAS requiere que uno de sus substratos (Xu5p) sea transportado dentro del peroxisoma por una proteína de membrana desconocida, probablemente por medio de un mecanismo activo (Van der klei et al., 2006). Además, los productos de reacción (DHA y GAP) deben transportarse al citosol para continuar su asimilación.
- Se deduce que el transporte de la Xu5p requiere gasto energético, ya que cuando el estado de energía de las células es alto, se aumenta la velocidad de suministro de Xu5p para la reacción con formaldehído localizado en el peroxisoma (Van der klei et al., 2006). Se estima que el NADH que se genera a partir de la vía disimilativa, se convierte en ATP en las mitocondrias.

Para realizar la modificación en el modelo a escala genómica, se realizó knock out a la reacción que transporta la Xu5p hacia el peroxisoma (“XU5Ptx”), utilizando el comando “changeRxnBounds”, haciendo sus límites 0. La instrucción utilizada quedó de la siguiente forma:

```
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b')
```

El siguiente paso es el reemplazar la ecuación de transporte, para agregar el gasto de ATP, en este caso se consideró el gasto de 1 molécula de ATP para transportar 1 molécula de Xu5p desde citosol hasta el peroxisoma, generando una molécula de ADP. Para agregar la reacción se usará el comando “addReaction”, en donde se deben agregar los metabolitos involucrados y su respectiva estequiometría. La instrucción utilizada quedó de la siguiente forma:

```
model =addReaction(model,'XU5Ptx1', {'atp_c[C_c]','xu5p_D_c[C_c]','adp_c[C_c]','pi_c[C_c]','xu5p_D_x[C_x]'},[-1 -1 1 1 1],1);
```

Esta modificación se realizó al control ($FLD^+DAS_p^+DAS_c^-$), a la estrategia 1 ($FLD^-DAS_p^+DAS_c^-$) y estrategia 2 ($FLD^+DAS_p^+DAS_c^+$). En la figura 3.5 se aprecia en rojo en que parte del metabolismo del metanol se produce la modificación.

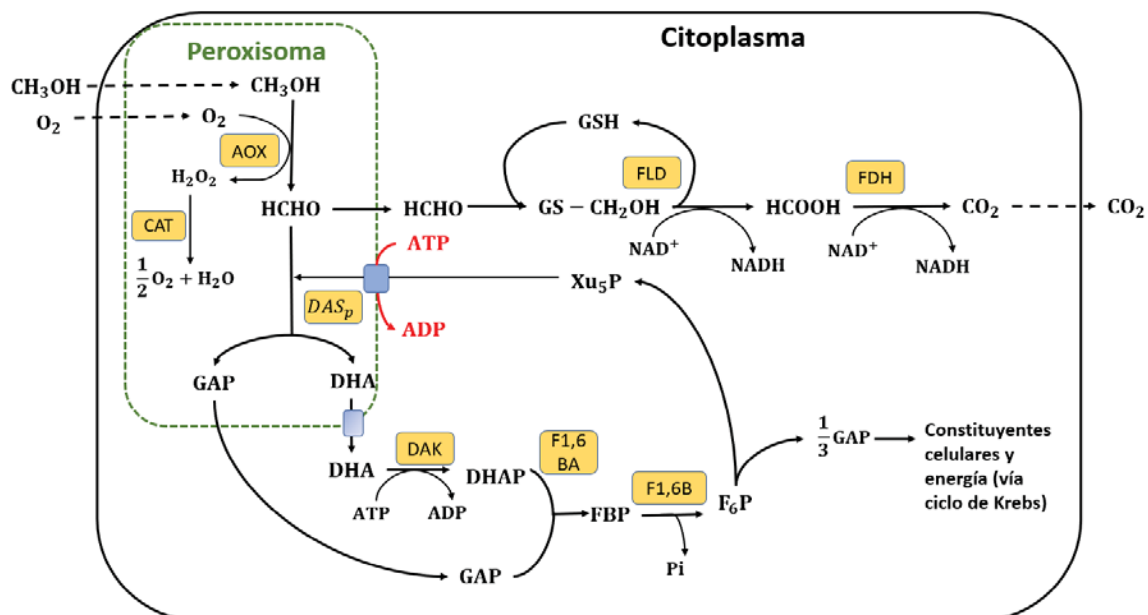


Figura 3. 5Metabolismo del metanol considerando el gasto energético en el transporte de la xilulosa 5 fosfato.

3.2.4 Modelación con producción de proteína ROL

Como fue mencionado antes, el modelo iMT1026 posee la característica de producir la proteína lipasa de *Rhizopus oryzae* dentro del subsistema de producción de proteína recombinante.

Para la producción de ROL, solo es necesario realizar un cambio en los límites de las reacciones relacionadas con la proteína. Estas reacciones son:

- “rolAA”: Reacción relacionada con la composición de aminoácidos.
- “rolRNA”: Reacción relacionada con la composición de mRNA.
- “rolDNA”: Reacción relacionada con la composición DNA de ROL
- Una reacción de ensamble que une a las tres anteriores, llamada “pROL”:



Esta proteína posee reacciones de intercambio que también deben ser activadas cambiando sus límites, estas son:

- “Rolt”: Encargada de realizar el transporte de ROL desde el citosol hacia el espacio extracelular
- “Ex_rol”: Valor de salida de ROL mostrada por el software.

Los cálculos de la composición de la proteína ROL y los detalles de las condiciones de cada reacción se encuentran en el anexo C.

3.2.5 Estudio de condiciones operacionales relacionadas con el consumo de oxígeno

Para el estudio de condiciones operacionales se utilizaron datos obtenidos del trabajo de doctorado de Christian Canales Valenzuela: “Producción heteróloga de lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) con *Pichia pastoris* utilizando estrategia de inducción con mezcla de sustratos metanol-glicerol”. Para la evaluación de estas condiciones se buscó la predicción de la velocidad de crecimiento específico, que tan preciso son los valores de consumo específico de oxígeno y la producción de proteína ROL.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 MODELACIÓN USANDO METANOL COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA

Para realizar la modelación se usó como función objetivo la velocidad de crecimiento específico. Para el consumo de fuente de carbono y energía, solo se fijó el consumo de metanol en 6 mmol/gDCW*h dejando libre los valores de consumo para los otros nutrientes. Para el crecimiento celular de *P. pastoris* el medio posee los siguientes nutrientes: NH_4^+ (ion amonio), PO_4^{3-} (fosfato), O_2 (oxígeno molecular), Fe^{2+} (ion Ferroso), SO_4 (Sulfato) sin fijar.

4.1.1 Modelación de las distintas estrategias

En la tabla 4.1 se puede observar los resultados obtenidos de la modelación de las distintas estrategias que buscan una redistribución de los flujos en el metabolismo del metanol para *P.pastoris*.

De los resultados se puede apreciar que para las estrategias 1 ($FLD^- DAS_p^+ DAS_c^-$) y 4 ($FLD^- DAS_p^- DAS_c^+$), los valores de μ fueron 2,24% menores que el control ($FLD^- DAS_p^+ DAS_c^-$), mientras que para las estrategias 2 ($FLD^+ DAS_p^+ DAS_c^+$) y 3 ($FLD^+ DAS_p^- DAS_c^+$), el valor de μ es el mismo que el control. En esta etapa, aun no se ha considerado el consumo de ATP para el transporte de la xilulosa-5-fosfato, por lo que esta variable se evaluará en el siguiente subcapítulo.

Tabla 4. 1 Modelación de las distintas estrategias que buscan una redistribución de flujos (Consumo de metanol de 6 [mmol/gDCW*h]).

Variables	Control	E1*	E2**	E3***	E4****	Unidad
μ	0,0895	0,0875	0,0895	0,0895	0,0875	[h ⁻¹]
consumo de NH4	0,513	0,501	0,513	0,513	0,501	[mmol/g DCW *h]
Consumo de O2	5,67	5,746	5,67	5,67	5,746	[mmol/g DCW *h]
Producción de CO2	2,792	2,865	2,792	2,792	2,865	[mmol/g DCW *h]
% flujo por vía disimilativa	29,75	-	29,75	34,175	-	[%]
% flujo por vía asimilativa	70,25	100	70,25	65,825	100	[%]

* (FLD⁻ DAS_p⁺ DAS_c⁻)
 ** (FLD⁺ DAS_p⁺ DAS_c⁺)
 *** (FLD⁺ DAS_p⁻ DAS_c⁺)
 **** (FLD⁻ DAS_p⁻ DAS_c⁺)

4.1.2 Modelación agregando el consumo de ATP para el transporte de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma

Para esta modelación, que considera el consumo de ATP para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato al peroxisoma, se considerarán las estrategias que contemplan la entrada y salida de este metabolito hacia el organelo. Las estrategias que se consideran son: el control, estrategia 1 y estrategia 2.

Control vs Control con gasto energético para el transporte de xilulosa-5-fosfato

El análisis se realiza comparando los valores obtenidos para la modelación con las ecuaciones que posee el modelo iMT1026 sin hacer cambios y agregando el consumo de 1 ATP como gasto para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato. En la figura 4.1 se puede observar cómo se distribuyen los flujos en ambos casos.

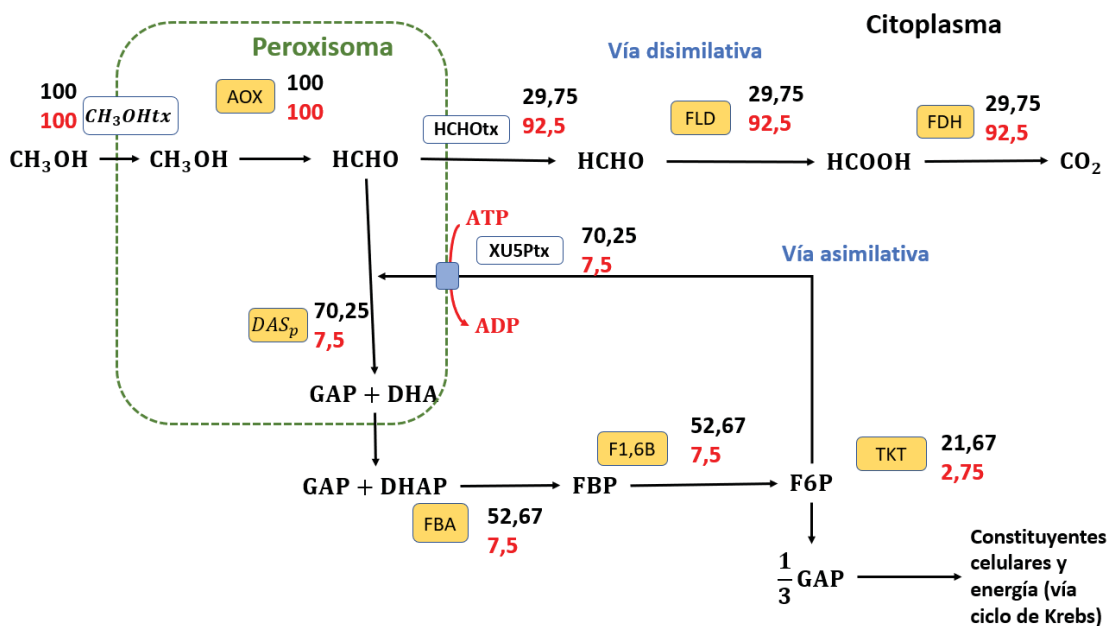


Figura 4. 1 Distribución de los flujos modelación del control vs control incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato para el control. Encerrados en azul se puede ver los nombres para las reacciones de transporte involucradas en el metabolismo del metanol del modelo iMT1026, encerrados en amarillo se ve las enzimas más importantes en el metabolismo del metanol. Los valores en negro son el resultado de la modelación para el control, mientras que los valores en color rojo son los valores resultantes de la modelación del control agregando el gasto energético para el ingreso de la XU5P. El valor absoluto corresponde a 6 [mmol/gDCW*h] de metanol.

En la Tabla 4.2 se hace una comparación para los valores de velocidad de crecimiento específico, consumo específico de oxígeno, amonio y producción de dióxido de carbono entre el control sin considerar el gasto de ATP y el control considerando el gasto energético para el transporte de Xu5P. En la última columna(Δ) se observa como varía el control agregando este cambio.

Tabla 4. 2 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT1026 control vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma.

Variables	Control metanol	Control metanol ATP	Unidad	$\Delta\%$
μ	0,0895	0,0646	[h ⁻¹]	27,82
consumo de NH ₄	0,51	0,37	[mmol/gDCW*h]	27,88
Consumo de O ₂	5,67	6,59	[mmol/gDCW*h]	16,35
Producción de CO ₂	2,79	3,68	[mmol/g*h]	31,81
% de flujo por vía disimilativa	29,75	92,52	[%]	210,99
% de flujo por vía asimilativa	70,25	7,47	[%]	89,35

Es posible apreciar que, al hacer la modificación, el valor de μ disminuye casi un 28%, aumenta el consumo de O₂ y la producción de CO₂ en un 16 % y 32% respectivamente. Por otro lado, al considerar el gasto de ATP para el transporte de la xilulosa-5-fosfato, se observa una disminución drástica con respecto al flujo de carbono hacia la vía asimilativa, disminuyendo un 89%.

