



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTORAL EN INGENIERÍA QUÍMICA

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE ESTRATEGIAS DE
OPTIMIZACIÓN PARA EL DISEÑO ÓPTIMO DE REDES
METABÓLICAS Y PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS**

Romina D. Lasry Testa

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2020

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de *Doctora en Ingeniería Química*, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la *Planta Piloto de Ingeniería Química*, dependiente del *Departamento de Ingeniería Química* durante el período comprendido entre *abril de 2014 y febrero de 2020*, bajo la dirección de la *Dra. María Soledad Díaz, Investigadora Principal de CONICET y Profesora Titular del Departamento de Ingeniería Química* y la *Dra. Vanina Estrada, Investigadora Adjunta de CONICET y Profesora Titular del Departamento de Ingeniería Química*.

Departamento de Ingeniería Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / /
, mereciendo la calificación de
.....(.....)

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Soledad y Vanina, por acompañarme de forma incondicional durante estos años, tanto desde lo profesional como desde lo personal. Por las enseñanzas impartidas sobre el mundo de la investigación y por la confianza.

A la Planta Piloto de Ingeniería Química, por ser el soporte institucional para la realización de esta tesis. Al Consejo Nacional de Investigaciones y Técnicas, a la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Ingeniería Química por proveer todos los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo.

A Any, Elsa, Nora, Vivi, Aldi, Adri, Yesi y Selva por la ayuda en las tareas administrativas diarias a lo largo de estos años.

A todos los integrantes del grupo de Procesos, por los momentos diarios compartidos durante estos años.

A Pipi, Carla, Pachu, Ale, Jime y Lau por ser grandes compañeros de oficina, por todos los mates, charlas, consejos y lindos momentos compartidos. A Seba por la ayuda computacional, y también por los mates y las charlas.

A Vani, Clau, Fer y Juan por todas las agradables horas de trabajo compartidas en nuestro proyecto.

A Clau por toda la ayuda computacional, y por ser un gran complemento a lo largo de esta tesis. A Vani por todas las enseñanzas biológicas. A los dos, por la paciencia y la buena onda. Gracias, son grandes compañeros de trabajo.

A mis amigos de toda la vida, y en especial a Mari y a Daio, con quienes comparto profesión y vocación, por las charlas y el ánimo cuando las cosas no salen bien. Las quiero.

A mi mama, por apoyarme en todo, acompañarme a cada paso y entenderme y aceptarme como soy. Gracias ma, te quiero.

A mi novio, por siempre apoyarme en mi decisión de dedicarme a esto, y por siempre sacarme una sonrisa y hacerme ver el lado bueno de las cosas. Te amo.

RESUMEN

Las cianobacterias tienen potencial como productoras de biocombustibles y otros productos químicos, ya que pueden crecer utilizando el CO₂ presente en la atmósfera como fuente de carbono, la luz como fuente de energía y el agua como fuente de electrones. Esto resulta atractivo en el contexto actual de cambio climático ocasionado por las elevadas concentraciones de CO₂ en la atmósfera. En esta tesis se estudia la producción de etanol de cuarta generación y polihidroxibutirato (PHB) a partir de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, con un enfoque de Ingeniería de Sistemas Metabólicos.

En primer lugar, se cura un modelo estequiométrico de escala genómica (GEM) de dicha cianobacteria con información bibliográfica específica actualizada, con el objetivo de mejorar las predicciones *in silico*. Luego, el GEM es validado frente a datos experimentales fisiológicos y datos de fluxómica, demostrándose que la curación resulta efectiva en mejorar las predicciones del modelo. Con el modelo curado y validado, se formulan problemas de programación binivel para buscar estrategias de acoplamiento, a través de la supresión de genes, entre el crecimiento y la producción del compuesto de interés con el objetivo de convertir al metabolito deseado en un subproducto obligado del crecimiento y que en consecuencia, su producción resulte una parte integral de la función metabólica del organismo. Matemáticamente, las intervenciones genéticas se representan por medio de variables binarias asociadas a dichos genes. Estos problemas son reformulados por medio de la teoría de la dualidad, obteniéndose como resultado problemas de programación mixta entera lineal (MILP) en un solo nivel que se resuelven tanto para el caso de etanol como para el de PHB. Existen en bibliografía formulaciones de este tipo, aunque con variables binarias asociadas a reacciones. El aporte realizado en esta tesis al incorporar asociación de variables binarias a genes es un avance en el agregado de información biológica a este tipo de formulaciones.

En el caso del etanol se obtienen dos mutantes factibles que presentan diferentes estrategias de intervención para acoplar la producción al crecimiento, una relacionada con la producción de acetato y la otra, con el balance celular de poder reductor, siendo el segundo caso el más prometedor desde el punto de vista biotecnológico ya que aumenta en un 235 % la productividad de la cepa con respecto a las productividades presentadas en bibliografía. Para este producto, también se estudia la posibilidad de producción con una estrategia en dos etapas. En dicha estrategia, se considera un primer biorreactor con condiciones que maximicen el crecimiento y un segundo biorreactor donde un nutriente limita dicho crecimiento y se favorece la producción de etanol. Esta estrategia mejora aún más los índices de producción.

En el caso de PHB también se obtienen dos mutantes factibles, pero la estrategia de acoplamiento no varía. La diferencia entre ambos son dos intervenciones más, que hacen que la tasa de producción de PHB aumente un 25%. La estrategia, en este caso, también está relacionada con el balance de poder reductor de la red, pero se observan mayores cambios en los flujos metabólicos internos que para el caso del etanol. La productividad del mejor mutante se analiza en condiciones de exceso y de limitación de nutrientes.

Las productividades obtenidas vuelven atractiva la realización de experimentos *in vivo* para avanzar en el diseño de cepas de *Synechocystis* como fábricas celulares de etanol de cuarta generación y de bioplásticos.

Los modelos desarrollados constituyen herramientas útiles para el diseño de cepas industriales para la producción fotosintética no solo de biocombustibles y bioplásticos, sino también de compuestos de interés en una gran variedad de industrias como la farmacéutica, la nutracéutica, de biofertilizantes, entre otros.

ABSTRACT

Cyanobacteria are potential candidates for biofuel and chemical product production, due to their ability to grow autotrophically, on the atmospheric CO₂ as carbon source, light as energy source, and water as electron source. These capacities become attractive in the current climate change context, caused by the high concentrations of CO₂ in the atmosphere. In this thesis, the production of fourth generation ethanol and polyhydroxybutyrate (PHB) from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 is studied through a Systems Metabolic Engineering approach.

First, a genomic scale stoichiometric model (GEM) of *Synechocystis* is curated, based on specialized and actualized bibliography, to improve the *in silico* predictions. Then, the GEM is validated against physiological and fluxomic data. After model curation and validation, bilevel programming problems are formulated, to determine genetic engineering strategies to couple growth and bioproduct production by gene knock-outs. The aim of coupling production is turning the biotechnological compound into an obligate subproduct of growth, so that its production becomes an integral part of the organism's metabolic function. Mathematically, knock-outs are represented by binary variables associated to the corresponding genes. This bilevel programming problems are reformulated into one level Mixed Integer Linear Programming (MILP) problems by applying the duality theory, and are solved for both ethanol and PHB cases. Considering binary variables associated with genes instead of reactions is a novel contribution of this thesis. and constitutes a step towards the incorporation of biological meaning into *in silico* results.

For the case of ethanol, two feasible mutants are obtained, with different intervention strategies to couple production to growth. One of the strategies is related to acetate production and the other with the cellular reductive power balance. The latter is the most promising case from a biotechnological point of view, because it gives a productivity 235%.higher than those reported in bibliography. Also, a two-stage ethanol production

strategy is addressed, where a first bioreactor with growth maximizing conditions and a second one with nutrient limiting conditions are considered. This strategy further improves production indexes.

In the case of PHB, two feasible mutants are obtained with similar coupling strategies. The difference between them are two interventions that improve PHB production rate by 25%. The strategy in this case is also related with the cellular reductive power balance, but more changes in the internal metabolic fluxes are required, as compared to the ethanol case. The productivity of the best mutant is analyzed under excess and limiting nutrient conditions. The results obtained are encouraging to make further in vivo experiments to move forward in the design of *Synechocystis* as a microbial cell factory of fourth generation biofuels and bioplastics.

The models developed in this thesis constitute useful tools for the design of industrial strains for the photosynthetic production of not only biofuels and bioplastics, but also of compounds of interest with application in a wide range of industries like pharmaceutical, nutraceutical and biofertilizers, among others

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	x
NOMENCLATURA	xiii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	
CAPÍTULO 1: Introducción general	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Cianobacterias	4
1.2.1. Productos de interés comercial de cianobacterias.....	8
1.3. Ingeniería de Sistemas Metabólicos	10
1.3.1. Biología de sistemas	12
1.3.2. Modelos de redes metabólicas	15
1.3.3. Reconstrucción de redes a escala genómica	18
1.4. Objetivos	20
1.4.1. Objetivo general.....	20
1.4.2. Objetivos específicos	21
1.5. Estructura de la tesis	21
CAPÍTULO 2: Modelo metabólico a escala genómica de <i>Synechocystis</i>	23
2.1. Introducción.....	23
2.2. Cadenas transportadoras de electrones en <i>Synechocystis</i>	28
2.3. Mecanismos de captación de carbono	30
2.4. Vías de producción de etanol y PHB	33
2.5. Modelos metabólicos basados en restricciones.....	35
2.6. Desarrollo del GEM de <i>Synechocystis</i>	39

2.7. Conclusiones.....	49
CAPÍTULO 3: Estudio de distribuciones de flujo y tasas del GEM por medio de datos experimentales.	50
3.1. Introducción.....	50
3.2. Métodos computacionales para el análisis del GEM.....	52
3.2.1. Analisis de Balance de Flujo (FBA)	52
3.2.2. Análisis de Variabilidad de Flujo: FVA	58
3.2.3. Análisis de Espacios de Flujo	59
3.2.4. Modelo de crecimiento en cultivo batch	60
3.2.5. Datos experimentales de cultivo batch	61
3.2.6. Datos experimentales de Fluxómica	62
3.3. Resultados y Discusión	64
3.3.1. Cálculo de tasas a partir de datos de cultivo batch.	64
3.3.2. Determinación de condiciones óptimas de crecimiento a partir del modelo ...	66
3.3.3. Validación del modelo frente a mediciones de flujos metabólicos.....	69
3.3.4. Análisis de distribución de flujos en Synechocystis.....	72
3.4. Conclusiones.....	79
CAPÍTULO 4: Producción fotosintética de etanol	81
4.1. Introducción.....	81
4.2. Materiales y Métodos	86
4.2.1. Formulación de problemas binivel para el diseño in silico de cepas acopladas productoras de etanol.....	86
4.2.2. Minimización del ajuste metabólico	92

4.2.3. Producción de etanol por limitación de nutrientes en dos etapas.....	93
4.3. Resultados y Discusión	94
4.3.1. Producción Teórica Máxima de Etanol	94
4.3.2. Producción de etanol acoplada al crecimiento en <i>Synechocystis</i>	95
4.3.2.1. Resolución de problemas binivel	95
4.3.2.1.1. <i>Caso 1: Dos intervenciones genéticas (M1)</i>	97
4.3.2.1.2. <i>Caso 2: Diez intervenciones genéticas (M2)</i>	98
4.3.2.1.3. <i>Comparación entre los mutantes</i>	101
4.3.2.1.4. <i>Comparación de las formulaciones implementadas con OptKnock y OptForce</i>	103
4.3.2.1.5. <i>Análisis del Mutante M2</i>	105
4.3.2.1.6. <i>Comparación con datos experimentales</i>	113
4.3.2.2. Producción bajo limitación de nutrientes en varias etapas.....	115
4.3.2.2.1. <i>Condiciones de Limitación por Nitrógeno</i>	115
4.3.2.2.2. <i>Condiciones de limitación por fósforo</i>	117
4.3.2.2.3. <i>Análisis de las dos etapas</i>	118
4.4. Conclusiones.....	120
CAPÍTULO 5: Producción fotosintética de PHB	122
5.1. Introducción.....	122
5.2. Materiales y Métodos	125
5.2.1. Producción teórica máxima de PHB	125
5.2.2. Producción de PHB acoplada al crecimiento	126
5.2.2.1. Análisis de las estrategias de acoplamiento	128

5.2.2.2.	Análisis de tasa de producción y espacios de flujos.....	132
5.2.2.3.	Análisis de distribución de flujos para M4	134
5.2.3.	Estimación de productividad.....	140
5.3.	Conclusiones.....	143
CAPÍTULO 6: Conclusiones y Proyecciones		144
6.1.	Conclusiones generales	144
6.2.	Conclusiones particulares	145
6.3.	Proyecciones.....	148
PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....		150
BIBLIOGRAFÍA.....		152
APÉNDICE A.....		175
APÉNDICE B.....		204
APÉNDICE C.....		218
APÉNDICE D.....		220
APÉNDICE E.....		223

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema representando el flujo de CO ₂ en la tierra y en las células. A la izquierda: La producción de combustibles fósiles genera CO ₂ en mayor medida que el CO ₂ que se fija en los océanos y bosques. A la derecha: Una representación esquemática de una célula que consume CO ₂ (autótrofa) presente en la atmosfera para producir combustibles y otros productos. Traducido de Hu <i>et al.</i> (2019)	2
Figura 1.2. Desarrollo de cepas/células óptimas como eje principal en el desarrollo de un nuevo bioproceso económicamente viable en base a nuevas tecnologías aplicadas a un enfoque de ingeniería de sistemas metabólicos. Modificado de Hong & Nielsen (2012).	4
Figura 1.3. Esquema del metabolismo general de las cianobacterias	5
Figura 1.4. Diferentes formas y organizaciones celulares en cianobacterias. Células esféricas del género <i>Synechocystis</i> (a) , colonias de células en un solo plano del género <i>Merismopedia</i> (b) , filamentos elipsoidales de <i>Arthrospira</i> (c) y filamentos lineales del género <i>Oscillatoria</i> (d) . Fuentes de las fotografías: http://cfb.unh.edu/ , http://sistemas.fciencias.unam.mx/ , https://www.landcareresearch.co.nz/	6
Figura 1.5. Etapas en el diseño de un bioproceso con el enfoque de la ingeniería de sistemas metabólicos. Fuente: Lee & Kim (2015).	11
Figura 1.6. Representación esquemática de los diferentes tipos de modelos. Ordenados de izquierda a derecha según mayor a menor carácter cualitativo y de derecha izquierda de mayor a menor carácter cuantitativo. Modificado de Steuer <i>et al.</i> (2012).	16
Figura 1.7. Evolución del número de GEMs publicados por año, desde la aparición del primero en el año 1999 hasta el año 2016. Adaptado de Kim <i>et al.</i> (2017)	18
Figura 2.1. Ultraestructura de una célula completa de <i>Synechocystis</i> (a) y ampliaciones de la zona de la pared celular (b) y (c) . T membranas tilacoidales, LT lumen tilacoidal, C carboxisoma, CP gránulo de cianoficina, g gránulo de glucógeno, r ribosomas, PM	

membrana OM membrana externa, PD capa de peptidoglicano, EP espacio periplasmático. Barra escala: 100 nm. Fuente de la imagen: Liberton *et al.* (2006) 25

Figura 2.2. Representación esquemática del metabolismo general de las cianobacterias. Traducido de Baroukh *et al.* (2015)..... 26

Figura 2.3. Esquema de la fotosíntesis en *Synechocystis*. Las cadenas transportadoras de electrones se utilizan para la producción de NADPH en la ferredoxina (Fd) y también producen un gradiente de protones que es utilizado para generar ATP en la ATPasa. Fd, Flv 1/3 y H₂asa participan de las vías alternativas de transporte de electrones..... 29

Figura 2.4. Esquema del mecanismo de concentración de carbono en *Synechocystis*. Se muestran los cinco modos de captación de carbono: tres de HCO₃⁻ (i, ii y iii) y dos de CO₂ (iv y v). La numeración utilizada en el esquema se corresponde con el texto..... 31

Figura 2.5. Esquema del CCM de *Synechocystis*. Se observa el ingreso de HCO₃⁻ ubicado en la membrana plasmática y el de CO₂ en la membrana tilacoidal. El HCO₃⁻ que se acumula en el citoplasma ingresa al carboxisoma donde se convierte de CO₂ por medio de la enzima CA. Por último, la RuBisCO convierte el CO₂ a 3PG. En este esquema no se muestra el proceso de fotorrespiración 33

Figura 2.6. Vías de producción de etanol en *Synechocystis*. ADH: Alcohol deshidrogenasa; ACS: Acetil-CoA sintetasa; ALDH: Aldehído deshidrogenasa; ACK: Acetato Kinasa; PTA: Fosfato acetiltransferasa; PK: Xilosa 5-fosfato/Fructosa 6-fosfato fosfoketolasa; PDC: Piruvato Descarboxilasa 34

Figura 2.7. Vía de producción de PHB en *Synechocystis*. phaA: acetil-CoA Acetiltransferasa; phaB: acetoacetil-CoA reductasa; phaE: polihidroxialcanoato sintasa subunidad PhaE; phaC: polihidroxialcanoato sintasa subunidad PhaC..... 35

Figura 2.8. Distintos tipos de asociaciones GPR posibles. 37

Figura 2.9. Vías de producción de Serina. En azul la vía dependiente de la luz, en verde la vía independiente, identificada por Klemke *et al.* (2015) 42

Figura 2.10. Vías de producción de Glucógeno. A la izquierda, la original incluida en el modelo, a la derecha la modificada incluida en el modelo desarrollado en esta tesis . 43

Figura 2.11. Ciclo de Krebs cerrado con la enzima AKGDH (a) y las dos alternativas para su cierre en <i>Synechocystis</i>	44
Figura 2.12. Composición de la biomasa de <i>Synechocystis</i> como se incluye en el modelo, expresada en porcentaje	46
Figura 2.13. Distribución de reacciones por subsistema, según su distribución en el modelo. Se puede observar que las vías más conocidas y también las más complejas de modelar son las que más reacciones contienen. La categoría Generales contiene reacciones que aportan compuestos a varios subsistemas	48
Figura 3.1. Modelado metabólico basado en restricciones. El espacio nulo definido por la matriz S se convierte en el cono de flujos de la red al agregar restricciones. Al definir un objetivo celular, se llega a uno de los vértices de dicho cono. Traducido de Orth <i>et al.</i> (2010)	54
Figura 3.2. a) Región factible de un sistema simplificado de dos dimensiones. Se muestra un caso donde la optimización (maximización) resulta en un vértice del espacio de flujos dando como resultado una única solución óptima marcada como un punto rojo sobre la recta A que representa la función objetivo; y un caso donde la optimización resulta en una arista del espacio de flujos, lo que resulta en múltiples soluciones óptimas marcadas como puntos verdes sobre la recta B. b) Se puede observar que la inclusión de restricciones obtenidas a partir de datos experimentales ómicos reducen la región factible del LP siendo los datos de fluxómica los más apropiados para representar el fenotipo metabólico de la célula.	58
Figura 3.3. Variación de la tasa de crecimiento máximo frente a la variación simultánea de disponibilidad de carbono inorgánico y luz	67
Figura 3.4. a) Crecimiento frente a cambios en la captación de CO_2 . b) Crecimiento frente a cambios en la disponibilidad de luz.	68
Figura 3.5. Variación de la tasa de crecimiento frente a cambios en los valores de ATP de mantenimiento.	69

Figura 3.6 . Resultados numéricos para el crecimiento fotoautotrófico limitado por carbono.....	73
Figura 3.7. Distribución de flujos optimizando la síntesis de biomasa en condiciones de limitación de carbono. Los valores de flujo tienen unidades de $\text{mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La captación de carbono inorgánico como CO_2 es de $0.336 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y de $3.364 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ como HCO_3^- . Se cumple que: $v_{\text{CO}_2} + v_{\text{HCO}_3} \leq 3.7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La restricción de flujo de fotones es $v_{\text{fotones}} \leq 100 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y toma un valor de $100 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La captación de nitrógeno, el fósforo y micronutrientes no se encuentra restringida.....	78
Figura 3.8. Distribución del carbono total fijado por la RuBisCO entre las principales vías del metabolismo del carbono.	79
Figura 4.1. Matriz Energética mundial (círculo externo) y Argentina (círculo interno) del año 2018, expresada como porcentajes del tipo de energía consumida. Totales: Mundial, 13960 Mtep; Argentina, 88 Mtep.....	81
Figura 4.2. Evolución de las emisiones de CO_2 desde el año 1965 al 2018, a nivel mundial y en Argentina. Datos expresados en Millones de Toneladas de CO_2 . Fuente: BP Statistical Review of World Energy (2019).....	82
Figura 4.3. Clasificación de biocombustibles según la materia prima.....	83
Figura 4.4. Trade-off entre la producción de etanol y el crecimiento. Toda el área naranja representa el posible espacio de flujos.	95
Figura 4.5. Trade-off crecimiento-producción de etanol para el mutante acoplado M1.	102
Figura 4.6. Trade-off crecimiento-producción de etanol para el mutante acoplado M2.	102
Figura 4.7. Comparación entre dos tipos de mutantes utilizando como ejemplo la producción de succinato en <i>E. coli</i> . Adaptado de Machado & Herrgard (2015).....	104
Figura 4.8. Captación de nutrientes y producción de biomasa y etanol para M2.	106

Figura 4.9. Distribución de flujo optimizada para tasa de crecimiento máxima en estado de limitación por carbono para el mutante acoplado M2 con diez *knock-outs*. Los valores de flujo están dados en mmol gPS⁻¹ h⁻¹. La tasa de captación de carbono inorgánico como CO₂ es 0.336 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ y 3.364 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ como HCO₃⁻; $v_{CO2} + v_{HCO3} \leq 3.7$ mmol gPS⁻¹ h⁻¹. El flujo de fotones es $v_{photon} \leq 100$ mmol gSP⁻¹ h⁻¹. Las captaciones de fósforo, nitrógeno y sulfato no están restringidas 108

Figura 4.10. Análisis de sensibilidad sobre los flujos de biomasa y etanol para el mutante M2 considerando variaciones en las captaciones de luz **(a)**, el carbono inorgánico **(b)** y el ATP para mantenimiento celular **(c)**..... 112

Figura 4.11. Tasa de crecimiento **(a)**, producción máxima de etanol **(b)**, y producción mínima de ATP **(c)** requerida para seis escenarios diferentes de captación de fósforo. 118

Figura 4.12. Resultados para los casos de limitación en dos etapas con limitación de nitrógeno **(a)** y fósforo **(b)** comparados con los resultados del mutante acoplado M2 **(c)**. 120

Figura 5.1. Producción mundial de plásticos hasta el año 2018. Adaptado de Crawford & Quinn (2016) 123

Figura 5.2. Trade-off entre el crecimiento y la producción de PHB para *Synechocystis*. 126

Figura 5.3. Espacio de flujos para el mutante acoplado M4 133

Figura 5.4. Análisis de sensibilidad sobre los flujos de biomasa y PHB para el mutante acoplado M4 considerando variaciones en las captaciones de luz **(b)**, el carbono inorgánico **(a)** y el ATP para mantenimiento celular **(c)**..... 134

Figura 5.5. Entradas y salidas para el mutante acoplado M4. 135

Figura 5.6. Distribución de flujo optimizada para tasa de crecimiento máxima en estado de limitación por carbono para el mutante acoplado M2 con 10 *knock-outs*. Los valores de flujo están dados en mmol gPS⁻¹ h⁻¹. La tasa de captación de carbono inorgánico como CO₂ es 0.336 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ y 3.364 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ como HCO₃⁻; $v_{CO2} + v_{HCO3}$

$\leq 3.7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. El flujo de fotones es $100 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Las captaciones de fósforo, nitrógeno y sulfato no están restringidas. 138

Figura 5.7. Perfiles de concentración obtenidos del modelo en gPROMS..... 141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Productos obtenidos de cianobacterias por medio de biología sintética.....	10
Tabla 2.1. Clasificación taxonómica de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	24
Tabla 2.2. Reacciones que describen el CCM en el GEM de <i>Synechocystis</i>	41
Tabla 2.3. Comandos utilizados en COBRA Toolbox para la curación del modelo	47
Tabla 3.1. Ejemplo sencillo de red metabólica, sus correspondientes balances de masa dinámicos y la matriz estequiométrica resultante.....	52
Tabla 3.2. Tipos de restricciones que se imponen a las reacciones en un GEM. M es un número grande, un valor típico es 1000. Fuente: (Maranas & Zomorodi, 2016).....	55
Tabla 3.3. Datos experimentales en la cepa silvestre de <i>Synechocystis</i>	62
Tabla 3.4. Datos experimentales para la cepa de <i>Synechocystis</i> productora de etanol	62
Tabla 3.5. Datos de flujos calculados por 13C INST-MFA de Young <i>et al.</i> (2011). Los datos se presentan para una captación de carbono inorgánico de 100 mmol gPS-1 h-1 y con intervalos de confianza del 95%.....	63
Tabla 3.6. Escenarios de crecimiento en <i>Synechocystis</i>	68
Tabla 3.7. Diferencias entre conversiones definidas en el modelo de Young <i>et al.</i> (2011), y las reacciones que las representan en el GEM. No se incluyen cofactores, agua, ni protones. Para más detalle referirse al anexo con los números de reacción.....	71
Tabla 3.8. Comparación entre medidas de flujo por ¹³ C MFA de Young <i>et al.</i> (2010) y valores predichos por el GEM. No se incluyen cofactores, agua, ni protones. Para más detalle referirse a los Apéndices A y B con los números de reacción.....	72
Tabla 3.9. Tasa de crecimiento y principales parámetros bioenergéticos y fotosintéticos considerando un flujo de 0 y de 0,01 mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹ para la fotorrespiración, comparados con tres escenarios diferentes para la reacción tipo Mehler (Libre, 10 y 20%).....	76
Tabla 4.1. Formulaciones del problema binivel para acoplar producción de un subproducto al crecimiento.....	88

Tabla 4.2. Producción de biomasa y etanol obtenida resolviendo el problema asociado a la Formulación 2.	96
Tabla 4.1. Genes que deben eliminarse para obtener los mutantes M1 y M2 que acoplan la producción de etanol al crecimiento en <i>Synechocystis</i>	100
Tabla 4.4. Tasa de crecimiento y principales parámetros fotosintéticos y bioenergéticos para el mutante no acoplado y para el mutante obtenido resolviendo el problema de optimización binivel con diez intervenciones (M2).....	110
Tabla 4.5. Distribuciones de flujo de los datos experimentales y del GEM curado de <i>Synechocystis</i> bajo condiciones de limitación de nitrógeno.	116
Tabla 5.1. Mutantes que acoplan el crecimiento a la producción de PHB en <i>Synechocystis</i>	128
Tabla 5.2. Reacciones, enzimas y genes involucrados en los mutantes con crecimiento y producción de PHB acoplados.	131
Tabla 5.3. Parámetros fotosintéticos para el mutante productor de PHB acoplado M4, comparados a los de la cepa silvestre desacoplada	136
Tabla 5.4. Tasas de crecimiento máxima y de producción de PHB para diferentes valores de captación de nitrógeno, fósforo y azufre	141

NOMENCLATURA

<u>Símbolo</u>	<u>Descripción</u>
<i>3HBUT – CoA</i>	(R)-3-hidroxi-butanoil-CoA
<i>Mal</i>	(S)-Malato
<i>2PG</i>	2-fosfoglicerato
<i>2PGlyc</i>	2-fosfoglicolato
<i>α – KG</i>	2-oxoglutarato
<i>3PG</i>	3-fosfoglicerato
<i>Acald</i>	Acetaldehído
<i>Ac</i>	Acetato
<i>AcCoA</i>	Acetil-CoA
<i>AcP</i>	Acetilfosfato
<i>AccCOA</i>	Acetoacetil-CoA
HCO_3^-	Anión bicarbonato
NO_3^-	Anión nitrato
SO_4^{2-}	Anión sulfato
<i>Aconi</i>	Cis-Aconitato
<i>Cit</i>	Citrato
K_{ext}	Coeficiente de extinción
<i>CoA</i>	Coenzima A
<i>NDH – I</i>	Complejo NADH deshidrogenasa I
<i>X</i>	Concentración de biomasa
<i>LB</i>	Cotas inferiores a los flujos
<i>UB</i>	Cotas superiores a los flujos
<i>G1P</i>	D-Glucosa1-fosfato
<i>G6P</i>	D-Glucosa6-fosfato
<i>DGDG</i>	Digalactosil-diacilglicerol
CO_2	Dióxido de carbono
<i>E4P</i>	Eritrosa-4-fosfato
<i>EtOH</i>	Etanol
Fd^+	Ferredoxina oxidada
Fd	Ferredoxina reducida
<i>v</i>	Flujos
<i>PEP</i>	Fosfoenolpiruvato
<i>FBP</i>	Fructosa-1,6-bisfosfato

<i>F6P</i>	Fructosa-6-P
<i>Fum</i>	Fumarato
<i>G3P</i>	Gliceraldehído3-fosfato
<i>Gly3P</i>	Glicerol3-fosfato
<i>DHAP</i>	Dihidroxiacetonafosfato
<i>Gcn</i>	Glicina
<i>Gly</i>	Glicolato
<i>Glx</i>	Glioxilato
<i>Glyc</i>	Glucógeno
<i>Gln</i>	Glutamina
<i>k</i>	Índice asignado a las variables binarias
<i>i</i>	Índice asignando a metabolitos del GEM
<i>j</i>	Índice asignando a metabolitos del GEM
<i>Icit</i>	Isocitrato
<i>Glu</i>	L-Glutamato
<i>S</i>	Matriz estequeométrica
<i>MGDG</i>	Monogalactosil-diacilglicerol
<i>NADP⁺</i>	Nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidado
<i>NADPH</i>	Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
<i>NAD⁺</i>	Nicotin adenin dinucleótido oxidado
<i>NADH</i>	Nicotin adenin dinucleótido reducido
<i>PP_i</i>	Ortofosfato
<i>OAA</i>	Oxaloacetato
<i>O₂</i>	Oxigeno
<i>Pyr</i>	Piruvato
<i>Pc⁺</i>	Plastocianina oxidada
<i>Pc</i>	Plastocianina reducida
<i>PHB</i>	Poli-beta-hidroxi-butirato
<i>H⁺</i>	Protón
<i>Rxn</i>	Reacción
<i>R5P</i>	Ribosa-5-fosfato
<i>RuBP</i>	Ribulosa-1,5-bisfosfato
<i>Ru5P</i>	Ribulosa-5-fosfato
<i>S7P</i>	Sedoheptulosa-7-fosfato
<i>Succ</i>	Succinato
<i>Sucsal</i>	Succinato semialdehído

<i>SucCoA</i>	Succinil-CoA
<i>SQDG</i>	Sulfoquinovosil diacilglicerol
μ	Tasa de crecimiento
<i>THF</i>	Tetrahidrofolato
<i>y</i>	Variabes binarias
α_{LB}	Variabes de linealización asociadas a las cotas inferiores
α_{UB}	Variabes de linealización asociadas a las cotas superiores
<i>w</i>	Variabes del problema dual asignadas a los flujos fijos
x_{LB}	Variabes del problema dual asociadas a las cotas inferiores
x_{UB}	Variabes del problema dual asociadas a las cotas superiores
w_{MB}	Variabes del problema dual, asociadas a los balances de masa
<i>PPP</i>	Vía de las Pentosas fosfato
<i>X5P</i>	Xilulosa-5-fosfato

Introducción general

1.1. Introducción

El cambio climático se evidencia a nivel mundial debido a diferentes observaciones en características del planeta como el aumento global de la temperatura, el calentamiento de los océanos, el encogimiento de las capas de hielo y nieve, el retroceso de los glaciares, el aumento del nivel del mar, entre otros. Específicamente, la temperatura global ha sufrido un aumento de casi 1°C desde fines del siglo XIX, con la mayor parte del aumento registrándose en los últimos 35 años (NASA, 2020). Existe un 95% de probabilidad que la causa de este calentamiento sea la actividad humana, que desde la revolución industrial en 1760 ha generado emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero (IPCC, 2014). Dentro de estos gases se encuentra el dióxido de carbono (CO₂), el vapor de agua, el óxido nitroso (N₂O), el metano (CH₄) y los clorofluorocarbonos (CFCs). Excepto los últimos, los demás se encuentran naturalmente en la atmósfera cumpliendo la función de absorber la radiación infrarroja emitida por la tierra. Las actividades industriales, y principalmente el uso de combustibles fósiles, han ocasionado grandes cantidades de emisiones de gases de efecto invernadero, aumentando los niveles de los mismos en la atmósfera a niveles mucho mayores a los normales, lo cual ha resultado en el mencionado aumento en la temperatura de la tierra. La concentración atmosférica de CH₄ se ha incrementado en 150%, la de CO₂ en 40% y la de N₂O solo en 20%, con el CO₂ siendo el que más contribuye al calentamiento global (Royal Society, 2020). Es en este contexto que se busca complementar a los combustibles fósiles por fuentes de energía renovables que

no generen emisiones de CO₂, como así también se buscan opciones para reducir esta elevada concentración atmosférica de CO₂ (Figura 1.1).

Las cianobacterias son capaces de crecer utilizando el CO₂ disponible en la atmósfera como fuente de carbono, por lo cual la producción fotosintética de compuestos de interés comercial a partir de estos microorganismos ha sido un tema muy investigado por la comunidad científica en los últimos años. Esto se debe principalmente a su capacidad para producir diversos productos, dentro de los cuales se encuentran biocombustibles y bioplásticos contribuyendo a su vez, a disminuir los niveles de CO₂ atmosféricos (Figura 1.1). Si bien existen diversos procesos a escala industrial a partir de cianobacterias (Takenaka & Yamaguchi, 2013) para el caso de los biocombustibles y los bioplásticos aún no se han alcanzado los niveles de producción que resulten en procesos económicamente factibles.

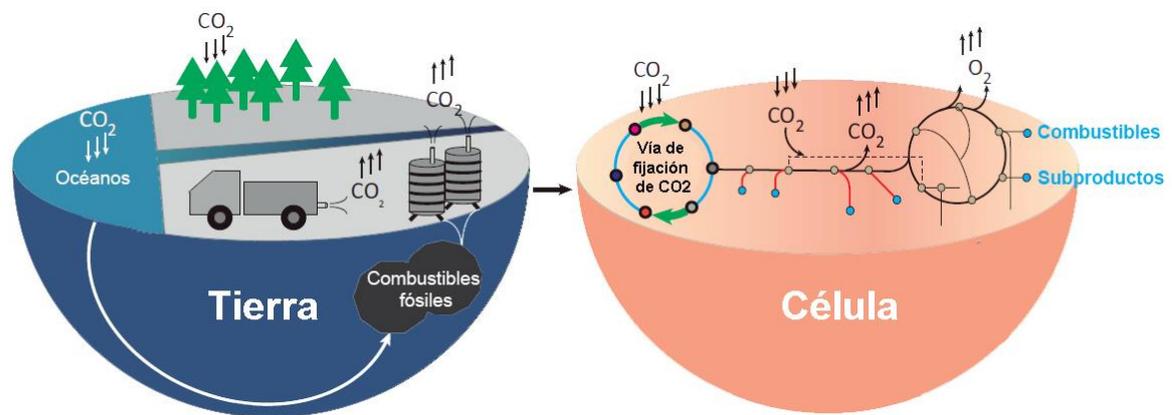


Figura 1.1. Esquema representando el flujo de CO₂ en la tierra y en las células. A la izquierda: La producción de combustibles fósiles genera CO₂ en mayor medida que el CO₂ que se fija en los océanos y bosques. A la derecha: Una representación esquemática de una célula que consume CO₂ (autótrofa) presente en la atmosfera para producir combustibles y otros productos. Traducido de Hu *et al.* (2019)

El desarrollo de microorganismos capaces de producir biocompuestos a escala industrial es, de hecho, la fase crítica del diseño y desarrollo de un nuevo bioproducto. Este objetivo puede alcanzarse exitosamente a partir de técnicas tradicionales de ingeniería metabólica, concepto que emergió a principios de los años 90 y que se define como la

utilización de tecnologías de ADN recombinante para mejorar las propiedades de un microorganismo con el objetivo de producir un determinado compuesto de interés (Liu & Nielsen, 2019). Sin embargo, los productos que han alcanzado escala industrial por medio de la utilización de estas técnicas es aún relativamente bajo. Esto se debe a los proyectos de ingeniería metabólica clásica fallan en el desarrollo de **fábricas celulares**, al no tener en cuenta los aspectos prácticos de la producción a escala industrial, principalmente por los ciclos de prueba y error que ocurren en la modificación de los microorganismos y por no incluir en los estudios una completa comprensión del metabolismo del microorganismo considerado, el comportamiento a escala piloto y los niveles de producción reales (Choi *et al.*, 2019). Del intento de superar estas limitaciones surge la **Ingeniería de Sistemas Metabólicos**, que integra tres disciplinas: La **biología de sistemas**, la **biología sintética** y la **ingeniería evolutiva**. Esta nueva disciplina fue declarada por un panel de expertos de empresas y universidades destacadas, en el año 2016, como una de las 10 tecnologías emergentes más importantes, en el contexto del Foro Económico Mundial (WEF, 2016). Desde su aparición ha permitido el desarrollo en menor tiempo, de manera más eficiente y más económica, de sistemas de producción a gran escala de diversos compuestos químicos y fármacos, permitiendo reducir el costo del diseño de entre 50 y 300 años/personas a aproximadamente 10 años/personas (Lee & Kim, 2015) (Figura 1.2).

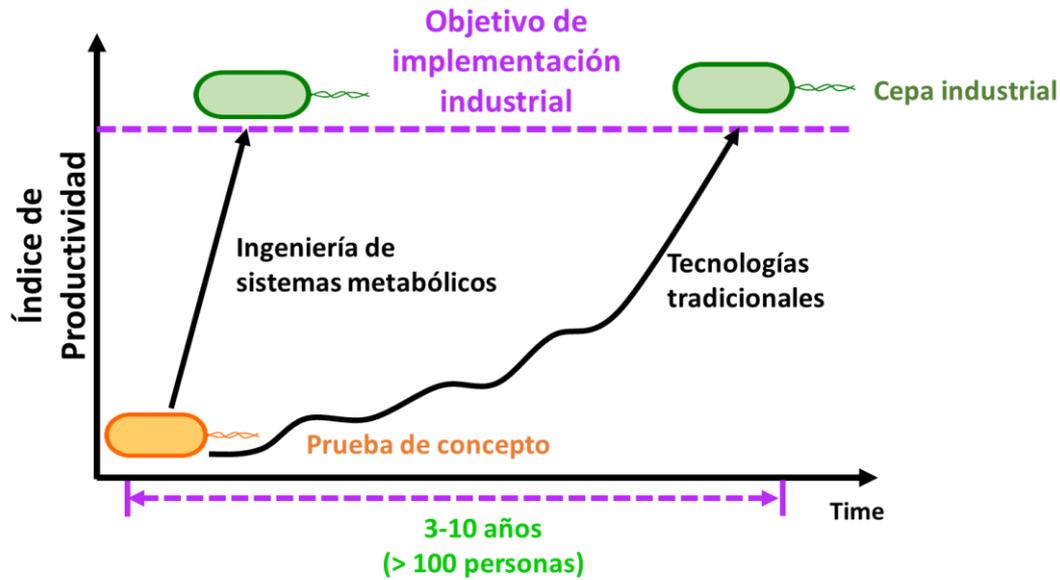


Figura 1.2. Desarrollo de cepas/células óptimas como eje principal en el desarrollo de un nuevo bioproceso económicamente viable en base a nuevas tecnologías aplicadas a un enfoque de ingeniería de sistemas metabólicos. Modificado de Hong & Nielsen (2012).