Estrategia 1 vs Estrategia 1 con gasto energético para transporte de xilulosa-5-fosfato

Esta estrategia se refiere al uso del modelo iMT1026 realizando un Knock Out en la enzima Formaldehído deshidrogenasa (FLD). Los resultados para la estrategia 1 con gasto energético no fueron posibles de obtener utilizando el modelo iMT1026, probablemente por no poseer el poder de oxidoreducción proporcionado por el NADH, generado por la vía disimilativa. Las razones de lo anterior serán expuestas en el capítulo 5.

En la Tabla 4.3 se hace una comparación para los valores de velocidad de crecimiento específico, consumo específico de oxígeno, amonio y producción de dióxido de carbono. En la última columna(Δ) se observa como varía la estrategia 2 agregando este cambio.

Tabla 4. 3 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT1026 sin cambios vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma para la estrategia 2

Variables	Estrategia 2	Estrategia 2 ATP	Unidad	$\Delta\%$
μ	0,0895	0,0895	[h ⁻¹]	0,00
consumo de NH ₄	0,513	0,513	[mmol/gDCW*h]	0,00
Consumo de O ₂	5,67	5,67	[mmol/gDCW*h]	0,00
Producción de CO ₂	2,792	2,792	[mmol/gDCW*h]	0,00
% de flujo por vía disimilativa	29,75	33,33	[%]	12,03
% de flujo por vía asimilativa	70,25	66,67	[%]	5,10

Para el control y las estrategias 1 y 2, se considerarán las modificaciones presentadas anteriormente para realizar la comparación, ya que estas se considera que estos cambios son más adecuados según los antecedentes planteados en el capítulo 3.2. En la estrategia 1, no se considera la modificación ya que la simulación no es viable. Las estrategias 3 y 4 no sufren modificaciones debido a que la Xu5P no debe entrar al peroxisoma.

Tabla 4. 4 Tabla resumen de las distintas estrategias considerando el gasto energético, para consumo de metanol como única fuente de carbono y energía.

Variables	Control ATP	Estrategia 1*	Estrategia 2 ATP**	Estrategia 3***	Estrategia 4****	Unidad
μ	0,0646	-	0,0895	0,0895	0,0875	[h ⁻¹]
consumo de NH ₄	0,37	-	0,513	0,513	0,501	[mmol/gDCW*h]
Consumo de O ₂	6,597	-	5,67	5,67	5,746	[mmol/gDCW*h]
Producción de CO ₂	3,68	-	2,792	2,792	2,865	[mmol/gDCW*h]
% de flujo por vía disimilativa	92,521	-	33,333	34,175	-	[%]
% de flujo por vía asimilativa	7,479	-	66,667	65,825	100	[%]

*(FLD⁻ DAS_p⁺ DAS_c⁻)

** (FLD⁺ DAS_p⁺ DAS_c⁺)

*** (FLD⁺ DAS_p⁻ DAS_c⁺)

*** (FLD⁻ DAS_p⁻ DAS_c⁺)

Haciendo un análisis de los valores de μ en la Tabla 4.4, las estrategias 2 y 3 son 38,5% mayor al control (considerando gasto de ATP), mientras que la estrategia 4 es 35,4% mayor. Por otro lado, analizando la distribución de flujos, en la estrategia 2 y 3 se logró un aumento considerable hacia la vía asimilativa, siendo casi 9 veces mayor que el control.

4.2 MODELACIÓN CON USO DE GLICEROL Y METANOL COMO FUENTES DE CARBONO Y ENERGÍA

Para realizar la modelación se usó como función objetivo la velocidad de crecimiento específico. Para el consumo de fuente de carbono y energía, solo se fijó el consumo de metanol en 4 mmol/gDCW*h y

el de glicerol en 3 mmol/gDCW*h, dejando libre los valores de consumo para los otros nutrientes. Para el crecimiento celular de *P. pastoris* el medio posee los siguientes nutrientes: NH_4^+ (ion amonio), PO_4^{3-} (fosfato), O_2 (oxígeno molecular), Fe^{2+} (ion Ferroso), SO_4 (Sulfato) sin fijar.

4.2.1 Modelación de las distintas estrategias

En la Tabla 4.5 se puede observar los resultados obtenidos de la modelación de las distintas estrategias que buscan una redistribución de los flujos en el metabolismo del metanol para *P.pastoris*.

De los resultados se puede apreciar que para las estrategias 1 ($FLD^- DAS_p^+ DAS_c^-$) y 4 ($FLD^- DAS_p^- DAS_c^+$), los valores de μ fueron menores que el control ($FLD^- DAS_p^+ DAS_c^-$), mientras que para las estrategias 2 ($FLD^+ DAS_p^+ DAS_c^+$) y 3 ($FLD^+ DAS_p^- DAS_c^+$), el valor de μ es el mismo que el control. En esta etapa, aun no se ha considerado el consumo de ATP para el transporte de la xilulosa-5-fosfato, por lo que esta variable se evaluará en el siguiente subcapítulo.

Tabla 4. 5 Modelación de las distintas alternativas fijando valor de metanol y glicerol

Variables	Control	Estrategia 1*	Estrategia 2**	Estrategia 3***	Estrategia 4****	Unidad
μ	0,2527	0,25	0,2527	0,2527	0,25	[h ⁻¹]
consumo de NH ₄	1,449	1,434	1,449	1,449	1,434	[mmol/gDCW*h]
Consumo de O ₂	7,1	7,19	7,1	7,1	7,19	[mmol/gDCW*h]
Producción de CO ₂	3,94	4,03	3,94	3,94	4,03	[mmol/gDCW*h]
% de flujo por vía disimilativa	53,5	-	53,5	53,5	-	[%]
% de flujo por vía asimilativa	46,5	100	46,5	46,5	100	[%]

*(FLD⁻DAS_p⁺DAS_c⁻)

** (FLD⁺DAS_p⁺DAS_c⁺)

*** (FLD⁺DAS_p⁻DAS_c⁺)

*** (FLD⁻DAS_p⁻DAS_c⁺)

Se puede apreciar que sin tener gasto de energía en la incorporación de la xilulosa-5-fosfato, no se logra distinguir una diferencia notable entre el control y las distintas estrategias planteadas.

4.2.2 Modelación agregando el gasto de ATP para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato al peroxisoma

Para la modelación, que considera el consumo de ATP para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato al peroxisoma, se considerarán las estrategias que contemplen la entrada y salida del peroxisoma de este metabolito hacia el organelo. Las estrategias que se consideran son: el control, la estrategia 1 y la estrategia 2.

Control vs Control con gasto energético para el transporte de xilulosa-5-fosfato

El análisis se realiza comparando los valores obtenidos para la modelación con las ecuaciones que posee el modelo iMT1026 sin hacer cambios y agregando el consumo de 1 ATP como gasto para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato. En la Figura 4.3 se puede observar cómo se distribuyen los flujos en ambos casos.

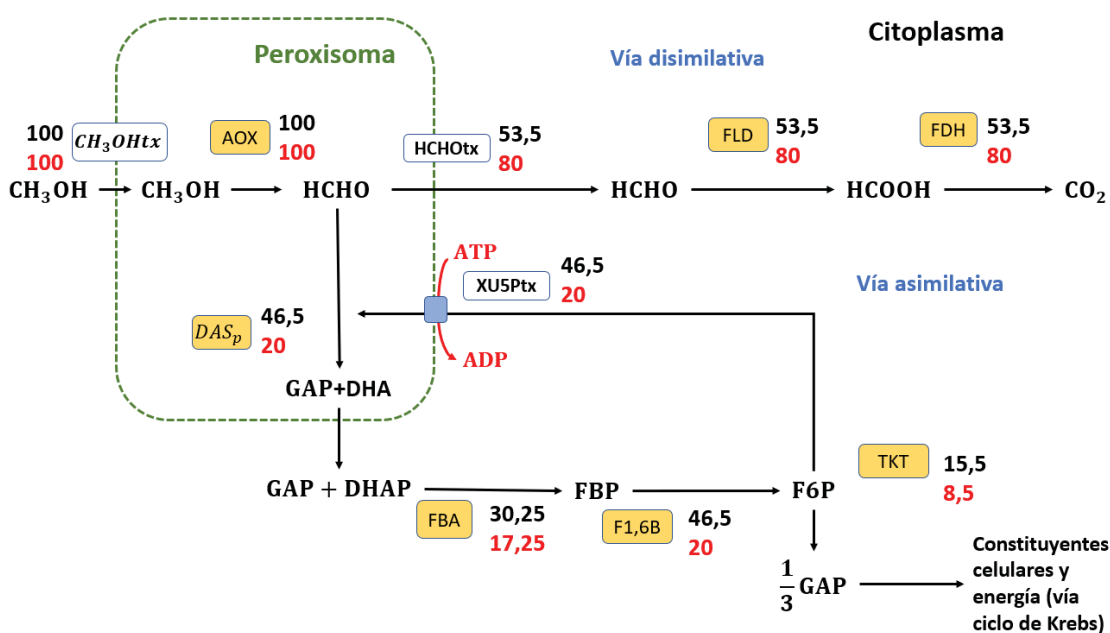


Figura 4. 3 Distribución de los flujos modelación del control con metanol-glicerol vs control metanol-glicerol incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa 5 fosfato para el control. Encerrados en azul se puede ver los nombres para las reacciones de transporte involucradas en el metabolismo del metanol del modelo iMT 1026, encerrados en amarillo se ve las enzimas más importantes en el metabolismo del metanol. Los valores en negro son el resultado de la modelación para el control, mientras que los valores en color rojo son los valores resultantes de la modelación del control agregando el gasto energético para el ingreso de la XUSP. El valor absoluto corresponde a 4 [mmol/gDCW*h] de metanol

En la Tabla 4.6 se hace una comparación para los valores de velocidad de crecimiento, consumo específico de oxígeno, amonio y producción de dióxido de carbono. En la última columna(Δ) se observa como varía el control agregando este cambio.

Tabla 4. 6 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT1026 sin cambios vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma para consumo de metanol y glicerol.

Variables	Control metanol	Control metanol con gasto energético	Unidad	Δ%
μ	0,2527	0,2494	[h ⁻¹]	1,31
consumo de NH ₄	1,449	1,429	[mmol/gDCW*h]	1,38
Consumo de O ₂	7,1	7,22	[mmol/gDCW*h]	1,69
Producción de CO ₂	3,94	4,068	[mmol/gDCW*h]	3,25
% de flujo por vía disimilativa	53,5	75,5	[%]	41,12
% de flujo por vía asimilativa	46,5	24,5	[%]	47,31

Estrategia 1 vs Estrategia 1 con gasto energético para transporte de xilulosa-5-fosfato

Esta estrategia se refiere al uso del modelo iMT1026 realizando un Knock Out en la enzima Formaldehído deshidrogenasa (FLD). Los valores de flujos para ambas estrategias se encuentran en la Figura 4.4.

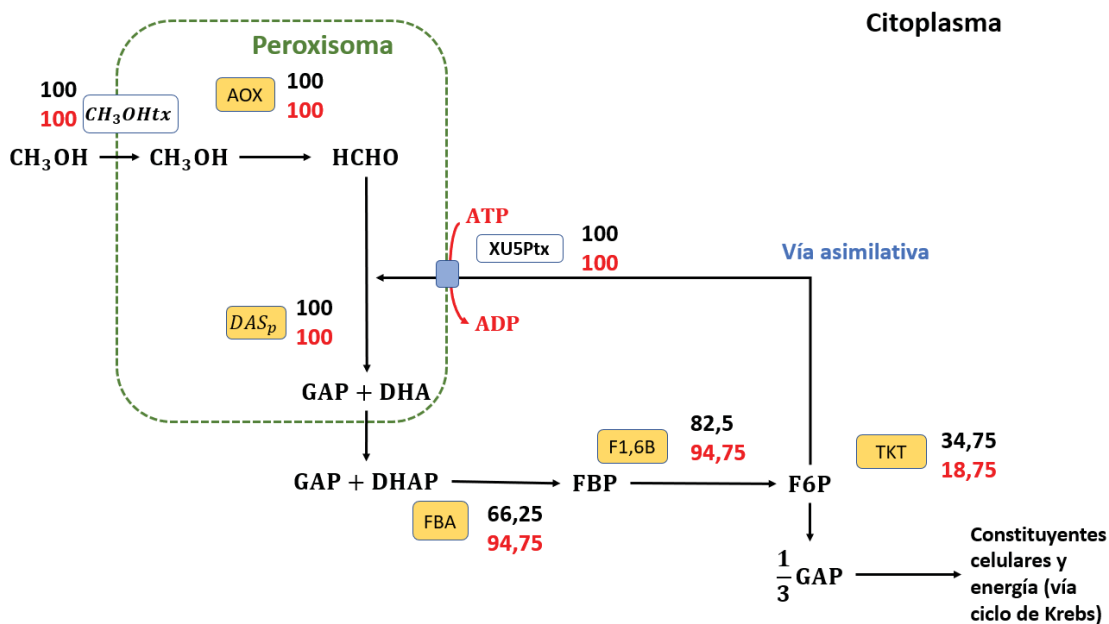


Figura 4. 4 Distribución de los flujos modelación de la estrategia 1 vs la estrategia 1 incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato para el consumo de metanol y glicerol. En azul se puede ver los nombres para las reacciones involucradas en el metabolismo del metanol del modelo iMT1026. Los valores en negro son el resultado de la modelación para la estrategia 1, mientras que los valores en color rojo son los valores resultantes de la modelación de la estrategia agregando el gasto energético para el ingreso de la XU5P. El valor absoluto corresponde a 4 [mmol/gDCW*h] de metanol.

En la Tabla 4.7 se hace una comparación para los valores de velocidad de crecimiento, consumo específico de oxígeno, amonio y producción de dióxido de carbono. En la última columna (Δ) se observa como varía la estrategia 1 agregando el consumo de Xu5P para transportarse al peroxisoma.

Tabla 4. 7 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT1026 de la estrategia 2 vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma para consumo de metanol y glicerol.

Variables	Estrategia 1	Estrategia 1ATP	Unidad	$\Delta\%$
μ	0,25	0,1988	[h ⁻¹]	20,48
consumo de NH4	1,434	1,139	[mmol/gDCW*h]	20,57
Consumo de O2	7,19	9,1	[mmol/gDCW*h]	26,56
Producción de CO2	4,03	5,88	[mmol/gDCW*h]	45,91
% de flujo por vía disimilativa	-	-	[%]	-
% de flujo por vía asimilativa	100	100	[%]	0

Haciendo una comparativa entre ambas estrategias, al realizar la modificación, el valor de μ disminuye un 20,5%.

Estrategia 2 vs Estrategia 2 con gasto energético para transporte de xilulosa-5-fosfato

La estrategia 2 se refiere al uso del modelo iMT1026 expresando la enzima dihidroxiacetona sintasa peroxisomal (DAS) en el citosol. El análisis se hace comparando la estrategia 2 y su variación considerando el gasto energético para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato entrando al peroxisoma. La distribución de los flujos se puede observar en la Figura 4.5.

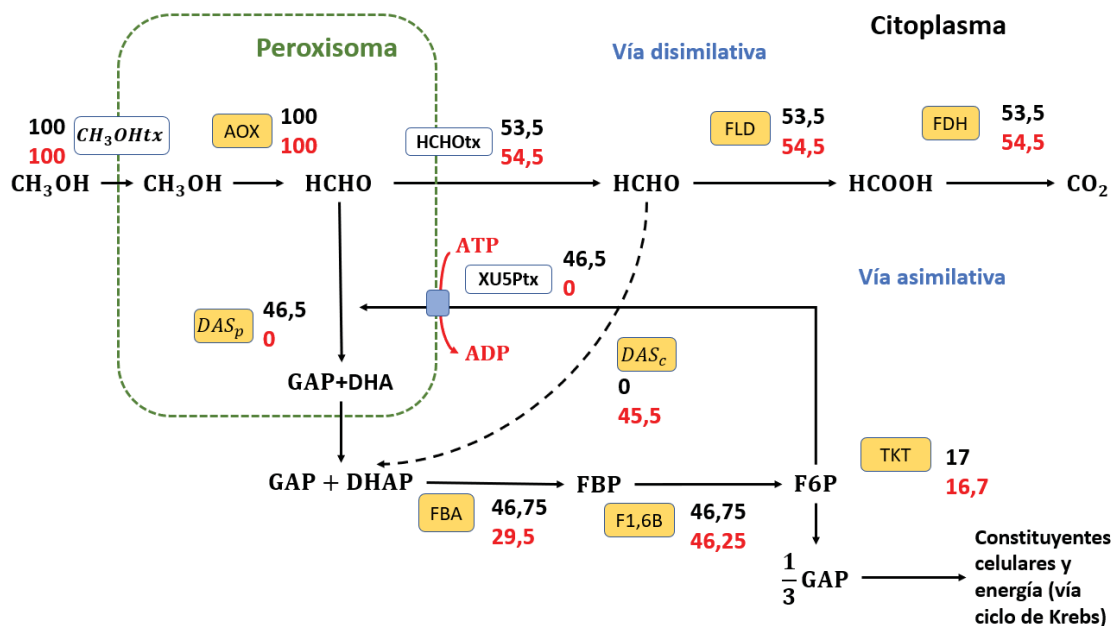


Figura 4. 5 Distribución de los flujos modelación de la estrategia 2 vs la estrategia 2 incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato para el consumo de metanol y glicerol. En azul se puede ver los nombres para las reacciones involucradas en el metabolismo del metanol del modelo iMT1026. Los valores en negro son el resultado de la modelación para la estrategia 2, mientras que los valores en color rojo son los valores resultantes de la modelación de la estrategia agregando el gasto energético para el ingreso de la XU5P. El valor absoluto corresponde a 4 [mmol/gDCW*h] de metanol.

Los valores para velocidad de crecimiento, consumo específico de oxígeno, amonio y producción de dióxido de carbono se puede encontrar en la Tabla 4.8. En la última columna(Δ) se observa como varía la estrategia 2 agregando este cambio.

Tabla 4. 8 Resultados de flujos en modelación del modelo de iMT1026 sin cambios vs el mismo modelo agregando el gasto de ATP al ingreso de xilulosa-5-fosfato al peroxisoma para consumo de metanol y glicerol.

Variables	Estrategia 2	Estrategia 2 ATP	Unidad	$\Delta\%$
μ	0,2527	0,2527	[h ⁻¹]	0,00
consumo de NH4	1,449	1,449	[mmol/gDCW*h]	0,00
Consumo de O2	7,1	7,1	[mmol/gDCW*h]	0,00
Producción de CO2	3,94	3,94	[mmol/gDCW*h]	0,00
% de flujo por vía disimilativa	53,5	54,5	[%]	1,87
% de flujo por vía asimilativa	46,5	45,5	[%]	2,15

Considerando las modificaciones tanto al control como a las distintas estrategias se obtiene la Tabla 4.9. Recordar que las estrategias 3 y 4 no sufren modificaciones debido a que la XU5P no debe entrar al peroxisoma.

Tabla 4. 9 Tabla resumen de las distintas estrategias considerando el gasto energético para consumo de metanol y glicerol como fuente de carbono.

Variables	Control	Estrategia	Estrategia	Estrategia	Estrategia	Unidad
	ATP	1 ATP*	2 ATP**	3***	4****	
μ	0,2494	0,1988	0,2527	0,2527	0,25	[h ⁻¹]
consumo de NH ₄	1,429	1,139	1,449	1,449	1,434	[mmol/gDCW*h]
Consumo de O ₂	7,22	9,1	7,1	7,1	7,19	[mmol/gDCW*h]
Producción de CO ₂	4,068	5,88	3,94	3,94	4,03	[mmol/gDCW*h]
% de flujo por vía disimilativa	75,5	-	54,5	53,5	-	[%]
% de flujo por vía asimilativa	24,5	100	45,5	46,5	100	[%]

*(FLD⁻ DAS_p⁺ DAS_c⁻)

** (FLD⁺ DAS_p⁺ DAS_c⁺)

*** (FLD⁺ DAS_p⁻ DAS_c⁺)

*** (FLD⁻ DAS_p⁻ DAS_c⁺)

4.3 EVALUACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES EN *P. PASTORIS* UTILIZANDO EL MODELO iMT1026

4.3.1 Estimación de μ utilizando datos experimentales a distintas velocidades de agitación

Para esta modelación se busca llegar al valor experimental de velocidad de crecimiento específico ($\mu=0,05$ [h⁻¹]), para esto se define a μ como función objetivo, fijando los valores de consumo específico de metanol, glicerol y oxígeno, a partir de los datos presentados en la tabla 4.10.

Tabla 4. 10 Resultados experimentales de consumo específico de Metanol, glicerol y O_2 (tesis de doctorado Christian Canales Valenzuela). (Canales, 2015)

Velocidad de agitación [rpm]	DOT [%]	qO2 [mmol/gDCW*h]	qMet [mmol /gDCW*h]	qGlyc [mmol/ gDCW*h]
500	2	3,411	2,438	2,120
550	3	2,986	3,063	1,833
600	5	2,88	3,969	1,449
650	12	3,137	4,031	1,282
700	25	3,125	3,906	1,190

Los resultados de la modelación a distintas velocidades de agitación se observan en la Tabla 4.11, además de la diferencia entre el valor experimental y los de la modelación.

Tabla 4. 11 Velocidad de crecimiento específico experimental vs simulación a distintas velocidades de agitación.

Velocidad de agitación [rpm]	$\mu[h^{-1}]$ Experimental	$\mu[h^{-1}]$ Simulación	$\Delta\%$
500	0,05	0,0972	94,4
550	0,05	0,0539	7,8
600	0,05	0,018	64
650	0,05	0,028	44
700	0,05	0,03	40

Como se puede apreciar en la Tabla 4.11, es posible darse cuenta que la simulación entrega valores alejados a los datos obtenidos de valores experimentales a las distintas velocidades de agitación. Entre los valores de salida en el modelo iMT1026 es necesario recalcar que la simulación arroja valores de producción de etanol, mientras que experimentalmente, el etanol no se expresa. Los valores de producción de etanol se observan en la Tabla 4.12. mientras que en la Figura 4.6 se ve la relación que tiene la producción de etanol, con la velocidad de crecimiento específico.

Tabla 4. 12 Producción de etanol y velocidad de crecimiento vs velocidad de agitación, obtenidos en la simulación.

Velocidad de agitación [rpm]	Producción de etanol [mmol/gDCW*h]	μ [h ⁻¹]
500	1,35	0,0972
550	2	0,0539
600	2,48	0,018
650	2,11	0,028
700	1,91	0,03

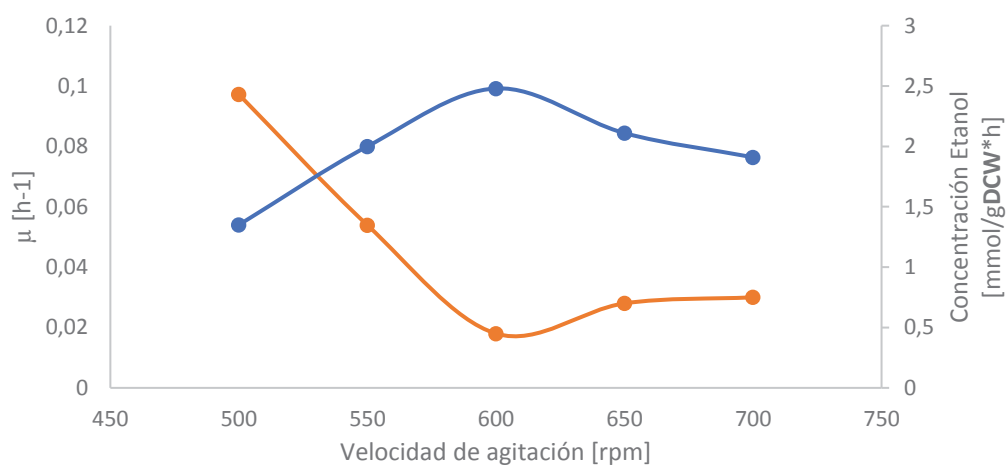


Figura 4. 6 Velocidad de crecimiento y producción de etanol vs la velocidad de agitación. En color anaranjado se observa la velocidad de crecimiento mientras que en azul es posible ver la producción de etanol.

Relación de la distribución de los flujos sobre el crecimiento de *P. pastoris*

Usando el software MATLAB, con su TOOLBOX COBRA, se rastreó el valor asignado a cada reacción de la ruta del metanol, de manera de comparar como afecta esta distribución a la velocidad de crecimiento específica. Los valores se observan en la Tabla 4.13.

Tabla 4. 13 Distribución del flujo en las rutas asimilativa y disimilativa.

Agitación [rpm]	μ [h ⁻¹]	Consumo de metanol [mmol/gDCW*h]	% ruta disimilativa	% ruta asimilativa
500	0,0972	2,438	20	80
550	0,0539	3,063	8,75	91,25
600	0,018	3,969	2,5	97,5
650	0,028	4,031	7,75	92,25
700	0,03	3,906	9,95	90,05

A diferencia de lo pensado, en la Tabla 4.13 se observa que cuanto mayor es el flujo hacia la ruta asimilativa, el comportamiento de la velocidad de crecimiento específico es menor. En la Figura 4.7 es posible observar la relación estrecha que hay entre el crecimiento y la distribución de los flujos.

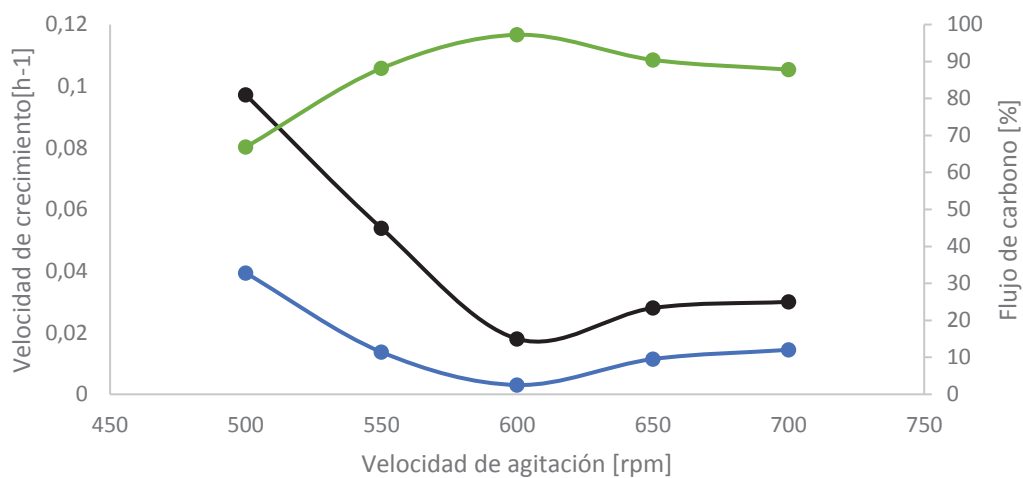


Figura 4. 7 Relación de la velocidad de crecimiento vs el porcentaje de distribución de flujos. En color negro es posible ver la velocidad de crecimiento para *P.pastoris*, en verde es posible ver el porcentaje de flujo de metanol que se distribuye hacia la vía asimilativa a cada velocidad de agitación, y en azul el porcentaje de flujo que distribuye hacia la vía disimilativa.