La **biología de sistemas** es una disciplina que integra mediciones experimentales con modelos matemáticos del metabolismo, con el objetivo de dilucidar el comportamiento de las células. Mediante las herramientas que brinda esta disciplina se realizan estimaciones *in silico* de productividades, modificaciones genéticas y efectos de medios de cultivo, antes de ir al campo *in vivo*, y evitando de esta forma experimentos con resultados negativos. Dentro del gran marco de la ingeniería de sistemas metabólicos, en el contexto de la biología de sistemas, en esta tesis se estudia la producción fotosintética *in silico* de bioetanol y bioplásticos a partir de cianobacterias.

1.2. Cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo de organismos procariotas que se encuentran dentro de los más antiguos en la Tierra ya que se considera que han existido desde hace 3.5 mil millones de años, y conservan al día de hoy muchas características que surgieron desde su origen (Klemenčič *et al.*, 2017). Se las suele denominar también como algas

verde-azuladas, aunque no deben confundirse con microalgas, ya que dicha clasificación se refiere a organismos eucariotas. Su color verde-azulado se debe a que contienen el pigmento ficocianina, pero no todas toman este color ya que puede ser modificado por la presencia de otros pigmentos como la clorofila a, de color verde, la ficoeritrina, de color rojo, o los carotenoides de color naranja. Esto lleva a que las cianobacterias presenten una amplia gama de colores, incluyendo verdes, rojos, marrones, amarillos y rosas (Huisman *et al.*, 2018).

Son los únicos miembros del reino bacteria capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, al igual que las plantas, utilizando agua como principal fuente de electrones, energía solar como fuente de fotones y CO_2 como fuente de carbono (Figura 1.3). Debido a estas características jugaron un rol crucial en el período Precámbrico, cuando la atmósfera pasó de ser reductora a oxidante, contribuyendo al aumento en la concentración atmosférica O_2 por medio del que liberan como producto de su metabolismo fotosintético (Komárek, 2003).

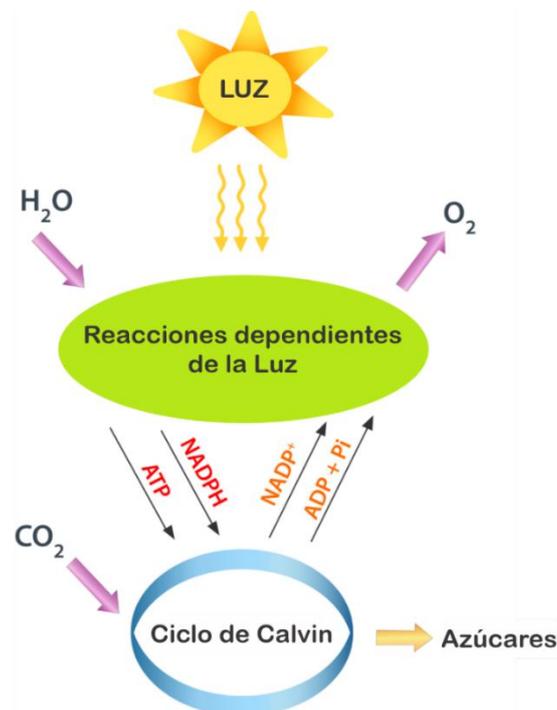


Figura 1.3. Esquema del metabolismo general de las cianobacterias

Es un grupo muy diverso, que incluye 150 géneros con aproximadamente 2000 especies, de amplia distribución en todo el planeta. Esto se debe a que tienen la capacidad de sobrevivir en hábitats extremos. Se las encuentra en aguas termales a temperaturas de hasta 74°C, también pueden sobrevivir a 0°C. Se han encontrado cianobacterias filamentosas en ambientes ácidos hasta pH de 2,9, como así también en locaciones muy alcalinas, con pH de 13 (Seckbach & Oren, 2007). También puede soportar altas intensidades de luz y radiaciones UV. Existen también cepas halotolerantes, que están presentes en ambientes costeros, pudiendo crecer en ambientes con altas concentraciones de sal (Sarma *et al.*, 2016). Pueden tener diferentes formas: esféricas, bastón, espirales; y pueden ser unicelulares, formar colonias, filamentos y *biofilms* (Figura 1.4).

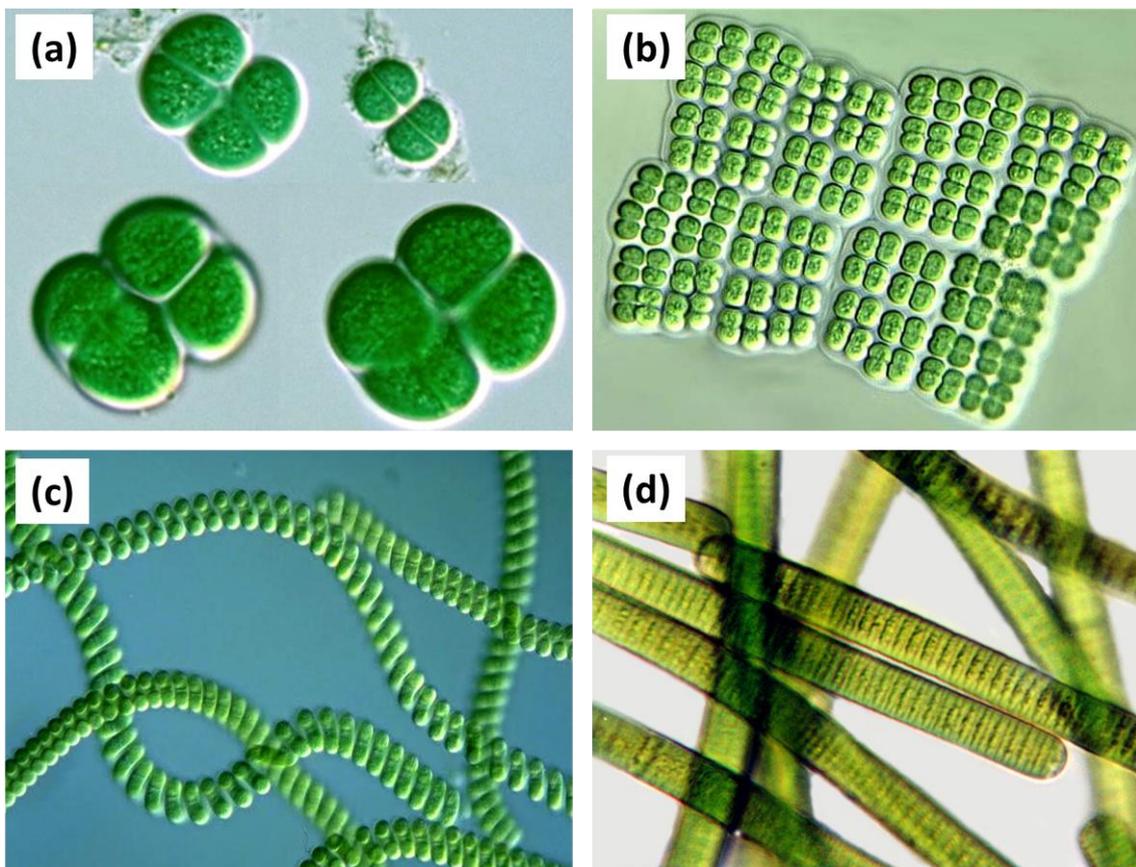


Figura 1.4. Diferentes formas y organizaciones celulares en cianobacterias. Células esféricas del género *Synechocystis* (a), colonias de células en un solo plano del género *Merismopedia* (b), filamentos elipsoidales de *Arthrospira* (c) y filamentos lineales del género *Oscillatoria* (d). Fuentes de las fotografías: <http://cfb.unh.edu/>, <http://sistemas.fciencias.unam.mx/>, <https://www.landcareresearch.co.nz/>.

Las cianobacterias son microorganismos Gram-negativos que tienen una pared celular más gruesa y compleja que la otras bacterias Gram-negativas, como por ejemplo *Escherichia coli*. Además, tienen una membrana exterior, una membrana de peptidoglicano, una membrana citoplasmática, y una capa externa formada por exopolisacáridos y proteínas polimerizadas. Esta última resulta un obstáculo al momento de romper las células, para lo cual es necesario utilizar fuertes detergentes y enzimas degradantes de peptidoglucano, como la lisozima. En el citoplasma se encuentran las membranas tilacoidales, que están relacionadas a los pigmentos, a los complejos antena de captación de luz y a la fotosíntesis. Los complejos para captación de luz se denominan ficobilisomas, que además de captarla también se encargan de transferirla a los dos fotosistemas: PSI y PSII. La cantidad de tilacoides es dependiente de las condiciones: con elevada iluminación y falta de CO₂, el número de tilacoides disminuye (Klemenčič *et al.*, 2017). Son organismos modelo del estudio de los ciclos circadianos, adaptándose a vivir en períodos de luz y períodos de oscuridad (Cohen & Golden, 2015). Cuando están en oscuridad, su metabolismo se ve modificado a heterotrófico, consumiendo las reservas de glucógeno acumuladas durante un período de luz y en algunas especies incluso consumiendo glucosa u otras fuentes de carbono del medio. El glucógeno es una de las inclusiones celulares que poseen las cianobacterias, junto con el polihidroxibutirato (PHB), gránulos de polifosfato y cianoficina, lípidos y ribosomas. El CO₂ fotosintético es fijado a través del ciclo de Calvin (Figura 1.3) por medio de la reacción catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO). El carbono fijado es conducido luego al ciclo de Krebs (o ciclo TCA) el cual se evidenció recientemente que cierra gracias a las enzimas 2-oxoglutarato descarboxilasa y succinato semialdehído deshidrogenasa (Zhang & Bryant, 2011). Uno de los productos intermedios de este ciclo es el α -cetoglutarato cuya función es servir de esqueleto carbonado para la asimilación de nitrógeno proveniente de amoníaco, conectando así el metabolismo del carbono con el del nitrógeno.

1.2.1. Productos de interés comercial de cianobacterias

Las cianobacterias producen un gran variedad de productos naturales con diferentes actividades biológicas (Dittmann *et al.*, 2015), y por otro lado, están ganando atención como huéspedes para aplicaciones biotecnológicas, debido a sus interesantes características metabólicas que representan una clara ventaja frente a los microorganismos heterotróficos. Dentro de él gran genero de las cianobacterias, *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*), *Synechococcus* sp. PCC 7002, y *Synechococcus elongatus* PCC 7942 han sido los microorganismos más utilizados en el estudio de la fotosíntesis, y como no existe evidencia científica de que produzcan toxinas, se los considera como huéspedes seguros para la producción de biocombustibles y productos farmacéuticos, entre otros (Klemenčič *et al.*, 2017).

Las cianobacterias son una fuente prometedora de productos naturales, grupo en el que se encuentran alrededor de 1100 metabolitos secundarios, de los cuales dos tercios provienen de los géneros *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* y *Hapalosiphon*, que son muy estudiados. La mayoría de estos metabolitos secundarios son producidos por las vías biosintéticas de péptidos no ribosomales (NRP) o de NRP híbridos policéticos, y tienen actividad biológica. Estos productos, que en muchos casos son las toxinas que producen los microorganismos, tienen potencial terapéutico, con características anticancerígenas, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales e inhibidoras de enzimas (Botana & Alfonso, 2015). Las toxinas pueden usarse en agricultura como pesticidas (Ali Shah *et al.*, 2017), mientras que otros productos se encuentran en los grupos de las vitaminas, pigmentos, aminoácidos, macrólidos, ácidos grasos, lipopéptidos y amidas (Santos-Merino *et al.*, 2019), y por último algunos más complejos tienen aplicación en la industria farmacéutica, como por ejemplo las microcistinas que tienen actividad anticancerígena (Sainis *et al.*, 2010). Una descripción detallada de los productos naturales de cianobacteria puede encontrarse en Dittmann *et al.* (2013).

Los microorganismos pertenecientes a los géneros más estudiados han sido modificados genéticamente por medio de biología sintética para producir nuevos compuestos por el agregado de vías de producción heterólogas. Algunas de las estrategias de ingeniería metabólica que se utilizan en este tipo de microorganismos fotosintéticos incluyen la modificación de la utilización de cofactores de NADH a NADPH, la expresión de vías con mayor fuerza impulsora termodinámica y la expresión de transportadores de excreción de productos (Lai & Lan, 2015). En esta clase de productos se pueden encontrar compuestos que son similares a los que se obtienen de plantas y algas, incluyendo fibras y biocombustibles, además de que cuentan con la posibilidad de sintetizar polihidroxiclcanoatos, una clase de bioplásticos dentro de la que se encuentra el polihidroxibutirato (PHB) (Santos-Merino *et al.*, 2019). Otros productos que puede ser producidos por este tipo de microorganismos incluyen alcoholes, ácidos grasos, terpenos de 5 a 15 átomos de carbono, azúcares simples, hidrógeno, biocombustibles, bioplásticos, entre otros. En la Tabla 1.1 se presentan algunos de estos productos, mientras que en Lai & Lan (2015) y en Knoot *et al.* (2018) puede encontrarse una descripción detallada de todos los productos que se han logrado obtener de cianobacterias por medio de modificaciones genéticas. Las cepas que se generan de esta forma son factibles para crecer en fotobiorreactores y por lo tanto cuentan con la posibilidad de ser plataformas fotosintéticas industriales (Formighieri, 2015).

Tabla 1.1. Productos obtenidos de cianobacterias por medio de biología sintética.

Producto	Especie de cianobacteria	Referencia
Iso-Butiraldehído		Atsumi <i>et al.</i> (2009)
Iso-Butanol		Atsumi <i>et al.</i> (2009)
1-Butanol		Lan & Liao (2011)
2,3-Butanodienol	<i>Synechococcus elongatus</i>	Oliver <i>et al.</i> (2013)
Iso-Propanol	PCC7942	Hirokawa <i>et al.</i> (2015)
Sucrosa		Ducat <i>et al.</i> (2012)
Glucosa y Fructosa		Niederholtmeyer <i>et al.</i> (2010)
Limoneno		Davies <i>et al.</i> (2014)
α -Bisaboleno		Davies <i>et al.</i> (2014)
n-Alcanos	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	Reppas & Ridley (2010), Patente: US 2010/0330642 A1
Manitol		Jacobsen & Frigaard, (2014)
Bioetanol		Gao <i>et al.</i> (2012)
Ácidos grasos		Liu <i>et al.</i> (2011)
Isopreno		Lindberg <i>et al.</i> (2010)
β -Felandreno	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Formighieri & Melis (2014)
Hidrogeno		Khanna & Lindblad (2015)
Glicerol		Savakis & Hellingwerf (2015)
Eritritol		van der Woude <i>et al.</i> (2016)

1.3. Ingeniería de Sistemas Metabólicos

La **ingeniería de sistemas metabólicos** no se encarga solo de estudiar el diseño de cepas, sino que también tiene en cuenta el resto del bioproceso, considerando variables como la composición del medio, el pH, la aireación, la alimentación de nutrientes (Chae *et al.*, 2017), y los procesos de separación y purificación, considerando de esta forma los procesos aguas abajo y aguas arriba de la fermentación o producción en el biorreactor (Figura 1.5). Las acciones que se realizan en las primeras dos etapas están orientadas a mejorar las productividades respecto al producto seleccionado, e incluyen la selección de la cepa, la construcción de la vía biosintética en caso del que producto no sea endógeno, mejora de la tolerancia al producto, desvío y optimización de los flujos metabólicos para la optimización de precursores, selección de fuentes de carbono y medio de cultivo, estudio de condiciones de cultivo batch y fed-batch, escalado de biorreactores, entre otras (Lee & Kim, 2015), y tienen una gran relación con las

herramientas de la **biología de sistemas**. El diseño de cepas específicamente, se plantea como un proceso iterativo en el cual se realizan simulaciones para obtener posibles modificaciones genéticas a partir de modelos matemáticos, luego se realizan dichas modificaciones *in vivo* y se estudia en laboratorio si la producción es óptima, volviendo a iniciar el proceso si no se alcanza dicha producción. Respecto a la tercera etapa, las acciones buscan reducir los costos globales de operación por medio de la mejora de los procesos de separación y purificación. En esta etapa debe tenerse en cuenta la formación de subproductos y si el producto deseado es extra o intra celular.

Existen algunos compuestos producidos a escala industrial cuyos bioprocesos fueron diseñados bajo este concepto de ingeniería de sistemas metabólicos, dentro de los cuales podemos encontrar los aminoácidos L-valina (Park *et al.*, 2011), L-treonina (Lee *et al.*, 2010), L-lisina (Becker *et al.*, 2011) y L-arginina (Park *et al.*, 2014); los químicos a granel 1,4-butanodiol (Yim *et al.*, 2011), 1,5-diaminopentano (Kind *et al.*, 2014), 1,4-diaminobutano, 1,3-propanodiol, butanol, isobutanol (Lee & Kim, 2015), ácido succínico (Becker *et al.*, 2013), y el fármaco artemisinina (Paddon & Keasling, 2014), pero aún no existe ningún proceso de este tipo desarrollado para microorganismos fotosintéticos.

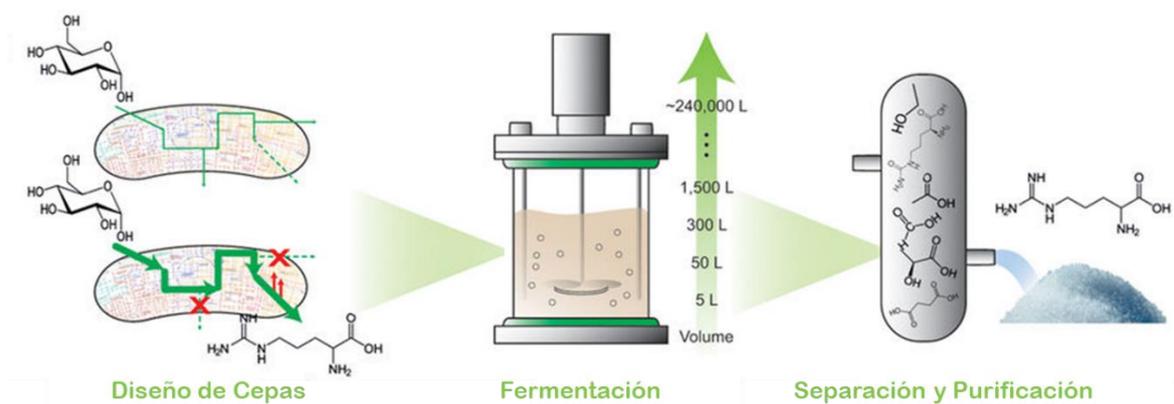


Figura 1.5. Etapas en el diseño de un bioproceso con el enfoque de la ingeniería de sistemas metabólicos. Fuente: Lee & Kim (2015).

1.3.1. Biología de sistemas

La biología de sistemas surge de la necesidad de dilucidar de manera holística los mecanismos involucrados en el comportamiento celular ya sea de organismos unicelulares como de células y/o tejidos de organismos superiores (Klipp *et al.*, 2009). Su base está en la integración de datos experimentales con los resultados de modelos matemáticos de metabolismo, planteándose de esta forma un proceso iterativo dentro del cual se resuelve un modelo en base a los datos disponibles, y luego se comprueban los resultados predichos por el modelo con nuevos experimentos, evitando de esta forma la realización de experimentos solo sobre suposiciones. Esta disciplina involucra datos cuantitativos, y es por lo tanto dependiente de la información biológica generada por estudios de biología molecular (Nielsen, 2017).

La biología de sistemas tiene un amplio rango de aplicación y es en la actualidad exitosamente aplicada en campos tales como el descubrimiento y desarrollo de drogas, biotecnología y en clínica médica (Kitano, 2015). En el caso de la industria química y biotecnológica, se puede destacar un programa de US\$ 600 millones lanzado recientemente por la empresa Exxon-Mobil en alianza con Synthetic Genomics Inc., una empresa que desarrolla cepas de microorganismos modificados genéticamente y procesos biotecnológicos basados en biología de sistemas, para la producción de biocombustibles a partir de algas (ExxonMobil, 2017). En la industria farmacéutica, empresas como Novartis, AstraZeneca y Hoffmann-La Roche utilizan herramientas de biología de sistemas para sus desarrollos. Esta última empresa utiliza tecnologías *in silico* en aproximadamente un 50 % de sus proyectos.

Para este tipo de estudios resulta básica la disponibilidad de modelos matemáticos del metabolismo de la célula o microorganismo que se quiera estudiar. Se pueden encontrar diferentes tipos de modelos, con diferente cantidad de información biológica y diferentes tamaños. Los modelos más útiles y representativos son los **modelos de escala**

genómica (GEMs, GEnomic Scale Models) que incluyen información del genoma completo del microorganismo con todas las reacciones y metabolitos relacionados al mismo, y sirven como representación de todos los procesos que ocurren dentro de la célula.

Una de las principales aplicaciones en las que ha crecido el campo de la biología de sistemas es en el diseño de “fábricas celulares microbianas” (*Microbial Cell Factories*), donde formulan modelos matemáticos que utilizan los GEMs de los microorganismos para estudiar la distribución de flujos de distintas vías metabólicas, predecir las tasas de crecimiento y de producción de biocompuestos de interés industrial, y sugerir, mediante las predicciones *in silico*, posibles modificaciones *in vivo* tanto en las condiciones de cultivo como intervenciones genéticas que aumenten la productividad del compuesto bajo estudio. Los mutantes obtenidos de esta forma luego pasan por un proceso de Adaptación Evolutiva en Laboratorio (ALE), que es una herramienta importante en la optimización de cepas facilitando la mejora de alguna característica, como puede ser el crecimiento máximo o la tasa de producción de un bioproducto, tanto por medio de técnicas predecibles como no intuitivas (Sandberg *et al.*, 2019).

Los recientes avances en las herramientas de ingeniería metabólica tales como los sistemas CRISPR/Cas9 y otras herramientas de edición genética, junto con la creciente capacidad para obtener sets de datos celulares ómicos (genómicos, proteómicos, transcriptómicos, metabolómicos y fluxómicos) y los avances en las técnicas computacionales, permiten el estudio de los efectos de manipulaciones complejas sobre el fenotipo y diseñar organismos productores de compuestos de interés comercial más robustos y eficientes (Laerke Hansen *et al.*, 2017). Los datos ómicos resultan muy relevantes para los GEMs, ya que como estos no involucran procesos de regulación a ningún nivel, sirven para agregar información fenotípica de características celulares y metabólicas en una escala de sistema completo. El análisis de este tipo de datos

también puede ser de utilidad en la identificación de genes a manipular para mejorar la producción de un compuesto (Chae *et al.*, 2017). Los datos de fluxómica son de especial interés en el análisis de distribuciones de flujo que se obtienen a partir de los GEMs, gracias a la metodología ^{13}C Analisis de flujos metabólicos (^{13}C -MFA) que se utiliza para la medición de flujos intracelulares (Young *et al.*, 2008). También se ha integrado información de proteómica y transcriptómica a los GEMs en algunos estudios, y en un futuro cercano comenzaran a encontrarse disponibles set de datos multiómicos que ocasionaran la aparición de nuevas capas de información en este tipo de modelos genómicos (Noor *et al.*, 2019).

Las estrategias *in vivo* para mejorar la producción de un compuesto de interés son generalmente complejas y no siempre se obtienen resultados positivos, lo que lleva a pensar en la utilidad de una herramienta que permita probar ciertas modificaciones *in silico* antes de llevarlas al ámbito experimental. La herramienta más sencilla y utilizada en la comprensión del metabolismo celular es el **Análisis de Balance de Flujo (FBA, Flux Balance Analysis)** (Savinell & Palsson, 1992), que se basa en maximizar el crecimiento celular, lo cual es el estado normal de la célula, sujeto a las restricciones impuestas por la estequiometría del GEM por medio de un problema de programación lineal, unido a restricciones adicionales como información termodinámica, datos experimentales, etc. Se han propuesto estrategias para mejorar la producción de bioproductos acoplado el crecimiento con la producción del compuesto de interés (Burgard *et al.*, 2003), fundamentándose en la idea de que si la célula maximiza su crecimiento, también maximizará la producción del compuesto deseado. Este acoplamiento se logra identificando reacciones a eliminar (*knock-outs*) *in silico*, que representan intervenciones genéticas *in vivo*.

La disponibilidad de herramientas de este tipo aplicadas a cianobacterias posibilitará el estudio de la producción de una gran variedad de compuestos en diferentes microorganismos con objetivos biotecnológicos.

1.3.2. Modelos de redes metabólicas

La formulación de modelos matemáticos de redes metabólicas de los microorganismos ha sido posible por la existencia secuenciación completa del genoma de un gran número de microorganismos, lo cual trajo como consecuencia que se plantee la posibilidad de generar modelos matemáticos para representar estos genomas y poder estudiarlos sistemáticamente. Debido a la complejidad de los procesos biológicos y a la gran cantidad de información contenida en estas secuenciaciones, los modelos matemáticos no pueden llegar a representar toda la información e interacciones contenidas en un determinado microorganismo. Esto llevo a que se generen diferentes tipos de modelos, con diferentes niveles de detalle y orientados a diferentes objetivos. En general, se puede decir que existe una relación inversa entre el tamaño del modelo matemático (cantidad de reacciones metabólicas incluidas) y el detalle del mismo (Figura 1.6). En los modelos topológicos, las redes se representan por medio de grafos, donde los elementos son nodos (puntos) y las relaciones entre ellos son las líneas. Este tipo de modelos pueden incluir todos los componentes de una célula, como metabolitos, genes, proteínas, etc., pero no incluyen información cuantitativa del metabolismo, como estequiometría, cinéticas, etc. Estos modelos se encuentran en el extremo izquierdo de la Figura 1.6, ya que contienen toda la información cualitativa de una red, pero carecen de información cuantitativa. En el otro extremo se encuentran los modelos cinéticos detallados que tienen en cuenta los flujos de cada una de las reacciones como función de la concentración de los metabolitos y todos los parámetros relacionados con las funciones enzimáticas, describiendo los flujos de las reacciones con las diferentes expresiones cinéticas (ej.: Michaelis-Menten) (*Di Maggio et al.*, 2017, 2014, 2010; Di

Maggio, 2012). Este conjunto de ecuaciones da como resultado un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) no-lineal que al resolverse da como resultado los perfiles de concentración de cada metabolito en el tiempo. Este tipo de enfoque solo puede utilizarse para modelos pequeños del metabolismo ya que la poca disponibilidad de información sobre los mecanismos de reacción y los parámetros cinéticos involucrados en los mismos (como K_m y v_{max}), y el costo computacional que representaría un modelo de grandes dimensiones y altamente no lineal, hacen que sea muy difícil poder utilizarlos para redes del metabolismo completo (Di Maggio *et al.*, 2014). Es por estas limitaciones que los modelos existentes de este tipo son generalmente pequeños, incluyendo pocas reacciones metabólicas, pero muy detallados y con mucha información biológica de las reacciones que contienen. En el caso de microorganismos fotoautótrofos y cianobacterias existen modelos cinéticos detallados solo para ciertos subsistemas, como el ciclo circadiano, el fotosistema II, el mecanismo de concentración de carbono (CCM, *Carbon Concentrating Mechanism*) y el ciclo de Krebs (Steuer *et al.*, 2012).

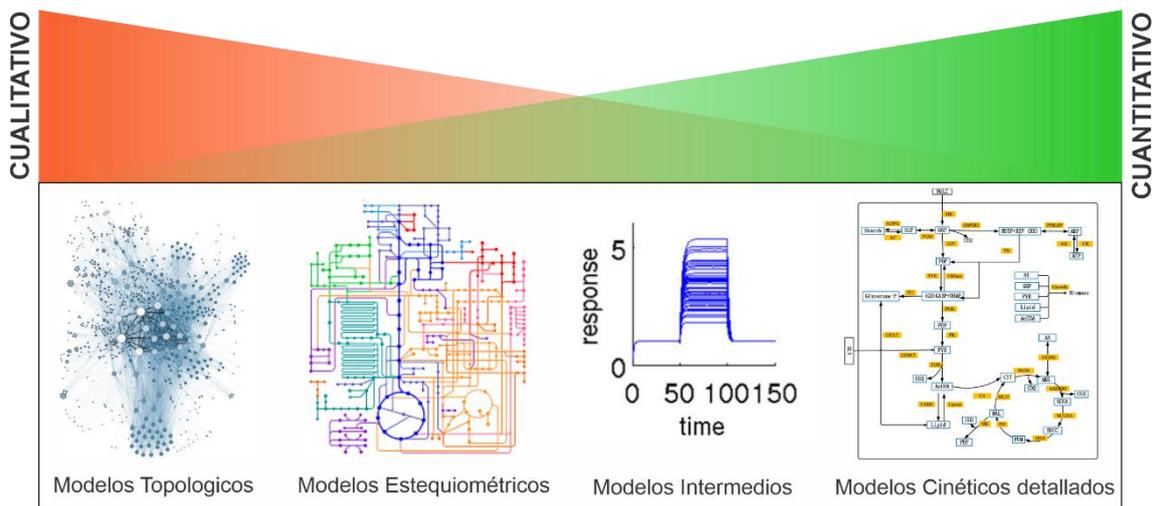


Figura 1.6. Representación esquemática de los diferentes tipos de modelos. Ordenados de izquierda a derecha según mayor a menor carácter cualitativo y de derecha izquierda de mayor a menor carácter cuantitativo. Modificado de Steuer *et al.* (2012).

Actualmente, la mejor opción para representar el metabolismo a escala genómica son los modelos estequiométricos o GEMs que incorporan información del genoma completo de un microorganismo (reacciones, metabolitos, enzimas, genes, etc.) sin la necesidad de incorporar información cinética que no está disponible, resultando en sistemas de ecuaciones lineales que contienen los balances de masa para cada metabolito de la red. Estos modelos permiten un análisis del comportamiento del metabolismo completo, aunque no brindan información sobre los perfiles de concentración y las funciones enzimáticas (Maranas & Zomorodi, 2016), pero igualmente tienen aplicaciones muy importantes en la ingeniería de microorganismos.

Por último, es importante notar que existen métodos intermedios entre los modelos cinéticos y los estequiométricos, que resultan híbridos entre estos dos tipos: incluyen un pequeño modelo cinético de algún subsistema y lo incluyen dentro del GEM completo (Luo *et al.*, 2006; Mahadevan *et al.*, 2002).

Los GEMs comenzaron a publicarse alrededor del comienzo del siglo XXI, y a partir de allí la producción fue en aumento hasta el año 2014 donde la tendencia comienza a mostrar un decrecimiento (Figura 1.7). Este cambio no representa necesariamente una disminución del interés en los mismos por parte de la comunidad científica, sino que se relaciona con dos aspectos: los GEMs para los microorganismos más interesantes de ser estudiados y más analizados biológicamente ya se encuentran publicados y revisados, y la reconstrucción de los microorganismos faltantes menos estudiados resulta muy difícil debido a la carencia de información experimental y biológica de los mismos (Kim *et al.*, 2017).

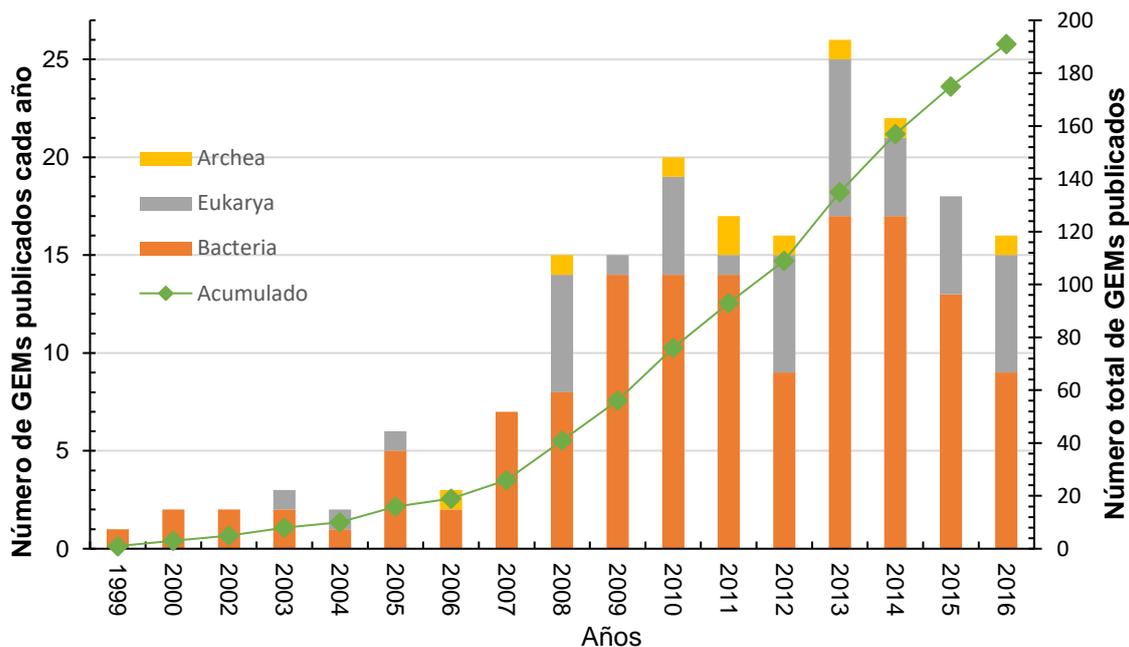


Figura 1.7. Evolución del número de GEMs publicados por año, desde la aparición del primero en el año 1999 hasta el año 2016. Adaptado de Kim *et al.* (2017)

1.3.3. Reconstrucción de redes a escala genómica

La reconstrucción de modelos de redes metabólicas a escala genómica es un proceso complejo e iterativo que comenzó a ser posible ante la disponibilidad de las secuencias de genomas completos de una gran variedad de microorganismos. Al ser un proceso complejo, se hace visible la necesidad de un procedimiento sistemático para la creación de cada nuevo modelo. Thiele & Palsson (2010) publicaron un protocolo donde proponen las siguientes etapas:

- **Etapa 1:** Se busca la anotación del genoma más reciente a partir de la que se obtienen los genes y las reacciones metabólicas relacionadas en una base de datos, como por ejemplo KEGG (Kanehisa & Goto, 1999) o CyanoBase (Fujisawa *et al.*, 2017). Se incluyen también los números EC (*Enzyme Commission numbers*) que los relacionan.
- **Etapa 2:** Esta etapa se divide en una serie de pasos que, de cumplirse correctamente, completarán la reconstrucción:
 - i. Organización de los datos según la vía de la que forman parte.

- ii. Verificación de las funciones metabólicas con literatura específica.
- iii. Comparación con microorganismos filogenéticamente similares.
- iv. Definición de sustratos y cofactores a usar.
- v. Inclusión de las cargas de los metabolitos, ya que en las bases de datos generalmente se presentan las fórmulas sin cargas.
- vi. Control de la estequiometría de las reacciones (puede ser necesario agregar protones o agua)
- vii. Determinación de la reversibilidad de las reacciones.
- viii. Ubicación de los genes y reacciones en los compartimientos correspondientes.
- ix. Definición del mapeo de genes-reacciones-proteínas (GPR).
- x. Asociación de los metabolitos a algún identificador universal para que el modelo sea accesible a otros científicos, por ejemplo KEGG, ChEBI (Hastings *et al.*, 2016) y PubChem (Kim *et al.*, 2019).
- xi. Asignación de un nivel de confianza a cada reacción según la cantidad de información que se tiene de la misma con una escala que va del 0 al 4.
- xii. Determinación de las reacciones espontáneas.
- xiii. Inclusión de las reacciones para el transporte de los metabolitos que pasan de un compartimiento a otro.
- xiv. Identificación de funciones metabólicas faltantes por medio de mapas disponibles, por ejemplo, en KEGG.
- xv. Determinación de la composición de la biomasa experimentalmente y, a partir de ella, determinación de la reacción de formación de biomasa. La composición juega un papel muy importante en los estudios de eliminación de genes *in silico* ya que la no presencia de un metabolito en la biomasa lo vuelve no esencial para el crecimiento, como a todas las reacciones que ocurren para su formación.

- xvi. Inclusión de la reacción de ATP asociado a crecimiento.
 - xvii. Recopilación de información sobre los requerimientos de nutrientes para el crecimiento.
- **Etapa 3:** Formulación de un modelo matemático a partir de la reconstrucción. En esta etapa se incluye la estequiometría de las reacciones como elementos de la llamada “matriz estequiométrica” (S). Este proceso puede realizarse mediante herramientas computacionales como COBRA Toolbox (Schellenberger *et al.*, 2011b).
 - **Etapa 4:** Evaluación de la red ya convertida en modelo matemático. El modelo inicial reconstruido manualmente probablemente contenga reacciones faltantes o “puntos muertos” (*Metabolic Dead Ends*), ciclos estequiométricos que no estén correctamente balanceados, problemas en las vías de producción de precursores de la biomasa, reacciones bloqueadas (que no puede tener flujo en ninguna condición), todos errores que deben corregirse para asegurar la consistencia del modelo. Por último, debe evaluarse cuantitativamente el crecimiento que predice el modelo: si no es cercano al esperado deben revisarse los nutrientes limitantes y la producción de todos los precursores en un proceso denominado curación del modelo.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar estrategias de modelado y optimización con modelos de redes metabólicas de cianobacterias a escala genómica con fines biotecnológicos mediante la aplicación de técnicas avanzadas de programación matemática.

1.4.2. Objetivos específicos

- Formular un modelo de la red metabólica de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 a partir de datos experimentales, bibliografía actualizada y modelos existentes.
- Evaluar el desempeño del modelo desarrollado frente a diferentes condiciones ambientales, y validarlo frente a datos de fluxómica disponibles en bibliografía específica y de crecimiento disponibles en el grupo.
- Formular problemas de optimización bi-nivel mixto enteros lineales para el diseño de cepas que acoplen el crecimiento a la producción de biocombustibles por medio de eliminación *in silico* de genes.
- Estudiar las condiciones de crecimiento y limitación de nutrientes para aumentar la producción de etanol en *Synechocystis* sp. PCC 6803 desde un enfoque de producción en dos etapas.
- Determinar estrategias de intervenciones genéticas para acoplar el crecimiento a la producción fotosintética de bioplásticos en *Synechocystis*.

1.5. Estructura de la tesis

Esta tesis se encuentra organizada en seis capítulos según se detalla a continuación:

En el **Capítulo 1** se detalla la situación mundial actual frente al cambio climático, ocasionado en gran medida por las emisiones antropogénicas de CO₂, lo cual lleva a analizar posibilidades de reemplazo a los combustibles fósiles y estrategias para disminuir los niveles de CO₂ en la atmosfera. Se presenta a la cianobacterias como potenciales candidatas a aportar soluciones en estos aspectos, y se brinda una descripción del rango de productos que pueden obtenerse a partir de estos microorganismos. Además, se presentan las herramientas de la ingeniería de sistemas metabólicos como una vía para el desarrollo de bioprocesos sustentables y económicamente rentables.

En el **Capítulo 2** se realiza la curación manual de un GEM de *Synechocystis* existente a partir de datos experimentales y bibliografía actualizada. Se realiza también una descripción detallada del microorganismo bajo estudio, incluyendo la fotosíntesis, el mecanismo de fijación de carbono, y las vías de producción de etanol y PHB.

En el **Capítulo 3** se evalúa la performance del modelo curado en el Capítulo 2 por medio de técnicas de FBA. Para esto se analiza el comportamiento frente a diferentes condiciones ambientales, se compara la tasa de crecimiento del modelo frente a datos experimentales disponibles en el grupo, y se valida la distribución de flujo en condiciones fotoautotróficas para un set de datos de fluxómica disponible en bibliografía.

En el **Capítulo 4** se desarrollan problemas de optimización binivel mixto enteros lineales para el diseño de cepas, con el objetivo de acoplar el crecimiento a la producción de un producto de interés, por medio de la identificación de intervenciones genéticas. Estos problemas se reformulan por medio de la teoría de la dualidad a problemas mixto enteros lineales (MILP). Luego, dichos problemas se utilizan para analizar la posibilidad de acoplar la producción fotosintética de etanol al crecimiento en *Synechocystis*.

En el **Capítulo 5** se utilizan los problemas de optimización formulados en el Capítulo 4 para el estudio de la producción fotosintética de bioplásticos en *Synechocystis*.

Por último, en el **Capítulo 6** se presentan las conclusiones generales y particulares de esta tesis, como así también los trabajos futuros que pueden realizarse siguiendo esta línea de investigación

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis se encuentran publicados en los congresos nacionales, internacionales y journals que se encuentran detallados en la sección Publicaciones y Congresos.

Modelo metabólico a escala genómica de *Synechocystis*

2.1 Introducción

Synechocystis sp. PCC 6803 (a partir de ahora *Synechocystis*) es una cianobacteria de forma celular esférica de 1,5 a 2 μm de diámetro no fijadora de nitrógeno. En la Tabla 2.1 se puede ver la clasificación taxonómica completa de la especie. Su metabolismo es mixotrófico, siendo capaz de realizar fotosíntesis oxigénica durante períodos de luz y crecer heterotróficamente durante períodos de oscuridad a partir de respiración aeróbica (glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa). Su genoma es poliploide con unas 12 copias cromosómicas y un tamaño de 3,5 Mb codificando para unos 3317 genes. Posee tres plásmidos pequeños (5,2 kb, 2,4 kb y 2,3 kb) y cuatro de mayor tamaño (pSYSM:120 kb, pSYSX:106 kb, pSYSA:103 kb y pSYSG:44 kb) (Kaneko *et al.*, 2003). Fue el primer organismo fotosintético completamente secuenciado y anotado (Kaneko & Tabata, 1997) y esta información se encuentra disponible en las bases de datos CyanoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) y CYORF (<http://cyano.genome.jp/>). *Synechocystis* es eficientemente transformable por incorporación de material genético exógeno e integra el ADN por recombinación homóloga doble (Kufryk *et al.*, 2002), lo que ha permitido el desarrollo de un gran número de estrategias de ingeniería genética para la obtención de diferentes mutantes.

La disponibilidad la información genómica completa, la predisposición a ser genéticamente modificado y su tipo de metabolismo han posicionado a *Synechocystis* como organismo modelo para el estudio de los procesos fotosintéticos y del estudio genético de organismos fotoautótrofos.

Tabla 2.1. Clasificación taxonómica de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Dominio	Prokaryota
Reino	Eubacteria
Subreino	Negibacteria
Filo	Cyanobacteria
Clase	Cyanophyceae
Subclase	Synechococcophycidae
Orden	Synechococcales
Familia	Merismopediaceae

En la micrografía de la Figura 2.1 se puede observar que la envoltura celular de *Synechocystis* está formada, como es típico en las bacterias gram negativas, por una membrana externa, una capa fina de peptidoglicanos y el espacio periplasmático entre ésta y la membrana plasmática (Figura 2.1 b y c). En el citoplasma se pueden observar las membranas tilacoidales concéntricas (Figura 1 a) donde están alojados los elementos de las cadenas transportadoras de electrones de los fotosistemas I y II, y de la fosforilación oxidativa. Los pigmentos fotosintéticos de *Synechocystis* son la clorofila a, la ficocianina y la aloficocianina (MacColl, 1998). También producen carotenoides como pigmentos accesorios y de protección siendo los principales el β -caroteno, mixoxantófila, zeaxantina y equinenona (Zhang *et al.*, 2015). La membrana plasmática solo posee los elementos funcionales de la cadena transportadora de electrones que participan en la fosforilación oxidativa.

Synechocystis posee tres inclusiones celulares principales (Figura 2.1 a): i) carboxisomas, cuerpos poliédricos que contienen a la enzima Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (RuBisCO) encargada de la fijación de CO₂ en el ciclo de Calvin; ii) gránulos de glucógeno que constituyen una reserva de carbono y energía para los períodos de oscuridad; y iii) gránulos de cianoficina que es un polipéptido no ribosomal formado principalmente por partes iguales de aspartato y arginina, y actúa como compuesto de reserva de nitrógeno y carbono.

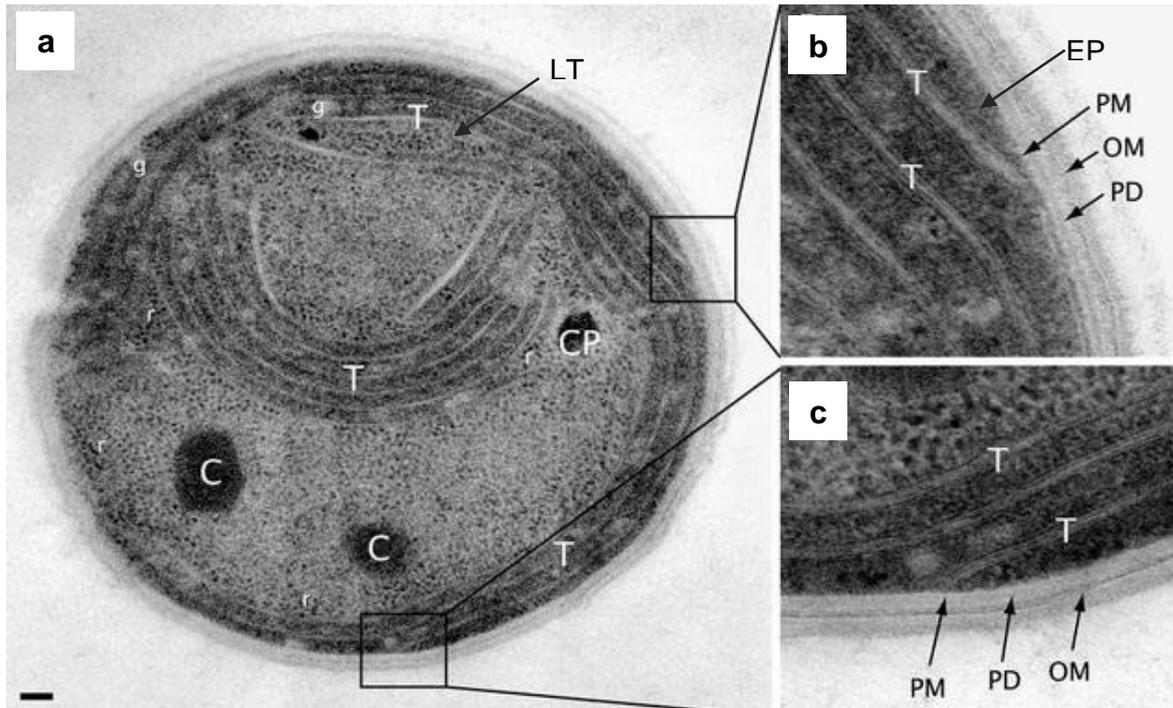


Figura 2.1. Ultraestructura de una célula completa de *Synechocystis* (a) y ampliaciones de la zona de la pared celular (b) y (c). T membranas tilacoidales, LT lumen tilacoidal, C carboxisoma, CP gránulo de cianoficina, g gránulo de glucógeno, r ribosomas, PM membrana OM membrana externa, PD capa de peptidoglicano, EP espacio periplasmático. Barra escala: 100 nm. Fuente de la imagen: Liberton *et al.* (2006)

En la Figura 2.2 se presenta un esquema con las principales vías del metabolismo del carbono de *Synechocystis*. La luz y el agua son utilizadas para la producción de energía y oxígeno por medio de la fotosíntesis. Esta energía es luego empleada en la fijación de carbono que tiene lugar en el ciclo de Calvin. El principal producto de este ciclo es el 3PG que se utiliza en la glucólisis, que puede dividirse en superior e inferior. En la glucólisis superior, que está interconectada con la vía de las Pentosas Fosfato (PPP), se produce energía en forma de NADPH, y se generan metabolitos precursores de la biomasa como los carbohidratos. En la glucólisis inferior ocurre la síntesis de lípidos a partir de acetil-CoA, que también se utiliza en el ciclo de Krebs, donde se generan precursores para la producción de nucleótidos, aminoácidos y pigmentos, procesos que requieren la fijación de nitrógeno, azufre y magnesio, respectivamente.

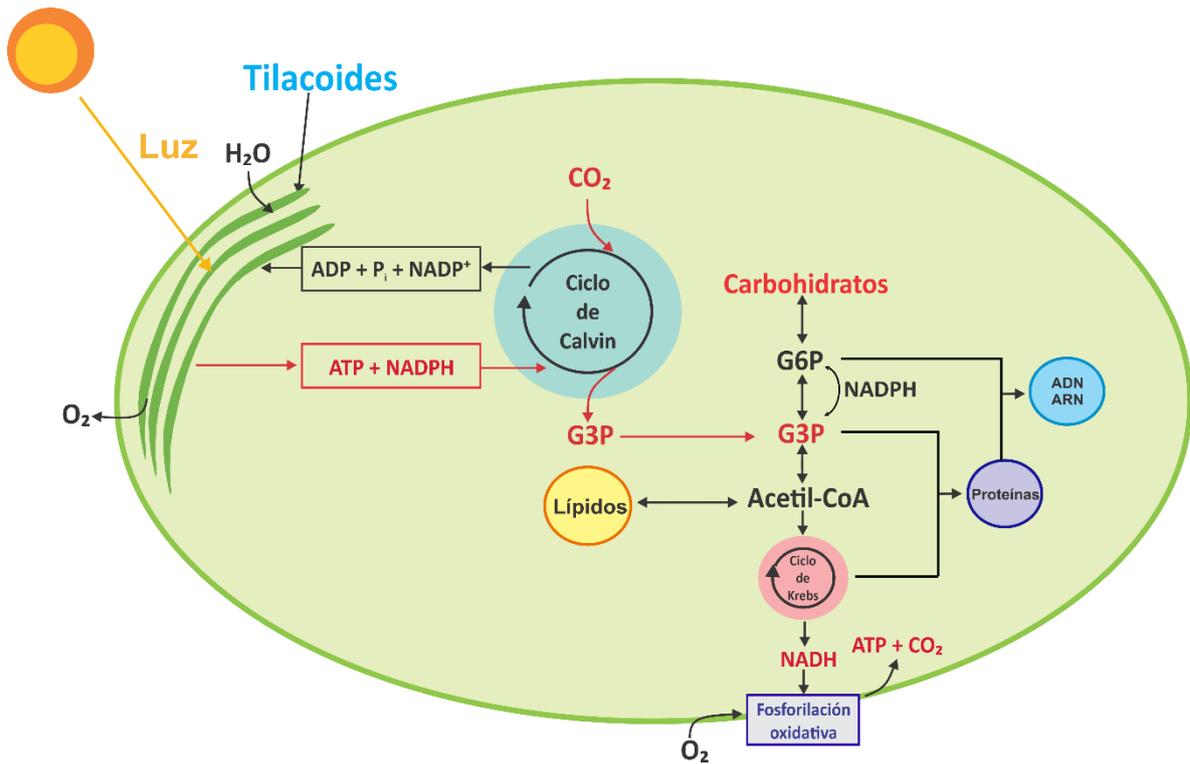


Figura 2.2. Representación esquemática del metabolismo general de las cianobacterias. Traducido de Baroukh *et al.* (2015)

En lo que respecta al modelado metabólico de *Synechocystis*, en los últimos 10 años se han publicado reconstrucciones con diferente nivel de detalle, principalmente de los sistemas relacionados con la fotosíntesis (Baroukh *et al.*, 2015). Las primeras dos reconstrucciones (Hong & Lee, 2007; Shastri & Morgan, 2005) incluyen menos de 100 reacciones, involucrando las principales vías del metabolismo central del carbono. Estos modelos permiten evaluar el crecimiento celular en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas. El primer modelo metabólico a escala genómica de *Synechocystis* fue propuesto por Fu (2009), aunque esta reconstrucción no se encuentra correctamente curada y por lo tanto no se pueden obtener resultados computacionales a partir de ella. Posteriormente se publicaron casi simultáneamente las reconstrucciones de Montagud *et al.* (2010) (*iSyn669*) y de Knoop *et al.* (2010). El modelo *iSyn669* fue el primer GEM en considerar dos compartimentos celulares y puede utilizarse en las configuraciones de crecimiento heterotrófico, autotrófico y mixotrófico; mientras que el modelo de Knoop *et al.* (2013) fue el primero en incluir el proceso de fotorrespiración. El

siguiente modelo publicado fue el de Yoshikawa *et al.* (2011), el cual es el primero en incluir una validación frente a datos experimentales de fluxómica para condiciones heterotróficas y mixotróficas. La reconstrucción de Nogales *et al.* (2012) (*iJN678*) incluye una descripción más completa y compartimentada del proceso fotosintético. El análisis *in silico* de este modelo permitió la identificación de dos estados de crecimiento fotoautotrófico diferentes: limitado por carbono y limitado por luz. Además, estos autores comparan sus resultados *in silico* con resultados *in vivo* de un estudio experimental con ^{13}C -Análisis de Flujos Metabólicos (^{13}C -MFA, *Metabolic Flux Analysis*) para crecimiento fotoautotrófico (Young *et al.*, 2011). Saha *et al.* (2012) desarrollaron el modelo *iSyn731*, validándolo frente a los mismos datos experimentales que Nogales *et al.* (2012). En este caso, los autores fijan el valor máximo de producción de biomasa y obtienen los valores mínimos y máximos para cada flujo para los que la solución con el crecimiento fijado es válida. Más de un 50% de los flujos considerados en este análisis no se corresponden con los rangos presentados para los valores experimentales. Finalmente, Knoop *et al.* (2013) proponen una modificación de su modelo publicado previamente (Knoop *et al.*, 2010), el cual utilizan para estudiar la distribución de flujos intracelulares en un estado limitado por luz. Este modelo resulta el primero en estudiar la reorganización del metabolismo bajo ciclos alternativos de luz/oscuridad.

Las reconstrucciones iniciales de los modelos metabólicos a escala genómica deben ser validadas frente a datos experimentales. Cuando estos modelos no son capaces de representar de forma precisa estos datos necesitan un curado manual que implica la revisión de los balances de masa de los metabolitos, las relaciones Gen-Proteína-Reacciones y la reversibilidad de las reacciones con información experimental específica del microorganismo bajo estudio. Este proceso consume mucho tiempo porque no existe un método sistemático para realizarlo (Machado *et al.*, 2016) y se realiza en base a literatura específica del estudio de las enzimas y bases de datos públicas CyanoBase (Fujisawa *et al.*, 2017), CyanoEXpress (Hernandez-prieto &

Futschik, 2012), KEGG (Kanehisa & Goto, 1999), MetaCyc (Caspi *et al.*, 2006), SEED (Overbeek *et al.*, 2014), BRENDA (Schomburg *et al.*, 2002) , etc.

En este capítulo, se presenta la curación, realizada como parte del trabajo de tesis, del modelo metabólico a escala genómica desarrollado por Knoop *et al.* (2013) en base a bibliografía específica reciente de *Synechocystis*, con el objetivo de mejorar las predicciones del modelo para el diseño *in silico* de cepas fotoautótrofas productoras de compuestos de interés biotecnológico.

2.2 Cadenas transportadoras de electrones en *Synechocystis*

Synechocystis cuenta con tres cadenas transportadoras de electrones diferentes, dos de ellas relacionadas a la fotosíntesis y una a la respiración. Las cadenas de electrones utilizadas en el proceso de fotosíntesis se denominan Flujo Lineal y Flujo Cíclico de Electrones (LEF: *Lineal Electron Flux* y CEF: *Cyclic Electron Flow*). La fotosíntesis ocurre en la membrana tilacoidal en tres complejos proteicos transmembrana: el fotosistema I (PSI), el fotosistema II (PSII) y el complejo citocromo *b₆f* (cyt *b₆f*) (Figura 2.3). El LEF es idéntico al de las plantas superiores y se utiliza para generar poder reductor en forma de ferredoxina reducida (Fd) o NADPH y ATP que luego serán consumidos en el proceso de fijación de CO₂, en la captación de nutrientes y en otros procesos metabólicos, con producción asociada de O₂. La captación de luz en los fotosistemas es mediada por complejos proteicos específicos de cianobacterias denominados ficobilisomas que transfieren la energía lumínica colectada al centro de reacción formado por clorofila que se encuentra ubicado en la membrana tilacoidal (Arteni *et al.*, 2009).

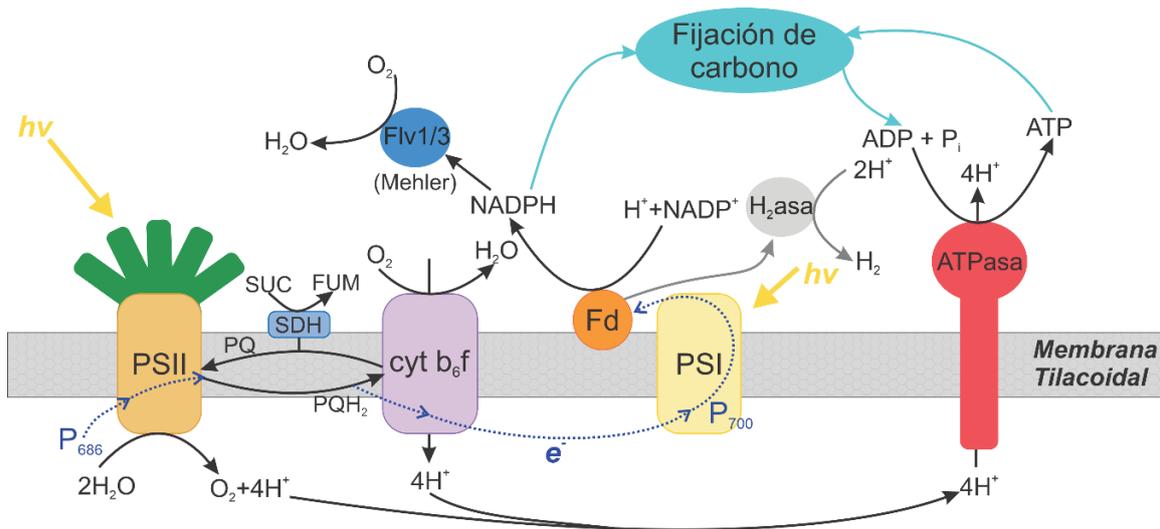


Figura 2.3. Esquema de la fotosíntesis en *Synechocystis*. Las cadenas transportadoras de electrones se utilizan para la producción de NADPH en la ferredoxina (Fd) y también producen un gradiente de protones que es utilizado para generar ATP en la ATPasa. Fd, Flv 1/3 y H $_2$ asa participan de las vías alternativas de transporte de electrones.

El flujo de electrones ocurre por una diferencia de potencial redox generada por la luz y por la distribución espacial de los complejos proteicos en función de su potencial redox creciente (Hallenbeck, 2017). Este transporte de electrones genera además un gradiente de protones a través de la membrana que luego lleva a la producción de ATP por medio de la enzima ATP sintasa (ATPasa). La cadena de transporte LEF genera una relación ATP/NADPH de 1,28, mientras que la relación necesaria para suplir la fijación de CO $_2$ en el ciclo de Calvin es de 1,5 (Kramer & Evans, 2011), por lo tanto es necesario un suministro adicional de ATP. Existen vías Alternativas de Flujos de Electrones (AEF: *Alternative Electron Flux*) que tienen como principal función balancear la relación ATP/NADPH, el cual es un parámetro indispensable en la homeostasis celular. La principal AEF es el CEF, en el cual el flujo de electrones se produce solo alrededor del PSI generando un gradiente de protones que es utilizado para la producción de ATP, sin la generación de NADPH (Nogales *et al.*, 2012). Una de las reacciones importantes de las vías AEF es la reacción de tipo Mehler, que utiliza electrones generados en el PSII para reducir O $_2$ a H $_2$ O en el PSI. Esta reacción se ha observado en condiciones de fluctuaciones de luz, donde protege al PSI de la presión

reductiva, así como en condiciones de luz continua y en exceso de CO₂ (Thiel *et al.*, 2019). En este microorganismo el NADPH generado en la fotosíntesis es, en mayor medida, oxidado para la fijación de CO₂ en el ciclo de Calvin, por lo tanto, la cadena respiratoria de transporte de electrones no tiene la función exclusiva de reciclar NADPH, sino que los donadores de electrones son el succinato, el H₂ y el NAD(P)H. El funcionamiento de estas vías es muy complejo y aún continúa bajo estudio (Knoop *et al.*, 2013; Nogales *et al.*, 2012).

2.3 Mecanismos de captación de carbono

El mecanismo de concentración de carbono inorgánico en cianobacterias (CCM) ha sido ampliamente estudiado en varias especies dentro de las que se encuentra *Synechocystis*. Se han identificado cinco modos de captación de carbono (Price *et al.*, 2008) (Figura 2.4), de los cuales tres implican el ingreso de anión bicarbonato (HCO₃⁻) y los dos restantes de CO₂. Los tres modos implicados en la captación de HCO₃⁻ son:

- i. Un transportador inducible de alta afinidad codificado por el gen *cmpABCD* perteneciente a la familia de las ATPasas de transporte identificado por Omata *et al.* (1999) denominado BCT1.
- ii. Un transportador inducible de alta afinidad dependiente de Na⁺ identificado por Shibata *et al.* (2002) denominado SbtA.
- iii. Un transportador de baja afinidad, pero flujo elevado, dependiente de Na⁺, identificado por Price *et al.* (2004) denominado BicA.

Los modos de captación de CO₂ están asociados a complejos NDH-I (Complejo NADH deshidrogenasa), a diferencia de los sistemas de captación de HCO₃⁻ asociados a transportadores. La captación de CO₂ se realiza en dos pasos: la entrada pasiva de CO₂ a la célula a través de la membrana externa, seguida por la conversión de este CO₂ en HCO₃⁻. Los dos complejos NDH-I involucrados son:

- iv. NDH-I4 ubicado en la membrana plasmática (Maeda *et al.*, 2002)

- v. NDH-I3 inducido frente a limitación de carbono inorgánico y tiene mayor afinidad que el NDH-I4 (Maeda *et al.*, 2002). Se encuentra ubicado en la membrana tilacoidal (Prommeenate *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

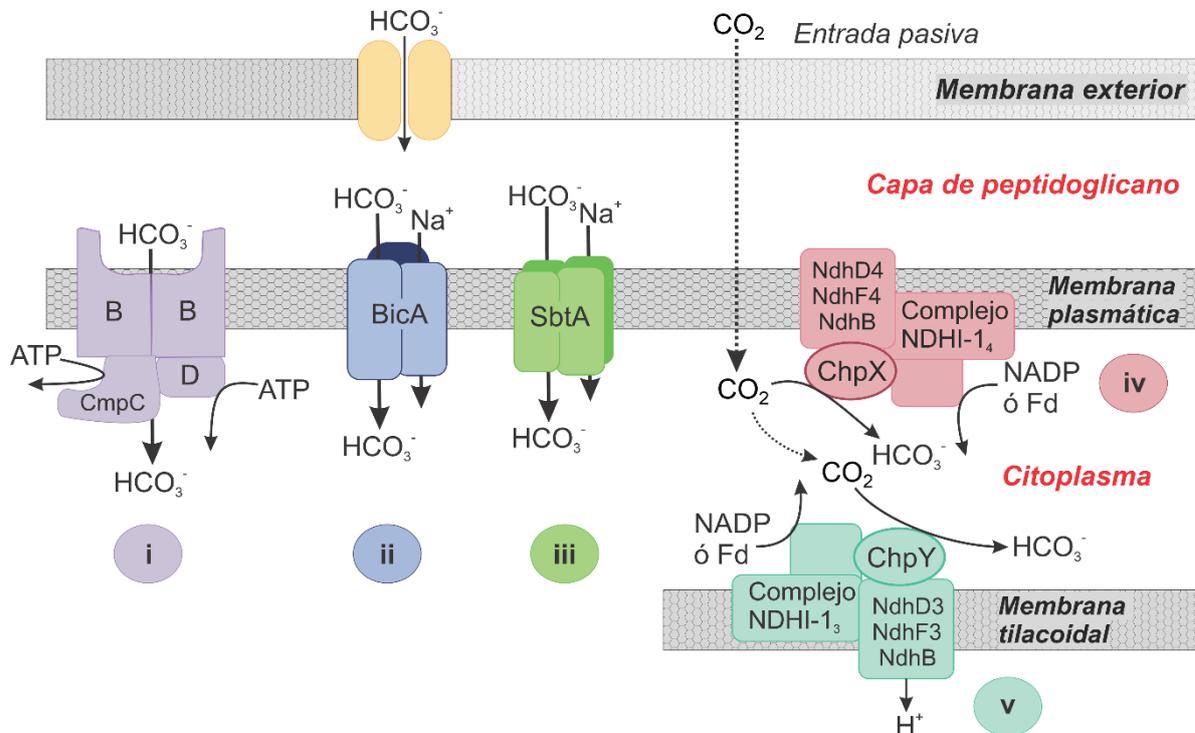


Figura 2.4. Esquema del mecanismo de concentración de carbono en *Synechocystis*. Se muestran los cinco modos de captación de carbono: tres de HCO_3^- (i, ii y iii) y dos de CO_2 (iv y v). La numeración utilizada en el esquema se corresponde con el texto.

Todo el carbono inorgánico que ingresa a la célula se convierte a HCO_3^- en cual es transportado a los carboxisomas. Como se mencionó anteriormente, en estas inclusiones se encuentra la enzima RuBisCO. Esta enzima es la primera del ciclo de Calvin y tiene una doble función pudiendo actuar como carboxilasa, catalizando la fijación de CO_2 para producir dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PG), o puede actuar como oxigenasa fijando O_2 por medio de la fotorrespiración, proceso que culmina con la producción de CO_2 . La reacción de fotorrespiración ocurre a niveles muy bajos salvo en condiciones de baja presión parcial de CO_2 , lo cual se cree que favorece la actividad oxidativa; y perjudica el nivel de fijación de carbono, por lo que se la considera como una de las reacciones más ineficientes del metabolismo (Allahverdiyeva *et al.*, 2011). Las cianobacterias de agua dulce, como *Synechocystis*, contienen β -carboxisomas, que

resultan esenciales para la operación eficiente del CCM (Price *et al.*, 2008). Dentro de ellos existe una enzima específica denominada anhidrasa carbónica (AC) que cataliza la conversión del HCO_3^- que ingresa a los carboxisomas a CO_2 que luego será fijado por la RuBisCO. Existe otra posible vía de fijación de carbono en *Synechocystis* a través de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), que cataliza la formación de oxaloacetato (OAA) a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) y HCO_3^- . Esta enzima es un punto clave de ramificación que determina el tipo de fijación de carbono en los organismos fotosintéticos, y se la encuentra en plantas, algas, cianobacterias y bacterias heterotróficas (Takeya *et al.*, 2017). Se ha encontrado que esta enzima tiene actividad en condiciones heterotróficas y mixotróficas, representando en este último caso un 25% del carbono metabolizado (Yang *et al.*, 2002). Sin embargo, en condiciones fotoautotróficas no tiene efecto neto en el balance de carbono dado que cuando se encuentra activa lo hace en conjunto con la enzima málica (ME), que cataliza la descomposición de (S)-Malato (MAL) en piruvato (PYR) y CO_2 . Esto hace que el carbono fijado por la PEPC sea liberado por la ME, por medio de un ciclo similar al de fijación de carbono en las plantas C4, pero sin una pérdida neta de carbono (Young *et al.*, 2011). Otro aspecto importante es que existe una barrera difusiva a la pérdida de CO_2 a través de la membrana de los carboxisomas, que debe ser mínima para que la fijación de carbono se maximice (Badger & Price, 2003). En la Figura 2.5 se puede ver un esquema completo del CCM de *Synechocystis*.

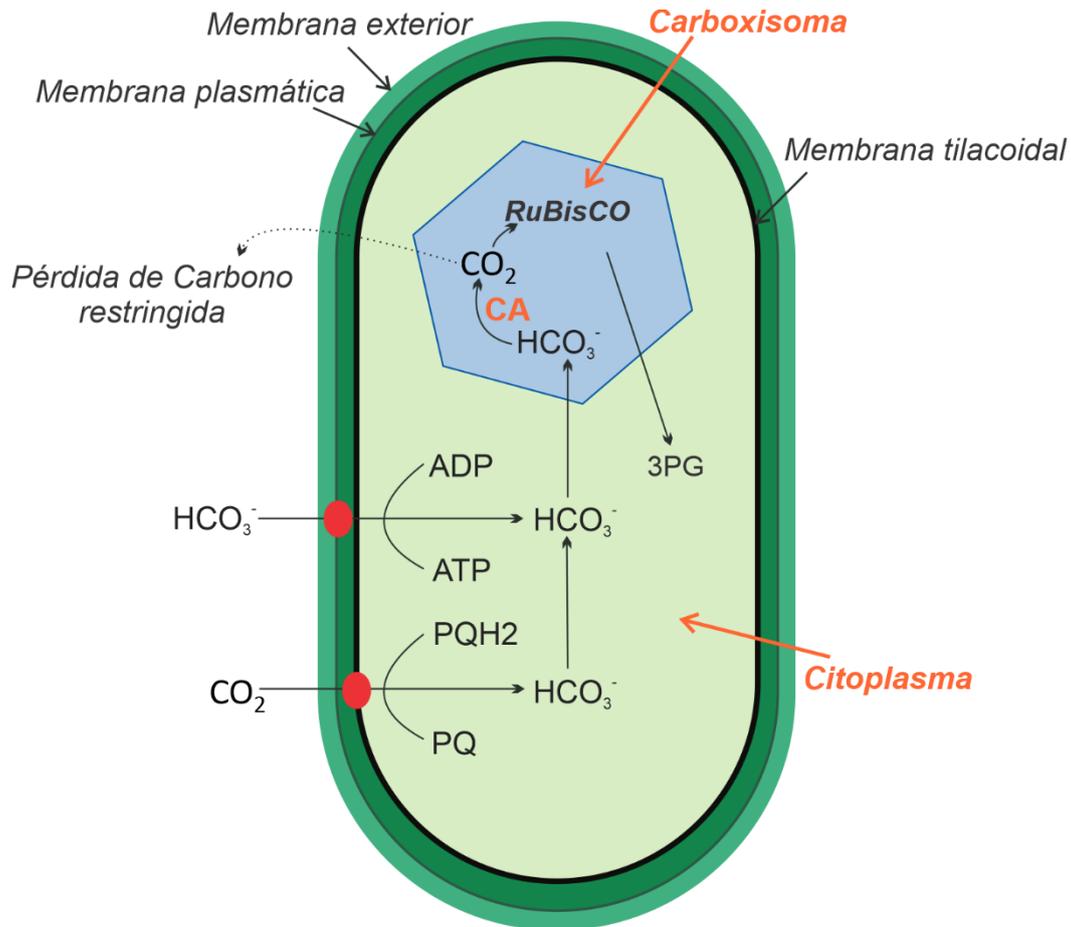


Figura 2.5. Esquema del CCM de *Synechocystis*. Se observa el ingreso de HCO_3^- ubicado en la membrana plasmática y el de CO_2 en la membrana tilacoidal. El HCO_3^- que se acumula en el citoplasma ingresa al carboxisoma donde se convierte de CO_2 por medio de la enzima CA. Por último, la RuBisCO convierte el CO_2 a 3PG. En este esquema no se muestra el proceso de fotorrespiración

2.4 Vías de producción de etanol y PHB

Synechocystis fue modificada para permitir la producción fotosintética de etanol considerando la inserción de los genes *pdh* y *adh11* de la bacteria anaeróbica estricta productora de etanol *Zymomonas mobilis* por primera vez en el año 2009 (Dexter & Fu, 2009). A partir de dicha modificación, se realizaron otros intentos de obtener cepas modificadas con mejor productividades entre los que se pueden nombrar los estudios de Dienst *et al.* (2014), Gao *et al.* (2012) y Vidal Vidal (2009), además de algunas patentes, propiedad de la empresa *Algenol Biofuels*. (Duehring *et al.*, 2014, 2012) Por otro lado, recientemente se ha encontrado evidencia de que *Synechocystis* posee una vía de producción de acetato a través de la enzima fosfoquetolasa que contribuye al

metabolismo del carbono durante el metabolismo autotrófico (Xiong *et al.*, 2015) lo que lleva a la presencia de una vía de producción natural de etanol que podría tener actividad en determinadas condiciones ambientales (nutrientes, luz, etc.). Además, las cianobacterias cuentan con un metabolismo fermentativo que se encuentra activo en condiciones anaeróbicas y de oscuridad, y que tiene diferentes vías tales como fermentación ácida mixta, fermentación homo y hetero láctica y fermentación acética, con hidrógeno, acetato, formato, lactato, CO₂ y etanol como productos (Stal & Moezelaar, 1997). En la Figura 2.6 se pueden observar las vías de producción de etanol natural y heteróloga. El diseño *in silico* de cepas productoras de etanol se describirá en detalle en el Capítulo 4.

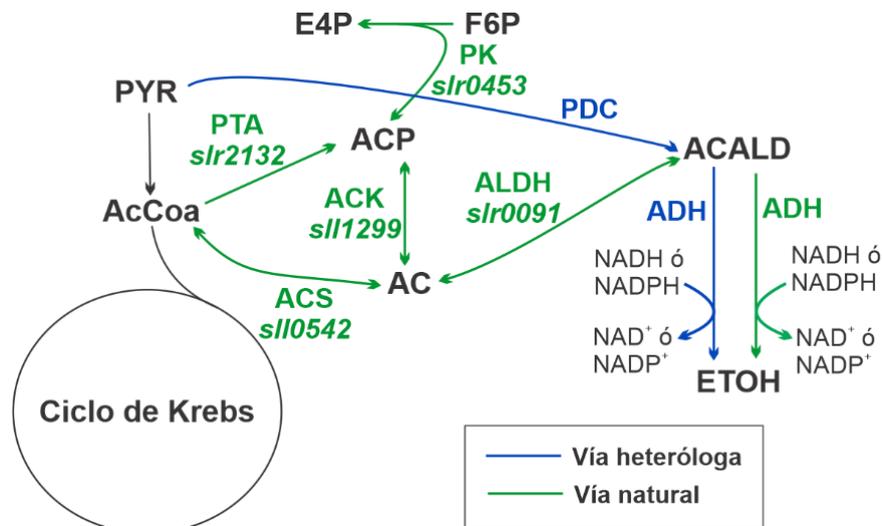


Figura 2.6. Vías de producción de etanol en *Synechocystis*. ADH: Alcohol deshidrogenasa; ACS: Acetil-CoA sintetasa; ALDH: Aldehído deshidrogenasa; ACK: Acetato quinasa; PTA: Fosfato acetiltransferasa; PK: Xilosa 5-fosfato/Fructosa 6-fosfato fosfoketolasa; PDC: Piruvato descarboxilasa

Esta cianobacteria también cuenta con la capacidad de acumular polihidroxibutirato (PHB), un biopolímero perteneciente a la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs), que también es producido por ciertas bacterias heterotróficas y que resulta muy estudiado con el objetivo de reemplazar a los plásticos convencionales. En algunos casos, las propiedades térmicas y mecánicas del PHB producido por cianobacterias son comparables a las del producido por bacterias heterotróficas, lo cual presenta a

Synechocystis como potencial productora de PHB con fines biotecnológicos. Debido a esto, se han realizado numerosos estudios de las tasas de producción de este polímero y como mejorarlas, realizando modificaciones genéticas y considerando condiciones de crecimiento con limitación de nutrientes, siendo el caso de limitación de nitrógeno el más estudiado (Hirai *et al.*, 2019; Thiel *et al.*, 2019). La vía de producción de PHB en *Synechocystis* es natural, y está relacionada con el ciclo de Calvin, ya que comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA que se convierten en acetoacetil-CoA por medio de la enzima *phaA* (Alberto *et al.*, 2018). Luego por medio de la acción de las enzimas *phaB* y *phaC/phaE* se produce el PHB. La vía de producción de PHB se esquematiza en la Figura 2.7.

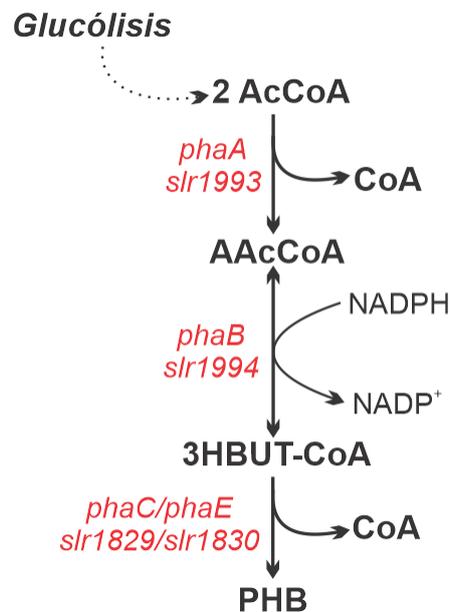


Figura 2.7. Vía de producción de PHB en *Synechocystis*. *phaA*: acetil-CoA acetiltransferasa; *phaB*: acetoaetil-CoA reductasa; *phaE*: polihidroxiálcanoato sintasa subunidad PhaE; *phaC*: polihidroxiálcanoato sintasa subunidad PhaC

2.5 Modelos metabólicos basados en restricciones

Como se describió en el Capítulo 1, los modelos metabólicos basados en restricciones consisten en un set de balances de masa para cada uno de los metabolitos intracelulares. Como vimos en la Figura 2.1, *Synechocystis* cuenta con diversos compartimentos celulares que deben tenerse en cuenta en los modelos metabólicos ya

que hay reacciones que tienen lugar en los diferentes compartimentos, metabolitos que se encuentren en varios de ellos, y también existen reacciones de intercambio de metabolitos entre dichos compartimentos.