4.3.2.- Modelación de consumo de oxígeno y Producción de proteína ROL

Modelación consumo de oxígeno

Para la realización de este cálculo, se busca llegar al mismo valor de μ que la medida experimentalmente ($\mu=0,05$ [h^{-1}]), se fija como función objetivo la velocidad de crecimiento específica. Los valores de consumo específico de metanol y glicerol se fijan según los valores experimentales de la Tabla 4.10, de acuerdo a la velocidad de agitación correspondiente, probando con distintos valores de consumo específico de oxígeno hasta llegar a un valor similar al μ experimental. En la Tabla 4.14. se presentan los valores resultantes de esta modelación y en la Figura 4.8 se ve gráficamente la diferencia en el comportamiento de las curvas de consumo de oxígeno experimental y simulada.

Tabla 4. 14 Consumo específico de oxígeno experimental vs simulado, para obtener un valor $\mu=0,05$ h^{-1} .

Velocidad de agitación [rpm]	μ [h-1] Simulación	qO2 experimental [mmol/gDCW*h]	qO2 Simulación [mmol/ gDCW*h]	Δ qO2
500	0,0507	3,411	2,530	25,83%
550	0,0504	2,986	2,920	2,21%
600	0,0504	2,88	3,490	21,18%
650	0,0504	3,137	3,550	13,17%
700	0,0502	3,125	3,490	11,68%

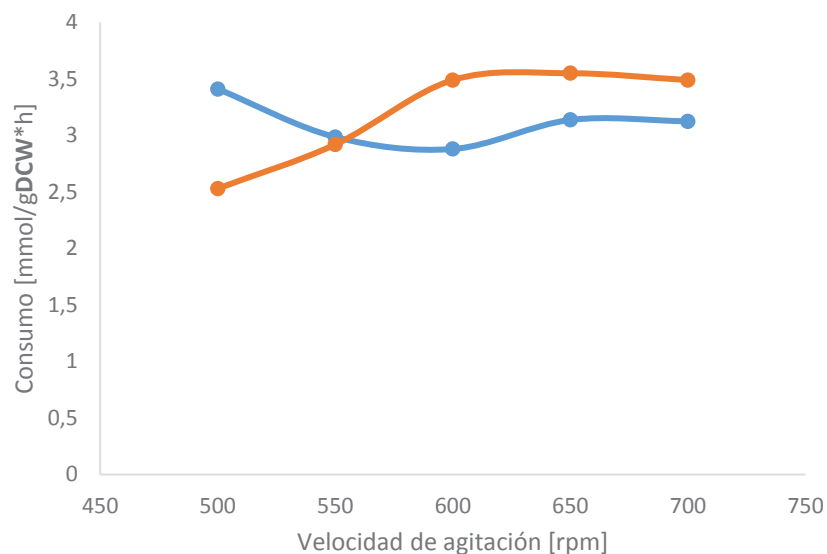


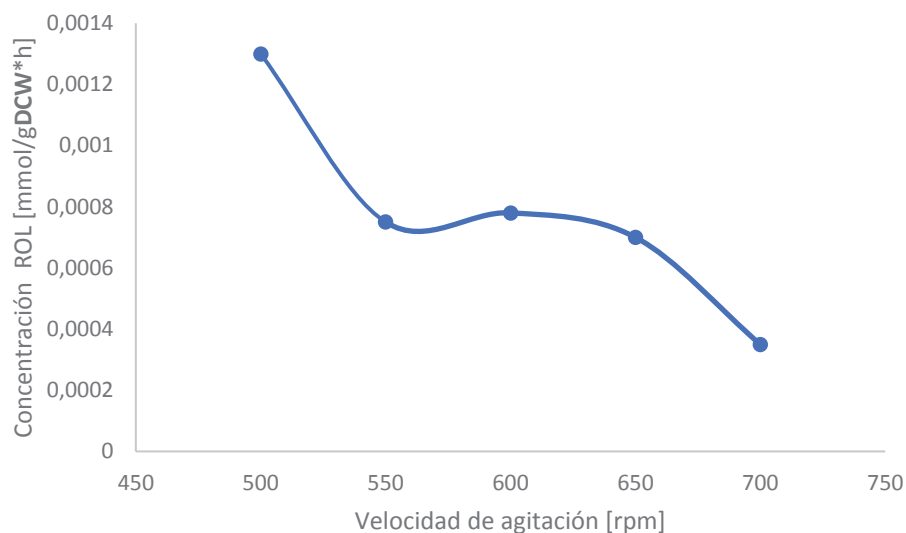
Figura 4. 8 Diferencia entre los datos experimentales de consumo de oxígeno y los de la modelación ($\mu=0,05h^{-1}$). En color azul se observa los valores experimentales de consumo específico de oxígeno y en color anaranjado se ve los valores resultantes de la modelación.

Producción de proteína ROL

Para realizar este cálculo, la función objetivo es la producción de la proteína ROL, se fijan los valores obtenidos de μ y consumo específico de oxígeno de la Tabla 4.14, y se fijan los valores de consumo de metanol y glicerol de los datos experimentales. En la Tabla 4.15 se presentan los valores resultantes de la modelación. Nuevamente se puede observar una producción de etanol de la que no se tiene evidencia experimentalmente. En la Figura 4.9 se observa el comportamiento de la producción de proteína ROL para las distintas velocidades de agitación.

Tabla 4. 15 Producción de proteína ROL, modelación $\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$

Velocidad de agitación [rpm]	q Met [mmol /gDCW*h]	q Glyc [mmol /gDCW*h]	O ₂ Modelación [mmol/gDCW*h]	u [h-1] Modelación	Producción ROL [mmol/gDC W*h]	Producción etanol [mmol/gDC W*h]
500	2,438	2,12	2,53	0,0507	0,00130	2,2
550	3,063	1,833	2,92	0,0504	0,00075	2,06
600	3,969	1,449	3,49	0,0504	0,00078	1,88
650	4,031	1,282	3,55	0,0504	0,00070	1,69
700	3,906	1,19	3,49	0,0502	0,00035	1,55

Figura 4. 9 Producción de proteína ROL a distintas velocidades de agitación. $\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$

Usando el software MATLAB, con su TOOLBOX COBRA, se rastreó el valor asignado a cada reacción de la ruta del metanol, de manera de comparar como afecta esta distribución a la producción de la proteína ROL. Los valores se observan en la Tabla 4.16.

Tabla 4. 16 Distribución de flujos para distintas velocidades de agitación cuando se produce ROL. $\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$.

Velocidad de agitación [rpm]	% de flujo por vía disimilativa	% de flujo por vía asimilativa	Producción ROL [mmol/gDCW*h]
500	3,2	96,8	0,0013
550	5,87	94,13	0,00075
600	12,34	87,66	0,00078
650	14,88	85,12	0,0007
700	16,64	83,36	0,00035

En la Figura 4.10 se puede observar cómo se distribuye el flujo de carbono en las rutas asimilativa y disimilativa, y como estas influyen en la producción de proteína ROL a distintas velocidades de agitación. Los resultados indican que cuanto mayor es la velocidad de agitación, menor es la producción de proteína ROL y el porcentaje de flujo de carbono que va por la ruta disimilativa.

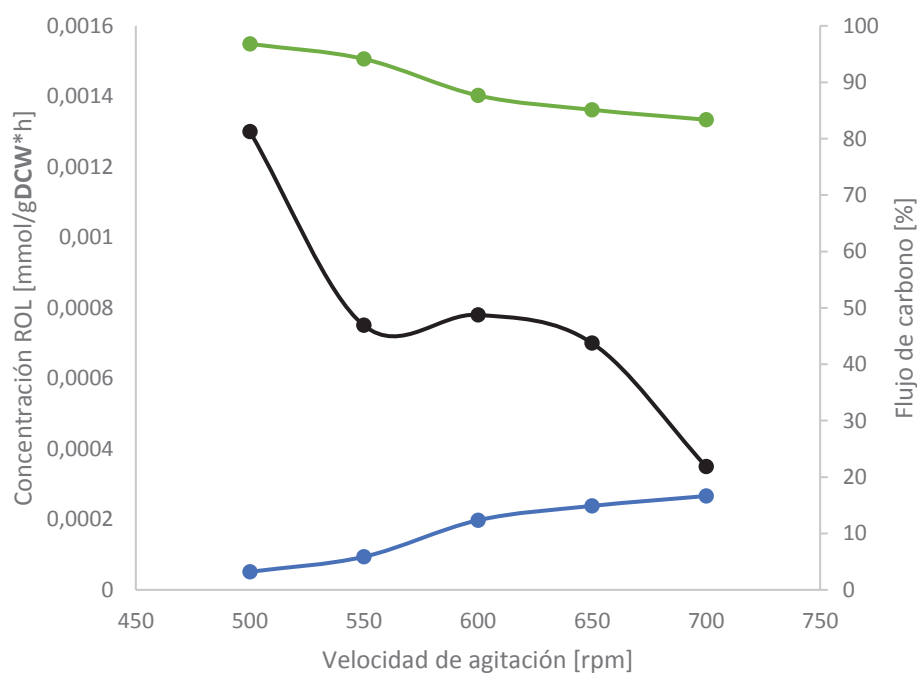


Figura 4. 10 Relación de Producción de ROL vs el porcentaje de distribución de flujos. En color negro es posible ver la producción de proteína ROL, en verde es posible ver el porcentaje de flujo de metanol que se distribuye hacia la vía asimilativa a cada velocidad de agitación, y en azul el porcentaje de flujo que distribuye hacia la vía disimilativa.

4.3.3 Evaluación de las condiciones operacionales ocupando el modelo modificado con el gasto energético para el transporte de la xilulosa-5-fosfato dentro del peroxisoma.

Para la realización de este cálculo, se busca llegar al mismo valor de μ que la medida experimentalmente ($\mu=0,05h^{-1}$), se fija como función objetivo la velocidad de crecimiento específica. Los valores de consumo específico de metanol y glicerol se fijan según los valores experimentales de la Tabla 4.10, de acuerdo a la velocidad de agitación correspondiente, probando con distintos valores de consumo específico de oxígeno hasta llegar a un valor similar al μ experimental. En la Tabla 4.17 se presentan los valores resultantes de esta modelación que incluye el consumo de ATP para el transporte de Xu5P al peroxisoma.

Tabla 4. 17 Consumo de oxígeno simulado, para llegar a la velocidad de crecimiento experimental considerando el gasto energético en el transporte de peroxisomal de xilulosa-5-fosfato. $\mu=0,05 h^{-1}$.

Velocidad de agitación [rpm]	q Met [mmol /gDCW*h]	q Glyc [mmol/ gDCW*h]	O ₂ Modelación [mmol/ gDCW*h]	μ [h-1] calculado	Producción Etanol [mmol/gDCW*h]
500	2,438	2,12	2,89	0,0505	2,102
550	3,063	1,833	3,42	0,0506	1,9
600	3,969	1,449	4,2	0,0503	1,65
650	4,031	1,282	4,27	0,0503	1,46
700	3,906	1,19	4,18	0,0504	1,32

De los datos obtenidos de la Tabla 4.17, se observa producción de etanol, lo que no se condice con los datos experimentales. También se puede observar una gran diferencia entre los valores de consumo de oxígeno experimental y el modelado. La diferencia entre los valores de consumo específico de O₂ se registra en la Tabla 4.18.

Tabla 4. 18 Consumo específico de oxígeno experimental vs simulación (Considerando gasto de ATP para transportar Xu5P).

O ₂ experimental [mmol/gDCW*h]	O ₂ Modelación [mmol/ gDCW*h]	Δ%
3,411	2,89	15,27
2,986	3,42	14,53
2,88	4,2	45,83
3,137	4,27	36,12
3,125	4,18	33,76

La diferencia entre los valores mostrados en la tabla 4.18 se observa gráficamente en la Figura 4.11.

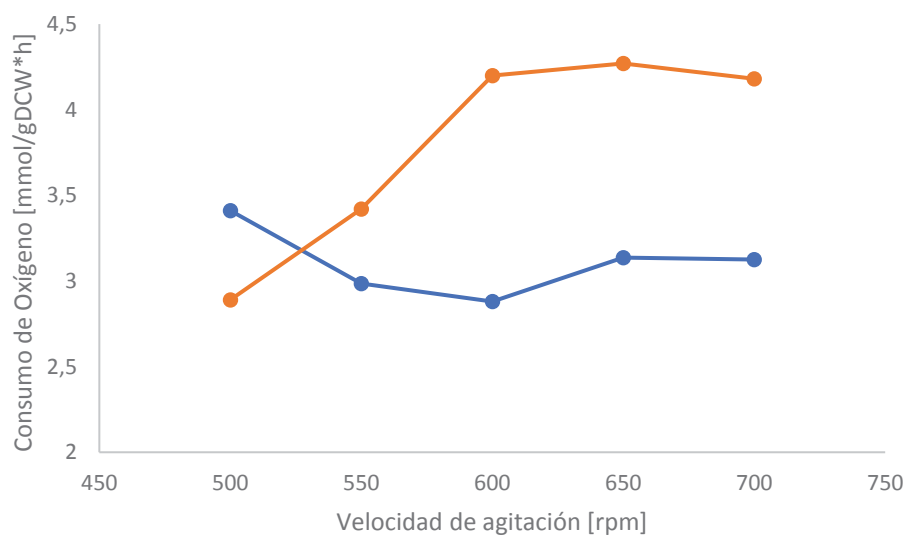


Figura 4. 11 Diferencia entre la medición experimental oxígeno y la modelación ($\mu=0,05h^{-1}$) (Considerando gasto de ATP para transportar Xu5P). En color azul se observa los valores experimentales de consumo específico de oxígeno y en color anaranjado se ve los valores resultantes de la modelación.