La base de los modelos basados en restricciones se encuentra en la matriz estequiométrica (S) del microorganismo bajo estudio. Esta matriz S se obtiene a partir de la lista de reacciones y contiene las reacciones en las columnas y los metabolitos en las filas. Cuando un metabolito actúa como reactivo, le corresponderá un coeficiente negativo en la matriz S , y cuando actúa como producto, le corresponderá uno positivo. Los metabolitos que se intercambian entre compartimentos celulares aparecen en múltiples filas de la matriz estequiométrica, una por cada compartimento en que se lo encuentre (Nielsen & Hohmann, 2017).

Las variables de estos modelos son los flujos metabólicos de las reacciones, que representaremos con el vector v . Además de la matriz S , los modelos contienen información de las asociaciones entre los genes, las enzimas metabólicas y las transformaciones bioquímicas que realizan las mismas en lo que se denomina como asociación Gen-Proteína-Reacción (GPR) (Thomas *et al.*, 2015). Las reacciones metabólicas están relacionadas con sus correspondientes genes y pueden tener diferentes mapeos GPR (Figura 2.8) (Maranas & Zomorodi, 2016):

- *Mapeo uno a uno*: Una reacción (Rxn A) es catalizada por una única enzima (Prot 1) que es codificada por un único gen (Gen 1).
- *Isoenzimas*: Una reacción (Rxn B) es catalizada por dos enzimas (Prot 2 y Prot 3) codificadas por dos genes (Gen 2 y Gen 3). Con uno solo de los genes es suficiente para que se produzca la reacción.
- *Complejos proteicos de unidades múltiples*: Una reacción (Rxn C) es catalizada por dos enzimas (Prot 3 y Prot 4) codificadas por los genes Gen 4 y Gen 5.

Ambos genes son necesarios para que se produzca la reacción. Los complejos pueden contener más de 2 genes.

- *Enzimas multifuncionales*: Un único gen (Gen 6) codifica una única enzima (Prot 6) que cataliza las reacciones Rxn D y Rxn E.

Por lo tanto, los GEMs incluyen un listado de genes y un listado de enzimas, representadas por su número EC (*Enzyme Commission Number*).

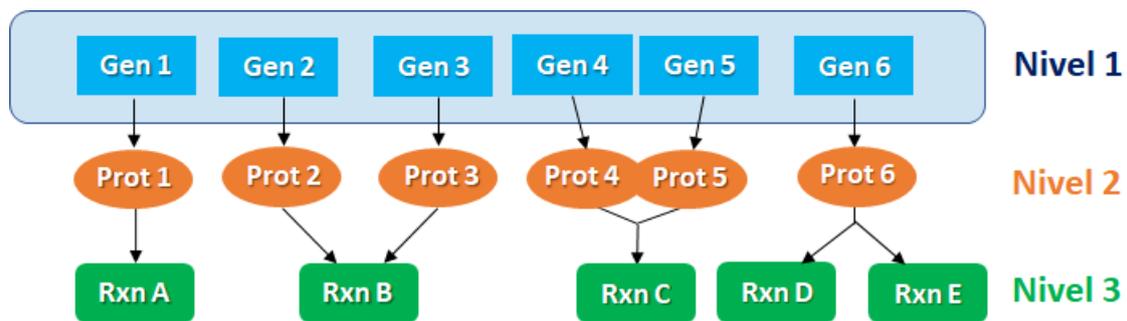


Figura 2.8. Distintos tipos de asociaciones GPR posibles.

Una reacción importante que debe incorporarse a los modelos de redes metabólicas es la reacción de formación de biomasa en la cual se tienen en cuenta todos los metabolitos precursores de la biomasa con sus correspondientes coeficientes estequiométricos. Esta es una reacción artificial que se construye con fines de modelado. Para construir esta reacción se necesita información experimental sobre la composición de la biomasa del microorganismo que se está considerando, a partir de la cual se determinará la fracción que aporta cada precursor en unidades de mmol por g de peso seco de biomasa (mmol gPS^{-1}). La tasa de crecimiento del microorganismo se calcula a partir de esta reacción en h^{-1} , por lo tanto, todos los flujos v del GEM se calculan en $\text{mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Fondi, 2018).

Una vez que se cuenta con la matriz S se incorporan restricciones al modelo. Por un lado, se encuentran las restricciones relacionadas con las capacidades catalíticas de las enzimas, las cuales definen límites inferiores y superiores sobre el flujo para cada enzima. Estos valores generalmente se fijan en valores muy grandes

($\sim 1000 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ya que no se conocen sus valores máximos reales, salvo para los flujos extracelulares que limitan las entradas y salidas de nutrientes a la red. Otras restricciones tienen que ver con la reversibilidad de las reacciones. Estas se definen a partir de información termodinámica, bioquímica o fisiológica de las enzimas. Para una reacción irreversible, se restringe el flujo v_i correspondiente solo a valores positivos, mientras que para las reacciones reversibles el flujo v_i puede tomar tanto valores positivos como negativos.

Existen numerosos métodos para analizar este tipo de redes y determinar los flujos v en base a las restricciones que se incluyen. El conjunto de estos métodos de análisis y reconstrucción basados en restricciones (COBRA: *CO*nstraint-*B*ased *A*nalysis and *R*econstruction) se encuentran actualmente agrupados en COBRA Toolbox (Schellenberger *et al.*, 2011b), una base de datos de métodos COBRA que funciona bajo MATLAB. Dentro de esta base de datos existen métodos que permiten modificar de forma sencilla un GEM, agregando y eliminando reacciones y metabolitos, modificando restricciones de capacidades enzimáticas y reversibilidades, editando compartimentos celulares, etc.

Como se puede inferir de lo descrito en los párrafos anteriores, cada GEM contiene una cantidad importante de información, por lo cual es necesario contar con una forma estandarizada y ordenada de representar y almacenar toda la información contenida en ellos. COBRA Toolbox interpreta modelos de redes metabólicas en formato SBML (*Systems Biology Markup Language*). Este formato fue desarrollado por Hucka *et al.* (2003), con el objetivo de permitir el intercambio de modelos entre diferentes herramientas de modelado y análisis. Es un lenguaje que no depende de ningún software y está basado en el lenguaje XML. Este formato resulta muy aceptado y usado por la comunidad científica que trabaja en biología de sistemas ya que es una disciplina

altamente colaborativa, por lo cual un lenguaje estándar para representar y compartir los modelos resulta de gran utilidad.

2.6 Desarrollo del GEM de *Synechocystis*

En esta tesis, curamos el modelo propuesto por Knoop *et al.* (2013) a partir de bibliografía específica reciente. Este modelo se encuentra publicado en el formato SBML lo que permite su utilización directa con el software adecuado.

Para la modificación del modelo se utilizaron herramientas de COBRA Toolbox. El modelo en formato SBML fue convertido al formato de COBRA, y a partir de allí se realizaron las modificaciones. Los compartimientos celulares que están incluidos en el GEM original y que no serán modificados son siete: citoplasma (cyt), carboxisoma (cax), lumen tilacoidal (tll), membrana tilacoidal (tlm), periplasma (pps), la membrana citoplasmática (cym) y el espacio extracelular (ext).

En principio, para considerar la producción de etanol por la vía heteróloga, se incluyó en el modelo de la red metabólica la reacción catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa (PDC, EC 4.1.1.1) codificada por el gen heterólogo *pdv* de la bacteria etanológica *Zymomonas mobilis*. Esta enzima cataliza la descarboxilación no oxidativa de piruvato para producir acetaldehído y CO₂. Se incluye también la reacción de excreción de etanol al medio que representa el carácter extracelular del metabolito. De esta manera, la cepa mutante *in silico* cuenta con dos vías para la producción de etanol: la natural y la heteróloga (Figura 2.6). Respecto al PHB, cuya vía de producción también se describió en la sección 2.2, aunque no es un metabolito extracelular, debe agregarse una reacción para su salida al medio con fines de modelado para considerar su producción.

El CCM no se encontraba correctamente descrito en el modelo seleccionado como base. En primer lugar, contaba únicamente con la posibilidad de ingreso de carbono

como HCO_3^- . Esto se modificó siguiendo la descripción realizada en la sección 2.3, Figura 2.4 y Figura 2.5. La captación de carbono está representada por tres reacciones, que existían en el modelo original. Sin embargo, la captación difusiva de CO_2 no se encontraba definida, lo cual no permitía la posterior conversión de CO_2 a HCO_3^- en los complejos NDH-I, por lo tanto, se agregó una reacción para el ingreso difusivo de CO_2 . En el caso *in vivo*, el CO_2 que ingresa lo hace al citoplasma. Si en el modelo se indica de esta forma, sería el mismo que el proveniente de descarboxilaciones, lo cual no representaría correctamente la realidad. Para superar esta situación, el CO_2 que entra por difusión se definió como ubicado en el lumen tilacoidal (tl), y ese metabolito se utilizó únicamente en las reacciones correspondientes a los complejos NDH-I. Además, se consideró la posibilidad de una interconversión del CO_2 proveniente de descarboxilaciones intracelulares a HCO_3^- , como se describe en el modelo *ijN678* (Nogales *et al.*, 2012), para lo cual se debió agregar la reacción de interconversión entre CO_2 y HCO_3^- .

Se consideran las dos posibles reacciones catalizadas por la enzima RuBisCO (Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, EC 4.1.1.39, RUBP): Carboxilación y fotorrespiración. La reacción de carboxilación catalizada por esta enzima pertenece al ciclo de Calvin y lleva a la formación de dos moléculas de 3PG que son consumidas en la glucólisis y/o en la vía PPP. Por otro lado, la reacción de oxigenación es el primer paso en la vía de la fotorrespiración y lleva a la producción de una única molécula de 2-fosfoglicolato (2PG). Así, se completa la descripción del CCM en *Synechocystis*, y las reacciones que lo modelan en el GEM se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Reacciones que describen el CCM en el GEM de *Synechocystis*.

Formula de reacción	Enzima/Función
$Na^+(ext) + HCO_3^-(ext) \rightarrow Na^+(cyt) + HCO_3^-(cyt)$	BicA
$Na^+(ext) + HCO_3^-(ext) \rightarrow Na^+(cyt) + HCO_3^-(cyt)$	SbtA
$HCO_3^-(ext) + H_2O(cyt) + ATP(cyt) \rightarrow HCO_3^-(cyt) + PPI(cyt) + ADP(cyt)$	CmpC (ATPasa)
$CO_2(ext) \rightarrow CO_2(tll)$	Transporte difusivo de CO_2
$NADPH(cyt) + 4H^+(cyt) + PQ(tlm) + H_2O(cyt) + CO_2(tll) \rightarrow NADP^+(cyt) + PQH_2(tlm) + 4H^+(tll) + HCO_3^-(cyt)$	NDH_I ₃
$NADPH(cyt) + 4H^+(cyt) + PQ(cym) + H_2O(cyt) + CO_2(tll) \rightarrow NADP^+(cyt) + PQH_2(cym) + 4H^+(pps) + HCO_3^-(cyt)$	NDH_I ₄
$HCO_3^-(cyt) \rightarrow HCO_3^-(cax)$	Transporte de HCO_3^- dentro del Carboxisoma
$HCO_3^-(cyt) + H^+(cyt) \leftrightarrow H_2CO_3(cax)$	Interconversión de HCO_3^- en CO_2 (1 ^{er} etapa)
$H_2CO_3(cax) \leftrightarrow CO_2(cax) + H_2O(cax)$	Interconversión de HCO_3^- en CO_2 (2 ^{da} etapa)
$O_2(cyt) \rightarrow O_2(cax)$	Transporte de O_2 dentro del Carboxisoma
$RuBP(cax) + CO_2(cax) + H_2O(cax) \rightarrow 2\ 3PG(cax)$	RuBisCO Carboxilasa
$RuBP(cax) + O_2(cax) + H_2O(cax) \rightarrow 3PG(cax) + 2PG(cax)$	RuBisCO Oxigenasa
$3PG(cax) \rightarrow 3PG(cyt)$	Transporte de 3PG fuera del Carboxisoma
$2PG(cax) \rightarrow 2PG(cyt)$	Transporte de 2PG fuera del Carboxisoma
$CO_2(cyt) + H_2O(cyt) \rightarrow HCO_3^-(cyt) + H^+(cyt)$	Conversión de CO_2 de descarboxilaciones

El 2PG que surge de la función oxigenasa de la RuBisCO a continuación es transformado en L-serina, por lo cual resulta una vía de producción del aminoácido L-serina dependiente de la luz. Esta vía fue considerada como esencial para *Synechocystis*, hasta la identificación de una vía de síntesis de serina independiente de

la luz en esta cepa (Klemke *et al.*, 2015). Los tres genes involucrados en esta recientemente identificada vía (*sll1908*, *sll1559* y *slr1124*) también resultan esenciales para el crecimiento. El modelo original contenía las reacciones correspondientes a estos genes, pero sin evidencia de los genes que las codificaban. Esto es algo que suele ocurrir en los modelos metabólicos cuando no se cuenta con información experimental sobre una vía, pero se la requiere para la producción de un metabolito esencial para el crecimiento. Las reacciones faltantes sobre las que no se tiene evidencia se toman de una base de datos como por ejemplo KEGG, donde pueden verse las vías completas, aunque las enzimas y genes correspondientes no estén anotados para el microorganismo en particular. En base al trabajo de Klemke *et al.* (2015), se pudo agregar la información de los genes y enzimas que codifican estas reacciones, confirmando la existencia de las mismas a partir de evidencia experimental. Así es como en el nuevo GEM, quedan presentes las dos vías de producción de L-Serina. Una representación de las mismas con las enzimas y genes correspondientes a cada reacción se puede ver en la Figura 2.9.

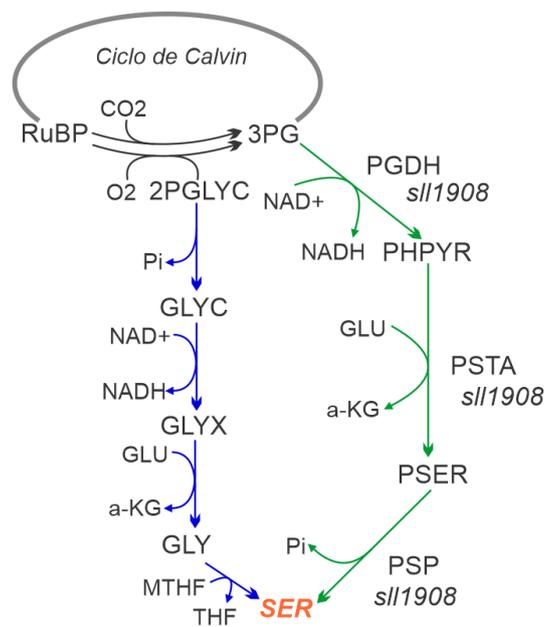
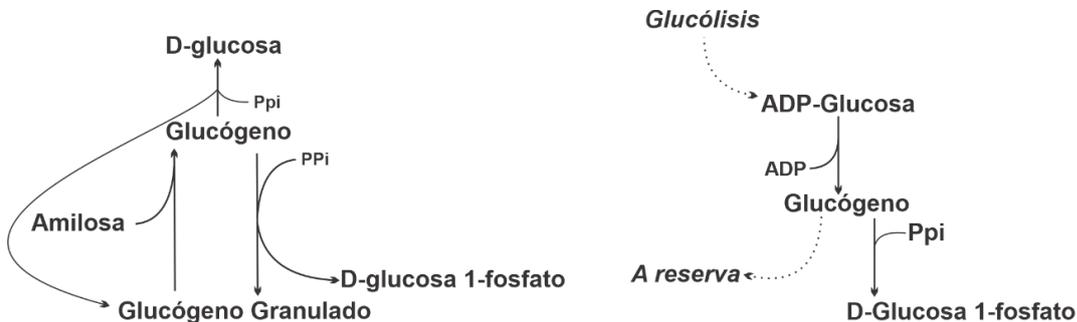


Figura 2.9. Vías de producción de Serina. En azul la vía dependiente de la luz, en verde la vía independiente, identificada por Klemke *et al.* (2015)

El glucógeno es considerado como el principal compuesto de reserva de carbono, junto con el PHB que se produce en condiciones de limitación de nutrientes. La vía de síntesis de glucógeno del modelo fue modificada de acuerdo a la presentada recientemente por Carrieri *et al.* (2017) y de acuerdo a la base de datos KEGG (Kanehisa & Goto, 1999). En la Figura 2.10 se muestra una comparación entre la vía del modelo original (izquierda) y la vía modificada incluida en el modelo final (derecha). Como se puede observar, el modelo original presentaba un ciclo en el que se producía glucógeno a partir de glucógeno granulado, y el mismo glucógeno se descomponía en glucógeno granulado nuevamente. Además de que este tipo de vías con ciclos generan problemas en los GEMs, la vía original también contenía los metabolitos Amilosa y D-glucosa, que en esa forma no eran producidos por la red en ninguna reacción, por lo cual la única forma de que se encontraran en el modelo era si existía una reacción de ingreso del exterior. La vía modificada resulta mucho más sencilla, y está confirmada experimentalmente por Carrieri *et al.* (2017).



a) Vía de producción de Glucogeno en modelo original de Knoop *et al.* (2013)

b) Vía de producción de Glucógeno modificada según KEGG y Carrieri *et al.*(2017)

Figura 2.10. Vías de producción de Glucógeno. A la izquierda, la original incluida en el modelo, a la derecha la modificada incluida en el modelo desarrollado en esta tesis

Al igual que todas las cianobacterias, *Synechocystis* no cuenta con la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (AKGDH - EC 1.2.4.2) que cierra el ciclo de Krebs en la mayor parte de los organismos. Es por esto que anteriormente se creía que el ciclo de Krebs en las cianobacterias era abierto y que solo tenía una función anaplerótica (Smith *et al.*, 1967), hasta que se identificó un bypass (Zhang & Bryant, 2011), que comprende

las enzimas 2-oxoglutarato descarboxilasa (2-OGDC - EC 4.1.1.71) y Succinato-semialdehído deshidrogenasa (SSDHA- EC 1.2.1.16). En bibliografía se encuentran otras dos posibles vías que cierran este ciclo que son el ciclo del glioxilato y el ciclo del ácido γ -aminobutírico (ciclo GABA). El primero está formado por las enzimas isocitrato liasa (EC 4.1.3.1) y malato sintasa (EC 2.3.3.9), que sirven como desvío de las dos reacciones de descarboxilación del ciclo de Krebs (EC 1.1.1.4.2 y EC 1.2.4.2) y permiten la formación de succinato y malato directamente a partir de isocitrato. El segundo está compuesto por las enzimas glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15), GABA aminotransferasa (EC 2.6.1.19), SSDHA y glutamato deshidrogenasa. En las reconstrucciones existentes al momento, están incorporadas las tres posibilidades de cerrar el ciclo. Sin embargo, Thiel *et al.* (2017) mostraron experimentalmente que *Synechocystis* no cuenta con las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa, por lo cual el ciclo del glioxilato se eliminó del GEM desarrollado en esta tesis. Existe evidencia experimental de que el bypass identificado por Zhang & Bryant (2011) y el ciclo GABA se encuentran activos en *Synechocystis* y que el ultimo es el más activo de ambos (Xiong *et al.*, 2014). En la Figura 2.11 se muestra, para una mejor comprensión, el ciclo de Krebs clásico y las dos opciones que se incluyen en el GEM de *Synechocystis* curado en esta tesis.

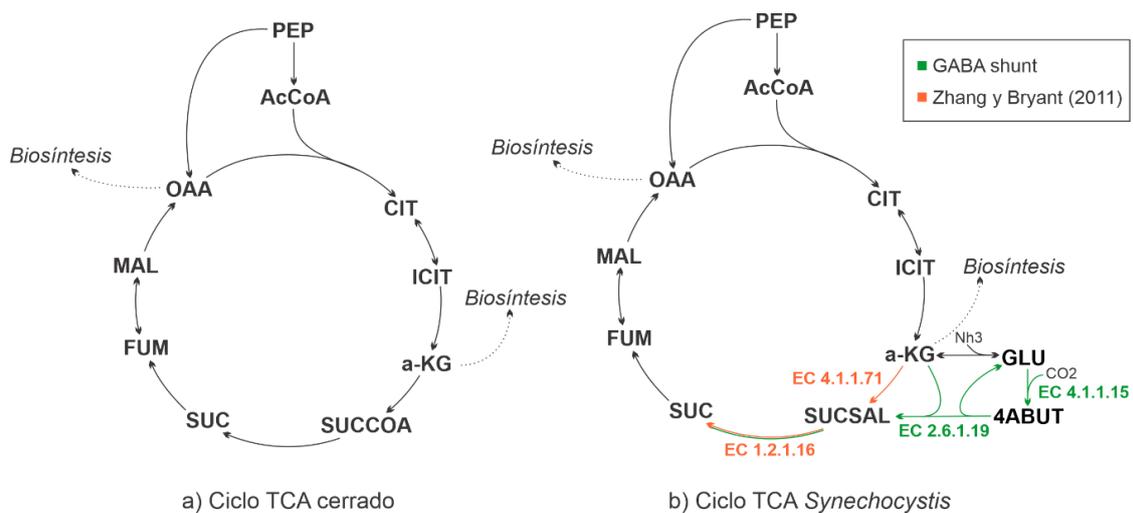


Figura 2.11. Ciclo de Krebs cerrado con la enzima AKGDH (a) y las dos alternativas para su cierre en *Synechocystis*

Recientemente se ha demostrado experimentalmente que *Synechocystis* tiene una vía para la producción de acetato por medio de la enzima fosfoquetolasa (EC 4.1.2.9, *slr0453*) (Figura 2.6) que contribuye al metabolismo del carbono durante el crecimiento autotrófico (Xiong *et al.*, 2015). Para incorporar esta nueva evidencia, se agregaron al GEM de *Synechocystis* las reacciones relacionadas con esta enzima, y también consideramos la información de reversibilidad presentada en Xiong *et al.* (2015) para las reacciones catalizadas por las enzimas codificadas por los genes *slr2132*, *sll1299* y *sll0542*. La reacción correspondiente a la enzima acetil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.1) fue modificada a su forma reversible de acuerdo a Ihlenfeldt & Gibson (1977).

Con respecto a la fotosíntesis, el proceso comienza con la captación de luz. Aunque la luz no es realmente materia, en el modelo se representa como un metabolito, al que se denomina como *Fotones*. Estos fotones se incorporan al modelo por medio de una reacción de intercambio entre el espacio extracelular y la membrana tilacoidal (donde se encuentran los fotosistemas). Una vez que ingresan al modelo, se dividen en dos tipos de fotones que se asignan a cada uno de los fotosistemas: P700 corresponde al flujo de luz que ingresa al PSI, mientras que P680 corresponde al PSII (Figura 2.3). Esta distinción tiene que ver con la longitud de onda de máxima absorción de cada fotosistema, donde el P700 corresponde a longitudes de 700 nm, y el P680 a 680 nm, con ambas longitudes de onda dentro del espectro visible.

El modelo contiene reacciones de intercambio y de transporte. Estas se diferencian debido a que las de transporte son reacciones que tienen genes asociados y que generalmente implican un transporte entre diferentes compartimientos con gasto de energía (ATP) o consumo de agua. No existen transportadores en la membrana exterior codificados en el genoma de *Synechocystis*, lo cual sugiere una alta permeabilidad de su membrana exterior respecto de otras bacterias (Nogales *et al.*, 2012), por lo tanto, las reacciones de intercambio a través de la membrana exterior se modelan por medio

de reacciones de difusión pasiva. Este tipo de reacciones representan metabolitos que son excretados al medio. Se agregaron reacciones de este tipo para ácidos orgánicos como son el acetato, piruvato, 2-oxoglutarato, fumarato, succinato, citrato y (S)-malato, que aunque no tienen genes asociados existe evidencia experimental de su presencia en *Synechocystis* (Nogales *et al.*, 2012).

La reacción de producción de biomasa se mantuvo como en el modelo original, donde se encuentra adaptada y modificada basado en Nogales *et al.* (2012). En dicho modelo la reacción de biomasa fue construida de diversas fuentes: Las fracciones correspondientes a proteínas, carbohidratos, lípidos, ARN y ADN proviene de información experimental de Shastri & Morgan (2005), la fracción de cada ácido graso se tomó de datos experimentales de Okazaki *et al.* (2006), la composición de glucógeno de Yoo *et al.* (2002), los pigmentos fotosintéticos de Lagarde & Beuf (2000), Nakamura *et al.* (2003) y Schledz *et al.* (2001), y la fracción de peptidoglucano y metabolitos solubles se tomó de datos de *Synechocystis* y otras bacterias Gram-negativas (Jantaro *et al.*, 2003; Neidhardt *et al.*, 1992). La distribución de los compuestos que forman la biomasa puede verse en la Figura 2.12. Además de esta composición, la reacción de producción de biomasa contiene glucógeno, ya que incluirlo allí es la forma en la que se le indica al modelo que es un compuesto de reserva.

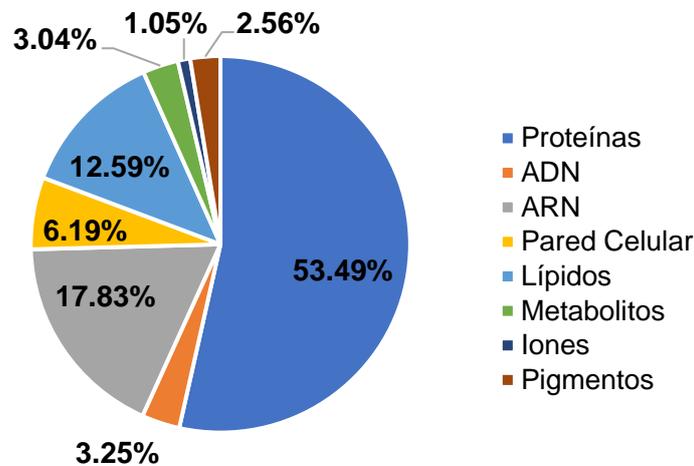


Figura 2.12. Composición de la biomasa de *Synechocystis* como se incluye en el modelo, expresada en porcentaje

Todas estas modificaciones se realizaron por medio de funciones específicas de COBRA. Luego se utilizó otro comando específico de COBRA para detectar y eliminar reacciones repetidas en el modelo ya que las mismas no aportan diferencias en el tipo de estudios que se realizan en esta tesis. Los comandos utilizados para la curación manual de la red se presentan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Comandos utilizados en COBRA Toolbox para la curación del modelo

Comando	Función
<i>addMetabolite</i>	Agregar un metabolito a la reconstrucción
<i>addReaction</i>	Agregar una reacción a la reconstrucción
<i>chageRxnMets</i>	Modificar los metabolitos en una reacción
<i>removeMetabolites</i>	Eliminar un metabolito del modelo
<i>removeRxns</i>	Eliminar una reacción del modelo
<i>checkDuplicateRxn</i>	Revisar el modelo en busca de reacciones repetidas. Puede eliminarlas directamente o solo identificarlas, según elección del usuario
<i>detectDeadEnds</i>	Identifica metabolitos que participan en una única reacción, o que solo se producen o consumen

El modelo final contiene 704 reacciones, 80 reacciones de intercambio y 535 metabolitos, dentro de los cuales los que se encuentran en varios compartimentos celulares se cuentan como un único metabolito. El modelo contiene reacciones reversibles e irreversibles, que son indicadas por medio de valores lógicos: 1 para reacciones reversibles, 0 para reacciones irreversibles. Del total de las reacciones, 215 se encuentran definidas como reversibles. Respecto a los compartimentos en los que está dividido el modelo, el que más metabolitos contiene es el citoplasma (cyt), ya que allí ocurre la mayoría de las reacciones metabólicas. En el carboxisoma (cax) ocurre la fijación de carbono y la fotorrespiración, ya que allí se encuentra ubicada la enzima RuBisCO, que cataliza estos procesos. En el lumen tilacoidal (tll), las membranas tilacoidal (tlm) y citoplasmática (cym), y el periplasma (pps) se encuentran todas las reacciones relacionadas a la fotosíntesis y a la cadena respiratoria, y numerosos

metabolitos que participan en estos procesos metabólicos se intercambian entre estos compartimientos celulares. Por último, el espacio extracelular (ext) sirve para indicar los metabolitos que la célula intercambia con el medio de cultivo y, por lo tanto, está relacionado con las reacciones de transporte. Las reacciones del modelo están divididas en subsistemas para un mejor análisis del mismo, estos subsistemas y la división de cantidad de reacciones en los mismos se pueden ver en la Figura 2.13.

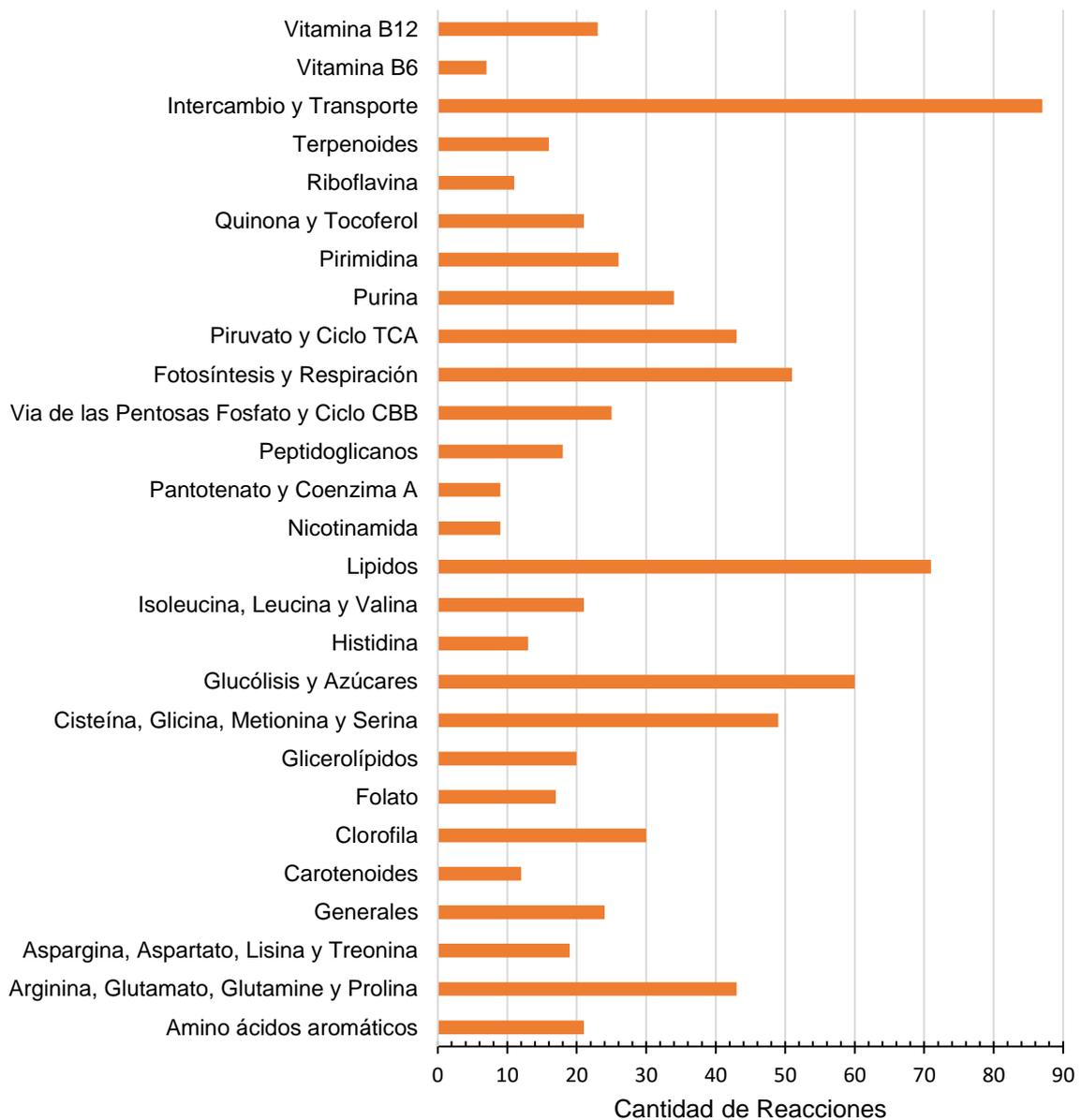


Figura 2.13. Distribución de reacciones por subsistema, según su distribución en el modelo. Se puede observar que las vías más conocidas y también las más complejas de modelar son las que más reacciones contienen. La categoría Generales contiene reacciones que aportan compuestos a varios subsistemas

Para poder implementar el GEM de *Synechocystis* en el entorno GAMS (*General Algebraic Modelling System*) (GAMS Development Corporation, Washington, DC) se lo convirtió a formato GAMS Data eXchange (GDX) que facilita el ingreso de gran número de datos que de otra forma deberían escribirse en un archivo de texto. Para esto se escribió una función específica en MATLAB que sirve como herramienta para convertir modelos de formato COBRA a formato GDX. Así, el modelo final modificado queda disponible en 3 formatos: COBRA, SBML y GDX, y también como un archivo Excel (XLSX) que contiene toda la información en forma de texto que resulta útil al momento de analizar resultados del modelo. El modelo completo se encuentra dividido en tres apéndices. En el Apéndice A se encuentran una lista de los números de reacción con sus correspondientes fórmulas de reacción, en el Apéndice B se encuentran las asociaciones GPR en forma de tabla con los números de reacción, números E.C. y genes correspondientes.

2.7 Conclusiones

En este capítulo se realizó la curación manual de un modelo a escala genómica existente de *Synechocystis*, incorporando información experimental a partir de bibliografía específica actualizada con el fin de obtener una herramienta más precisa para la determinación de la distribución de flujos metabólicos bajo distintas condiciones ambientales y para el diseño de cepas *in silico*.

Las modificaciones más importantes fueron correcciones en el mecanismo de concentración del carbono, en las vías natural y heteróloga de producción de etanol, en la vía de producción de acetato, en la vía de producción de glucógeno, en el ciclo de Krebs y en la validación de la vía de producción de L-serina independiente de la luz. Estas modificaciones se realizaron con COBRA Toolbox, en el programa MATLAB. El modelo final cuenta con 704 reacciones y 535 metabolitos y se encuentra también disponible para GAMS y en un archivo XLSX.

Estudio de distribuciones de flujo y tasas del GEM por medio de datos experimentales

3.1. Introducción

Una vez que se cuenta con un GEM definido en base a la literatura e información experimental más reciente, se debe comprobar su validez comparando las estimaciones que se obtienen del modelo frente a datos experimentales para luego poder realizar diversos análisis computacionales. Los métodos de análisis están en su mayoría basados en optimización matemática y se enmarcan dentro de los métodos COBRA, introducidos en el capítulo anterior.

Cuando se desea analizar el comportamiento de un GEM frente a diferentes condiciones ambientales, los problemas matemáticos que quedan definidos son de Programación Lineal (LP, *Linear Programming*), y tienen la ventaja de presentar una resolución sencilla aun brindando valiosa información sobre el comportamiento del microorganismo estudiado. La resolución de estos problemas LP tienen como utilidad la obtención de estados óptimos para ciertas restricciones y permiten investigar cómo se modifican los flujos variando uno o más parámetros del modelo para analizar cómo las condiciones ambientales afectan la distribución de flujos metabólicos (Palsson, 2006).

El método más utilizado y estudiado para el estudio de la distribución de flujos metabólicos bajo diferentes condiciones es el Análisis de Balance de Flujo o FBA (*Flux Balance Analysis*). El FBA fue introducido por primera vez hace más de dos décadas por Savinell & Palsson (1992), y es la herramienta básica que se utiliza en el estudio de redes metabólicas, permitiendo determinar la distribución de flujos para un estado.

estacionario de la red mediante la resolución de un problema LP. Su principal utilidad surge de que un GEM definido a partir de su matriz estequiométrica S , no tiene una única posible distribución de flujos, por lo cual se debe definir una función objetivo que tenga relevancia biológica. Al maximizar o minimizar este objetivo se obtiene una distribución de flujos, aunque el FBA por sí solo no garantiza que esta solución sea única, si no que, como se explica más adelante, pueden existir múltiples distribuciones de flujo con un mismo valor del objetivo seleccionado (Nielsen & Hohmann, 2017). Con esta técnica pueden representarse diferentes fenotipos celulares agregando restricciones a la disponibilidad de nutrientes, condiciones de luz u oscuridad, etc. Otra técnica de análisis es el Análisis de Variabilidad de Flujo o FVA (*Flux Variability Analysis*) que se desprende del FBA y se utiliza para estudiar los flujos máximos y mínimos que son admitidos por todas las reacciones de una determinada red.

Los resultados de técnicas como el FBA se ven enriquecidos por el agregado de información experimental sobre tasas de captación de nutrientes, secreción de productos, crecimiento y flujos intracelulares. Generalmente, los datos de tasas de captación y crecimiento medidos experimentalmente no pueden utilizarse tal como se encuentran, ya que existe una discrepancia entre las unidades de medición: los datos experimentales tienen unidades de concentración (gPS L^{-1} , mM), mientras que al modelo deben ingresarse datos de flujo ($\text{mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$). Esto ocasiona que deba utilizarse algún modelo de crecimiento para poder obtener datos que puedan ingresarse al modelo como restricciones.

En este capítulo, se presentará una descripción detallada de los métodos computacionales que se utilizan para el análisis del GEM presentado en el Capítulo 2 y la validación del mismo frente a sets de datos experimentales fisiológicos propios y datos ómicos de bibliografía.

3.2. Métodos computacionales para el análisis del GEM

En esta sección, se explican los métodos matemáticos que se utilizan para el análisis del GEM de *Synechocystis*. Además, se presentan dos sets de datos experimentales disponibles para validar el comportamiento del GEM desarrollado. Uno de estos sets de datos corresponde a experimentos en cultivo batch, mientras que el otro responde a un estudio de fluxómica obtenido de bibliografía.

3.2.1. Analisis de Balance de Flujo (FBA)

En el capítulo anterior se explicó que los modelos estequiométricos a escala genómica están representados por una matriz estequiométrica S , que contiene la lista de metabolitos en sus filas y las reacciones en sus columnas. Si consideramos un ejemplo sencillo (Tabla 3.1), podemos plantear los balances de masa dinámicos correspondientes para las concentraciones de los metabolitos A, B y C (C_A , C_B y C_C) que participan en la red metabólica de ejemplo y que da como resultado un sistema de ecuaciones diferenciales.

Tabla 3.1. Ejemplo sencillo de red metabólica, sus correspondientes balances de masa dinámicos y la matriz estequiométrica resultante.

Célula hipotética	Balances de masa	Sv
	$\frac{dC_A}{dt} = v_1 - v_2 - v_3 + v_4$ $\frac{dC_B}{dt} = v_2 - v_5 - v_6$ $\frac{dC_C}{dt} = v_3 - v_4 + v_5 - v_7$	$\begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & 0 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \end{pmatrix}$

En forma matricial, los balances de masa para pueden representarse de forma matricial como sigue:

$$\frac{dC}{dt} = S \cdot v \tag{3.1}$$

donde C representa el vector de concentraciones de cada metabolito intracelular, S representa la matriz estequiométrica de $n \times m$, con n metabolitos y m reacciones, y v representa el vector de flujos metabólicos o velocidades de reacción.