Producción de proteína ROL

Para realizar este cálculo, la función objetivo es la producción de la proteína ROL, se fijan los valores velocidad de crecimiento específico ($\mu = 0,05[h^{-1}]$) y consumo específico de oxígeno de la Tabla 4.18, y se fijan los valores de consumo de metanol y glicerol de los datos experimentales. En la tabla 4.19 se presentan los valores resultantes de la modelación. Nuevamente se puede observar una producción de etanol de la que no se tiene evidencia experimentalmente.

Tabla 4. 19 Modelación de la producción de proteína ROL considerando los valores de consumo específico obtenidos por el tanteo considerando el gasto energético en el transporte de peroxisomal de xilulosa 5 fosfato.
 $\mu = 0,05 h^{-1}$

Velocidad de agitación [rpm]	q Met [mmol /gDCW*h]	q Glyc [mmol/ gDCW*h]	O2 Modelación [mmol/ gDCW*h]	u [h-1] calculado	Producción ROL [mmol/gDCW*h]	Producción etanol [mmol/gDCW*h]
500	2,438	2,12	2,89	0,05	0,00088	2,095
550	3,063	1,833	3,42	0,05	0,001	2,065
600	3,969	1,449	4,2	0,05	0,0005	1,88
650	4,031	1,282	4,27	0,05	0,00054	1,69
700	3,906	1,19	4,18	0,05	0,0007	1,55

Usando el software MATLAB, con su TOOLBOX COBRA, se rastreó el valor asignado a cada reacción de la ruta del metanol, de manera de comparar como afecta esta distribución a la producción de proteína ROL. Los valores se observan en la Tabla 4.20.

Tabla 4. 20 Distribución de flujos para distintas velocidades de agitación (Considerando gasto de ATP para transportar Xu5P) $\mu=0,05 \text{ h}^{-1}$

Velocidad de agitación [rpm]	% de flujo por vía disimilativa	% de flujo por vía asimilativa	Producción ROL [mmol/gDCW*h]
500	85,73	14,27	0,00088
550	88,48	11,52	0,001
600	91,21	8,79	0,0005
650	91,29	8,71	0,00054
700	91,14	8,86	0,0007

En la Figura 4.12 se puede observar cómo se distribuye el flujo de carbono en las rutas asimilativa y disimilativa, y como estas influyen en la producción de proteína ROL a distintas velocidades de agitación. Los resultados indican que cuando se considera el gasto energético involucrado para el transporte de Xu5P hacia el interior del peroxisoma, la distribución de flujo de carbono es lo opuesto al visto en el punto 4.3.2 (sin considerar gasto energético para el transporte de Xu5P). En esta oportunidad entre el 85% al 91% del flujo carbono se dirige hacia la vía disimilativa.

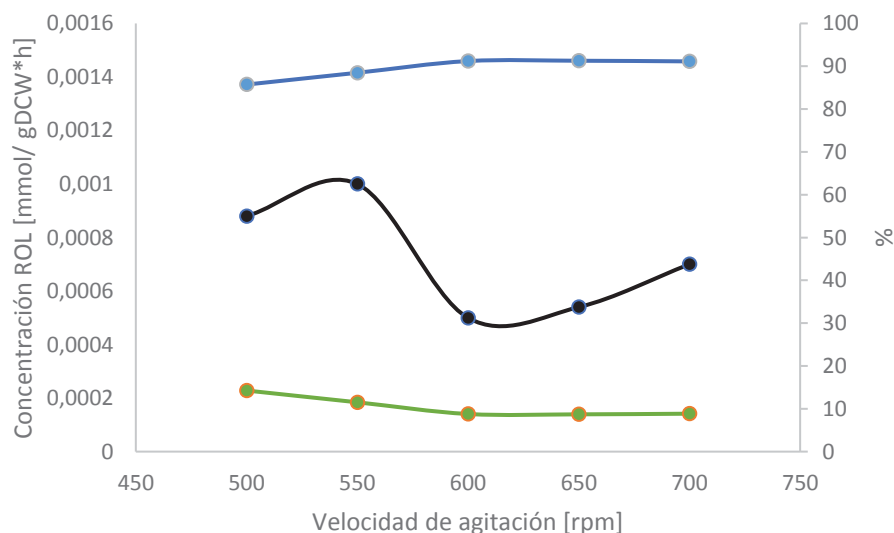


Figura 4. 12 Relación de Producción de ROL vs el porcentaje de distribución de flujos (Considerando gasto de ATP para transportar Xu5P). En color negro es posible ver la producción de proteína ROL, en verde es posible ver el porcentaje de flujo de metanol que se distribuye hacia la vía asimilativa a cada velocidad de agitación, y en azul el porcentaje de flujo que distribuye hacia la vía disimilativa.

A pesar de disminuir drásticamente el porcentaje de flujo de carbono que se dirige hacia la vía disimilativa, se observa en la Tabla 4.21 que la producción de proteína ROL no disminuye significativamente como podría pensarse si una gran parte del porcentaje de carbono se dirige hacia la formación de CO₂.

Tabla 4. 21 Comparativa producción proteína ROL (Punto 4.3.2 vs 4.3.3)

Producción ROL [mmol/gDCW*h]	Producción ROL [mmol/gDCW*h] Gasto ATP	Δ
0,00130	0,00088	32,3
0,00075	0,00100	33,3
0,00078	0,00050	35,9
0,00070	0,00054	22,9
0,00035	0,00070	100,0

5.1.1. Uso de metanol como única fuente de carbono y energía

En la Tabla 4.4, se muestra la comparación de las distintas estrategias considerando el consumo de ATP para el transporte de la Xu5P, las estrategias E2, E3 y E4 presentan mejoras respecto del control para μ , mientras que la estrategia E1 no pudo ser simulada.

Las estrategias E2 y E3 resultaron ser las mejores opciones, en donde se produce un aumento de casi nueve veces el valor del control para el porcentaje de flujo hacia la vía asimilativa.

Problemas para simular la Estrategia $E1(FLD^- DAS_p^+ DAS_c^-)$ considerando gasto de ATP para el transporte de la Xu5P

Para la simulación de esta estrategia, el programa no fue capaz de funcionar siendo metanol la única fuente de carbono y energía. Cuando el metanol es usado como única fuente de carbono y energía, la célula necesita un mayor estado energético para poder asimilarlo (Van der Klei et al., 2006) en relación a otras fuentes de carbono.

Se debe considerar que la idea de la estrategia es que el poder reductor perdido al quitar la vía disimilativa podría generarse en el ciclo de Krebs. Se propone que la energía necesaria para llevar el carbono hasta este ciclo no sería suficiente al usar metanol como única fuente de carbono y energía. Según Van der Klei cuando el estado de energía es bajo, se reduce el ingreso de la Xu5P para reaccionar con DAS, generando una acumulación de formaldehído en el peroxisoma, el que posteriormente difunde al citosol. La difusión de este metabolito al citosol, donde se une al glutatión, generaría un problema, ya que la enzima formaldehído deshidrogenasa, encargada de transformar el formaldehído en formato, no se encuentra disponible para reaccionar, generando una acumulación tóxica para la célula.

5.1.2. Uso de metanol y glicerol como fuentes de carbono y energía

En la Tabla 4.9, se muestra la comparación de las distintas estrategias considerando el consumo de ATP para el transporte de la Xu5P, las estrategias E2, E3 y E4 presentan mejoras respecto del control para μ , mientras que la estrategia E1 presenta una disminución en su velocidad de crecimiento específico.

Las estrategias E2 y E3 resultaron ser las mejores opciones, en donde se produce un aumento del 85% del valor arrojado por el control para el porcentaje de flujo hacia la vía asimilativa.

La E1 considerando el gasto de consumo de ATP para el transporte de Xu5P resultó de manera negativa disminuyendo la velocidad de crecimiento específico.

5.1.3. Consideraciones para la estrategia E2 (FLD⁺DAS_p⁺DAS_c⁺)

Acerca de la distribución de flujos para las estrategias E2 (que agregan la enzima DAS trabajando en el citosol) con y sin consideración de gasto energético para la incorporación de Xu5P al peroxisoma, los flujos de carbono resultantes de la simulación parecen no ser del todo ciertos debido a los valores de flujos de carbono que se aprecian en la Figura 4.2, en la cual se puede ver la diferencia de los flujos para la estrategia E2 (FLD⁺DAS_p⁺DAS_c⁺). Cuando no hay gasto energético, la enzima DAS citosólica no presenta funcionalidad ya que todo el flujo que se direcciona a la vía asimilativa pasa por la enzima DAS peroxisomal. Lo mostrado por el modelo no representa lo descrito en bibliografía, ya que el formaldehído difunde hacia el citosol, acumulándose y generando condiciones de estrés nutricional hasta que se una al glutatión, la función de esta enzima DAS citosólica es encontrarse ahí para evitar esta acumulación de formaldehído y llevar el flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs con la finalidad de que el carbono pase a formar constituyentes celulares o para la producción de metabolitos. Cuando se realiza la modificación incluyendo el gasto energético para el ingreso de la xilulosa-5-fosfato como se observa nuevamente en la Figura 4.2, la enzima DAS peroxisomal no tiene funcionamiento, siendo la enzima DAS citosólica la que hace todo el trabajo. Es discutible esta distribución ya que el formaldehído

difunde por la membrana peroxisomal por difusión simple, desplazándose por gradiente de concentración, esto generara eventualmente la acumulación de formaldehído en el peroxisoma, volviéndose a presentar el problema de la acumulación de intermediarios tóxicos.

5.2. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES OPERACIONALES

Para discutir los valores obtenidos por la modelación, primero debe hablarse de la metodología descrita para medir el consumo específico de metanol, glicerol y oxígeno.

5.2.1. Medición de Metanol y Glicerol

En cuanto al consumo de metanol se realizó la medición por cromatografía gaseosa (GC). Para su realización se prepara una curva de calibrado con diferentes concentraciones de metanol con 0.5 g/L de etanol como estándar interno procediendo a filtrar e inyectar. La concentración de metanol se determina de la relación entre áreas $AMet/AEtan$ y concentración de metanol. Para la evaluación de los datos de consumo a distintas velocidades, en los resultados expuestos en el punto 4.3, el modelo arroja resultados de producción de etanol que no son descritos en el trabajo experimental de Christian Canales, esto puede deberse a que ese estándar interno de etanol produzca una especie camuflaje para el etanol producido por la simulación. Otra explicación para lo sucedido se ve en estudios comparativos de nuevos modelos metabólicos a escala genómica, Rui Ye en su estudio “Comprehensive reconstruction and evaluation of *Pichia pastoris* genome-scale metabolic model that accounts for 1243 ORFs”, para la simulación de datos de carnicer, los resultados mostraron que iRY1243 e iMT1026 podrían predecir la tasa de crecimiento específico de *P. pastoris* y la tasa de consumo específico de CO_2 , sin embargo, el modelo iMT1026 predijo algunos subproductos no razonables (ácido cítrico, etanol, entre otros).

Para el consumo de glicerol, este fue medido por HPLC, siendo este método muy exacto por lo que las posibilidades de error son mínimas.

5.2.2. Medición de consumo de oxígeno

La medición del consumo de oxígeno se realizó de forma indirecta, a través del cálculo del kLa determinado por el método de desgasificación. El método se basa en la medición del cambio de nivel de O_2 disuelto con un electrodo durante un período sin aireación y con agitación mínima. Este método al ser de medición indirecto puede llevar a errores, lo que puede explicar los valores y el comportamiento tan distinto que se aprecia entre los valores de consumo de oxígeno experimentales y los arrojados por la modelación.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN

En base a la evidencia experimental obtenida durante el desarrollo de la investigación, las principales conclusiones son:

1. Se estableció un modelo metabólico a escala genómica iMT1026, para *P. pastoris*, el cual fue considerado como el más indicado al momento de llevar a cabo la parte experimental de este proyecto.
2. Se dispuso de distintas estrategias de modificaciones a nivel celular en el metabolismo de *P. pastoris*, planteándose 4 diferentes estrategias para modificar la distribución del flujo de carbono en la levadura, basado en información bibliográfica.
3. Se cuantificó el impacto de las modificaciones en la distribución del flujo de carbono realizadas in silico. La estrategia más conveniente entre las planteadas es la E2 ($FLD^+ DAS_P^+ DAS_C^+$), donde se considera agregar la enzima DAS en el citosol y mantener intactas las rutas del metabolismo del metanol para *P. pastoris*. Los resultados indican que mejora en un 38,5% para uso de metanol como única fuente de carbono y energía, y un 1,5% para metanol y glicerol como fuentes de carbono y energía, superando al control.