Se sabe que los transitorios intracelulares son del orden de milisegundos, mientras que el tiempo de crecimiento celular es del orden de horas. Debido a esto, se puede considerar que el problema representado por la Ecuación (3.1) se encuentra en cuasi estado estacionario, lo cual deriva en el siguiente sistema de ecuaciones lineales homogéneo:

$$S \cdot v = 0 \quad (3.2)$$

Típicamente, el número de reacciones es mayor que el número de metabolitos ($m > n$), por lo cual la Ecuación (3.2) no determina la distribución de flujos por sí sola, si no que define un sistema lineal indeterminado del cual hay infinitos vectores v que son solución, y que representan infinitas distribuciones de flujo en el espacio nulo de la matriz estequiométrica S . Es así, que la Ecuación (3.2) representa todos los posibles estados fenotípicos de la red metabólica (Maranas & Zomorodi, 2016). Se dice que estos estados componen el cono de flujos de la red en un espacio multidimensional, en el cual los ejes corresponden a los flujos de las reacciones individuales (Figura 3.1) y que matemáticamente puede estar representado por un cono convexo (Palsson, 2006). Como se explicará más adelante, no todos estos estados tienen significación biológica, por lo cual se deben incluir restricciones de diferentes tipos, además de la Ecuación (3.2), que contribuyan a reducir este escenario de infinitas soluciones de flujos. Se espera que cuanto más restringido se encuentre el sistema, a través de información fenotípica de la cepa, mayor será la significación biológica que tengan las distribuciones de flujo que se obtienen del mismo.

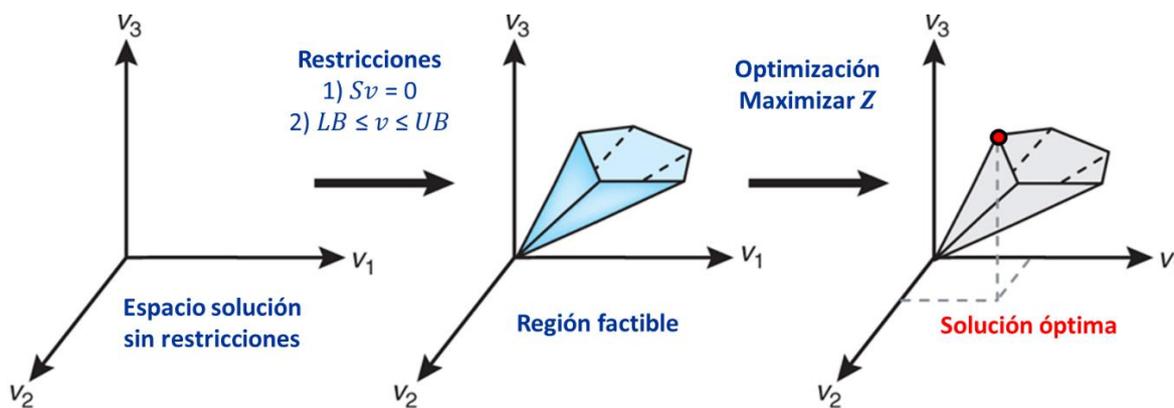


Figura 3.1. Modelado metabólico basado en restricciones. El espacio nulo definido por la matriz S se convierte en el cono de flujos de la red al agregar restricciones. Al definir un objetivo celular, se llega a uno de los vértices de dicho cono. Traducido de Orth *et al.* (2010)

Los tipos más comunes de restricciones que se agregan a este tipo de sistemas son termodinámicas y de capacidad. Las restricciones termodinámicas se refieren a la reversibilidad de las reacciones del GEM relacionadas con la energía libre de Gibbs (ΔG) de la reacción. Se analiza si este parámetro cambia de signo para diferentes concentraciones de los metabolitos participantes en la reacción: Si lo hace la reacción se considerará reversible, si no lo hace se considerará irreversible (Schellenberger *et al.*, 2011a). Si no se tiene esta información, se puede obtener de modelos de microorganismos similares o de literatura específica. Las reacciones de las que no se puede confirmar su reversibilidad por ningún método se suelen asumir como reversibles. Las restricciones de capacidad tienen que ver con reacciones sobre las que se conocen sus flujos máximos o mínimos a partir de datos experimentales. Además de estas restricciones, se imponen límites sobre la captación de nutrientes que se conocen de estudios experimentales o que se quieren limitar para obtener algún estado particular de la red metabólica. Los límites que se imponen para limitar la dirección en la que ocurre una reacción y no su flujo exacto, se indican con un valor grande de flujo que suele ser de $1000 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En la Tabla 3.2. Tipos de restricciones que se imponen a las reacciones en un GEM. M es un número grande, un valor típico es 1000. Fuente:

(Maranas & Zomorodi, 2016) se muestra un resumen de las restricciones típicas que se imponen sobre los modelos de redes metabólicas.

Tabla 3.2. Tipos de restricciones que se imponen a las reacciones en un GEM. M es un número grande, un valor típico es 1000. Fuente: (Maranas & Zomorodi, 2016)

Tipo de reacción	Límites: (LB_j, UB_j)
Irreversible	$(0, M)$
Reversible	$(-M, M)$
Reacción de intercambio para metabolitos no en el medio	$(0, M)$
Reacción de intercambio para metabolitos en exceso en el medio	$(-M, M)$
Reacción de intercambio para metabolitos limitantes en el medio	$(-c, M)$ $c > 0, c \ll M$
ATP asociado a mantenimiento	$(-c, c)$ $c > 0, c \ll M$
Reacciones con valores de flujo experimentales	$(v_j^{min,exp}, v_j^{max,exp})$

Aun cuando se hayan aplicado todas estas restricciones, el espacio de flujos posibles continúa siendo muy grande. Se deben incluir también restricciones adicionales, que permitan obtener un estado particular de la red. Es así que surge el FBA, que resulta una de las técnicas más utilizadas en el estudio de redes metabólicas a escala genómica (Savinell & Palsson, 1992). En el FBA, se define un LP considerando todas las restricciones anteriormente mencionadas y el modelo metabólico como restricciones de un problema de optimización en el cual se maximiza o minimiza un determinado objetivo celular.

Dado que se trabaja modelando organismos vivos, para definir este objetivo se deben tener en cuenta las características de la célula. Uno de los objetivos más utilizados es la maximización de la velocidad de formación de biomasa (BOF: *Biomass Objective Function*) (García Sánchez & Torres Sáez, 2014). Esta selección se debe a que los microorganismos durante el crecimiento balanceado (sin limitación de nutrientes) tienden a buscar el mejor estado metabólico para poder crecer y multiplicarse. El LP resultante de estas definiciones se formula de la siguiente manera:

$$\max v_{biomasa}$$

s. t.

$$\sum_{j \in M} S_{ij} v_j = 0 \quad \forall i \in N \quad (3.3)$$

$$LB_j \leq v_j \leq UB_j \quad \forall i \in M \quad (3.4)$$

$$v_j \in \mathbb{R}$$

donde LB_j y UB_j son las cotas inferiores y superiores, respectivamente, para todos los flujos de la red, que se definen como se describió anteriormente, y mediante los cuales pueden fijarse valores para el ingreso de nutrientes. A esta formulación pueden agregarse otras restricciones lineales que se utilizarán en esta tesis, como puede ser la dependencia entre dos flujos, o la limitación de una suma de flujos:

$$v_1 = a \times v_2 \quad (3.5)$$

$$v_1 + v_2 \leq c \quad (3.6)$$

donde a y c son escalares.

La resolución de este LP da como resultado la distribución de flujos para un estado de la red, determinado a partir de la región factible definida por las Ecuaciones (3.3), (3.4), (3.5) y (3.6).

Como se mencionó anteriormente, el FBA puede presentar infinitas soluciones óptimas (Figura 3.2 a), que proveen diferentes distribuciones de flujo para la misma función objetivo. Una forma de evitar esto es incorporar datos experimentales como restricciones que impongan límites realistas a los flujos metabólicos, como por ejemplo información de diferentes mediciones ómicas (Figura 3.2 b). De esta manera, se define una región factible más acotada y con sentido biológico que permite obtener, a partir de la resolución del LP, distribuciones de flujo más precisas (Mahadevan & Schilling, 2003; Nikoloski *et al.*, 2015)

La integración de experimentos *in silico* basados en la utilización de GEMs con valores obtenidos de experimentos de alto rendimiento a nivel sistémico pueden mejorar significativamente el diseño de microorganismos para aplicaciones biotecnológicas (Sánchez *et al.*, 2017). Los enfoques de modelado basado en restricciones tradicionales no incluyen información de regulación metabólica a ningún nivel. Para incluir información fenotípica y, por lo tanto, de regulación a diferentes niveles y en diferentes condiciones de cultivo, se pueden incorporar a los GEMs datos cuantitativos de transcriptómica, proteómica, metabolómica y fluxómica (Angione *et al.*, 2016). El tipo de dato ómico más directo para incorporar a un GEM es el de fluxómica, debido a que esos valores se incorporan como dato directamente a la red ya que indican el valor de las velocidades de los flujos metabólicos (Crown *et al.*, 2016). En las técnicas de ^{13}C -MFA, los precursores metabólicos (generalmente la fuente de carbono y energía) son enriquecidos con ^{13}C y luego la incorporación de este isótopo en los metabolitos intracelulares es medida por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y sus flujos metabólicos asociados son determinados en base a un modelo estequiométrico (Krömer *et al.*, 2009)

En los casos en que se utilizó FBA para analizar distribuciones de flujo completas, los problemas se resolvieron en GAMS con una formulación propia. En los casos en que solo se pretendió analizar valores de entrada y salida (crecimiento, captación de nutrientes, etc.) se utilizó la formulación provista en COBRA Toolbox. La diferencia se debe a que, al analizar distribuciones completas, era de interés incorporar restricciones del tipo de las Ecuaciones (3.5) y (3.6) y esto resulta más sencillo en la formulación propia de GAMS.

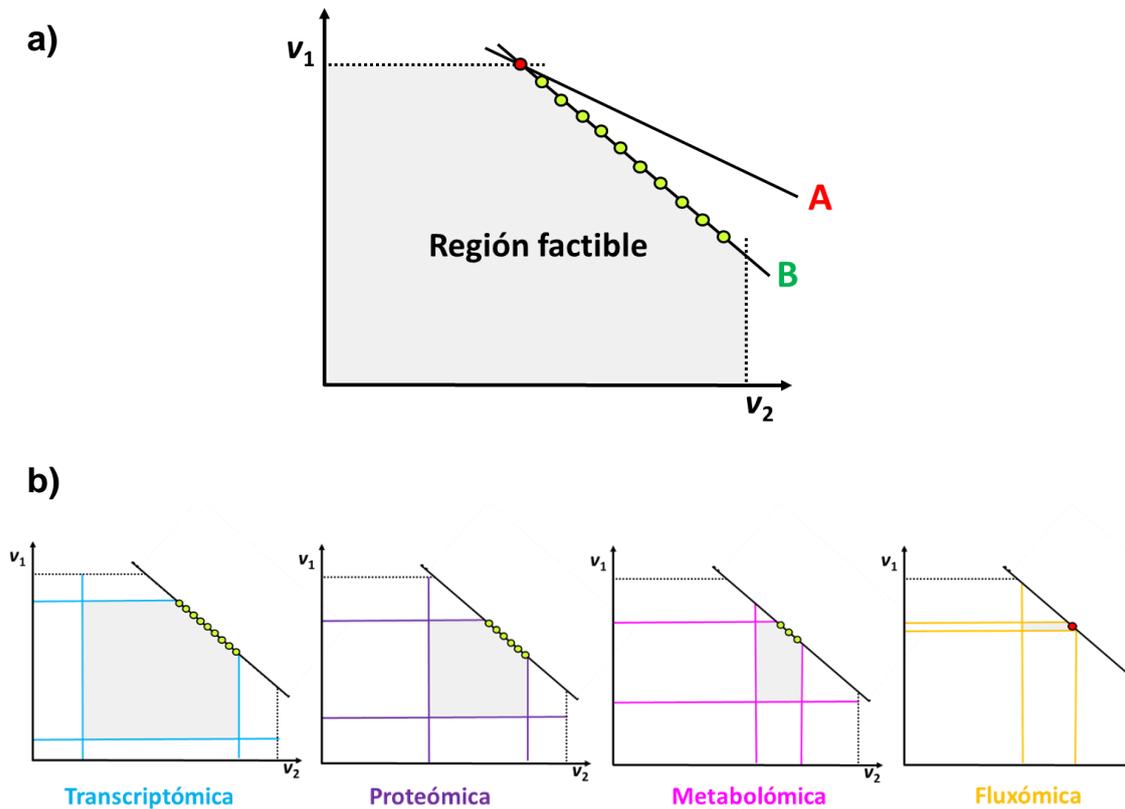


Figura 3.2. a) Región factible de un sistema simplificado de dos dimensiones. Se muestra un caso donde la optimización (maximización) resulta en un vértice del espacio de flujos dando como resultado una única solución óptima marcada como un punto rojo sobre la recta A que representa la función objetivo; y un caso donde la optimización resulta en una arista del espacio de flujos, lo que resulta en múltiples soluciones óptimas marcadas como puntos verdes sobre la recta B. b) Se puede observar que la inclusión de restricciones obtenidas a partir de datos experimentales ómicos reducen la región factible del LP siendo los datos de fluxómica los más apropiados para representar el fenotipo metabólico de la célula.

3.2.2. Análisis de Variabilidad de Flujo: FVA

Otra opción en la definición de la función objetivo para el LP presentado en la sección anterior es seleccionar un flujo en la red, maximizarlo y minimizarlo para obtener las cotas que corresponden a esa reacción dada la región factible fijada por las restricciones. Este procedimiento puede utilizarse de forma iterativa para obtener flujos máximos y mínimos para cada reacción presente en el GEM. Esta formulación particular se denomina como Análisis de Variabilidad de Flujo (*FVA: Flux Variability Analysis*) (Maranas & Zomorodi, 2016). En el FVA cada flujo metabólico se define como función objetivo y es maximizado y minimizado sujeto a las mismas restricciones que se

formulan en el FBA (Ecuaciones (3.3) y (3.4)). Utilizando esta técnica, se evita que los flujos de los que no se tiene información experimental estén únicamente acotados por los valores grandes (M) que se utilizan para indicar la reversibilidad.

$$\max/\min v_j$$

s. t.

$$\sum_{j \in M} S_{ij} v_j = 0 \quad \forall i \in N \quad (3.3)$$

$$LB_j \leq v_j \leq UB_j \quad \forall i \in M \quad (3.4)$$

$$v_j \in \mathbb{R}$$

En esta tesis, se implementó en GAMS este enfoque para incorporar al modelo matemático datos de flujos medidos experimentalmente provenientes de un estudio de fluxómica (Sección 3.4). Para esto se fijan los datos experimentales de los flujos metabólicos como cotas inferiores y superiores (Ecuación (8)) y se realiza un FVA para obtener las cotas para los flujos no medidos. Luego se resuelve un FBA maximizando biomasa con estas restricciones experimentales y se comprueba si el modelo puede representar los resultados experimentales, brindando una solución factible de crecimiento que coincida con la obtenida experimentalmente.

3.2.3. Análisis de Espacios de Flujo

Una formulación similar al FBA puede utilizarse para obtener los espacios de flujo variando un número bajo de parámetros (uno o dos). Por ejemplo, se puede calcular tasa de crecimiento y/o producción de un metabolito de interés a medida que aumenta la disponibilidad de un nutriente. Las restricciones de este LP coinciden con las del FBA. Si se varían dos parámetros, pueden obtenerse superficies que representen este espacio de flujo en tres dimensiones. La proyección de esta superficie sobre el eje correspondiente al parámetro 1 resultará equivalente al espacio de flujo si solo se variara el parámetro 2, y viceversa. Este tipo de análisis es útil para estudiar las tasas óptimas de captación de nutrientes, secreción de productos y/o de flujos intracelulares de interés.

3.2.4. Modelo de crecimiento en cultivo batch

Una forma de obtener datos experimentales de las tasas de crecimiento, de captación de nutrientes y otros sustratos y la tasa de producción de compuestos extracelulares para validar los GEMs es a partir de cultivos batch en las condiciones ambientales deseadas. Para el cálculo de las tasas se asume un modelo de crecimiento batch, donde se representa el crecimiento celular y la producción/consumo de metabolitos por medio de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias. Las Ecuaciones (3.7) y (3.8) representan este sistema, donde μ es la tasa neta de crecimiento, X la concentración de biomasa (gPS L⁻¹), P la concentración de un producto o sustrato y v_p la tasa de producción/consumo, de un producto o nutriente

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.7)$$

$$\frac{dP}{dt} = v_p X \quad (3.8)$$

En estas ecuaciones, μ tiene unidades de h⁻¹ y v_p de mmol gPS⁻¹ h⁻¹, para que los balances queden bien definidos Integrando la Ecuación (3.7), reemplazando en la Ecuación (3.8) y resolviendo esta última, se obtiene la solución de este sistema, dada por las Ecuaciones (3.9) y (3.10) Estas últimas pueden utilizarse para estimar tasas de crecimiento, producción de metabolitos o captación de nutrientes. Debe notarse que estas ecuaciones pueden aplicarse siempre que el cultivo se encuentre en fase exponencial, ya que se asumió que μ se mantiene constante. La Ecuación (3.10) representa un sustrato cuando el ΔP es negativo y un producto cuando es positivo.

$$X = X_0 e^{\mu(t_f - t_0)} \quad (3.9)$$

$$v_p = \frac{\Delta P \mu}{X_0} \frac{1}{(e^{\mu t_f} - e^{\mu t_0})} \quad (3.10)$$

3.2.5. Datos experimentales de cultivo batch

Para la validación del modelo se cuenta con un set de datos experimentales de la cepa silvestre (*wild type*) de *Synechocystis* y de una cepa mutante productora de etanol, que fueron obtenidos en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de la Universidad de Sevilla por la doctora Vanina Estrada. La cepa mutante fue obtenida por Vidal Vidal (2009) y contiene los genes *pdh* y *adhII* de *Zymomonas mobilis*, que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa II, que participan en la vía de producción de etanol y son los mismos que se agregaron al GEM de *Synechocystis* que se presenta en esta tesis. Los genes agregados a la cepa mutante están bajo el control del promotor endógeno *petE*, que se activa en presencia de cobre. Esto implica que la producción de etanol en el mutante puede controlarse, activándola a través del agregado de cobre al medio de cultivo. El cultivo se realizó en medio BG-11 a 30°C en condiciones de luz continua con una intensidad de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se burbujeó aire enriquecido con un 1% de CO_2 , lo cual puede considerarse como un medio rico en dicho nutriente (Laiglecia *et al.*, 2013). Se llevaron a cabo experimentos por duplicado en cultivos batch líquidos, donde se midió la biomasa por OD_{730} , concentración de clorofila *a* y carbono orgánico total; el nitrógeno y el fósforo por métodos espectrofotométricos; y el etanol por un método enzimático. Los datos obtenidos se presentan en las tablas a continuación, tanto para la cepa mutante como para la cepa silvestre. En las Tabla 3.3 y Tabla 3.4 se presentan los valores medios de los datos obtenidos para la cepa silvestre y la etanologénica en cultivo batch.

Tabla 3.3. Datos experimentales en la cepa silvestre de *Synechocystis*

Tiempo [h]	Biomasa [gPS L⁻¹]		NO₃⁻ [mM]		PO₄ [mM]	
	Media	Ds	Media	DS	Media	DS
0	0,2283	0,002	7,0039	0,479	0,0552	0,0055
2	0,1770	0,016	7,1430	0,310	0,0545	0,0021
4	0,1873	0,034	7,1252	0,348	0,0532	0,0031
6	0,0969	0,006	8,1988	3,030	0,0418	0,0151
8	0,1092	0,005	7,6038	1,428	0,0444	0,0024
10	0,1338	0,000	7,3774	0,743	0,0403	0,0019
25	0,3233	0,002	8,0915	1,722	0,0352	0,0055
27	0,3515	0,020	8,2305	0,684	0,0290	0,0051
29	0,3656	0,010	9,1295	1,097	0,0264	0,0053
31	0,3909	0,017	8,9775	1,484	0,0199	0,0024
33	0,3822	0,036	7,8004	0,587	0,0174	0,0031
35	0,4431	0,016	8,1917	0,846	0,0132	0,0038
49	0,8294	0,005	5,4459	0,500	0,0103	0,0024
52	0,7957	0,084	5,4249	0,061	0,0111	0,0026
55	0,7597	0,010	5,6432	0,331	0,0107	0,0027

Tabla 3.4. Datos experimentales para la cepa de *Synechocystis* productora de etanol

Tiempo [h]	Biomasa [gPS L⁻¹]		Etanol [mM]		NO₃⁻ [mM]		PO₄ [mM]	
	Media	Ds	Media	Ds	Media	Ds	Media	Ds
0	0,0843	0,008	0,0354	0,017	6,6466	0,479	0,0561	0,0686
2	0,0850	0,017	0,0282	0,009	7,0072	0,310	0,0552	0,0195
4	0,1025	0,007	0,0358	0,015	6,8390	0,348	0,0539	0,0007
6	0,0861	0,002	0,0443	0,015	6,9377	3,030	0,0494	0,0012
8	0,1077	0,001	0,0511	0,020	7,4405	1,428	0,0471	0,0033
10	0,1260	0,005	0,0625	0,011	7,7784	0,743	0,0447	0,0033
25	0,3204	0,007	0,1803	0,022	6,8853	1,722	0,0308	0,0022
27	0,3292	0,016	0,2068	0,013	7,0761	0,684	0,0303	0,0094
29	0,3717	0,007	0,2281	0,012	6,7980	1,097	0,0227	0,0046
31	0,4000	0,006	0,2469	0,024	7,3154	1,484	0,0207	0,0055
33	0,4157	0,011	0,2737	0,022	6,4584	0,587	0,0153	0,0027
35	0,4439	0,020	0,2998	0,032	5,9928	0,846	0,0172	0,0051
49	0,7307	0,001	0,4781	0,076	5,1727	0,500	0,0138	0,0023
52	0,7750	0,016	0,4849	0,082	5,1306	0,061	0,0147	0,0016
55	0,7774	0,015	0,5874	0,110	5,7014	0,331	0,0144	0,0006

3.2.6. Datos experimentales de Fluxómica

Se obtuvieron datos de flujos metabólicos medidos por la técnica ¹³C MFA de un estudio realizado por Young *et al.* (2011) para *Synechocystis*. Esta técnica permite la medición directa de los flujos principales de un microorganismo bajo determinadas condiciones.

Dado que los flujos son el resultado final de las diferentes etapas de regulación de una célula, un mapa de flujo obtenido por esta técnica representa exactamente un fenotipo del microorganismo bajo estudio (Nielsen & Hohmann, 2017). En este trabajo, se evalúan los flujos metabólicos en *Synechocystis* en condiciones fotoautotróficas de crecimiento, obteniendo una tasa de crecimiento de 0.09 h^{-1} y una tasa de captación de carbono inorgánica calculada de $3.7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Se presenta una medición precisa de todas las reacciones pertenecientes al ciclo de Calvin, como así también de las vías de fotorrespiración, enzima málica y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En la Tabla 3.5 se presentan los datos experimentales utilizados para validar el GEM. Estos datos se encuentran normalizados para una captación de carbono inorgánico de $100 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que la captación de CO_2 experimental fue de $3,7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Tabla 3.5. Datos de flujos calculados por ^{13}C INST-MFA de Young *et al.* (2011). Los datos se presentan para una captación de carbono inorgánico de $100 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y con intervalos de confianza del 95%.

Reacción	Valor	LB95	UB95
Glucolisis y PPP			
$G6P \rightarrow F6P$	-19,0	-24,0	-15,0
$G6P \rightarrow RU5P + CO_2$	16,0	12,0	21,0
$F6P \rightarrow FBP$	-60,0	-66,0	-53,0
$FBP \rightarrow DHAP + GAP$	-60,0	-66,0	-53,0
$DHAP \rightarrow GAP$	-95,0	-99,0	-90,0
$GAP \rightarrow 3PGA$	-228,0	-237,0	-219,0
$3PGA \rightarrow 2PGA$	23,2	22,9	23,6
$2PGA \rightarrow PEP$	23,6	23,4	23,8
$PEP \rightarrow PYR$	9,5	7,9	11,1
Ciclo de Calvin			
$RU5P \rightarrow X5P$	-75,9	-76,2	-75,5
$RU5P \rightarrow R5P$	-35,6	-35,7	-35,4
$RU5P \rightarrow RUBP$	127,00	123,0	132,0
$RUBP + CO_2 \rightarrow 3PGA + 3PGA$	127,0	123,0	132,0
$X5P \rightarrow GAP + EC_2$	-75,9	-76,2	-75,5
$F6P \rightarrow E4P + EC_2$	38,5	38,4	38,7
$S7P \rightarrow R5P + EC_2$	37,3	37,2	37,5
$F6P \rightarrow GAP + EC_3$	1,0	-6,0	9,0
$S7P \rightarrow E4P + EC_3$	-1,0	-9,0	6,0
$DHAP + E4P \rightarrow SBP$	36,0	29,0	43,0
$SBP \rightarrow S7P$	36,0	29,0	43,0
Ciclo de Krebs			

$PYR \rightarrow ACA + CO_2$	11,8	11,5	12,0
$OAA + ACA \rightarrow CIT$	3,2	3,0	3,4
$CIT \rightarrow ICI$	3,2	3,0	3,4
$ICI \rightarrow AKG + CO_2$	3,0	3,0	3,0
$SUC \rightarrow FUM$	0,2	0,0	0,4
$FUM \rightarrow MAL$	1,8	1,7	2,0
$MAL \rightarrow OAA$	-3,6	-5,2	-1,9
Reacciones Antibiólicas			
$MAL \rightarrow PYR + CO_2$	5,3	3,7	6,9
$PEP + CO_2 \rightarrow OAA$	11,6	9,9	13,2
$ICI \rightarrow GOX + SUC$	0,2	0,0	0,4
$GOX + ACA \rightarrow MAL$	-0,1	-0,3	0,1
Fotorrespiración			
$RUBP \rightarrow 3PGA + 2PG$	0,4	0,0	0,8
$2PG \rightarrow GLC$	0,4	0,0	0,8
$GLC \rightarrow GOX$	0,4	0,0	0,8
$GOX + GOX \rightarrow GA + CO_2$	0,3	0,0	0,5
$GA \rightarrow 2PGA$	0,3	0,0	0,5

3.3. Resultados y Discusión

En esta sección se presentará la validación de la tasa de crecimiento del GEM desarrollado a partir de los dos sets de datos experimentales del cultivo batch y un análisis detallado de la distribución de flujos del modelo ajustado por estos datos experimentales en condiciones de crecimiento fotoautotrófico, que es el objeto de estudio de esta tesis ya que presenta atractivas características desde el punto de vista biotecnológico.

3.3.1. Cálculo de tasas a partir de datos de cultivo batch.

Para estimar μ a partir de los datos experimentales se reescribe la Ecuación (3.7) en forma logarítmica, de modo que se describe la fase exponencial como una relación lineal entre $\ln(X/X_0)$ y t . (Ecuación (3.11)). Al observar los datos de biomasa para la cepa silvestre (Tabla 3.3), se puede ver que los primeros tres valores de tiempo (0, 2 y 4 horas) corresponden a la fase lag de crecimiento, por lo tanto estos puntos no se consideran en la estimación para este set de datos. X_0 es el valor de biomasa a las 6

horas, que se toma como comienzo de la fase exponencial. Para la cepa etanológica, no se observa fase lag, por lo cual X_0 es el primer valor.

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t \quad (3.11)$$

Se consideran para ambas cepas los puntos de 6 horas a 10 horas para el cálculo. Los valores de tasa de crecimiento neta (μ) obtenidos según lo indicado son de 0.082 h^{-1} para la cepa silvestre y de 0.08 h^{-1} para la cepa etanológica.

Para el cálculo de la tasa de producción de etanol en la cepa etanológica se utiliza la Ecuación (3.10), y se deben considerar los datos correspondientes al mismo intervalo de tiempo que se consideró para el cálculo de μ . El valor de tasa de producción de etanol ($v_{p_{\text{EtOH}}}$) obtenido desde los datos experimentales es de $0,0236 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Se ha determinado recientemente, que la captación de fósforo por parte de *Synechocystis* es un mecanismo complejo que se da en dos etapas (Zhou *et al.*, 2017). En la primera el fósforo es adsorbido a polímeros extracelulares que excreta la célula y en una segunda etapa es captado a través de transportadores de membrana en función de la concentración de fósforo intracelular y del que se encuentra adsorbido a la superficie celular. En el caso del nitrógeno, y basado en los datos experimentales se puede apreciar que no siguen una marcada tendencia decreciente para ninguna de las dos cepas, lo que lleva a pensar que la captación de nitrógeno podría seguir un mecanismo complejo al igual que el fósforo. Debido a que los enfoques de modelado utilizados en esta tesis asumen estado estacionario, no son capaces de representar estas dinámicas complejas y las tasas de captación de estos nutrientes no pueden calcularse como se describe para μ y la tasa de producción de etanol.

En este capítulo, se utilizará a modo comparativo la tasa de crecimiento calculada a partir de los datos para la cepa silvestre, mientras que la tasa de producción de etanol se compara con los resultados del modelo en el Capítulo 4.

3.3.2. Determinación de condiciones óptimas de crecimiento a partir del modelo

En el crecimiento fotoautotrófico los nutrientes más importantes a tener en cuenta son el carbono inorgánico ($C_i = CO_2 + HCO_3^-$) que se utiliza como única fuente de carbono, y la luz que se utiliza como fuente de energía. A partir de los datos de Shastri & Morgan (2005), quienes realizaron un experimento de cultivo de *Synechocystis* en condiciones fotoautotróficas con el objetivo de determinar tasas máximas de captación de nutrientes, se conoce que la tasa máxima de captación de C_i del microorganismo bajo estudio es de $3,7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Con respecto a la luz, la tasa de captación mínima necesaria según Nogales *et al.* (2012) es de $54,5 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Como la tasa de captación de C_i es la máxima, y la de luz la mínima, se decidió analizar el espacio de flujo variando estos dos parámetros para observar el comportamiento de la red. El C_i se considera en un rango entre 0 y $3,7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y la luz entre 0 y $200 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que resulta tres veces mayor que el mínimo reportado en bibliografía. Se fijaron, además, todas las posibles fuentes de carbono orgánico (ej: glucosa, fructosa, etc.) en $0 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para evitar situaciones decrecimiento mixotrófico. Estos rangos se discretizaron en 50 puntos, y se resolvió un FBA para cada una de las combinaciones de puntos en MATLAB, obteniéndose una superficie (Figura 3.3) que muestra la variación del crecimiento máximo frente a los cambios en C_i y luz. Si esta superficie se proyecta sobre el plano que corta al máximo valor de luz (en la dirección indicada en el eje de las abscisas correspondiente a la luz), se obtiene como varía el crecimiento únicamente respecto de variaciones en el C_i (Figura 3.4). Si se realiza la misma operación, pero proyectando sobre el plano que corta al valor máximo de C_i (en la dirección indicada en el eje de las abscisas correspondiente al carbono inorgánico), se obtiene la variación de crecimiento frente a cambios en la luz (Figura 3.4).

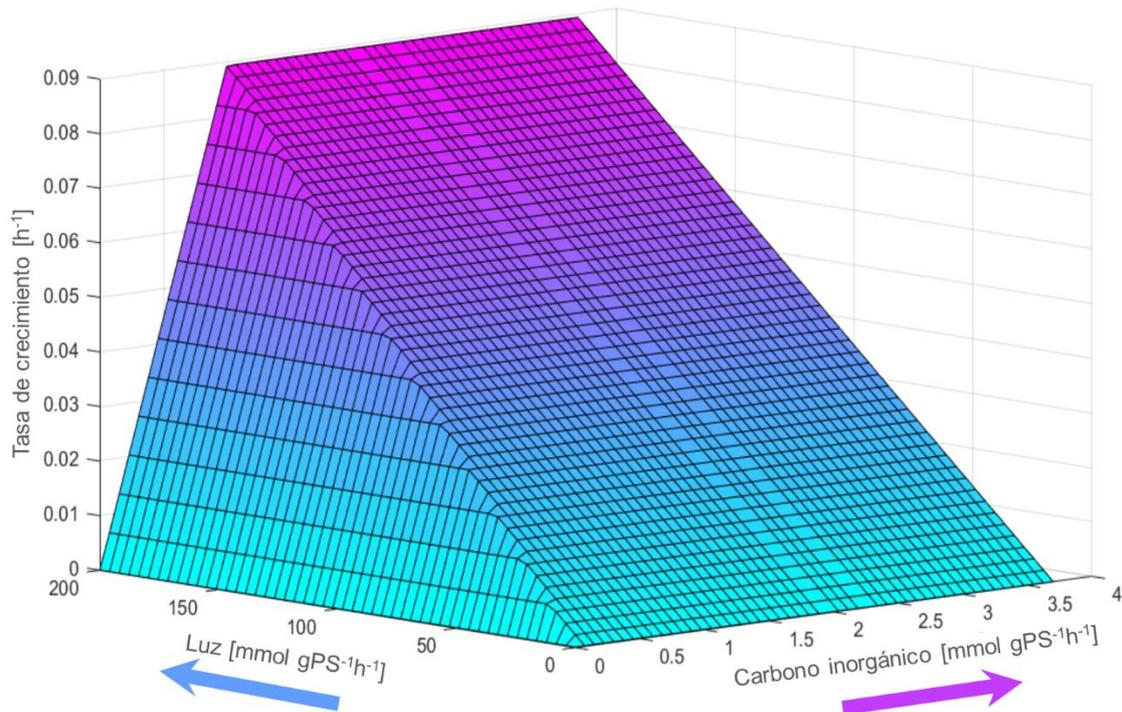


Figura 3.3. Variación de la tasa de crecimiento máximo frente a la variación simultánea de disponibilidad de carbono inorgánico y luz

A partir de estos gráficos se pudo determinar que, con la luz en un valor elevado, el Ci determina la tasa máxima de crecimiento sin que exista ningún otro factor limitante, ya que no se observa que la pendiente se mantenga constante en ningún rango de valores. Por lo tanto, como $3.7 \text{ mmol gSP}^{-1} \text{ h}^{-1}$ es la tasa máxima posible de captación en *Synechocystis*, se considera que la tasa de crecimiento (μ) máxima del GEM es de 0.089 h^{-1} . Este valor presenta una diferencia de solo 8,5% respecto a los datos experimentales presentados en la Sección 3.3.1. Shastri & Morgan (2005) calcularon una tasa de crecimiento experimental de 0.085 h^{-1} , lo cual representa una diferencia solo del 4.7% respecto a la predicha por el GEM.

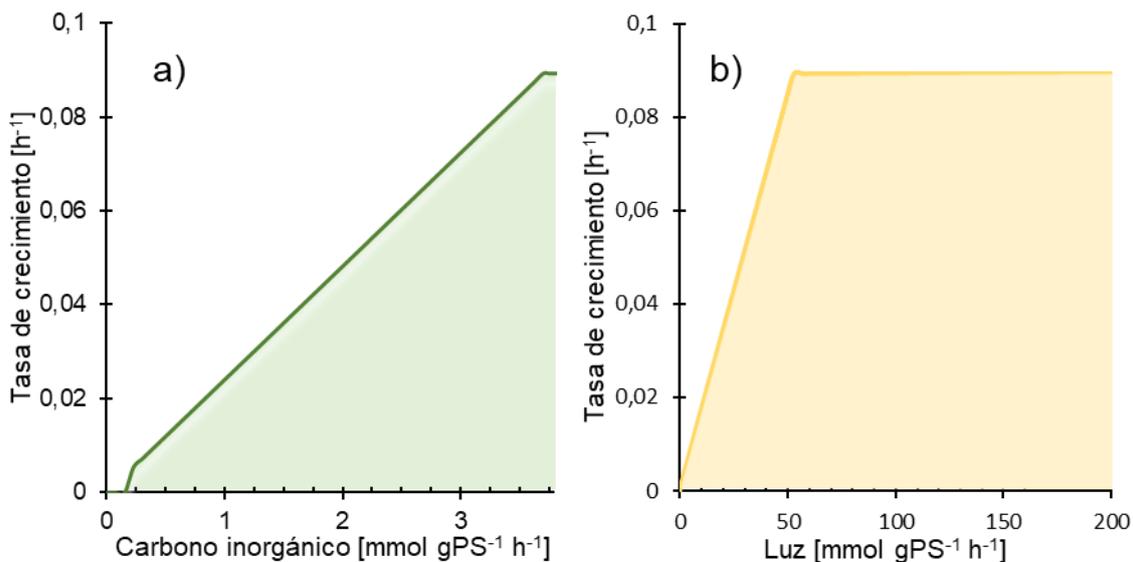


Figura 3.4. a) Crecimiento frente a cambios en la captación de Ci. b) Crecimiento frente a cambios en la disponibilidad de luz.

Con respecto a la luz, se puede observar que deja de ser un factor limitante a partir de aproximadamente $53 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En valores menores a éste, aunque la captación de Ci se encuentre en su máximo valor, μ no puede alcanzar su valor máximo ya que el factor limitante del crecimiento es la luz. De esta forma quedan definidos dos escenarios para el crecimiento de *Synechocystis*: uno limitado por luz, y otro limitado por carbono (Tabla 3.6). Se decide a partir de aquí considerar para las evaluaciones del GEM un valor de $100 \text{ mmol de fotones gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, para evitar que la luz resulte un factor limitante frente a las diferentes condiciones que se estudiarán.

Tabla 3.6. Escenarios de crecimiento en *Synechocystis*.

Condiciones fijadas en el GEM	Escenario de crecimiento
$v_{luz} \leq 53 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ $v_{Ci} \leq 3,7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Limitado por luz
$v_{luz} \geq 53 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ $v_{Ci} \leq 3,7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Limitado por carbono

Un parámetro importante a tener en cuenta es el ATP que utiliza la célula para realizar actividades distintas a la síntesis de macromoléculas para el crecimiento denominado ATP de mantenimiento. Este ATP es utilizado para procesos que los modelos

metabólicos no representan tales como el reemplazo de componentes celulares dañados, el ajuste de potenciales de membrana, el mantenimiento del pH intracelular, el transporte intracelular entre otros. Para incluir la energía que la célula invierte en estos procesos se incluye en el modelo una reacción de hidrólisis de ATP ($ATP + H_2O \rightarrow ADP + H^+ + P_i$) para la cual se fija un valor de flujo. En bibliografía se presentan diversos valores para este flujo, por lo cual se decidió analizar el comportamiento del GEM frente a cambios en este flujo, variándolo entre 0 y 100 $\text{mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$ (valores seleccionados arbitrariamente). En este caso (Figura 3.5), se observó que este parámetro no tiene una elevada influencia en el crecimiento, ya que, para condiciones óptimas de C_i y luz, se observa una caída en la tasa de crecimiento máxima recién para un flujo de aproximadamente 40 $\text{mmol gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$. Este valor es más elevado que los valores observados en bibliografía. Se decide en este caso utilizar como valor fijo 0,13 $\text{mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$, que es el presentado por Knoop *et al.* (2013).