Se descarta utilizar la E1 ($FLD^- DAS_P^+ DAS_C^-$), ya que, al perder el poder oxidoreductor otorgado por el NADH generado por la vía disimilativa, la célula no posee la energía suficiente para metabolizar metanol como única fuente de carbono y energía. Considerando el uso de metanol y glicerol, también es una opción que debiese rechazarse, debido a que disminuye la velocidad de crecimiento específico.

4. Se logró realizar la modelación de la producción de la proteína recombinante lipasa de *Rhizopus Orizae*, donde la comparación de la simulación con los datos experimentales no fue posible debido a la diferencia en la expresión de la proteína.

5. Se estudiaron los efectos de las condiciones operacionales relacionadas con el consumo de oxígeno a distintas velocidades de agitación.

Se realizó una simulación del μ , con los datos experimentales de la Tabla 4.10, obteniendo valores distintos para μ simulado respecto del μ experimental, además como se observa en la Figura 4.7, a medida que aumenta el flujo de carbono a la vía asimilativa el valor de μ disminuye, lo que se contradice con la literatura. Luego se intentó igualar μ experimental con el simulado, cambiando los valores de consumo específico de oxígeno, fijando los valores de consumo específico de metanol y glicerol según los datos de la Tabla 4.10, donde los valores de consumo de oxígeno simulados y experimentales no presentan una relación. Finalmente se estudió la distribución del flujo de carbono para los datos experimentales de la Tabla 4.10, para ver su relación con la producción de ROL. Se puede concluir que cuando no se considera el consumo de ATP para transporte de Xu5P, a mayor porcentaje de carbono que va hacia la vía asimilativa mayor es la producción de proteína ROL, lo que es coherente de acuerdo a la literatura. Cuando se considera el consumo de ATP, se logra un óptimo de producción de ROL a 550 rpm, donde se observa que la ruta asimilativa disminuye 9 veces su valor mientras que la disimilativa aumenta en este mismo valor.

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES

7.1. USO DE NUEVOS MODELOS A ESCALA GENÓMICA

A medida que se desarrolló este proyecto, nuevos modelos metabólicos a escala genómica fueron desarrollados, por lo tanto, para seguir con las distintas estrategias planteadas que buscan una redistribución de flujos y la evaluación de condiciones operacionales, podrían ser utilizados los siguientes GSMM:

- iRY1254: Publicado posterior al modelo iMT1026, es un modelo consenso realizado a partir de PpaMbel1254, iPP668, iLC915 e iMT1026. Se investigó la utilización de distintas fuentes de carbono y nitrógeno. Los resultados mostraron ser similares a los del modelo utilizado en este trabajo, pero no predice algunos subproductos no razonables con datos experimentales como producción de ácido cítrico, etanol, entre otros.
- Kp.1.0: Este modelo anteriormente descrito en el punto 2.8.5, es un modelo consenso, generado a partir de PpaMbel1254, iPP668 e iLC915. Además, incorpora las reacciones del metabolismo de los esfingolípidos que fueron agregados en el modelo iMT1026. Los autores estimaron que Kp.1.0 es el modelo más completo entre los que se encontraban disponibles hasta su creación, considerando que iMT1026 V2.0 es un GSMM que no incorporó consistentemente las relaciones en la versión ejecutable del modelo cuando las reacciones son catalizadas por más de un producto génico.
- iMT1026 V3.0: Es el último modelo publicado, actualización del que se hizo en 2016. En él se analiza el rendimiento de *P.pastoris* creciendo en cultivos de quimiostato utilizando glicerol o metanol como fuente de carbono en un amplio rango de tasas de crecimiento. La composición de biomasa observada cambia en términos de contenido de proteína y ARN en función de la tasa de crecimiento, lo que respalda la hipótesis hecha por los autores. Para ambas fuentes de carbono, se observó un mayor contenido de proteína y ARN a mayores tasas de crecimiento (Tomàs-Gamisans, Ferrer & Albiol, 2017).

Con respecto a la relación de este modelo y los estudios realizados en este trabajo, esta nueva versión del modelo iMT1026, no considera el gasto de la xilulosa-5-fosfato, pero las condiciones para simular las capacidades de crecimiento en las fuentes de carbono metanol y glicerol han sido mejoradas considerablemente. En la figura 7.1 se observa gráficamente la mejora de las simulaciones en relación a los valores experimentales.

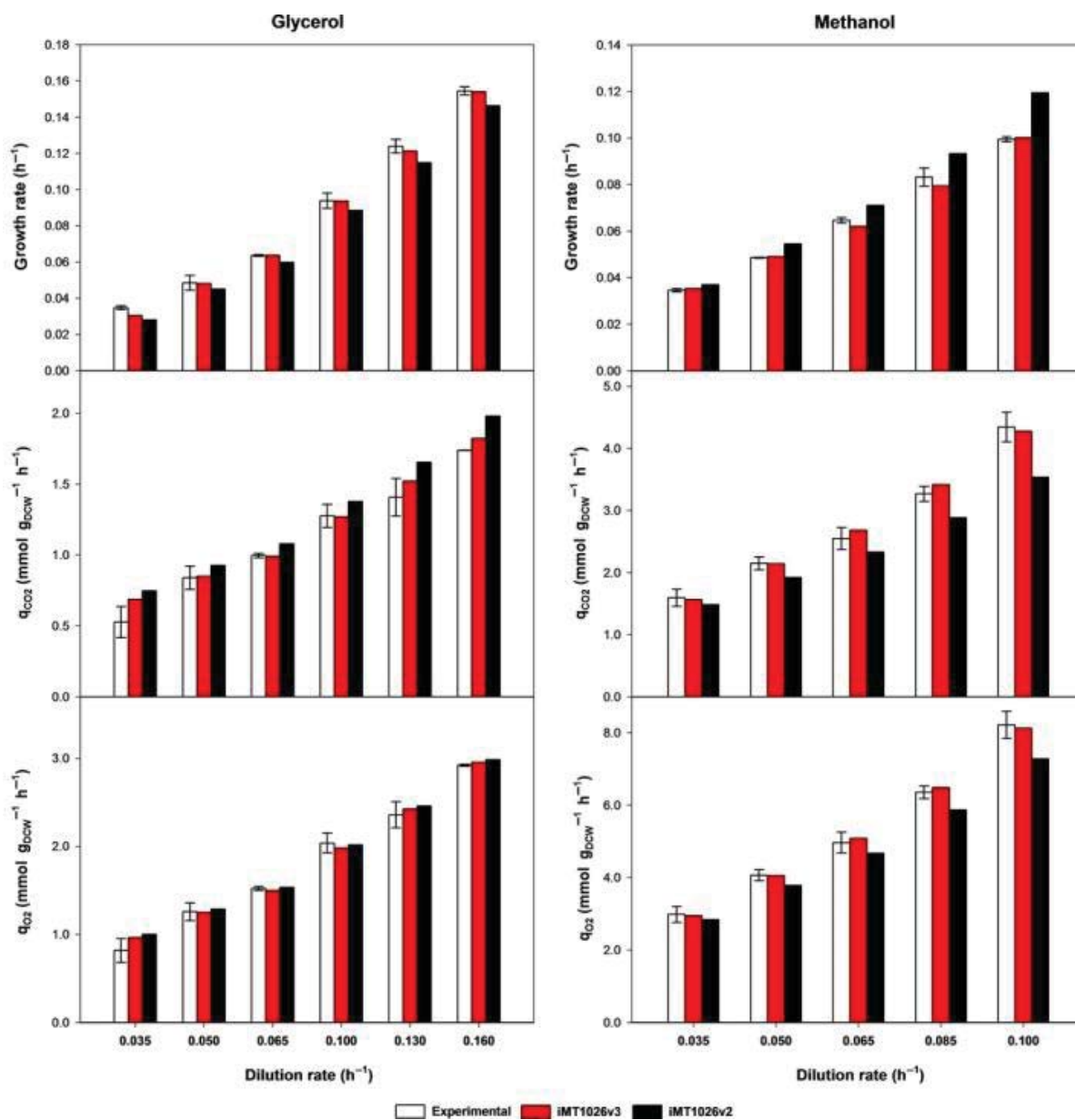


Figura 7. 1 Comparación de modelo iMT1026 versión 3.0 vs versión 2.0. En blanco se observan los valores experimentales, en rojo los valores predichos por la versión 3.0 y en negro los de la versión 2.0.

Al tener 3 nuevos modelos actualizados, podría evaluarse cuál es la mejor opción para la predicción de distintas estrategias de cultivos y análisis de datos experimentales.

7.2. MODELACIÓN DEL METABOLISMO DEL METANOL SEGÚN PROPUESTA DE RUßMAYER

Para esta recomendación se puede crear un modelo desde cero o modificar uno ya existente. En la propuesta de Rußmayer se propone que la vía completa de asimilación de metanol se localiza en los peroxisomas en lugar de emplear parte de la vía citosólica de los fosfatos de pentosa para la regeneración de xilulosa-5-fosfato. Este proceso de asimilación de C1 cíclico compartimentalizado denominado ciclo de xilosa-monofosfato se asemeja al principio del ciclo de Calvin y utiliza sedoheptulosa-1,7-bisfosfato como intermedio (Rußmayer et al., 2015).

7.3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN FUENTE DE NITRÓGENO Y VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ESPECÍFICO.

A base de la experiencia desarrollada en este trabajo, se desprende la estrecha relación que posee la fuente de nitrógeno con la velocidad de crecimiento específico en la modelación. De los datos experimentales expuestos en el capítulo 4.3 se obtiene la Figura 7.2 en donde se observa que ambas curvas tienen un comportamiento muy similar.

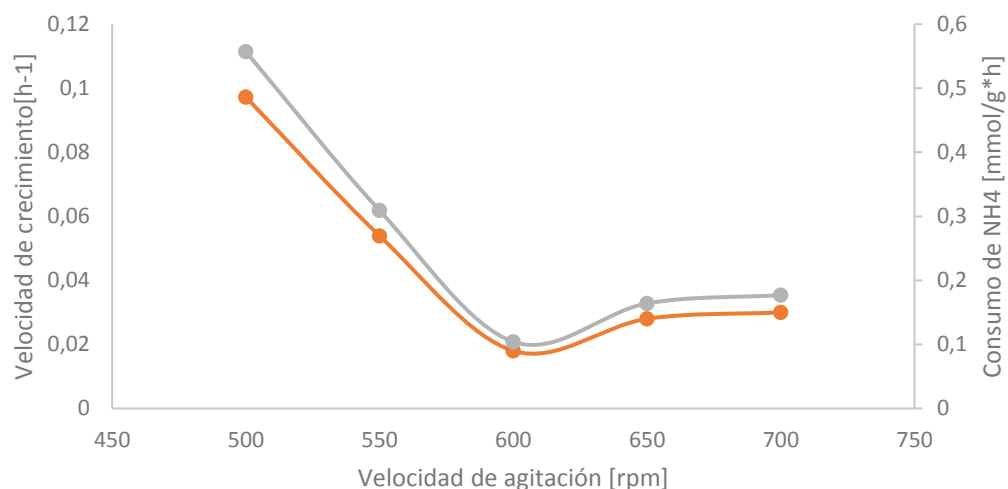


Figura 7. 2 Comportamiento de la velocidad de crecimiento específico y el consumo de ión amonio vs la velocidad de agitación. Modelación: En color anaranjado se puede apreciar la velocidad de crecimiento y en gris se puede apreciar la concentración de amonio que se consume a cada velocidad de agitación.

La fuente de nitrógeno utilizada en los medios de cultivo con *P. pastoris* es el hidróxido de amonio (NH₄OH), que además se utiliza para controlar el pH del cultivo. Son pocos los informes que relacionan la optimización de la adición de NH₄OH con el aumento de la producción de proteínas heterólogas (Yang et al., 2004).

Lo mostrado por el modelo puede ser una variable de estudio a considerar por lo visto en la Figura 7.2, sin embargo, en un trabajo realizado por Yang y colaboradores en el 2004, encontraron que la máxima producción de la huriidina recombinante se obtuvo con 0,4 mol/L de NH₄OH y que concentraciones superiores a esta ocasionan una disminución en los niveles de producción de la misma (Yang et al., 2004).

Las principales estrategias empleadas con el propósito de incrementar la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo consisten en la adición de fuentes de nitrógeno alternativas, tales como: sulfato de amonio, cas-aminoácidos, extracto de levadura o peptona. Así mismo, en estudios realizados por Sinha y colaboradores en el 2005 se corroboró que la adición de cas-aminoácidos al medio de cultivo puede ser empleado como fuente de nitrógeno adicional al hidróxido de amonio, y en la prevención de la degradación proteolítica del interferón-tau ovino (Sinha et al., 2005).

7.4. CREACIÓN DE UNA BIBLIOTECA VIRTUAL PARA TRABAJOS DE CULTIVOS IN SILICO

Como una recomendación para la Escuela de Ingeniería Bioquímica (EIB), sugeriría la creación de una biblioteca virtual donde se recopile información acerca de trabajos in silico. Dentro de la información que debiera encontrarse en esta biblioteca, podría considerarse: información relacionada con instalación y uso de los distintos tipos de softwares, modelos metabólicos publicados para los microorganismos más utilizados en investigación, modelos creados y modificados en la EIB, de manera de tener acceso a trabajos anteriormente realizados y generar una continuidad en la investigación.

Teniendo acceso a esta información, se podría retomar proyectos in silico, que pudieron verse truncados por el no desarrollo de ciertas tecnologías.

CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA

Buckholz, R. and Gleeson, M. (1991). Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Proteins. *Bio/Technology*, 9(11), pp.1067-1072.

Canales, C. (2015). Producción heteróloga de lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) con *Pichia pastoris* utilizando estrategia de inducción con mezcla de sustratos metanol-glicerol. Doctorado. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Caspeta, L., Shoaie, S., Agren, R., Nookaew, I. and Nielsen, J. (2012). Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and in-silico evaluation of their potentials. *BMC Systems Biology*, 6(1), p.24.

Cereghino, J. and Cregg, J. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), pp.45-66.

Cankorur-Cetinkaya, A., Dikicioglu, D., & Oliver, S. (2017). Metabolic modeling to identify engineering targets for *Komagataella phaffii*: The effect of biomass composition on gene target identification. *Biotechnology And Bioengineering*, 114(11), 2605-2615. doi: 10.1002/bit.26380

Cereghino G P, Cereghino J L, Ilgen C, Cregg J M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002; 13: 329–332.

Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H., Jahic, M. and Enfors, S. (2005). Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27(6), pp.399-406.

Chung, B., Selvarasu, S., Andrea, C., Ryu, J., Lee, H., Ahn, J., Lee, H. and Lee, D. (2010). Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement. *Microbial Cell Factories*, 9(1), p.50.

Clasquin MF, Melamud E, Singer A, Gooding JR, Xu X, Dong A, et al. Riboneogenesis in yeast. *Cell*. 2011;145:969–80.

Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb Cell Factories* 5:17.

Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J., Ferrer, P., Cregg, J. and Valero, F. (2005). Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116(4), pp.321-335.

Creeg J., K Madden. (1988). Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Devind Microbiol* 29, pp 23-42.

De Mot, R. In *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, ed. H. Verachtert & R. De Mot. Marcel Dekker. Inc., New York, 1990, pp. 1633223.

Di Lorenzo, M., Hidalgo, A., Haas, M. and Bornscheuer, U. (2005). Heterologous Production of Functional Forms of *Rhizopus oryzae* Lipase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp.8974-8977.

Dos Santos, M., Gombert, A., Christensen, B., Olsson, L. and Nielsen, J. (2003). Identification of In Vivo Enzyme Activities in the Cometabolism of Glucose and Acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by Using ¹³C-Labeled Substrates. *Eukaryotic Cell*, 2(3), pp.599-608.

Fickers P. (2014). *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 2 (3), pp 354-363.

Flores, C., Rodríguez, C., Petit, T. and Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), pp.507-529.

Gamboa R A, Marín L D, Martínez J A, Espitia C, Servín L, Valdez N A (2013). Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. *World J Microbiol Biotechnol.*; 29, pp 1421–1429.

Guillén, M., Benaiges, M. and Valero, F. (2011). Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase extract from *Rhizopus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* with a native extract. *Biochemical Engineering Journal*, 54(2), pp.117-123.

Gurobi.com. (2018). *Gurobi Optimizer Features & Benefits | Gurobi*. [online] Available at: <http://www.gurobi.com/products/features-benefits> [Accessed 12 April. 2018].

Hamilton S R, Cook W. J, Gomathinayagam S, Burnina I, Bukowski J, Hopkins D. (2013). Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris*. *Glycobiology.*; 23, pp 1192–1203.

Harber, W. M. Veenhuis, (1989). Metabolism of one-carbon compounds, In: *The Yeast*, ed. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Academic Press. 2nd edition. London. 3, 289-316.

Hartner F., A. Glieder. (2006). Review: Regulation of metanol utilisation pathway genes in yeast. *MicrobCellFact* 5(39), pp 1-21.

Heyland, J., Fu, J., Blank, L. and Schmid, A. (2011). Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), pp.1942-1953.

Invitrogen™ *Pichia* Expression Kit, original kit. (2018). Retrieved from <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K171001>

Jahic, M., Rotticci-Mulder, J., Martinelle, M., Hult, K. and Enfors, S. (2002). Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(6), pp.385-393.

Jungo, C., Urfer, J., Zocchi, A., Marison, I. and von Stockar, U. (2007). Optimisation of culture conditions with respect to biotin requirement for the production of recombinant avidin in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 127(4), pp.703-715.

Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, Y., Suga, K.I., 1998. Effect of methanol concentration on the production of human [beta] 2-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 482–487.

Khatri, N. and Hoffmann, F. (2006). Oxygen-limited control of methanol uptake for improved production of a single-chain antibody fragment with recombinant *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(3), pp.492-498.

Kurtzman, C.P. (1984). *Pichia Hansen*, In: The yeast a taxonomic study, eds. Kreger-van Rij, N.J.W. Elsevier Science Publishers. 3rd edition. pp.295-378. Amsterdam.

Lee, C., Lee, S., Jung, K., Katoh, S. and Lee, E. (2003). High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 38(8), pp.1147-1154.

Lehninger.2009. Glicolisis, gluconeogenesis y ruta de las pentosas fosfato. Nelson D. L., and M. M. Cox. Principios de bioquímica. 5th edition, pp.558-553.

Lim, H., Choi, S., Kim, K. and Jung, K. (2003). Dissolved-oxygen-stat controlling two variables for methanol induction of rGuamerin in *Pichia pastoris* and its application to repeated fed-batch. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(4), pp.342-348.

Lopes M, Oliveira C, Domingues L, Mota M, Belo I. (2014). Enhanced Heterologous Protein Production in *Pichia pastoris* Under Increased Air Pressure. *Biotechnol. Prog.* 30 (5), pp1-8

Ma, C., & Subramani, S. (2009). Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis. *IUBMB Life*, 61(7), 713-722. doi: 10.1002/iub.196

Mathworks.com. (2018). *MATLAB* - *MathWorks*. [online] Available at: <https://www.mathworks.com/products/matlab.html> [Accessed 6 April. 2018].

Mayson B E, Kilburn DG, Zamost B L, Raymond C K, Lesnicki G J. (2003). Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnol. Bioeng.*; 81, pp 291-298

Metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*, 6(9), pp.1290-1307.

Opencobra.github.io. (2018). *Flux Balance Analysis (FBA) — The COBRA Toolbox*. [online] Available at: <https://opencobra.github.io/cobratoolbox/latest/tutorials/tutorialFBA.html> [Accessed 20 June 2018].

Poutou, R., Quevedo, B., Córdoba, H., Sáenz, H. and Barrera, L. (2005). Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA*, 3(3), pp.75-87.

Rußmayer, H., Buchetics, M., Gruber, C., Valli, M., Grillitsch, K., Modarres, G., Guerrasio, R., Klavins, K., Neubauer, S., Drexler, H., Steiger, M., Troyer, C., Al Chalabi, A., Krebiehl, G., Sonntag, D., Zellnig, G., Daum, G., Graf, A., Altmann, F., Koellensperger, G., Hann, S., Sauer, M., Mattanovich, D. and Gasser, B. (2015). Systems-level organization of yeast methylotrophic lifestyle. *BMC Biology*, 13(1).

Santos de Jesus, S. (2008). ANÁLISIS CUANTITATIVO Y MODELIZACIÓN DEL METABOLISMO DE LA LEVADURA *Pichia pastoris*. Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma de Barcelona.

Sauer, M., Branduardi, P., Gasser, B., Valli, M., Maurer, M., Porro, D., & Mattanovich, D. (2018). Differential gene expression in recombinant *Pichia pastoris* analysed by heterologous DNA microarray hybridisation. *Microbial Cell Factories*, 1, 3-17.

Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R., Thiele, I., Orth, J., Feist, A., Zielinski, D., Bordbar, A., Lewis, N., Rahmanian, S., Kang, J., Hyduke, D. and Palsson, B. (2011). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*, 6(9), pp.1290-1307.

Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R., Thiele, I., Orth, J., Feist, A., Zielinski, D., Bordbar, A., Lewis, N., Rahmanian, S., Kang, J., Hyde, D. and Palsson, B. (2011). Quantitative prediction of cellular

Shimotohno, K. (2000). Hepatitis C virus and its pathogenesis. *Semin Cancer Biol* 10: 233- 240

Sinha J, Plantz B A, Inan M, Meagher M M. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005; 89: 102–12.

Sohn, S., Graf, A., Kim, T., Gasser, B., Maurer, M., Ferrer, P., Mattanovich, D. and Lee, S. (2010). Genome-scale metabolic model of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its use for in silico analysis of heterologous protein production. *Biotechnology Journal*, 5(7), pp.705-715.

Steffan, J. and McAlister-Henn, L. (1992). Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 267, pp.24708-24715.

Stratton J, Chiruvolu V, Meagher M. (1998). High cell-density fermentation. In: *Pichia protocols: Methods in molecular biology*, Higgins DR, Creeg JM., Totowa, New Jersey: Humana Press, 103, pp. 107-120.

Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H., Bornscheuer, U., Schmid, R. and Tanaka, A. (1998). Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(2), pp.164-168.

Tomàs-Gamisans, M., Ferrer, P. and Albiol, J. (2016). Integration and Validation of the Genome-Scale Metabolic Models of *Pichia pastoris*: A Comprehensive Update of Protein Glycosylation Pathways, Lipid and Energy Metabolism. *PLOS ONE*, 11(1), p.e0148031.

Tomàs-Gamisans, M., Ferrer, P., & Albiol, J. (2017). Fine-tuning the *P. pastoris* iMT1026 genome-scale metabolic model for improved prediction of growth on methanol or glycerol as sole carbon sources. *Microbial Biotechnology*, 11(1), 224-237. doi: 10.1111/1751-7915.12871

Trotsenko, Y. and Bystrykh, L. (1983). Regulation of primary pathways of methanol metabolism in methylotrophic yeasts. *Environmental Regulation of Microbial Metabolism*, 1, pp.113–120.

Van der Klei, I., Yurimoto, H., Sakai, Y. and Veenhuis, M. (2006). The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), pp.1453-1462.

Vanz, A., Lünsdorf, H., Adnan, A., Nimtz, M., Gurramkonda, C., Khanna, N. and Rinas, U. (2012). Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microbial Cell Factories*, 11(1), p.103.

Wegner, G. (1983). 4414329 Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. *Biotechnology Advances*, 1(2), p.367.

Wolf, K. (1996). No conventional yeast in biotechnology. A Handbook. Berlin, Germany, Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp 203-253

Wriessnegger, T., Gubitz, G., Leitner, E., Ingolic, E., Cregg, J., Delacruz, B. and Daum, G. (2007). Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(4), pp.455-461.

Yang J, Zhou X, Zhang Y. Improvement of recombinant hirudin production by controlling NH₄⁺ concentration in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology letters*. 2004 26:1013–1017.

Ye, R., Huang, M., Lu, H., Qian, J., Lin, W., & Chu, J. et al. (2017). Comprehensive reconstruction and evaluation of *Pichia pastoris* genome-scale metabolic model that accounts for 1243 ORFs. *Bioresources And Bioprocessing*, 4(1). doi: 10.1186/s40643-017-0152-x.

Zagoya, J.C.D., J.J.H Gomez. 1995. *Bioquímica*, Ediciones McGraw-Hill. 2nd edition, pp 750.

Zhang, W., Inan, M. and Meagher, M. (2000). Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5(4), pp.275-287.

NOMENCLATURA

pAOX:	Promotor AOX
AOX:	Enzima alcohol oxidasa
CO ₂ :	Dióxido de Carbono
O ₂ :	Oxígeno molecular
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
FLD:	Enzima formaldehído deshidrogenasa
FAD ⁺ :	Nucleótido de flavina
DAS:	Enzima dihidroxiacetona sintasa
ROL:	Lipasa de <i>Rhizopus Oryzae</i>
μ:	Velocidad de crecimiento específico
TCA:	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs
ATP:	Adenosin Trifosfato
Xu5P:	Xilulosa 5 fosfato
SCP:	Proteína comercial unicelular
GSMM:	Modelo celular a escala genómica
GTP:	Glicerol 3 fosfato
DHA:	Dihidroxiacetona
DHAP:	Dihidroxiacetona fosfato
CH ₃ OH:	Metanol
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HCHO:	Formaldehído
HCOOH:	Formato
GSH:	Glutati6n
GS-CH ₂ OH:	Hidroximetilglutati6n
gDCW	Gramo de c6lula seca
FBP:	1,6-bifosfato

S1,7BP:	Sedoheptulosa-1,7-bifosfato
FBA:	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa
E4P:	Eritrosa-4-fosfato
TKL:	Transcetolasa
TAL:	Transaldolasa
S7P:	Sedoheptulosa-7-fosfato
RPE1-2:	D-ribulosa-5-fosfato-3-isomerasa
hSOD:	Albumina sérica humana
HSA	Super óxido dismutasa humana
CER:	CO ₂ Exchange Ratio
LP:	Programación lineal
MILP:	Programación lineal entera mixta
QP:	Programación cuadrática
MIQP:	Programación cuadrática entera mixta
Δ%:	Porcentaje de error

ANEXOS:

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C

ANEXO D

ANEXO E

ANEXOS

Anexo A: Scripts utilizados para modelación con metanol como única fuente de carbono y energía

A.1. Control

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)
```

A.2. Knock Out vía disimilativa

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'FALDH2', 0, 'b'); %knock out a la enzima
formaldehído deshidrogenasa

%optimizacion
```

```

solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

A.3. Incorporación de enzima DAS en el citosol

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model =
addReaction(model, 'DASCit', {'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_
c[C_c]'} ,[-1 -1 1 1],0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el
citosol

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

A.4. Incorporación de enzima DAS en el citosol y knock out DAS peroxisomal

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = addReaction
(model, 'DASCit', {'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_c[C_c]'}
,[-1 -1 1 1],0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el citosol