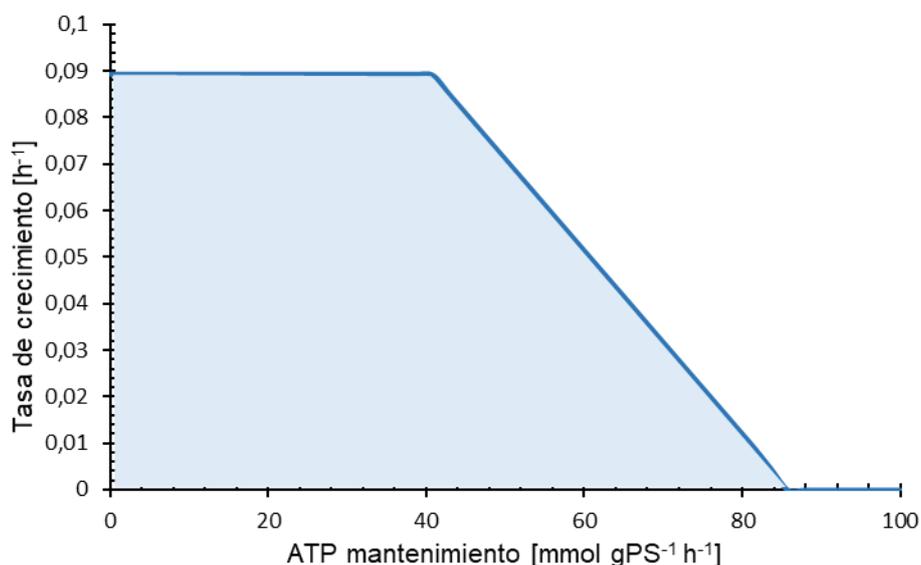


Figura 3.5. Variación de la tasa de crecimiento frente a cambios en los valores de ATP de mantenimiento.

3.3.3. Validación del modelo frente a mediciones de flujos metabólicos

Una vez validado el modelo frente a los datos experimentales de la tasa de crecimiento, se incorporaron los datos de fluxómica experimentales presentados en la Sección 3.2.6.

Se identificaron a que reacciones del GEM correspondían las reacciones incluidas en los datos experimentales publicados por Young *et al.* (2011), y se fijaron los datos experimentales como cotas superiores e inferiores para dichas reacciones. Algunas de las conversiones bioquímicas representadas por las reacciones del modelo utilizado por Young *et al.* (2011) se describen en varios pasos en el GEM. En estos casos, se fijaron los datos como cotas superiores e inferiores en todas las reacciones involucradas en dicha conversión. Esto ocurre con las conversiones de G6P a RU5P y CO₂, de GAP a 3PGA y de CIT a ICIT. Por otro lado, también se encontraron diferencias entre el GEM y las conversiones considerada en el modelo de Young *et al.* (2011) en algunas de las reacciones del ciclo de Calvin. En estos casos, se sumaron conversiones para obtener reacciones que estuvieran representadas en el modelo tomando en cuenta la dirección definida por el valor del flujo experimental (Tabla 3.5). Para una mayor comprensión se presentan estos casos en la Tabla 3.7. Por último, el modelo de Young *et al.* (2011) incluye las dos reacciones que permiten el ciclo del glioxilato. Como se mencionó en el Capítulo 2, se comprobó recientemente (Thiel *et al.*, 2017) que estas enzimas no se encuentran en *Synechocystis* y por lo tanto no se tuvieron en cuenta en el análisis.

Una vez definidas las cotas experimentales sobre los flujos del GEM, se resolvió un FVA con estas nuevas restricciones que reducen la región factible (Figura 3.2) con el objetivo de obtener cotas más precisas para los flujos de las reacciones del GEM que no se encontraban medidas experimentalmente, y con la captación de nutrientes determinada en la sección anterior. De esta forma, se obtienen sets de cotas inferiores y superiores (*LB* y *UB*) con mayor significación biológica para todas las reacciones del GEM lo que permite obtener resultados más precisos y cercanos al fenotipo de la cepa. Con todas las cotas determinadas, se resuelve un FBA maximizando biomasa. Los resultados numéricos muestran la misma tasa de crecimiento validada en Sección anterior (0,089 h⁻¹). Así, se comprueba que el modelo puede representar de forma precisa una condición medida *in vivo*.

Tabla 3.7. Diferencias entre conversiones definidas en el modelo de Young *et al.* (2011), y las reacciones que las representan en el GEM. No se incluyen cofactores, agua, ni protones. Para más detalle referirse al anexo con los números de reacción.

Conversión en modelo de Young <i>et al.</i> (2011)	Reacciones del GEM desarrollado
$G6P \rightarrow RU5P + CO_2$	$G6P \rightarrow GL6P$ (R422) $GL6P \rightarrow 6PG$ (R423) $6PG \rightarrow RU5P + CO_2$ (R424)
$GAP \rightarrow 3PGA$	$GAP \rightarrow 3PGP$ (R231) $3PGP \rightarrow 3PGA$ (R233)
$GOX + GOX \rightarrow GA + CO_2$	$2 GOX \rightarrow TA + CO_2$ (R201) $TA \rightarrow GA$ (R200)
$CIT \rightarrow ICIT$	$CIT \rightarrow ACO$ (R508) $ACO \rightarrow CIT$ (R509)
$GAP + EC2 \rightarrow X5P$ $F6P \rightarrow E4P + EC2$	$GAP + F6P \rightarrow X5P + E4P$ (R428)
$F6P \rightarrow GAP + EC3$ $E4P + EC3 \rightarrow S7P$	$F6P + E4P \rightarrow GAP + S7P$ (R430)
$S7P \rightarrow R5P + EC2$ $GAP + EC2 \rightarrow X5P$	$S7P + GAP \rightarrow R5P + X5P$ (R427)

Además, los resultados numéricos muestran una buena correlación entre la distribución de flujos para crecimiento fotoautotrófico obtenida con el GEM y los valores de flujo experimentales (Tabla 3.8). Solo siete de las 37 reacciones con valores experimentales quedaron fuera del intervalo de confianza del 95%. Es importante notar que la reacción R430 (una de las dos con una diferencia grande respecto a los datos experimentales) se encontraba dividida en dos reacciones en el modelo de Young *et al.* (2011), lo cual puede tener alguna injerencia en la diferencia de resultados.

Este set de datos experimentales también fue considerado en el análisis de GEMs anteriores (Knoop *et al.*, 2013; Nogales *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2012). En los casos de Knoop *et al.* y Nogales *et al.* los datos son utilizados a modo comparativo sin incorporarlos a los modelos, mientras que en el caso de Saha *et al.* son utilizados con la misma metodología que en la presente tesis, pero obteniendo una mayor cantidad de flujos fuera de los rangos experimentales.

Tabla 3.8. Comparación entre medidas de flujo por ^{13}C MFA de Young *et al.* (2011) y valores predichos por el GEM. Para más detalle referirse a los Apéndices A y B.

Reacción	Conversión representada por la reacción	GEM	Young <i>et al.</i> (2011)*		
		Valor	Valor	LB95	UB95
R422, R423, R424	$G6P \rightarrow Ru5P$	0,524	0,592	0,444	0,777
R223	$F6P \rightarrow G6P$	0,555	0,703	0,555	0,888
R225	$FBP \rightarrow F6P$	2,242	2,220	1,961	2,442
R229	$DHAP + G3P \rightarrow FBP$	2,242	2,220	1,961	2,442
R230	$G3P \rightarrow DHAP$	3,330	3,515	3,33	3,663
R231, R233	$3PG \rightarrow G3P$	8,236	8,436	8,103	8,769
R237	$3PG \rightarrow 2PG$	0,866	0,858	0,847	0,873
R238	$2PG \rightarrow PEP$	0,866	0,873	0,865	0,881
R420	$DHAP + E4P \rightarrow SBP$	1,199	1,332	1,073	1,591
R421	$SBP \rightarrow S7P$	1,199	1,332	1,073	1,591
R426	$R5P \rightarrow Ru5P$	1,349	1,317	1,309	1,321
R427	$S7P + G3P \rightarrow R5P + X5P$	1,421	1,428	1,421	1,432
R428	$F6P + G3P \rightarrow E4P + X5P$	1,456	1,384	1,376	1,387
R429	$Ru5P \rightarrow X5P$	2,877	2,808	2,793	2,819
R430	$E4P + F6P \rightarrow S7P + G3P$	0,222	1,343	1,073	1,591
R431a	$RuBP + CO_2 + H_2O \rightarrow 2\ 3PG$	4,750	4,699	4,551	4,884
R431b	$RUBP \rightarrow 3PGA + 2PG$	0,0	0,015	0,0	0,030
R432	$Ru5P \rightarrow RuBP$	4,750	4,699	4,551	4,884
R495	$PEP \rightarrow PYR$	0,411	0,352	0,292	0,411
R498	$PYR + COA \rightarrow ACCOA + CO_2$	0,426	0,437	0,425	0,444
R503	$PEP + CO_2 \rightarrow OAA$	0,383	0,429	0,366	0,488
R504	$MAL \rightarrow OAA$	0,070	0,133	0,070	0,192
R515	$OAA + ACA \rightarrow CIT$	0,116	0,118	0,111	0,126
R508, R509	$CIT \rightarrow ICIT$	0,116	0,118	0,111	0,126
R510	$ICIT \rightarrow aKG + CO_2$	0,116	0,111	0,111	0,126
R512	$FUM \rightarrow MAL$	0,200	0,067	0,063	0,074
R513	$SUCC \rightarrow FUM$	0,034	0,007	0,0	0,015
R517	$MAL \rightarrow PYR + CO_2$	0,130	0,196	0,138	0,255
R522	$2PG \rightarrow GLC$	0,0	0,015	0,0	0,030
R532	$GLC \rightarrow GOX$	8E-5	0,015	0,0	0,030
R200, R201	$2\ GOX \rightarrow GA + CO_2$	0,009	0,011	0,0	0,018
R199	$GA \rightarrow 2\ PGA$	0,0	0,011	0,0	0,018

*Valores transformados a una tasa máxima de captación de C_i de $3,7\ \text{mmol gPS}^{-1}\ \text{h}^{-1}$ usando una conversión de 0,037.

3.3.4. Análisis de distribución de flujos en *Synechocystis*

Los resultados numéricos obtenidos en la Sección 3.5.3 muestran que la curación manual realizada en el Capítulo 2 mejora las predicciones de los datos fenotípicos de fluxómica de los modelos anteriores (*Knoop et al., 2013a; Nogales et al., 2012; Saha et*

al., 2012). Por lo tanto, con las cotas obtenidas a partir de estos datos experimentales, se realiza un análisis más profundo de la distribución de flujos bajo diferentes escenarios que resultan de interés para el estudio de ciertos procesos involucrados en la fotosíntesis.

Los resultados numéricos obtenidos con estas cotas muestran un flujo de captación de CO_2 de $0,336 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y de $3,364 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de HCO_3^- . Esto cumple con la restricción fijada de $v_{\text{CO}_2} + v_{\text{HCO}_3} \leq 3,7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La captación de nutrientes inorgánicos tales como nitrógeno (como NO_3^-), fósforo (como PO_4^{3-}) y sulfato (como SO_4^{2-}) no se restringió. Los valores obtenidos de captación fueron de $0,8 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para nitrógeno, $0,016 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para sulfato y $0,065 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para fósforo (Figura 3.6). Como es esperable en las condiciones de ensayo, no se observa producción de ningún subproducto del crecimiento ya que la limitación del mismo está dada por el Ci y la captación del resto de los compuestos no está restringida.

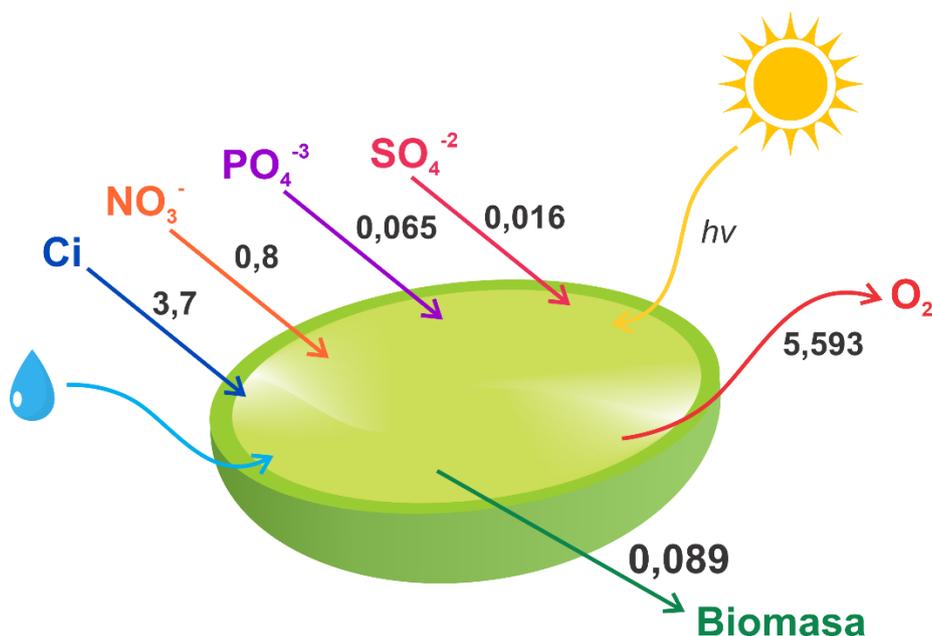


Figura 3.6 . Resultados numéricos para el crecimiento fotoautotrófico limitado por carbono.

Bajo las condiciones de estudio no se observa flujo a través de la enzima RuBisCO oxigenasa, como tampoco actividad basal de la fosforilación oxidativa en presencia de la luz a través de la oxidasa terminal, ni de la conversión de NADPH y O_2 en NADP^+ y

H₂O a través de la reacción de tipo Mehler. Además, no se detecta formación del anión superóxido.

Para tener en cuenta estrés oxidativo, se analizó un nuevo escenario suponiendo que el 0,5% del flujo de electrones a través de ambos fotosistemas (PSI y PSII) se utiliza en la producción del anión superóxido por medio de las reacciones de tipo Mehler. Se fijó también la captación del 10% de la producción de O₂ de PSII como actividad respiratoria basal. Estas restricciones se implementaron con las Ecuaciones (3.5) y (3.6).

Los resultados presentes en literatura respecto a la conversión de NADPH y O₂ en NADP⁺ y H₂O son muy dependientes de las condiciones de cultivo (Knoop *et al.*, 2013), y además se desea observar que ocurre en una condición con la RuBisCO oxigenasa activa. Por lo tanto, se estudió un escenario con flujo forzado a través de la RuBisCO oxigenasa con un valor de 0,01 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ y diferentes escenarios para el consumo de O₂ por la reacción de tipo Mehler. Se consideran tres diferentes escenarios: i) Libre, ii) 10% de la producción de O₂ en el PSII, y iii) 20% de la producción de O₂ en el PSII. Estos tres escenarios son analizados para ambos casos con y sin flujo forzado través de la enzima RuBisCO oxigenasa.

Se resolvieron entonces seis nuevos escenarios FBA, sujetos a las cotas obtenidas en la sección anterior, y se calcularon los parámetros más relevantes relacionados al metabolismo fotoautotrófico. Además, para estos nuevos escenarios se consideró flujo cero para las reacciones catalizadas por la enzima fosfoquetolasa (EC. 4.1.2.22) ya que los resultados experimentales presentados por Xiong *et al.* (2015) muestran que se encuentran inactivas bajo las condiciones consideradas. En la Tabla 3.9 se pueden ver los resultados de los seis escenarios.

Una observación importante sobre estos resultados, es el hecho de que el crecimiento se mantiene en su valor máximo para todos los escenarios. De esto se desprende que

las modificaciones realizadas no afectan a la disponibilidad de nutrientes, y que, por lo tanto, si observáramos solo las entradas y salidas al sistema no se observarían diferencias. Este tipo de modificaciones tienen injerencia en la distribución interna de flujos y es importante el análisis de estos resultados para conocer cómo se distribuye el flujo de carbono y energía en las distintas vías metabólicas, y también para evaluar si los parámetros fotosintéticos se encuentran dentro de valores observados *in vivo*. A continuación, se analizan los parámetros presentados en la Tabla 3.9. Las reacciones involucradas en los cálculos de dichos parámetros y los flujos de cada una de ellas se encuentran en el Apéndice D.

La relación ATP/NADPH requerida para la fijación de CO₂ en el ciclo de Calvin es de 1,5, pero las cianobacterias no tienen la capacidad de alcanzar este valor únicamente por medio de la vía de transporte de electrones lineal (LEF) (Figura 2.3), que puede alcanzar un valor máximo de 1,28 (Nogales *et al.*, 2012). La relación requerida es lograda a través de vías de transporte de electrones alternativas (AEF) disipadoras de poder reductor que tienen la función de consumir NADPH y regenerar NADP (Kramer & Evans, 2011). En la Tabla 3.9, se muestra que en todos los casos el valor de 1,5 de ATP/NADPH es alcanzado por actividad de las vías AEF (Apéndice D). En este sentido, los seis escenarios planteados en la Tabla 3.9 serían viables para lograr una efectiva fijación de carbono en el ciclo de Calvin.

Como se puede observar en la Tabla 3.9, los resultados numéricos no muestran diferencias si se compara cada escenario para la reacción tipo Mehler con y sin considerar fotorrespiración (RuBisCO oxigenasa activa o inactiva, respectivamente). Sin embargo, sí se observan diferencias entre los tres escenarios de la reacción de Mehler (Libre, 10% y 20%) si se analizan dentro del mismo caso de fotorrespiración. Se debe notar que en los dos casos en que la reacción de Mehler se encuentra libre, no existe flujo por esa vía. Esto es esperable ya que es una vía que disipa energía, y al optimizar

la producción de biomasa, el LP da como resultado una distribución que implica todo el gasto de energía en dirección a la síntesis de biomasa. Sin embargo, en este escenario, la relación ATP/NADPH no alcanza el valor mínimo necesario de 1,5 para que el ocurra la fijación de CO₂ en el ciclo de Calvin, lo cual podría indicar que la actividad de esta enzima es necesaria en *Synechocystis* como vía alternativa para lograr una relación ATP/NADPH apta para el crecimiento. Se requieren estudios experimentales para confirmar los resultados obtenidos *in silico*.

Tabla 3.9. Tasa de crecimiento y principales parámetros bioenergéticos y fotosintéticos considerando un flujo de 0 y de 0,01 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ para la fotorrespiración, comparados con tres escenarios diferentes para la reacción tipo Mehler (Libre, 10 y 20%).

	Sin fotorrespiración			Fotorrespiración fija		
	<i>Escenario Mehler</i>			<i>Escenario Mehler</i>		
	Libre	10%	20%	Libre	10%	20%
Tasa de crecimiento [h ⁻¹]	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089
RuBisCO carboxilasa [mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹]	4,750	4,750	4,750	4,740	4,740	4,740
RuBisCO oxigenasa [mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹]	0,000	0,000	0,000	0,010	0,010	0,010
ATP/NADPH (LEF)	1,273	1,279	1,302	1,271	1,280	1,303
ATP/NADPH (LEF + AEF)	1,607	1,624	1,713	1,599	1,625	1,714
PSI/PSII	2,649	2,462	2,037	2,644	2,458	2,033
hv/O₂	17,87	17,87	17,87	17,87	17,87	17,87
h_{vi}/h_{vo}	0,137	0,136	0,145	0,135	0,136	0,144

ATP/NADPH (LEF): ATP producido/NADPH consumido en vía de transporte de electrones lineal.

ATP/NADPH (LEF + AEF): ATP producido/NADPH consumido in vías de transporte de electrones lineal y alternativa.

PSI/PSII: Relación entre los flujos de los fotosistemas I y II.

hv/O₂: mmol de fotones consumidos/mmol de O₂ producidos.

h_{vi}/h_{vo}: Energía disipada/Energía Total disponible (en forma de fotones)

El parámetro h_{vi}/h_{vo} , que relaciona la energía disipada con la energía total disponible, muestra un valor mayor en el caso de mayor flujo por la reacción de Mehler. Esto se debe a que dicha reacción es en efecto una de las vías de disipación de energía, sin embargo, este aumento de flujo ocasiona una disminución en la energía disipada por una de las reacciones involucradas en la vía de transporte de electrones cíclica (CEF).

De los resultados también se desprende que, para un flujo de fotones constante en todos los escenarios, la producción de O₂ no se ve modificada.

Según un estudio experimental en condiciones de exceso de luz (Allahverdiyeva *et al.*, 2011) un 20% de los electrones del PSII pueden dirigirse a la reacción de tipo Mehler, lo cual valida el escenario (iii) sin fotorrespiración. Por lo tanto, se considera dicho escenario para extender la discusión de la distribución de flujos.

La Figura 3.7 muestra los resultados obtenidos en estas condiciones para el metabolismo central del carbono, mientras que los resultados numéricos completos se encuentran en el Apéndice E.

El carbono que es fijado a través de la enzima RuBisCO es mayor que el valor total de carbono captado por la célula. Se observó experimentalmente (Young *et al.*, 2011) que el CO₂ generado en reacciones de descarboxilación que ocurren en ciertas vías metabólicas puede ser reutilizado por la RuBisCO. Esta posibilidad fue incorporada al GEM logrando mejores predicciones del flujo a través de la RuBisCO.

El carbono es convertido en 3-fosfo-D-glicerato (3PG) a través de la enzima RuBisCO. Este metabolito marca una división en la glucólisis: una parte se dirige aguas arriba (glucólisis alta) y luego a la vía PPP, y otra parte aguas abajo (glucólisis baja) al metabolismo del piruvato y el ciclo de Krebs (Figura 2.2). El flujo que se dirige aguas arriba está involucrado en la síntesis de nucleótidos, de aminoácidos aromáticos, glicerolípidos, y glucógeno. Este último actúa como único compuesto de reserva, acumulándose para ser utilizado como fuente de energía en ausencia de luz. Otra parte del flujo proveniente de la RuBisCO se dirige hacia la glucólisis baja para la síntesis de ácidos grasos, de aminoácidos y de coenzima-A (CoA). Existe una pequeña porción restante de flujo de carbono que se dirige hacia la vía de síntesis de serina independiente de la luz (Figura 3.8).

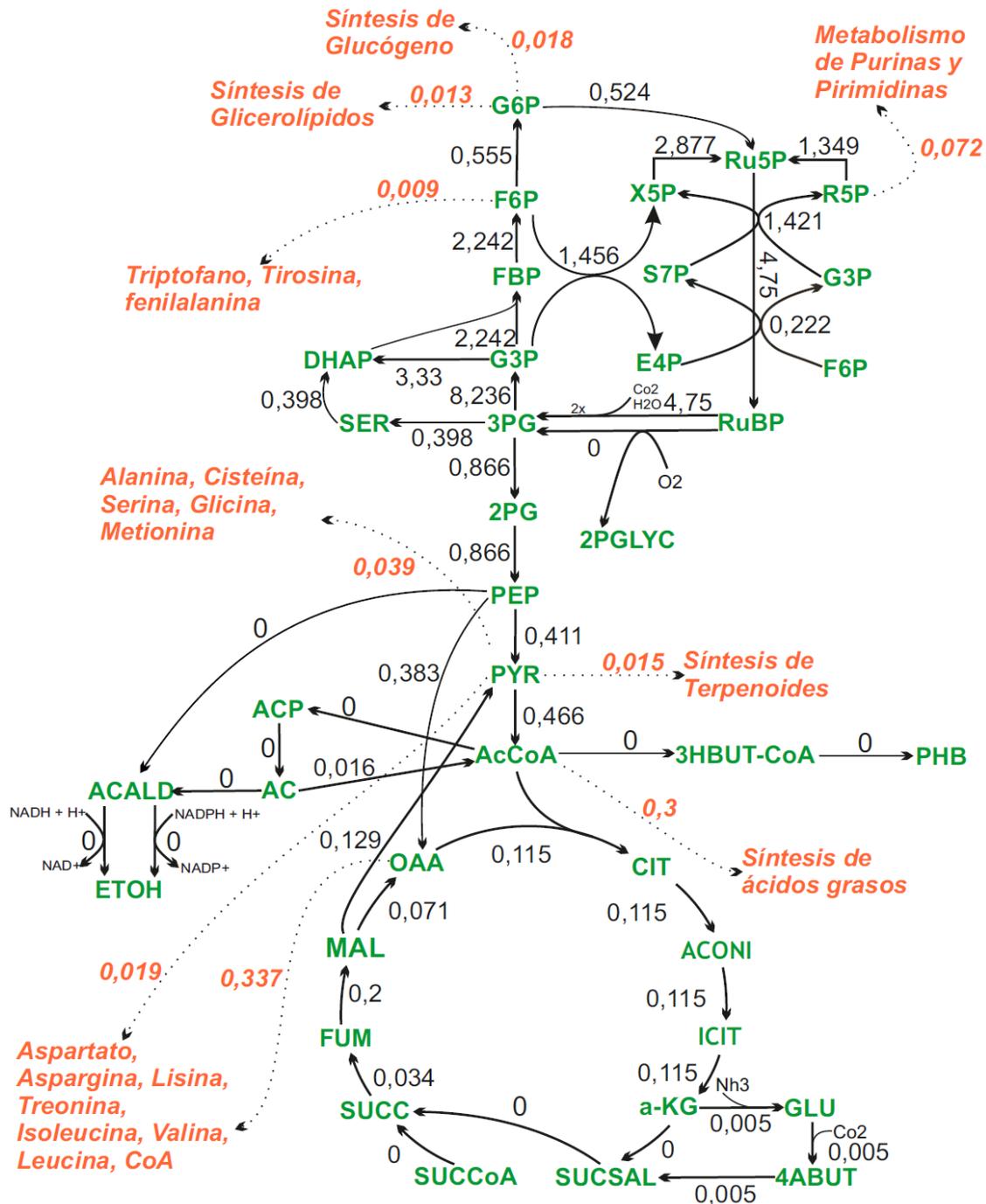


Figura 3.7. Distribución de flujos optimizando la síntesis de biomasa en condiciones de limitación de carbono. Los valores de flujo tienen unidades de mmol gPS⁻¹ h⁻¹. La captación de carbono inorgánico como CO₂ es de 0,336 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ y de 3,364 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ como HCO₃⁻. Se cumple que: $v_{CO_2} + v_{HCO_3^-} \leq 3,7$ mmol gPS⁻¹ h⁻¹. La restricción de flujo de fotones es $v_{fotones} \leq 100$ mmol gPS⁻¹ h⁻¹ y toma un valor de 100 mmol gDW⁻¹ h⁻¹. La captación de nitrógeno, el fósforo y micronutrientes no se encuentra restringida.

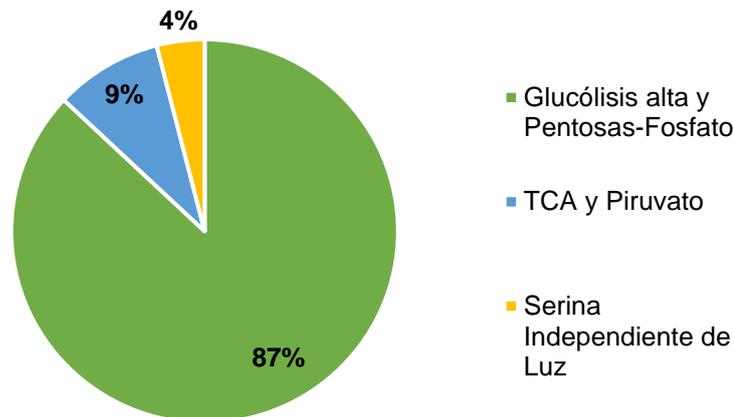


Figura 3.8. Distribución del carbono total fijado por la RuBisCO entre las principales vías del metabolismo del carbono.

Los resultados numéricos muestran actividad a través de las enzimas del ciclo GABA (EC 4.1.1.15, EC 2.6.1.19 y SSDHA), el cual constituye una de las alternativas para el cierre del ciclo de Krebs. Xiong *et al.* (2014) muestran en ensayos *in vivo* que tanto el ciclo GABA como el bypass a través de las enzimas 2-OGDC y SSADH se encontraban activas, pero no presentan una relación entre estos flujos que pueda utilizarse como restricción en el modelo. Para confirmar si el modelo obtiene los mismos resultados utilizando cualquiera de las dos vías, se fija la reacción desde 4BUT a SUCAL en cero (se elimina el ciclo GABA) y como resultado el modelo activa el bypass desde a-KG a SUCAL. Por lo tanto, este resultado confirma que se trata de un caso de múltiples soluciones óptimas en el cual dos distribuciones de flujo diferentes dan el mismo crecimiento óptimo. Se requiere mayor información experimental sobre la porción del flujo es dirigida a cada una de estas vías y las condiciones de cultivo para poder imponer al modelo a utilizar ambas vías a través de restricciones.

3.4. Conclusiones

En este capítulo presenta un análisis profundo del GEM curado presentando en el Capítulo 2. La información fisiológica y de fluxómica disponibles para *Synechocystis* revelan que los resultados numéricos obtenidos con el GEM curado son consistentes

con los datos experimentales, mejorando las predicciones obtenidas en trabajos anteriores publicados en la literatura. Además, a partir de los datos fenotípicos obtenidos a través de ^{13}C MFA se obtuvieron cotas con un mayor grado de significado biológico para el crecimiento fotoautotrófico de *Synechocystis*.

El análisis de la distribución de flujos completa del GEM brinda información de la distribución del flujo de carbono fijado fotosintéticamente, mostrando que la mayor parte de éste se dirige hacia la síntesis de los precursores de las macromoléculas que forman la biomasa (aminoácidos, nucleótidos, glicerolípidos) y de glucógeno, a través de la glucólisis superior y de la vía de las pentosas fosfato. Una porción menor se dirige al metabolismo del piruvato, formación de ácidos grasos a partir de acetyl-CoA y al ciclo de Krebs para la síntesis de precursores de aminoácidos. También se observó flujo en la vía de síntesis de serina independiente de la luz.

El análisis de los parámetros fotosintéticos muestra la necesidad de la utilización de vías alternativas de transporte de electrones para alcanzar la relación de ATP/NADPH óptima para la fijación de carbono en el metabolismo fotoautotrófico. Se estudió la reacción de Mehler bajo diferentes escenarios, definiendo en base a experimentos computacionales y bibliografía fijar un 20% de la evolución de O_2 del PSII, que se corresponde con un aumento en el flujo de fotones a través del PSII.

En base a todos los resultados obtenidos en este capítulo, podemos inferir que el modelo desarrollado brinda una representación correcta de la información biológica disponible, y por lo tanto constituye una herramienta útil para el diseño de cepas productoras de compuestos de interés biotecnológicos abordados en los Capítulos 4 y 5 de la tesis.

Producción fotosintética de etanol

4.1. Introducción

La demanda mundial de energía primaria no presenta proyecciones favorables, y esto se atribuye principalmente al crecimiento estimado en la población mundial (García Prieto, 2018). Junto con esto, se presenta el problema de que las principales fuentes de esta energía continúan siendo no renovables. Si se observa la matriz energética del año 2018 (BP Statistical Review of World Energy, 2019) se encuentra que solo un 5% a nivel mundial y un 4% en Argentina de la energía consumida corresponden a fuentes renovables, excluyendo de ellas la hidroeléctrica y la nuclear (Figura 4.1).

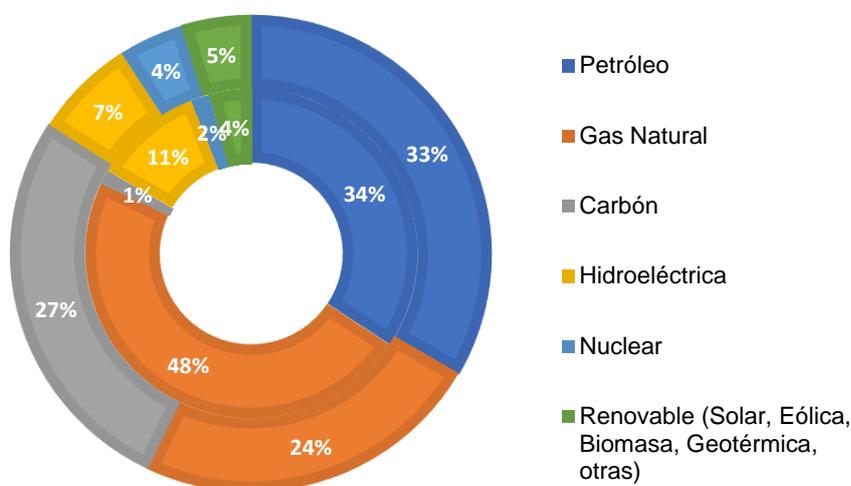


Figura 4.1. Matriz Energética mundial (círculo externo) y Argentina (círculo interno) del año 2018, expresada como porcentajes del tipo de energía consumida. Totales: Mundial, 13960 Mtep; Argentina, 88 Mtep.

El elevado consumo de energía de fuentes no renovables como el petróleo, el gas natural y el carbón, tiene como principal problema el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (CO₂, metano, óxido nitroso, ozono, clorofluorcarbonos) que

se encuentran ligados a la problemática del cambio climático. Los únicos gases de efecto invernadero que no se encuentran naturalmente en la atmósfera son los clorofluorocarbonos (CFCs). El aumento en las concentraciones atmosféricas de los GEI debido a las emisiones industriales resulta alarmante. De éstos el que ha mostrado un aumento más alarmante es el CO₂, cuyas emisiones muestran un sostenido aumento tanto a nivel mundial como a nivel nacional (Figura 4.2).

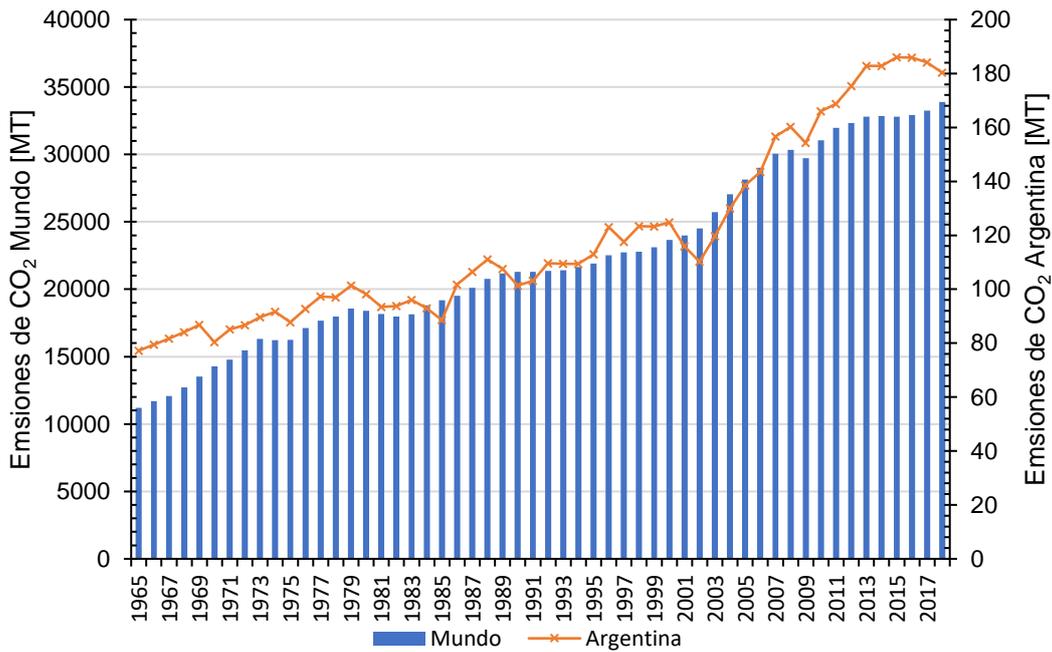


Figura 4.2. Evolución de las emisiones de CO₂ desde el año 1965 al 2018, a nivel mundial y en Argentina. Datos expresados en Millones de Toneladas de CO₂. Fuente: BP Statistical Review of World Energy (2019).

Los biocombustibles han surgido como una alternativa para complementar los combustibles fósiles, con el objetivo de disminuir el impacto ambiental y la concentración de CO₂ en la atmosfera. Estos combustibles renovables se clasifican por generación, según la materia prima a partir de la cual se producen (Figura 4.3). Los de primera generación son biocombustibles basados en cultivos como maíz, trigo, cebada, remolacha y caña de azúcar, por lo cual, presentan la desventaja de que compiten con la producción de alimentos. Los de segunda generación se basan en biomasa lignocelulósica, que puede provenir tanto de residuos de agricultura y forestales, como

de cultivos específicos para biocombustibles. La tercera generación incluye biocombustibles obtenidos a partir de la producción de biomasa algal, y aún se encuentra bajo estudio para aumentar las tasas de producción, mejorar los procesos de separación y reducir los costos de producción. El área de los biocombustibles de cuarta generación es aún un campo emergente, y la producción de éstos se basa en la conversión directa de energía solar en combustibles utilizando microorganismos genéticamente modificados y materias primas de bajo costo y gran disponibilidad. La producción de biocombustibles de cuarta generación se estudia desde hace más de 10 años con herramientas de biología sintética, aunque aún no se han alcanzado índices de producción satisfactorios para la escala industrial (Aro, 2016).

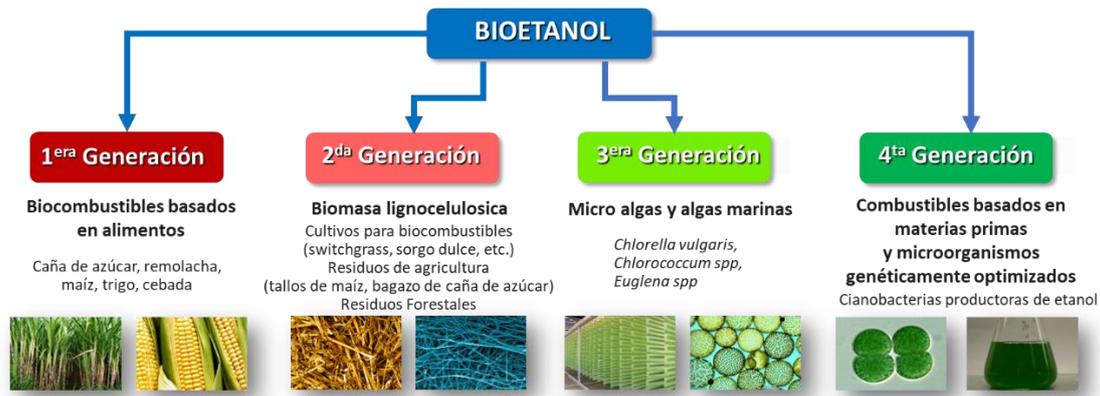


Figura 4.3. Clasificación de biocombustibles según la materia prima

En el marco de esta novedosa área de estudio de la producción de biocombustibles de cuarta generación, las cianobacterias, y específicamente *Synechocystis*, resultan importantes microorganismos, no solo para la producción de combustibles renovables como el etanol, sino también para la producción de compuestos de alto valor agregado. Una importante ventaja es que se pueden cultivar en fotobiorreactores y producir, por ejemplo, etanol, solo a partir de agua, luz y CO₂ presente en el ambiente, contribuyendo a la disminución de los preocupantes niveles de este gas de efecto invernadero presentes en la atmósfera en la actualidad. Estas características representan una gran

ventaja frente a la producción de bioetanol actual, que compite con los alimentos y requiere materias primas costosas.

La producción de biocombustibles a partir de cianobacterias se ha estudiado a partir de una patente publicada hace más de tres décadas. (Deng & Coleman, 1998) introducen genes de *Zymomonas mobilis* (naturalmente productora de etanol) en la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 para la producción de etanol. El mismo grupo de investigación (Woods *et al.*, 2004) posee una patente para la producción de al menos 1.7 mol etanol por mg de clorofila por hora.

Hasta el momento los índices de producción son bajos: la mejor productividad obtenida con *Synechocystis* hasta el momento es de 0,261 g L⁻¹ día⁻¹, y fue reportada por Dienst *et al.* (2014), mientras que el resultado que puede obtenerse para el caso de bacterias heterotróficas que es de 9.5 g L⁻¹ día⁻¹ (Hjersted & Henson, 2008). Es por esto que se continúa estudiando cómo mejorar la producción de bioetanol en *Synechocystis*, y los métodos computacionales basados en modelos metabólicos aplicados con un enfoque de ingeniería de sistema metabólicos resultan herramientas importantes para obtener una gran diversidad de alternativas, evitando experimentos de prueba y error *in vivo* que requieren largos períodos de tiempo e importantes sumas de dinero (Lee & Kim, 2015).

Acoplar la producción de un metabolito de interés biotecnológico al crecimiento celular se ha convertido en un principio clave para el diseño racional de microorganismos industriales (Klamt & Mahadevan, 2015). El objetivo es convertir el metabolito deseado en un subproducto obligado del crecimiento. En consecuencia, su producción resulta una parte integral de la función metabólica del organismo (Von Kamp & Klamt, 2017). Una ventaja clave de la síntesis acoplada es que permite utilizar Evolución Adaptativa en el Laboratorio (ALE) para optimizar la tasa de producción, al mismo tiempo que se optimiza la velocidad de crecimiento. Se ha comprobado, además, que las cepas acopladas son genéticamente más estables (Klamt & Mahadevan, 2015).

Para alcanzar el acoplamiento entre la producción del metabolito de interés y el crecimiento, la célula debe ser modificada genéticamente a través de la supresión (*knock-out*) de ciertos genes. Se ha dedicado mucho esfuerzo a desarrollar procedimientos *in silico* que usen representaciones GEM para obtener estas estrategias de acoplamiento de manera sistemática y teniendo en cuenta el metabolismo completo del microorganismo. Burgard *et al.* (2003) buscan identificar intervenciones genéticas del microorganismo bajo estudio que lleven a conseguir este estado acoplado, por medio de un problema de Programación Binivel. A partir de la publicación de este primer algoritmo se sentaron las bases para el desarrollo de una gran variedad de problemas binivel para diseño de cepas (Machado & Herrgård, 2015), que luego de ser reformulados resultan en una rama de métodos COBRA que involucra problemas de programación mixto entera lineal (MILP).

Esta atractiva estrategia se ha aplicado con éxito en microorganismo heterótrofos (Fong *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2013; Trinh *et al.*, 2008; Yim *et al.*, 2011), mientras que para cianobacterias se ha estudiado *in silico* la posibilidad de acoplar el crecimiento fotoautotrófico a la producción de limoneno, butanol y octanol (Shabestary & Hudson, 2016).

En este capítulo, se presentan dos estrategias de producción de etanol: i) a partir de un mutante acoplado, y ii) a partir de un proceso en dos etapas con limitación de nutrientes. Para el diseño *in silico* de mutantes acoplados de *Synechocystis* se formulan problemas de optimización binivel a partir de una modificación a los enfoques existentes donde se asignan variables binarias para la supresión de genes en vez del enfoque tradicional donde se asignan a las reacciones del GEM. Para el enfoque de producción en dos etapas se plantea un modelo extracelular dinámico utilizando los resultados obtenidos con el modelo intracelular.

4.2. Materiales y Métodos

En esta sección se presentan en detalle las dos estrategias de producción fotosintética de etanol propuestas. Estas mismas estrategias pueden emplearse para la producción de otros subproductos del crecimiento bajo las condiciones adecuadas.

4.2.1. Formulación de problemas binivel para el diseño in silico de cepas acopladas productoras de etanol

Para estudiar la posibilidad de acoplar la producción de un compuesto de interés al crecimiento celular es necesario determinar ciertas intervenciones genéticas o supresión de genes (*knock-outs*) que deben realizarse sobre el microorganismo considerado. Burgard *et al.* (2003) considera un problema binivel (OptKnock), donde en el problema interno se maximiza la producción de biomasa y en el problema externo el objetivo biotecnológico, asignándose variables binarias a las reacciones para representar los *knock-outs* necesarios para acoplar la producción al crecimiento. Otro enfoque presentado por Ranganathan *et al.* (2010) considera otra estrategia binivel en la que el problema interno minimiza la producción del compuesto de interés en lugar de maximizar la producción de biomasa, mientras que el problema externo minimiza la cantidad de intervenciones genéticas para lograr el acoplamiento, manteniendo la asignación de variables binarias a las reacciones. De esta forma el resultado no se encuentra sujeto a un estado de máxima producción de biomasa y el acoplamiento es efectivo para cualquier estado de flujos de la red. En este caso se consideran, además de *knock-outs*, subexpresión o sobreexpresión de reacciones (OptForce, Ranganathan *et al.* (2010)).

En un GEM, las reacciones están unidas a los genes correspondientes mediante las asociaciones Gen-Proteína-Reacción (GPR), que pueden tener diferentes mapeos (Figura 2.8). Asignar en el problema binivel el *knock-out* de genes con reacciones no permite representar completamente todas las opciones de mapeo GPR, lo cual trae

aparejados problemas en la transferencia de los resultados computacionales al campo experimental. Este es el caso de las enzimas multifuncionales que catalizan más de una reacción y están codificadas por un único gen (Ejemplo Gen 6 en la Figura 2.8). Siguiendo el ejemplo de la Figura 2.8, si el resultado del problema de optimización derivara en la eliminación de la Rxn D, debería eliminarse también la Rxn E y esta podría ser esencial para el crecimiento. Estos errores pueden ocurrir cuando las variables binarias están asociadas a reacciones dando lugar a mutantes *in silico* no viables *in vivo*, como es el caso de los resultados obtenidos por Shabestary & Hudson (2016). Asociar las variables binarias a los genes asegura evitar este tipo de equivocaciones, evitando a los experimentalistas implementar resultados erróneos obtenidos con estrategias de ingeniería metabólica.

Según lo expuesto anteriormente, en esta tesis se formularon dos problemas de optimización binivel tomando como base las formulaciones OptKnock y OptForce. Las variables binarias se modifican y pasan de estar asignadas a genes (nivel 1 en la Figura 2.8), con el objetivo de evitar posibles resultados biológicamente infactibles. Para esto, se debe incluir el mapeo GPR y las variables binarias se definen de manera que representan la eliminación de un gen cuando toman el valor 1. El problema interno es el mismo en ambas formulaciones: la minimización de la producción de etanol sujeta a las restricciones del FBA descritas en el Capítulo 3. Las funciones objetivo de los problemas externos son la minimización de las intervenciones requeridas (Formulación 1 –Tabla 4.1) y la maximización de la producción de etanol (Formulación 2 –Tabla 4.1). El set de restricciones del problema externo también se modifica entre las dos formulaciones, ya que una de las restricciones se intercambia con la función objetivo. En la Formulación 1, se impone un límite inferior sobre la producción mínima de etanol mientras que se minimizan las intervenciones genéticas (*knock-outs*) en la función objetivo. En la Formulación 2, se fija el máximo número de intervenciones permitidas mientras que se maximiza la producción de etanol en la función objetivo.

Tabla 4.1. Formulaciones del problema binivel para acoplar producción de un subproducto al crecimiento.

Formulación 1:	Formulación 2:
Problema Externo: Minimizar Intervenciones	Problema Externo: Maximizar Producción de Subproducto
Restricción Problema Externo: Mínima Producción de Subproducto permitida	Restricción Problema Externo: Máximo Número de intervenciones permitidas
$\min_{y_k, v_j} \sum_j y_k$ $v_{\text{producto}} \geq v_{\text{producto}}^{\min}$ s. t.	$\max_{y_k, v_j} v_{\text{producto}}$ $\sum y_k \leq n_{\text{interv}}^{\max}$ s. t.
Problema Interno: Minimizar producción de Subproducto	
$\min_{v_j} v_{\text{producto}}$ s. t.	
$v_{\text{biomasa}} \geq v_{\text{biomasa}}^{\min} \tag{4.3}$	
$\sum_j S_{i,j} v_j = 0 \quad \forall i \in M \tag{4.4}$	
$v_j = v_j^{\text{fijas}} \quad \forall j \in R_{\text{fijas}} \tag{4.5}$	
$v_j \geq LB_j(1 - y_k) \quad \forall (j, k) \in K \tag{4.6}$	
$v_j \leq UB_j(1 - y_k) \quad \forall (j, k) \in K \tag{4.7}$	
$LB_j \leq v_j \leq UB_j \quad \forall j \in R \tag{4.8}$	
Restricciones Comunes a ambos Problemas Externos:	
$\sum y_k \geq 1 \tag{4.9}$ $y_k \in \{0,1\}^K, v_j \in \mathbb{R}^R$	

En el problema interno se incluye un límite inferior sobre la producción de biomasa para evitar una solución en la que no haya crecimiento. El set de reacciones R^{fijas} se refiere a reacciones que tienen un valor fijo que no puede incluirse como límite inferior y superior, y son las que se fijan en cero para el FBA (Ej. reacciones de transporte de fuentes orgánicas de carbono) y la reacción de ATP de mantenimiento. Las variables binarias y_k indican un *knock-out* de un gen cuando toman el valor de 1. En las ecuaciones (4.6) y (4.7) se relacionan las reacciones con los genes por medio del set K

que está definido como: $K \subseteq R^{candidatas} \times G$, donde $R^{candidatas}$ son las reacciones que el modelo puede seleccionar para eliminar y G son los genes asociados a estas reacciones. De esta forma, se incorpora al modelo el mapeo de genes a proteínas y de proteínas a reacciones. Este mapeo considera la posibilidad de que un gen esté relacionado a más de una reacción, pero no la de que una reacción esté relacionada a más de un gen. Si el modelo incluyera grupos de genes relacionados a una reacción debe comprobarse que los genes del grupo solo aparezcan dentro de ese grupo y considerarse al grupo como un único gen para los fines de modelado. El set $R^{candidatas}$ contiene todas las reacciones que se consideran como posibles candidatas para realizar un *knock-out*, por lo tanto, no contiene las reacciones asociadas a genes esenciales para el microorganismo que, de eliminarse, causarían crecimiento nulo para el caso *in silico* y muerte celular para el caso *in vivo*, ni las reacciones que se encuentran en el set R^{fixed} . Los genes esenciales para el crecimiento constituyen un 38% del total de los genes en condiciones fotoautotróficas de crecimiento (Nogales *et al.*, 2012). Se permite que los flujos tomen valores negativos para las reacciones reversibles. Las cotas inferiores y superiores para todas las reacciones excepto la de biomasa, el producto, los nutrientes y las pertenecientes al set R^{fijas} son obtenidos por medio de un FVA, previamente realizado. Si resulta que alguna reacción tiene un flujo fijo determinado por la red, se identificará al realizar el FVA y se incluirá en el set R^{fijas} antes de comenzar la optimización.

Para resolver este problema binivel, una estrategia consiste en reformularlo como un problema lineal mixto entero (MILP) de un único nivel. Para esto, se aplican conceptos de la teoría de dualidad (Ignizio & Cavalier, 1994), considerando el problema interno como un problema *primal* que tiene su correspondiente problema *dual*. Las restricciones del problema externo se agregan con las restricciones del problema *dual* del problema interno, y se impone la condición de dualidad fuerte, es decir, una igualdad adicional

que establece que la función objetivo del problema primal es igual a la función objetivo de su correspondiente problema dual.

A continuación, se detalla la reformulación en un solo nivel para la Formulación 1, la misma descripción se puede extender a la Formulación 2 siguiendo los mismos pasos con muy pocas diferencias en el resultado final.

Las ecuaciones (4.10) a (4.13) que constituyen el problema interno lineal se consideran como un problema *primal* que tiene un problema *dual* correspondiente. De acuerdo a la teoría de dualidad, a cada restricción del problema *primal* le corresponde una variable del problema *dual*. Esta correspondencia comprende:

$$\sum_{j \in R} S_{i,j} v_j = 0 \quad \rightarrow \quad w_i^{MB} \in \mathbb{R} \quad (4.10)$$

$$v_j = v_j^{fijas} \quad \rightarrow \quad w_j \quad (4.11)$$

$$v_j \geq LB_j(1 - y_k) \quad \rightarrow \quad x_j^{LB} \in \mathbb{R}_{\geq 0} \quad (4.12)$$

$$v_j \leq UB_j(1 - y_k) \quad \rightarrow \quad x_j^{UB} \in \mathbb{R}_{\geq 0} \quad (4.13)$$

A partir de las definiciones anteriores, el problema *dual* queda definido como:

$$\min_{v_j, w_j, w_i^{MB}, x_j^{LB}, x_j^{UB}} \sum_{j=fijas} w_j v_j^{fijas} + \sum_{(j,k)} [x_j^{UB} UB_j(1 - y_k) - x_j^{LB} LB_j(1 - y_k)] \quad (4.14)$$

s. t.

$$\begin{cases} \sum_i S_{i,j} w_i^{MB} \geq -1 & \forall j = \text{producto} \end{cases} \quad (4.15)$$

$$\begin{cases} \sum_i S_{i,j} w_i^{MB} + w_j = 0 & \forall j \in R^{fijas} \end{cases} \quad (4.16)$$

$$\begin{cases} \sum_i S_{i,j} w_i^{MB} - x_j^{LB} + x_j^{UB} = 0 & \forall j \in R^{candidatas} \end{cases} \quad (4.17)$$

$$v_j \in \mathbb{R}, w_j \in \mathbb{R}, w_i^{MB} \in \mathbb{R}, x_j^{LB} \in \mathbb{R}_{\geq 0}, x_j^{UB} \in \mathbb{R}_{\geq 0}$$

En la formulación anterior, se observa que aparecen, en la función objetivo dos términos bilineales continuos discretos, de la forma $x_j^{LB} y_k$ y $x_j^{UB} y_k$ (Ecuación (4.14)). Como ya se mencionó, se busca resolver el problema con una estrategia de resolución de MILP, por lo que estas bilinealidades deben ser reformuladas. Para tal fin, se utilizan las linealizaciones exactas propuestas por Glover (1975), que introducen las equivalencias

$x_j^{LB} y_k = \alpha_j^{LB}$ y $x_j^{UB} y_k = \alpha_j^{UB}$ y dan como resultado las siguientes ecuaciones y variables

que se agregan al modelo:

$$\left. \begin{aligned} M_j y_k &\geq \alpha_j^{LB} \\ \alpha_j^{LB} &\geq x_j^{LB} - M_j(1 - y_k) \\ x_j^{LB} &\geq \alpha_j^{LB} \end{aligned} \right\} \quad \forall (j, k) \in K \quad (4.18)$$

$$\left. \begin{aligned} M_j y_k &\geq \alpha_j^{UB} \\ \alpha_j^{UB} &\geq x_j^{UB} - M_j(1 - y_k) \\ x_j^{UB} &\geq \alpha_j^{UB} \end{aligned} \right\} \quad \forall (j, k) \in K \quad (4.21)$$

$$\alpha_j^{UB} \geq x_j^{UB} - M_j(1 - y_k) \quad \forall (j, k) \in K \quad (4.22)$$

$$x_j^{UB} \geq \alpha_j^{UB} \quad \forall (j, k) \in K \quad (4.23)$$

Al presente modelo, se impone la condición de dualidad fuerte (igualdad entre funciones objetivos de los problemas *primal* y *dual*):

$$-v_{\text{producto}} = \sum_{j \in \text{fijas}} w_j v_j^{\text{fijas}} + \sum_{j \in \text{candidatas}} [LB_j(\alpha_j^{LB} - x_j^{LB}) + UB_j(x_j^{UB} - \alpha_j^{UB})] \quad (4.24)$$

Luego de aplicar las reformulaciones descritas, el problema MILP en un solo nivel para

la Formulación 1 resulta:

$$\min_{v_j, w_j, w_i^{MB}, x_j^{LB}, x_j^{UB}, \alpha_j^{LB}, \alpha_j^{UB}} \sum_j y_k$$

s. t.

$$\begin{aligned} -v_{\text{producto}} &= \sum_{j \in \text{fijas}} w_j v_j^{\text{fijas}} + \sum_{j \in \text{candidatas}} [LB_j(\alpha_j^{LB} - x_j^{LB}) + \\ &\dots + UB_j(x_j^{UB} - \alpha_j^{UB})] \end{aligned} \quad (4.24)$$

$$v_{\text{producto}} \geq v_{\text{producto}}^{\min} \quad (4.1)$$

$$v_{\text{biomasa}} \geq v_{\text{biomasa}}^{\min} \quad (4.3)$$

$$\sum_j S_{i,j} v_j = 0 \quad \forall i \in M \quad (4.4)$$

$$v_j = v_j^{\text{fijas}} \quad \forall j \in R^{\text{fijas}} \quad (4.5)$$

$$v_j \geq LB_j(1 - y_k) \quad \forall (j, k) \in K \quad (4.6)$$

$$v_j \leq UB_j(1 - y_k) \quad \forall (j, k) \in K \quad (4.7)$$

$$LB_j \leq v_j \leq UB_j \quad \forall j \in R \quad (4.8)$$

$$\sum_i S_{i,j} w_i^{MB} \geq -1 \quad \forall j = \text{producto} \quad (4.15)$$

$$\sum_i S_{i,j} w_i^{MB} + w_j = 0 \quad \forall j \in R^{fijas} \quad (4.16)$$

$$\sum_i S_{i,j} w_i^{MB} - x_j^{LB} + x_j^{UB} = 0 \quad \forall j \in R^{candidatas} \quad (4.17)$$

$$\left. \begin{array}{l} M_j y_k \geq \alpha_j^{LB} \\ \alpha_j^{LB} \geq x_j^{LB} - M_j(1 - y_k) \\ x_j^{LB} \geq \alpha_j^{LB} \end{array} \right\} \forall (j, k) \in K \quad (4.18)$$

$$(4.19)$$

$$(4.20)$$

$$\left. \begin{array}{l} M_j y_k \geq \alpha_j^{UB} \\ \alpha_j^{UB} \geq x_j^{UB} - M_j(1 - y_k) \\ x_j^{UB} \geq \alpha_j^{UB} \end{array} \right\} \forall (j, k) \in K \quad (4.21)$$

$$(4.22)$$

$$(4.23)$$

$$v_j \in \mathbb{R}, w_j \in \mathbb{R}, w_i^{MB} \in \mathbb{R}, x_j^{LB} \in \mathbb{R}^+, x_j^{UB} \in \mathbb{R}^+, y_k \in \{0; 1\}$$

Con fines comparativos ambas formulaciones y sus enfoques tradicionales (OptKnock y OptForce) fueron implementadas en GAMS (GAMS Development Corporation, Washington, DC).

4.2.2. Minimización del ajuste metabólico

La técnica de minimización del ajuste metabólico (MOMA, *Minimization of Metabolic Adjustment*) se utiliza para estimar el estado de cepas mutantes antes de la adaptación evolutiva en laboratorio (ALE). Es un problema de programación cuadrática (QP *Quadratic Programming*) en el que se minimiza la distancia entre los flujos de la cepa no acoplada y los del mutante. Esta técnica considera las mismas restricciones estequiométricas que el FBA, pero no fuerza a una solución con crecimiento máximo. Esto permite representar mejor el estado inicial de distribuciones de flujo del mutante asumiendo que en un principio, los flujos del mutante tenderán a modificarse lo menos posible respecto de los de la cepa salvaje (Segrè *et al.*, 2002)

Esta técnica se encuentra programada dentro de COBRA Toolbox, y se la utiliza para estimar el estado inicial de los mutantes acoplados que se obtienen, sin realizarle ninguna modificación propia.

4.2.3. Producción de etanol por limitación de nutrientes en dos etapas

Por otro lado, se plantea otra posible estrategia para la producción fotosintética de etanol, que no ha sido abordada aún en la literatura, que se orienta a maximizar la producción del metabolito deseado en la fase estacionaria de crecimiento (crecimiento desbalanceado) en una etapa posterior de obtención de biomasa con la cepa cultivada en condiciones óptimas (crecimiento balanceado). Durante la fase exponencial del crecimiento, la partición del flujo de carbono está estrechamente regulada por diversos mecanismos hacia la formación de los precursores de la biomasa, mientras que está demostrado experimentalmente (Wang *et al.*, 2011) que en estado estacionario se pueden producir biocombustibles y otros compuestos de interés.

En esta estrategia se considera una primera etapa donde las condiciones de captación de carbono y luz se definen para que la cepa se encuentre en fase exponencial de crecimiento (tasa de crecimiento máxima), donde todo el flujo de carbono está destinado a la producción de biomasa. Luego, se considera que la biomasa producida será transferida a un segundo biorreactor donde las condiciones estarán definidas para que el cultivo se encuentre en fase estacionaria. Esto se logra con condiciones de limitación de nutrientes, lo cual permite el desvío del flujo de carbono hacia la producción de subproductos.

Ambas etapas pueden analizarse por medio de FBA, modificando la función objetivo. En la primera etapa, se utiliza la maximización de biomasa como función objetivo, mientras que en la segunda etapa se utiliza una función objetivo de minimización de producción de ATP (García Sánchez & Torres Sáez, 2014), condición que es

característica de la fase estacionaria de crecimiento donde la tasa de crecimiento tiende a cero, ya que las tasas de crecimiento y muerte se encuentran balanceadas.

Se considerarán dos casos de limitación de nutrientes: nitrógeno y fósforo. Existe evidencia experimental que indica la producción de etanol en *Synechocystis* bajo condiciones de limitación de nitrógeno en un mutante incapaz de producir glucógeno y PHB (Namakoshi *et al.*, 2016). Estos dos casos se utilizarán en la segunda etapa, por lo cual la primera etapa es equivalente para ambos casos.

Para este análisis se considera otra versión del GEM, en la que las vías de producción de glucógeno y PHB fueron eliminadas para reproducir las condiciones observadas por Namakoshi *et al.* (2016). Para este mutante de glucógeno y PHB, el glucógeno se eliminó del GEM como componente de la biomasa, ya que al no poder producirlo el problema sería infactible.

4.3. Resultados y Discusión

En esta sección, se presentan primero los resultados obtenidos mediante las nuevas formulaciones desarrolladas con el correspondiente análisis de los mismos, se presenta una discusión sobre la performance de los diferentes algoritmos, y por último se analiza el caso de producción de bioetanol en dos etapas en condiciones de limitación tanto de nitrógeno como de fósforo.

4.3.1. Producción Teórica Máxima de Etanol

Para tener una noción de cuáles son los resultados que podrían obtenerse de la resolución del problema binivel, es importante conocer cuáles son los valores de tasa de producción de etanol máxima que puede obtenerse del GEM de *Synechocystis*. Para esto, se formula un FBA donde la función objetivo es la maximización de etanol. La máxima producción teórica de etanol se obtiene al maximizar su producción sin fijar ningún valor de biomasa, lo cual deriva en una solución con crecimiento nulo. Luego,

fijando valores sucesivos de crecimiento menores al máximo, se puede obtener una curva que representa la proyección del espacio de flujo del modelo en el espacio de crecimiento – producción de etanol (*trade-off*).

Los resultados del trade-off entre el crecimiento y la producción de etanol para *Synechocystis* se muestran en la Figura 4.4. La máxima producción teórica de etanol resulta de $1,85 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

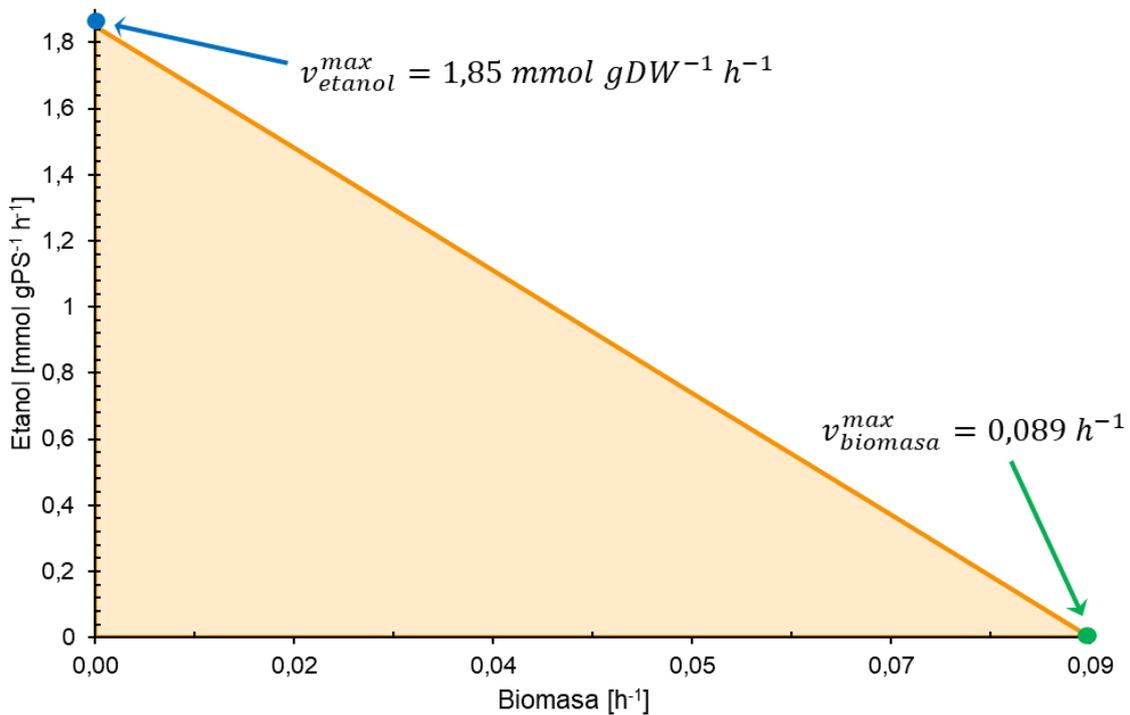


Figura 4.4. Trade-off entre la producción de etanol y el crecimiento. Toda el área naranja representa el posible espacio de flujos.

4.3.2. Producción de etanol acoplada al crecimiento en *Synechocystis*

4.3.2.1. Resolución de problemas binivel

El problema binivel reformulado cuenta con 2,532 variables continuas, 478 variables binarias y 6,370 restricciones, y se resolvió en una PC con un procesador Intel Core i7-4790 de 3,60 GHz y con 8 GB de memoria RAM.

Se resolvió el problema binivel reformulado a un único nivel, considerando al etanol como producto, para el caso de la función objetivo de maximización de la producción de

etanol (Formulación 2) para diferentes escenarios de máximas intervenciones permitidas (k); se consideran casos con $k=2$ hasta $k=10$ (Ecuación (4.2)). Se obtienen mutantes acoplados *in silico* para todo el rango de intervenciones permitidas con diferentes producciones máximas de etanol. Los resultados numéricos se presentan en la Tabla 4.2. Los tiempos de resolución son variables según el valor de k , pero rondan una hora.

Tabla 4.2. Producción de biomasa y etanol obtenida resolviendo el problema asociado a la Formulación 2.

k	v_{etanol} [mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹]	$v_{biomasa}$ [h ⁻¹]
2	0,017	0,088
5	0,017	0,088
8	0,017	0,088
9	0,017	0,088
10	1,054	0,038

Como se puede observar en la Tabla 4.2, para los escenarios de k igual a 2, 5, 8 y 9 intervenciones genéticas permitidas, las producciones de etanol y biomasa no se ven modificadas, mientras que se observa un importante incremento en la producción de etanol cuando se permiten 10 intervenciones simultáneas. Este aumento ocasiona una disminución en la producción de biomasa debido a la desviación de los recursos requeridos para el crecimiento a la producción de etanol. No se observa una mejora en la tasa de producción de etanol para casos con mayor número de intervenciones (Resultados no mostrados).

Luego del análisis con la Formulación 2, con la que se lograron obtener mutantes acoplados, se considera la posibilidad de forzar una solución con mayor producción de etanol mediante el uso de la Formulación 1 para diferentes producciones mínimas de etanol permitidas (Ecuación (4.1)). Para un caso con producción mínima de etanol de 1 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ el resultado numérico es equivalente al caso de 10 intervenciones obtenido mediante la Formulación 2. Se incrementa la mínima producción de etanol

permitida y se obtiene nuevamente el mismo set de genes a eliminar que para el caso de 10 intervenciones con la Formulación 2. Para valores de producción de etanol mayores a $1,054 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (mejor producción obtenida con Formulación 2), el problema se vuelve infactible.

A continuación, se considera el análisis de la distribución de flujo y de la eficiencia de la fotosíntesis para dos casos: El mutante con dos intervenciones, el cual se denominará M1, y el mutante con 10 intervenciones, que será denominado M2. La eliminación de la acetil-CoA sintetasa y del transportador de acetato son resultados que se mantienen tanto en M1 como en los casos donde se permiten 5, 8 y 9 intervenciones. Estos *knock-outs* están relacionados con la producción de acetato, como se discutirá en la siguiente sección, y a medida que el número de intervenciones aumenta se van agregando *knock-outs* en vías de menor importancia en cuanto al flujo de carbono, lo cual no implica una mejora en la producción de etanol. El caso de 10 intervenciones (M2) es el primero en evitar los dos *knock-outs* de M1, lo que resulta en una estrategia totalmente diferente, que no se relaciona con la producción de acetato sino con el balance de NADH y NADPH, íntimamente relacionado a la vía de producción de etanol que tiene como función regenerar NAD^+ .

4.3.2.1.1. Caso 1: Dos intervenciones genéticas (M1)

El mutante acoplado *in silico* M1 se obtuvo con un número máximo de *knock-outs* permitido de dos. Esta restricción se impuso con el objetivo de obtener el set más pequeño posible de intervenciones requeridas para alcanzar el objetivo de acoplar la producción de etanol al crecimiento. El mutante M1 provee una tasa de producción de etanol específica muy baja, lo cual es consistente con un crecimiento muy cercano a la tasa máxima obtenida para la cepa no acoplada (Figura 4.4). Las intervenciones requeridas para obtener este mutante son los *knock-outs* de los genes que codifican para la enzima acetil-CoA sintetasa (R499, *slI0542*) y la reacción de salida de acetato

(R820) (Tabla 4.3). La eliminación de R820 resulta de interés, ya que en la distribución de flujo obtenida en el Capítulo 3 se observa que en la cepa silvestre la reacción de producción de acetato se encuentra activa. La eliminación del gen *sll0542* que convierte acetato en acetil-CoA parece llevar a un sobre flujo de acetato en la célula, mientras que la eliminación de la R820 (que evita su excreción), permitiría que este acetato sea consumido y el correspondiente flujo de carbono sea redirigido a la síntesis de etanol. Para el caso de la reacción R820, la variable binaria se asignó directamente a la reacción. Fue considerada como un caso particular, ya que existe evidencia experimental sobre la posibilidad de que *Synechocystis* libere acetato al medio de cultivo bajo ciertas condiciones (Hasunuma *et al.*, 2016a), aunque aún no se ha encontrado evidencia del gen que codifica el transportador de acetato.

Los resultados numéricos del mutante M1 muestran una disminución de solo el 1,12% de la tasa máxima de crecimiento respecto a la máxima para la cepa no acoplada, mientras que la producción de etanol de $0,017 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ representa solo un 1,13% de la tasa teórica máxima.

4.3.2.1.2. Caso 2: Diez intervenciones genéticas (M2)

El mutante obtenido con 10 intervenciones genéticas es el primero en el cual la producción máxima de etanol aumenta, y la tasa de crecimiento máxima disminuye. Las intervenciones para este caso (Tabla 4.3), están principalmente relacionadas con el balance de NADH y NADPH de la red. La función de la reacción de producción de etanol es oxidar NADH a NAD⁺, la cual es la misma función que la de las reacciones catalizadas por las enzimas NADH-glutamato sintasa (*sll1027* y *sll1502*), fosfogliceraldehído deshidrogenasa (*slr0884*) y NADH deshidrogenasa tipo II (NADH-2 deshidrogenasa, *slr1743* o *sll1484* o *slr081*), cuyos genes asociados fueron seleccionados para ser eliminados en la solución del problema binivel. De esta forma, la red es forzada a usar la vía de producción de etanol para oxidar NADH. Se debe notar

que el GEM incluye tres isoenzimas para la NADH-2 deshidrogenasa (E.C. 1.6.99.3, *slr1743* o *slr1484* o *slr081*) que se encuentran representadas por una única reacción para fines de modelado. Por lo tanto, para eliminar esta reacción *in vivo* se necesita la eliminación de tres genes, lo que lleva a que el número total de *knock-outs in vivo* sea de 13.

Además, los resultados indican el *knock-out* de los genes que codifican para las dos subunidades de la NAD(P)⁺ transhidrogenasa (*slr1239* y *slr1434*), evadiendo de esta forma la interconversión entre NADH y NADPH y evitando la oxidación de NADPH por medio de otra vía. El *knock-out* del gen *slr0301*, que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato (PEP) sintasa, evita la desviación del flujo de carbono aguas arriba de la vía de la glucólisis, mientras que la eliminación de los genes que codifican para las enzimas glicina transaminasa (*slr0006*) y glicina oxidasa (*slr0633*) está relacionada con la eliminación de la enzima NADH-glutamato sintasa. Todos los genes, reacciones y números EC de las enzimas correspondientes para las intervenciones requeridas para obtener el mutante M2 se muestran en la Tabla 4.3.

Los resultados numéricos son similares a los resultados obtenidos por Shabestary & Hudson (2016) para el acoplamiento de la producción de 1-butanol y 1-octanol en la misma cepa de *Synechocystis*. La eliminación de los genes que codifican para la NADH-2 deshidrogenasa también contribuye a acoplar la producción de estos dos alcoholes al crecimiento, mientras que la eliminación de los genes relacionados a la enzima NAD(P)⁺ transhidrogenasa solo aportan al caso de 1-butanol.

La tasa de producción de etanol específica del mutante M2 es de 1,054 mmol gPS⁻¹ h⁻¹, lo cual equivale a un 57% del máximo teórico con la consecuente disminución de la tasa de crecimiento (0,038 h⁻¹) en relación a la tasa máxima *in silico* e *in vivo* (0,089 h⁻¹).

Tabla 4.3. Genes que deben eliminarse para obtener los mutantes M1 y M2 que acoplan la producción de etanol al crecimiento en *Synechocystis*.

Genes	Numero de reacción	Numero EC	Enzima	Formula de reacción	Cepa
<i>slI0542</i>	R499	6.2.1.1	Acetil-CoA sintetasa	$ATP(cyt) + Acetato(cyt) + CoA(cyt) \rightarrow AMP(cyt) + PP_i(cyt) + Acetil - CoA(cyt)$	M1
-	R820		Excreción de acetato	$Acetato(cyt) \rightarrow Acetato(ext)$	M1
<i>slI1027, slI1502</i>	R24	1.4.1.14	NADH-Glutamato sintasa	$2 L - Glutamato(cyt) + NAD^+(cyt) \leftarrow L - Glutamina(cyt) + 2 - Oxoglutarato(cyt) + NADH(cyt) + H^+(cyt)$	M2
<i>slr1239, slr1434</i>	R155	1.6.1.2	NAD(P)+ transhidrogenasa	$NADPH(cyt) + H^+(cyt) + NAD^+(cyt) \leftrightarrow NADP^+(cyt) + H^+(cyt) + NADH(cyt)$	M2
<i>slI0006</i>	R206	2.6.1.4	Glicina transaminasa	$Glicina(cyt) + 2 - Oxoglutarato(cyt) \leftrightarrow Glioxilato(cyt) + L - Glutamato(cyt)$	M2
<i>slr0633</i>	R209	1.4.3.19	Glicina oxidasa	$Glicina(cyt) + H_2O(cyt) + O_2(cyt) \rightarrow Glioxilato(cyt) + NH_3(cyt) + H_2O_2(cyt)$	M2
<i>slr0783</i>	R230	5.3.1.1	D-Gliceraldehido-3-fosfato Ketol-isomerasa	$D - Gliceraldehido 3 - fosfato(cyt) \leftrightarrow Glicerona fosfato(cyt)$	M2
<i>slr0884</i>	R232	1.2.1.12	Fosfogliceraldehído dehidrogenasa	$D - Gliceraldehido 3 - fosfato(cyt) + P_i(cyt) + NAD^+(cyt) \leftrightarrow 3 - fosfo - D - gliceroil fosfato(cyt) + NADH(cyt) + H^+(cyt)$	M2
<i>slr1755</i>	R263	1.1.1.94	Glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (NAD(P))	$sn - Glicerol 3 - phosphate(cyt) + NAD^+(cyt) \leftrightarrow Glicerona fosfato(cyt) + NADH(cyt) + H^+(cyt)$	M2
<i>slr1743</i>	R452	1.6.99.3	NADH dehidrogenasa	$NADH(cyt) + H^+(cyt) + PQ(tlm) \rightarrow NAD^+(cyt) + PQH_2(tlm)$	M2
<i>slr1743, slI1484, slr0851</i>	R455	1.6.99.3	NADH dehidrogenasa	$NADH(cyt) + H^+(cyt) + PQ(cym) \rightarrow NAD^+(cyt) + PQH_2(cym)$	M2
<i>slr0301</i>	R506	2.7.9.2	Fosfoenolpiruvato sintasa	$ATP(cyt) + Piruvato(cyt) + H_2O(cyt) \rightarrow AMP(cyt) + Fosfoenolpiruvato(cyt) + P_i(cyt)$	M2

4.3.2.1.3. Comparación entre los mutantes

Para una mejor comprensión del comportamiento de las cepas acopladas productoras de etanol (M1 y M2) se realizaron evaluaciones del modelo con FBA incluyendo las intervenciones genéticas por medio de la resolución del problema MILP. Para estos casos, los *knock-outs* se representan en el modelo fijando las cotas superiores e inferiores de las reacciones a eliminar en 0. Al igual que en la Sección 4.3.1, se realizaron evaluaciones para la producción de etanol a diferentes tasas de crecimiento para los dos mutantes, obteniéndose proyecciones del espacio de flujo del modelo en el espacio de crecimiento – producción de etanol. Los resultados numéricos se presentan en las Figura 4.5 y 4.6, donde también se incluye *el trade-off* del mutante no acoplado, que es equivalente al de la Figura 4.4, (área naranja, representa los mismos puntos en ambas figuras) con fines comparativos.