```

```
model = changeRxnBounds (model, 'DAS',0, 'b'); %knock out enzima DAS (en el
citosol)
```

```
%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)
```

A.5. Incorporación de enzima DAS en el citosol, Knock out vía disimilativa y knock out DAS peroxisomal

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'FALDH2',0, 'b'); %knock out a la enzima
formaldehído deshidrogenasa
model =
addReaction(model, 'DASCit', {'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_
c[C_c]'}, [-1 -1 1 1],0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el
citosol
model = changeRxnBounds (model, 'DAS',0, 'b'); %knock out enzima DAS (en el
citosol)

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)
```

Anexo B: Scripts utilizados para modelación con metanol y glicerol como fuente de carbono y energía

B.1.- Control

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)
```

B.2.-Knock Out vía disimilativa

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'FALDH2', 0, 'b'); %knock out a la enzima
formaldehído deshidrogenasa
```



```

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

B.3. Incorporación de enzima DAS en el citosol

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model =
addReaction(model, 'DASCit', {'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_
c[C_c]'}, [-1 -1 1 1], 0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el
citosol

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

B.4.- Incorporación de enzima DAS en el citosol y knock out DAS peroxisomal

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

```

```

%Modificación al modelo
model = addReaction
(model, 'DASCit', {'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_c[C_c]'}
, [-1 -1 1 1], 0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el citosol
model = changeRxnBounds (model, 'DAS', 0, 'b'); %knock out enzima DAS (en el
citosol)

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

B.5.- Incorporación de enzima DAS en el citosol, Knock out vía disimilativa y knock out DAS peroxisomal

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'FALDH2', 0, 'b'); %knock out a la enzima
formaldehído deshidrogenasa
model =
addReaction(model, 'DASCit', {'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_
c[C_c]'} , [-1 -1 1 1], 0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el
citosol
model = changeRxnBounds (model, 'DAS', 0, 'b'); %knock out enzima DAS (en el
citosol)

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

Anexo C: Composición de la proteína Rol

Composición aminoacídica ROL

Amino acid residue	#aa/prot	mol/mol prot	MW ^a	g/mol prot	mmol/g prot
Ala	15	0,056	71,078	3,963	0,508
Arg	9	0,033	156,186	5,226	0,305
Asn	11	0,041	114,103	4,666	0,373
Asp	13	0,048	114,080	5,513	0,440
Cys	6	0,022	103,144	2,301	0,203
Gln	13	0,048	128,129	6,192	0,440
Glu	9	0,033	128,106	4,286	0,305
Gly	21	0,078	57,051	4,454	0,711
His	6	0,022	137,139	3,059	0,203
Ile	16	0,059	113,158	6,731	0,542
Leu	17	0,063	113,158	7,151	0,576
Lys	15	0,056	128,172	7,147	0,508
Met	1	0,004	131,197	0,488	0,034
Orn	0	0,000	114,146	0,000	0,000
Phe	15	0,056	147,174	8,207	0,508
Pro	15	0,056	97,115	5,415	0,508
Ser	24	0,089	87,077	7,769	0,813
Thr	22	0,082	101,104	8,269	0,745
Trp	3	0,011	186,210	2,077	0,102
Tyr	12	0,045	163,173	7,279	0,406
Val	26	0,097	99,131	9,581	0,880
	269	1,000		109,773	9,110
				Req. ATP ^b	39,172

a:MW corresponde al residuo de aminoácido, y H2O MW se resta del aminoácido MW

b: Valores de ATP tomados de [3]

30.062 h2o[c] + 0.44 gln_L[c] + 0.305 glu_L[c] + 39.172 atp[c] + 0.034 met_L[c] + 0.813 ser_L[c] + 0.508 ala_L[c] + 0.44 asp_L[c] + 0.711 gly[c] + 0.373 asn_L[c] + 0.305 arg_L[c] + 0.102 trp_L[c] + 0.508 phe_L[c] + 0.508 lys_L[c] + 0.406 tyr_L[c] + 0.745 thr_L[c] + 0.203 cys_L[c] + 0.576 leu_L[c] + 0.203 his_L[c] + 0.88 val_L[c] + 0.508 pro_L[c] + 0.542 ile_L[c] -> 39.172 h[c] + 39.172 pi[c] + 39.172 adp[c] + fabAA[c]

Composición de ROL mRNA

	N. Nucl/mRNA	mol/mol pRNA	MW ^c	g/mol pRNA	mmol/g pRNA
A	255	0,315	328,198	103,322	0,977
C	157	0,194	304,173	58,957	0,601
G	211	0,260	344,198	89,661	0,808
U	187	0,231	305,158	70,450	0,716
	810	1		322,390	3,102
				Req. ATP^d	7,444

c: MW corresponde al residuo de monofosfato nucleótido, y se resta el H₂O del monofosfato ribonucleótido. En este caso, se resta de OH debido a la forma cargada del nucleótido y considerando ARN como un polianión a pH 7,3

d: Valores de ATP tomados de [3]

$4.342 \text{ h}_2\text{o}[\text{c}] + 7.444 \text{ atp}[\text{c}] + 0.977 \text{ amp}[\text{c}] + 0.716 \text{ ump}[\text{c}] + 0.808 \text{ gmp}[\text{c}] + 0.601 \text{ cmp}[\text{c}] \rightarrow 7.444 \text{ h}[\text{c}] + 7.444 \text{ pi}[\text{c}] + 7.444 \text{ adp}[\text{c}] + \text{fabRNA}[\text{c}]$

Composición de ROL DNA

	N. Nucl/pDNA	mol/mol pDNA	MW ^e	g/mol pDNA	mmol/g pDNA
A	187	0,231	312,199	72,076	0,754
C	211	0,260	288,174	75,068	0,851
G	157	0,194	328,198	63,614	0,633
T	255	0,315	303,185	95,447	1,028
	810,000			306,204	3,266
				Req. ATP^f	11,104

e: MW corresponde al residuo de desoxinucleótido monofosfato, y H₂O se resta del desoxinucleótido monofosfato. En este caso, el OH se sustrae debido a la forma cargada del desoxinucleótido y considerando el ADN como un polianión a pH 7,3

f: Valores de ATP tomados de [3]

$7.838 \text{ h}_2\text{o}[\text{c}] + 11.104 \text{ atp}[\text{c}] + 0.754 \text{ damp}[\text{c}] + 1.028 \text{ dtmp}[\text{c}] + 0.851 \text{ dcmp}[\text{c}] + 0.633 \text{ dgmp}[\text{c}] \rightarrow 11.104 \text{ h}[\text{c}] + 11.104 \text{ pi}[\text{c}] + 11.104 \text{ adp}[\text{c}] + \text{fabDNA}[\text{c}]$

Reacción de ensamble

$0.997 \text{ rolAA}[\text{c}] + 0.003 \text{ rolRNA}[\text{c}] + 2.84\text{e-}005 \text{ rolDNA}[\text{c}] \rightarrow \text{rol}[\text{c}]$

Anexo D: Consumo de metanol como fuente de carbono agregando consumo de energía en el transporte de xilulosa 5 fosfato al peroxisoma.

D.1.- Control

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model, 'XU5Ptx1', {'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]'}, [-1 -1 1 1 1], 1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)
```

D.2.-Knock Out vía disimilativa

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
```

```

model = changeRxnBounds (model, 'FALDH2',0, 'b'); %knock out a la enzima
formaldehído deshidrogenasa
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model,'XU5Ptx1',{ 'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]' } ,[-1 -1 1 1 1],1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

D.3.-Incorporación de enzima DAS en el citosol

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2',-1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model =
addReaction(model,'DASCit',{ 'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_
c[C_c]' } ,[-1 -1 1 1],0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el
citosol
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model,'XU5Ptx1',{ 'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]' } ,[-1 -1 1 1 1],1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

D.4.- Incorporación de enzima DAS en el citosol y knock out DAS peroxisomal

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

```

```

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2',-1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = addReaction
(model,'DASCit',{ 'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_c[C_c]' }
,[-1 -1 1 1],0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el citosol
model = changeRxnBounds (model, 'DAS',0, 'b'); %knock out enzima DAS (en el
citosol)
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model,'XU5Ptx1',{ 'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]' } ,[-1 -1 1 1 1],1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

D.5.- Incorporación de enzima DAS en el citosol, Knock out vía disimilativa y knock out DAS peroxisomal

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -6, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2',-1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'FALDH2',0, 'b'); %knock out a la enzima
formaldehído deshidrogenasa
model =
addReaction(model,'DASCit',{ 'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_

```

```

c[C_c]'} ,[-1 -1 1 1],0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el
citosol
model = changeRxnBounds (model, 'DAS',0, 'b'); %knock out enzima DAS (en el
citosol)
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model,'XU5Ptx1',{ 'atp_c[C_c]','xu5p_D_c[C_c]','adp_c[C_c]','pi_
c[C_c]','xu5p_D_x[C_x]'} ,[-1 -1 1 1 1],1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

E.- Consumo de metanol y glicerol como fuente de carbono agregando consumo de energía en el transporte de xilulosa 5 fosfato

E.1.- Control

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model, 'XU5Ptx1', {'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]'}, [-1 -1 1 1 1], 1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)
```

E.2.-Knock Out vía disimilativa

```
clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
```

```

model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model,'XU5Ptx1',{ 'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]' } ,[-1 -1 1 1 1],1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

model = changeRxnBounds (model, 'FALDH2',0, 'b'); %knock out a la enzima
formaldehído deshidrogenasa

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

E.3.-Incorporación de enzima DAS en el citosol

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2',-1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model,'XU5Ptx1',{ 'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]' } ,[-1 -1 1 1 1],1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

model =
addReaction(model,'DASCit',{ 'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_
c[C_c]' } ,[-1 -1 1 1],0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el
citosol

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

E.4.- Incorporación de enzima DAS en el citosol y knock out DAS peroxisomal

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model, 'XU5Ptx1', {'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]'}, [-1 -1 1 1 1], 1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

model = addReaction
(model, 'DASCit', {'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_c[C_c]'}
, [-1 -1 1 1], 0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el citosol
model = changeRxnBounds (model, 'DAS', 0, 'b'); %knock out enzima DAS (en el
citosol)

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

E.5.- Incorporación de enzima DAS en el citosol, Knock out vía disimilativa y knock out DAS peroxisomal

```

clear; clc;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')

%Definiendo el medio
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -4, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de metanol
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -3, 'b'); % Se fija el valor de
consumo de glicerol

```

```

model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2',-1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'b');

%Modificación al modelo
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model,'XU5Ptx1',{ 'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]' } ,[-1 -1 1 1 1],1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

model = changeRxnBounds (model, 'FALDH2',0, 'b'); %knock out a la enzima
formaldehído deshidrogenasa
model =
addReaction(model,'DASCit',{ 'fald_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'g3p_c[C_c]', 'dha_
c[C_c]' } ,[-1 -1 1 1],0) % Se agrega la reacción para el uso de DAS en el
citosol
model = changeRxnBounds (model, 'DAS',0, 'b'); %knock out enzima DAS (en el
citosol)

%optimizacion
solution = optimizeCbModel(model);
printFluxVector(model, solution.x)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

ANEXO F MODELACIÓN CONDICIONES OPERACIONALES

F.1 Script para la modelación de condiciones operacionales

```

clc; clear;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')
model = changeObjective (model, 'Ex_rol');

model = changeRxnBounds (model, 'Ex_biomass', 0.05, 'b');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glc_D', 0, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -Y, 'b');

```

```

model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -X, 'b');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', 0, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -Z, 'b');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'l');

solution = optimizeCbModel(model, 'max');
printFluxVector(model, solution.x, true)
printFluxVector(model, solution.x, true, true)

```

F.2 Script para la modelación de condiciones operacionales aplicando gasto energético para el transporte de xilulosa 5 fosfato.

```

clc; clear;
load('Tomas-Gamisans modelo sin fuente de carbono.mat')
model = changeObjective (model, 'Ex_rol');

model = changeRxnBounds (model, 'Ex_biomass', 0.05, 'b');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glc_D', 0, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_nh4', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_meoh', -Y, 'b');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_glyc', -X, 'b');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_pi', -1000, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_h', 0, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_o2', -Z, 'b');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_so4', -1, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_fe2', -1, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_k', -1, 'l');
model = changeRxnBounds (model, 'Ex_abt_D', 0, 'l');

model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx', 0, 'b'); % se hace un Knock out a
la ecuación original
model
=addReaction(model, 'XU5Ptx1', {'atp_c[C_c]', 'xu5p_D_c[C_c]', 'adp_c[C_c]', 'pi_
c[C_c]', 'xu5p_D_x[C_x]'}, [-1 -1 1 1 1], 1); % Se agrega una nueva ecuación
que incluya el gasto energetico del transporte de xilulosa 5 fosfato
model = changeRxnBounds (model, 'XU5Ptx1', 10, 'u');

model = changeRxnBounds (model, 'Ex_rol', 1000, 'u');
model = changeRxnBounds (model, 'rolAA', 1000, 'u');
model = changeRxnBounds (model, 'rolRNA', 1000, 'u');
model = changeRxnBounds (model, 'rolDNA', 1000, 'u');
model = changeRxnBounds (model, 'pROL', 1000, 'u');
model = changeRxnBounds (model, 'ROLt', 1000, 'u');

solution = optimizeCbModel(model, 'max');
printFluxVector(model, solution.x, true)

```

```
printFluxVector(model, solution.x, true, true)
```