En la Figura 4.5 se puede observar que para el mutante M1 la producción de etanol se encuentra muy alejada del máximo teórico (que corresponde al valor donde ambas curvas cortan al eje de las ordenadas), y el crecimiento se mantiene en un valor muy cercano al máximo del mutante no acoplado (correspondiente al valor donde la curva amarilla corta al eje de las abscisas). La proyección del espacio de flujo se mantiene casi sin modificaciones.

La Figura 4.6 muestra los resultados numéricos para el mutante M2, para distintos valores de producción de biomasa. En este caso, la proyección del espacio de flujos se ve significativamente alterada. Los resultados de este segundo caso son alentadores desde el punto de vista biotecnológico ya que se obtiene una mayor producción de etanol para un crecimiento más bajo.

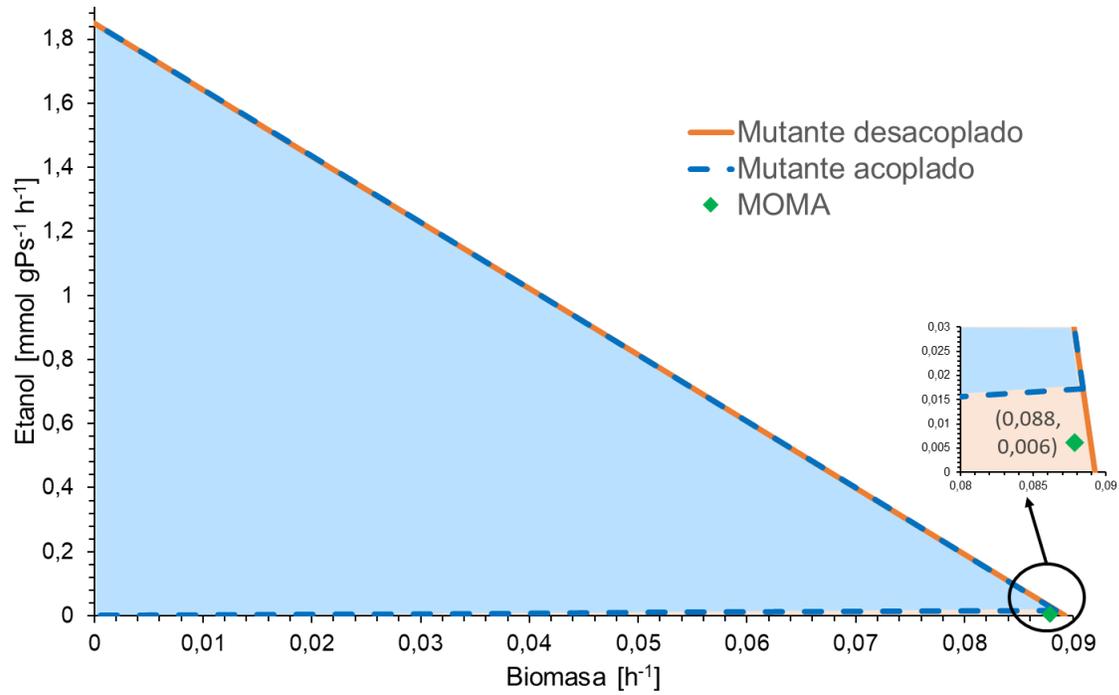


Figura 4.5. Trade-off crecimiento-producción de etanol para el mutante acoplado M1.

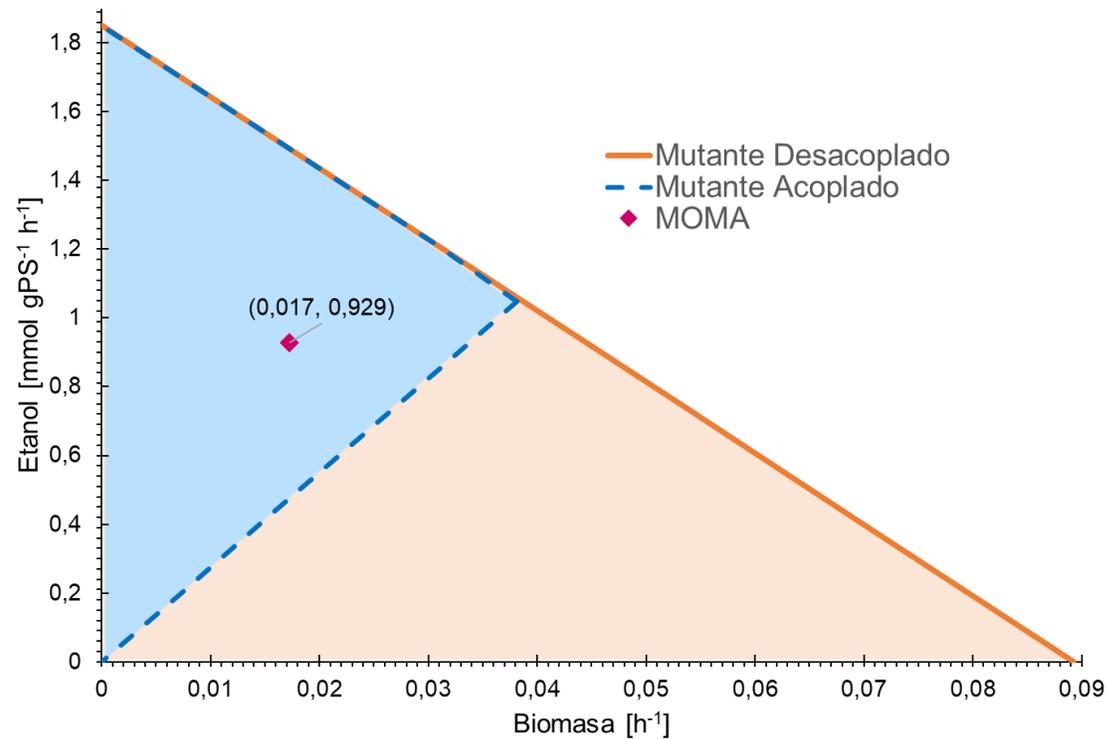


Figura 4.6. Trade-off crecimiento-producción de etanol para el mutante acoplado M2.

En ambas figuras se observa que el único punto donde no existe producción de etanol es el que corresponde a crecimiento nulo. El hecho de que exista producción de etanol para todo el rango de valores de biomasa en ambos mutantes acoplados prueba que, a pesar de las diferencias de productividad, el acoplamiento *in silico* de la producción de etanol al crecimiento fotoautotrófico es efectivamente obtenido.

A partir de este punto, se continuará con un análisis detallado del mutante M2, ya que, aunque ambos mutantes brindan una correcta solución de acoplamiento, éste resulta el más atractivo desde el punto de vista biotecnológico.

4.3.2.1.4. Comparación de las formulaciones implementadas con OptKnock y OptForce

En este trabajo de tesis se formuló en primera instancia un modelo basado en el propuesto por Burgard *et al.* (2003) (*OptKnock*), donde el problema interno maximiza la producción de biomasa con variables binarias asociadas a reacciones. Con este enfoque no fue posible obtener mutantes que acoplen la producción de etanol al crecimiento. Esto podría llevar a pensar erróneamente que efectivamente no existe una estrategia que permitan lograr esto en *Synechocystis*. Sin embargo, esta técnica nunca antes había sido utilizada para organismos fotosintéticos, que tienen una complejidad metabólica más elevada que los microorganismos heterotróficos para los cuales se había aplicado con éxito. El problema de esta formulación, radica en la función objetivo del problema interno. Como se mencionó en el capítulo anterior, al aplicar la función objetivo de maximización de biomasa en el FBA, se pueden determinar múltiples distribuciones de flujo que cumplan con dicho objetivo de crecimiento.

Es debido a estos problemas que se introduce el concepto de curva de producción, que se utiliza para visualizar los resultados de los mutantes acoplados en el espacio crecimiento-

producción. Este tipo de gráficos ayuda a ver que existen dos tipos de mutantes: los completamente acoplados y los parcialmente acoplados. Esto se ilustra con un ejemplo de producción de succinato acoplada al crecimiento en *Escherichia coli*, adaptado de Machado & Herrgård (2015) (Figura 4.7). En el caso del mutante parcialmente acoplado, se observa que el eje de las abscisas, que corresponde a los datos de crecimiento, es parte de la solución. Esto quiere decir que existen distribuciones de flujos factibles con producción de succinato nula. En cambio, en el caso completamente acoplado no existe ninguna solución sobre el eje de crecimiento, lo cual demuestra que no existe distribución de flujo en la que no haya producción de succinato y que por lo tanto la cepa no puede crecer sin la producción del subproducto.

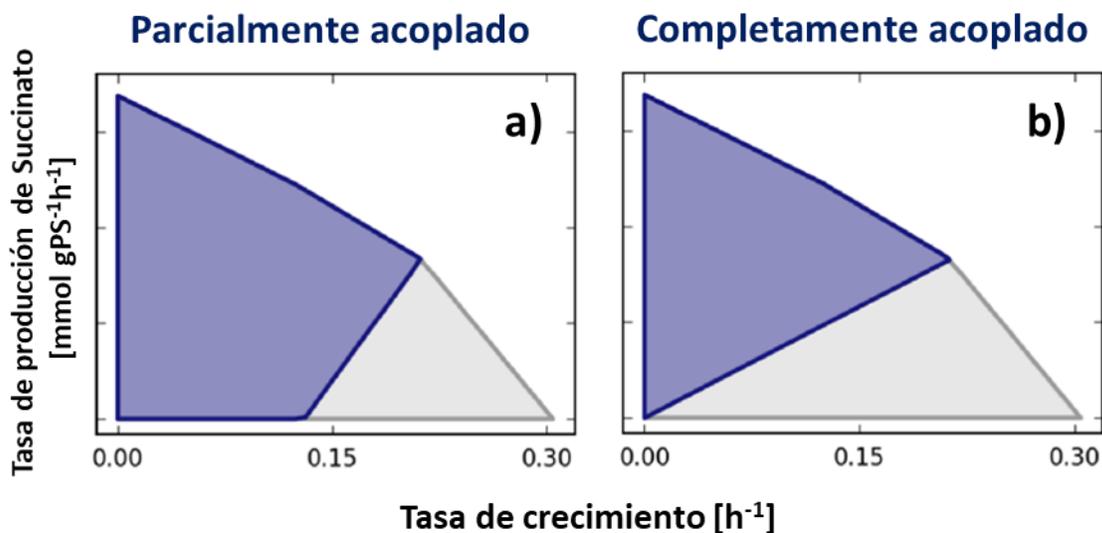


Figura 4.7. Comparación entre dos tipos de mutantes utilizando como ejemplo la producción de succinato en *E. coli*. Adaptado de Machado & Herrgård (2015)

La obtención de mutantes parcialmente acoplados ocurre en la formulación del algoritmo OptKnock. Este problema se evita al modificar la función objetivo del problema interno con una que minimice la producción del subproducto de crecimiento, como ocurre en la formulación propuesta por Ranganathan *et al.* (2010), que propone el algoritmo denominado OptForce. Este enfoque permite encontrar mutantes completamente acoplados para la

producción fotoautotrófica de etanol en *Synechocystis*. Sin embargo, como la asignación de variables binarias es sobre las reacciones, puede ocurrir que los resultados sugieran la eliminación de una reacción catalizada por una enzima multifuncional, cuya eliminación *in vivo* deriva en la eliminación de más de una reacción como se explicó en la Sección 4.2.1. El mutante obtenido por medio de la formulación *OptForce* sugiere la eliminación de la ATP sintasa plasmática (ATPasa) para forzar la síntesis de ATP a través de la fotosíntesis en lugar de a través de la oxidación fosforilativa. Pero la eliminación de dicha reacción implica también la eliminación del clúster de genes que codifican la enzima ATPasa tilacoidal (las ATPasas tilacoidales y de la membrana plasmática son codificadas por el mismo clúster de genes), lo cual llevaría a la completa eliminación de la producción de ATP por parte de la célula, dando como resultado un mutante inviable *in vivo*. Shabestary & Hudson (2016) obtuvieron un resultado similar para la obtención de mutantes acoplados para la producción de limoneno y butanol y estos autores fueron los primeros en emplear este tipo de técnicas en organismos fotosintéticos. En dicho trabajo no se intenta solucionar el problema si no que el mutante que presenta la eliminación de la ATPasa mencionada es descartado. En el enfoque desarrollado en esta tesis se evita este tipo de resultados permitiendo la obtención de mutantes de *Synechocystis* completamente acoplados para la producción fotoautotrófica de etanol.

4.3.2.1.5. Análisis del Mutante M2

En primer lugar, se analizan las entradas y salidas del modelo (o de la célula) al igual que se hizo en el Capítulo 3 para el caso no acoplado (Figura 4.8). En este caso el etanol se presenta como el único subproducto del crecimiento, y la captación de carbono inorgánico se mantiene en su máximo valor permitido. Un dato importante a tener en cuenta es que el etanol producido por este microorganismo es un metabolito extracelular, es decir que la célula lo excreta al medio de cultivo cuando lo produce.

La captación de nitrógeno, fósforo y sulfato presenta una disminución del 57%, 58% y 62% respectivamente, lo cual resulta lógico ya que disminuye la síntesis de macromoléculas que contienen estos elementos y aumenta la de etanol, que no los contiene.

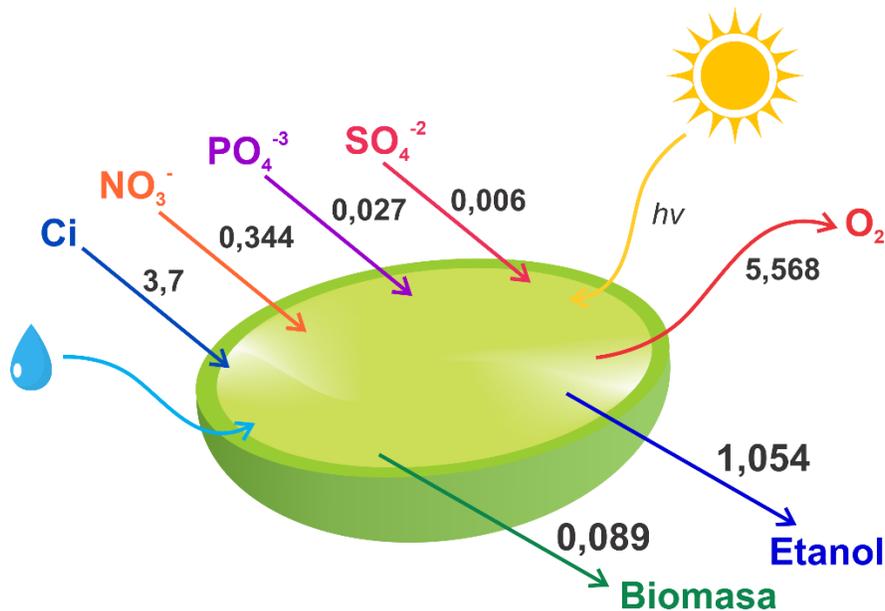


Figura 4.8. Captación de nutrientes y producción de biomasa y etanol para M2.

Para continuar analizando el comportamiento del mutante más atractivo desde el punto de vista biotecnológico (M2) se presenta el mapa de flujos con la distribución de flujos correspondiente a este mutante (Figura 4.9). Este mapa de flujos incluye las mismas vías que el presentado en el Capítulo 3 para el mutante no acoplado, con el fin de que sirva a modo de comparación. Si analizamos el carbono total fijado por la enzima RuBisCO este resulta un ~5% más elevado que para el caso no acoplado, y observando la distribución de flujos completa (Apéndice E) se puede ver que una posible causa es el aumento en la conversión de CO_2 de descarboxilaciones intracelulares a HCO_3^- . La distribución del carbono fijado también se ve modificada. El flujo aguas abajo del 3PG es un 73% más elevado que para el mutante no acoplado, lo cual se relaciona con que los precursores requeridos para la producción de etanol provienen del piruvato y las modificaciones

metabólicas fuerzan el flujo en esa dirección. El GEM tiene la posibilidad de producir piruvato a través de dos vías diferentes: directamente de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato (PYR) por medio de la enzima piruvato quinasa, o por medio de una desviación a través de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa y enzima málica (Figura 4.9). Los resultados numéricos muestran que se utiliza la segunda opción, lo cual resulta llamativo debido a que esta ruta metabólica no es la más común. En el caso desacoplado se observa que ambas vías son utilizadas. Para realizar un análisis de esta situación se formuló un FBA, fijando la primera reacción (fosfoenolpiruvato carboxilasa) de la segunda vía en 0 y, forzando, por lo tanto, el flujo por la enzima piruvato quinasa y los resultados son los mismos que para el caso original. Estos resultados indican que estamos frente a otro caso de multiplicidad de soluciones óptimas y que son necesarios estudios experimentales para imponer cotas realistas sobre los flujos de estas vías.

La enzima malato deshidrogenasa es una enzima reversible, y se observa un cambio en su direccionalidad entre el caso desacoplado y M2. En el caso desacoplado, esta enzima mantiene la dirección del ciclo que produce oxalacetato a partir a (S)-malato, mientras que en M2 el oxalacetato se utiliza para producir malato. Este cambio se mantiene al forzar la segunda vía de producción de piruvato a 0, por lo cual podría deberse a la necesidad de una mayor producción de piruvato para obtener una elevada producción de etanol. Este mismo cambio en la dirección también fue observado por Shabestary & Hudson (2016), en un estudio para la producción de butanol en *Synechocystis*.

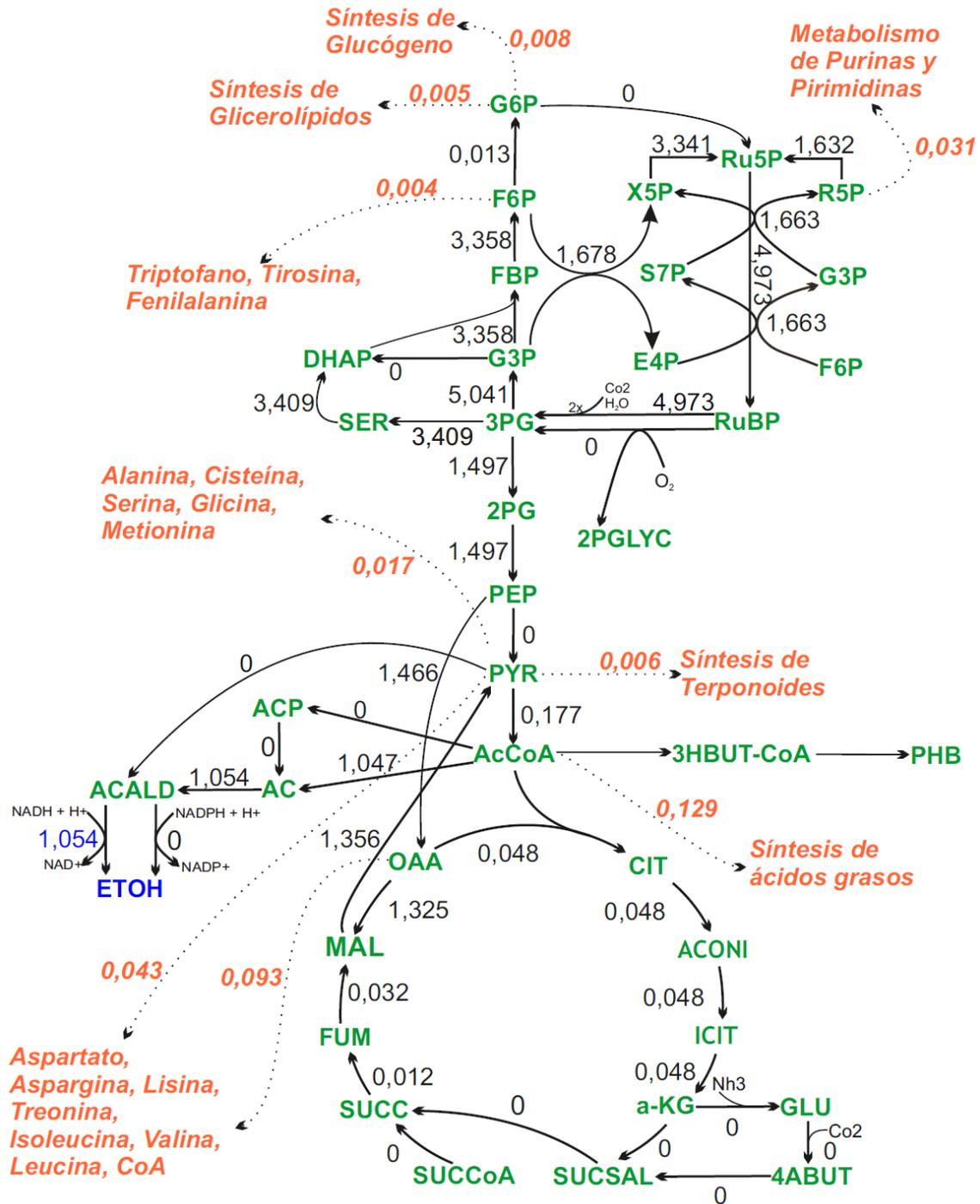


Figura 4.9. Distribución de flujo optimizada para tasa de crecimiento máxima en estado de limitación por carbono para el mutante acoplado M2 con diez *knock-outs*. Los valores de flujo están dados en $\text{mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La tasa de captación de carbono inorgánico como CO_2 es $0,336 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $3,364 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ como HCO_3^- ; $v_{\text{CO}_2} + v_{\text{HCO}_3^-} \leq 3,7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. El flujo de fotones es $v_{\text{luz}} \leq 100 \text{ mmol gSP}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Las captaciones de fósforo, nitrógeno y sulfato no están restringidas

Como se explicó en el Capítulo 2, *Synechocystis*, y por lo tanto su GEM, cuenta con dos posibles vías para la producción de etanol: una natural (Kaneko *et al.*, 1995) y una heteróloga (por medio de la enzima piruvato descarboxilasa, PDC). El primer resultado para obtener la distribución de flujos de M2 muestra flujo únicamente por la vía natural. La primera reacción involucrada en la vía natural es esencial para el crecimiento, por lo cual no puede forzarse a un flujo de 0 para observar que ocurre con la vía heteróloga. En un experimento *in vivo* la vía heteróloga esta obligatoriamente activa ya que la enzima PDC está presente debido a la inserción del gen heterólogo bajo un promotor que es activado. Sin embargo, no está demostrado que en los mutantes experimentales la única vía activa sea la heteróloga ya que, hasta la actualidad, no se han realizado mediciones de flujos intracelulares para la cepa etanológica. Para revisar que la selección de una vía o la otra no modifica la estrategia de acoplamiento, se resolvió nuevamente el problema bajo las mismas condiciones en las que se obtuvo el mutante M2, forzando la existencia de flujo a través de la vía heteróloga fijando una cota inferior al flujo a través de la enzima PDC de $0,1 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. El set de intervenciones obtenido fue el mismo. De estos resultados se desprende que el flujo a través de la vía heteróloga no modifica la estrategia de acoplamiento. Por otro lado, hay evidencia experimental sobre la actividad de las reacciones que producen acetato, precursor de la producción de etanol en la vía natural de producción en *Synechocystis* bajo condiciones fotoautotróficas y de limitación de nitrógeno (Xiong *et al.*, 2015). Con datos experimentales de estas enzimas, podrían fijarse valores y obtener una distribución de flujos más cercana al fenotipo celular.

Se calcularon los mismos parámetros fotosintéticos que para el caso no acoplado (Capítulo 3) (Tabla 4.4). Aunque el crecimiento para el mutante M2 es un ~55% más bajo que para la cepa no acoplada, el carbono fijado por la RuBisCO es un ~4,5% más alto. Este cambio

se debe al hecho de que en M2 el flujo hacia la producción de biomasa es desviado hacia la producción de etanol, aguas abajo del 3PG producido por la RuBisCO.

Tabla 4.4. Tasa de crecimiento y principales parámetros fotosintéticos y bioenergéticos para el mutante no acoplado y para el mutante obtenido resolviendo el problema de optimización binivel con diez intervenciones (M2).

	Mutante no acoplado	M2
Tasa de crecimiento [h^{-1}]	0,088	0,038
RuBisCO [$mmol\ gPS^{-1}\ h^{-1}$]	4,750	4,973
ATP/NADPH (LEF)	1,302	1,267
ATP/NADPH (LEF + AEF)	1,713	1,513
PSI/PSII	2,087	1,705
ΦCO_2	0,037	0,037
$h\nu/O_2$	17,879	17,958
$h\nu_i/h\nu_o$	0,145	0,101

ATP/NADPH (LEF): ATP producido/NADPH consumido en vía de transporte de electrones lineal.

ATP/NADPH (LEF + AEF): ATP producido/NADPH consumido in vías de transporte de electrones lineal y alternativa.

PSI/PSII: Relación entre los flujos de los fotosistemas I y II.

$h\nu/O_2$: mmol de fotones consumidos/mmol de O_2 producidos.

$h\nu_i/h\nu_o$: Energía disipada/Energía Total disponible (en forma de fotones)

La relación de ATP/NADPH considerando las vías LEF y AEF es mayor en el mutante no acoplado que en M2, pero igualmente alcanza el valor requerido para la fijación de carbono en el ciclo de Calvin ($ATP/NADPH > 1,5$). Esta reducción de la relación ATP/NADPH surge del uso de la vía de producción de etanol en M2, ya que el último paso en la producción de etanol consume NADPH. De esta forma, el consumo de NADPH en M2 es mayor que para el mutante no acoplado, lo cual lleva a una disminución en la relación ATP/NADPH. La disminución en el parámetro PSI/PSII viene dada por un aumento en los fotones que son utilizados en el PSII respecto al mutante no acoplado. El parámetro $h\nu_i/O_2$ no presenta una variación significativa debido a que los moles de O_2 producidos resultan solo ~0,5% menores. Se observa una disminución del 30% en la relación entre la energía disipada y la disponible. Dado que los fotones captados toman un flujo de $100\ mmol\ gPS^{-1}\ h^{-1}$ para ambos casos, se observan las vías de disipación de energía, y se ve que ésta es menor en el caso

de M2. Este cambio tiene está relacionado con los resultados obtenidos para la relación ATP/NADPH: el NADPH que se consume en estas vías de disipación de energía en el caso no acoplado y en M2 se consume en la producción de etanol.

Al utilizar MOMA en el entorno de MATLAB, los resultados numéricos muestran que el mutante acoplado M2 sigue siendo factible y la producción de etanol se mantiene acoplada al crecimiento. Las tasas de crecimiento y producción de etanol obtenidas con MOMA resultaron menores que las predichas por FBA, lo cual es esperable ya que se relaja la condición de crecimiento máximo. En la Figura 4.6 puede observarse el punto que representa la solución obtenida con MOMA, con las coordenadas correspondientes de la solución: la tasa de crecimiento es un 55% más baja, mientras que la tasa de producción de etanol muestra una disminución del 11,8%. Este cambio favorece una mayor producción de etanol. Esta podría ser una aproximación más cercana a la respuesta inicial subóptima de la cepa mutante, aunque después de aplicar ALE es de esperar que se encuentre en un punto entre el valor obtenido por MOMA y el máximo predicho por FBA.

Por último, se realizó un análisis de sensibilidad considerando los mismos parámetros que se estudiaron en el Capítulo 3 en el análisis de espacio de flujo, variando el flujo de luz, de carbono inorgánico y el ATP de mantenimiento (Figura 4.10). La biomasa y la producción de etanol no se ven modificadas a altas intensidades de luz, mientras que sí disminuyen para intensidades menores a $55 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, punto en el cual la luz pasa a ser el factor limitante del crecimiento. Esto mismo ocurre con la cepa no acoplada, como se analizó en el Capítulo 3. Con respecto al carbono inorgánico, como era de esperar, las tasas de crecimiento y producción de etanol disminuyen al disminuir el carbono inorgánico disponible. Se observa que las curvas tienen una pequeña diferencia de pendiente, siendo la disminución en la producción de etanol levemente más pronunciada. Finalmente, en

relación al ATP destinado a mantenimiento celular se observa que las productividades son independientes de este flujo hasta valores de 10 mmol gPS⁻¹ h⁻¹. Aunque este valor es elevado, debe notarse que es un 50% más bajo que el observado como límite en el caso de la cepa no acoplada (Capítulo 3).

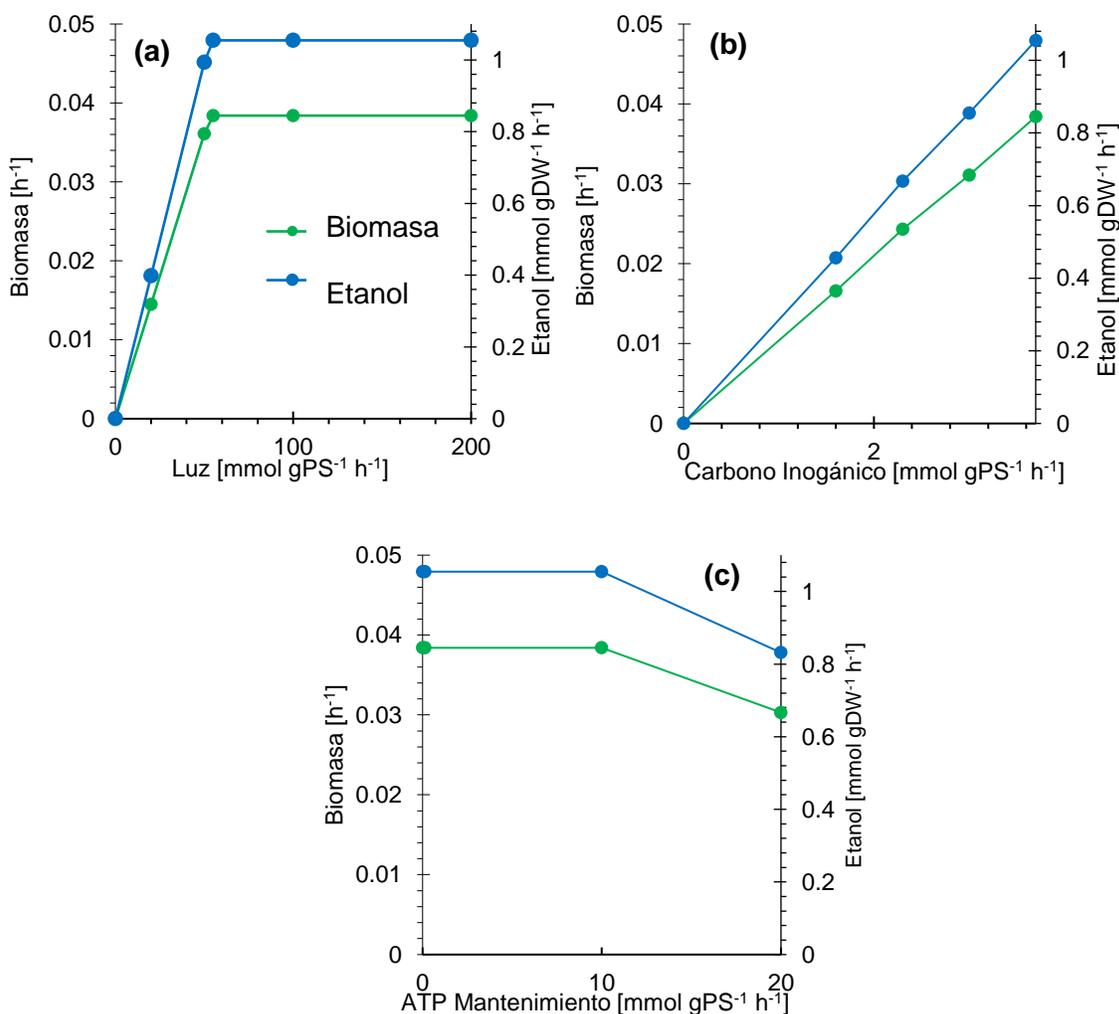


Figura 4.10. Análisis de sensibilidad sobre los flujos de biomasa y etanol para el mutante M2 considerando variaciones en las captaciones de luz **(a)**, el carbono inorgánico **(b)** y el ATP para mantenimiento celular **(c)**.

Las condiciones fotoautotróficas consideradas a lo largo de los resultados obtenidos se asemejan a las condiciones que se tienen en un cultivo en un fotobiorreactor con iluminación constante en un contexto industrial. Hay numerosos escenarios industriales en los que las

cianobacterias crecen en condiciones heterotróficas durante determinados períodos, como los estanques abiertos o fotobiorreactores sin fuente de luz artificial. Para tener un cierto entendimiento de la viabilidad de la producción de etanol del mutante M2 bajo condiciones de oscuridad, se realizó una corrida del modelo con las captaciones de luz, CO_2 y HCO_3^- fijas en $0 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y se habilita la captación de glucosa como la única fuente de carbono. Para esta captación de carbono orgánico se fija un valor de $0,85 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Yoshikawa *et al.*, 2011). Se encontró que el mutante es capaz de crecer y producir etanol en estas condiciones.

Aunque en esta tesis no se considera un modelo que tenga en cuenta ciclos luz/oscuridad, abordar el metabolismo cíclico circadiano de este tipo de microorganismos en función de los períodos naturales de luz y oscuridad es un punto importante a tener en cuenta en futuros estudios para valorar mejor la producción de biocombustibles, como ya se ha hecho para casos sin producción de subproductos, es decir sin fines biotecnológicos, como por ejemplo en el reciente estudio de Sarkar *et al.* (2019).

La estrategia de acoplar la producción de un determinado compuesto al crecimiento ha sido acertada en organismos heterotróficos, obteniéndose una mejora en las producciones de succinato, lactato y 1,3-propanodienol en *E. coli* (Burgard *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2015; Ranganathan *et al.*, 2010). La productividad de etanol en *Synechocystis* ha mejorado notablemente por medio de estrategias de ingeniería genética con modificaciones *in vivo* (Dexter *et al.*, 2015) desde $0,0766 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Dexter & Fu, 2009) hasta $0,261 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Dienst *et al.*, 2014), lo cual corresponde a un aumento del 241%.

4.3.2.1.6. Comparación con datos experimentales

La tasa de producción de etanol de la calculada a partir de los datos presentados en el Capítulo 3 a partir del cultivo batch de la cepa etanológica obtenidos en el Instituto de

Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla es de $0,0236 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Este valor es menor que el obtenido en el mutante acoplado M2 ($1,054 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$) por lo que los resultados obtenidos *in silico* resultan alentadores para implementar *in vivo* la estrategia de ingeniería metabólica obtenida.

Con el objetivo de realizar una comparación con datos dinámicos de bibliografía, se implementó un modelo de crecimiento batch (Laiglecia *et al.*, 2013) en gPROMS (PSEnterprise 2018). Dicho modelo tiene en cuenta la disminución en la disponibilidad de luz con el aumento de la densidad celular del cultivo (Ecuación (4.25)), situación que ocurre en fotobiorreactores con este modo de operación, y las ecuaciones del modelo de crecimiento batch que se describió en el Capítulo 3 sección 3.2.4. Se asumen condiciones de cultivo de bibliografía para calcular las tasas efectivas de producción del biocombustible. La concentración inicial de biomasa considerada (X_0) es de $0,078 \text{ gPS L}^{-1}$ (Laiglecia *et al.*, 2013), se asume un tiempo de cultivo de cuatro días con una tasa de crecimiento (μ) de $0,038 \text{ h}^{-1}$, que fue la obtenida para el mutante M2.

$$fI = \frac{I_0}{I_{opt}} e^{(1 - \frac{I_0}{I_{opt}})} \quad (4.26)$$

$$I_0 = I * \frac{1 - e^{(-K_{ext} * p * X)}}{K_{ext} * p * x} \quad (4.27)$$

donde p es la distancia del biorreactor a la fuente de luz expresada en m y K_{ext} es el coeficiente de extinción expresado en $\text{m L}^{-1} \text{ gPS}^{-1}$.

Los resultados numéricos muestran al final del tiempo de cultivo concentraciones finales de $2,753 \text{ gPS L}^{-1}$ y $3,498 \text{ g L}^{-1}$ para biomasa y etanol, respectivamente. La productividad de producción de etanol es de $0,874 \text{ gL}^{-1} \text{ día}^{-1}$, mientras que la mayor productividad obtenida experimentalmente al día de hoy es de $0,261 \text{ gL}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Dienst *et al.*, 2014). Los resultados son obtenidos sin considerar limitación de nutrientes. Para que esta situación sea posible

in vivo, de acuerdo al modelo simplificado considerado, sería necesario que el medio de cultivo inicial contuviera 1,5 g/L de nitrógeno (como nitrato) y 0,18 g/L de fósforo (como fosfato). Se considera también que el CO₂ sería burbujeado continuamente en el cultivo, acumulando un suministro de 11,67 g/L en los cuatro días.

4.3.2.2. Producción bajo limitación de nutrientes en varias etapas

4.3.2.2.1. Condiciones de Limitación por Nitrógeno

Actualmente existe un conjunto de datos de fluxómica para *Synechocystis* disponible en bibliografía, obtenidos a partir de ¹³C-MFA para crecimiento fotoautotrófico en condiciones de limitación de nitrógeno (Nakajima *et al.*, 2017). Estos datos se utilizaron para realizar el mismo procedimiento de validación del GEM presentado en el Capítulo 3 pero esta vez para condiciones de limitación de nitrógeno. En este estudio se reporta una tasa de crecimiento máxima de 0,015 h⁻¹, pero no se reporta una tasa de captación de nitrógeno. Por lo tanto, como primer paso se fijó en el modelo la producción de biomasa a este valor para obtener la tasa de captación de nitrógeno requerida para reproducir la distribución de flujos experimentales. La tasa resultante fue de 0,135 mmol gPS⁻¹h⁻¹, valor que se utilizó para validar el modelo.

La correlación entre los valores experimentales y la distribución de flujo obtenida por medio del modelo es muy precisa (Tabla 4.5). Solo se encontraron diferencias entre las reacciones que convierten fumarato a malato (*FUM* → *MAL*) y malato a oxalacetato (*MAL* → *OAA*), lo cual se debe, probablemente, a la diferencia en el modelo del ciclo de Krebs adoptado en Nakajima *et al.* (2017) y el de este trabajo.

Tabla 4.5. Distribuciones de flujo de los datos experimentales y del GEM curado de *Synechocystis* bajo condiciones de limitación de nitrógeno.

Reacción	GEM	Nakajima et al. (2017)
<i>G6P</i> → <i>RU5P</i>	0,389	0,349
<i>RU5P</i> → <i>RUBP</i>	1,229	1,191
<i>RUBP</i> → 2 <i>PGA</i>	1,229	1,191
<i>DHAP</i> + <i>E4P</i> → <i>S7P</i>	0,821	0,803
<i>PYR</i> → <i>ACCOA</i>	0,111	0,111
<i>ACCOA</i> → <i>CIT</i>	0,048	0,049
<i>CIT</i> → <i>ACONI</i>	0,048	0,049
<i>ACONI</i> → <i>ICIT</i>	0,048	0,049
<i>ICIT</i> → <i>AKG</i>	0,048	0,048
<i>GLU</i> → <i>ABUT</i>	0,02	0,021
4 <i>ABUT</i> → <i>SUCSAL</i>	0,02	0,021
<i>SUCSAL</i> → <i>SUCC</i>	0,022	0,021
<i>MAL</i> → <i>PYR</i>	0,583	0,537
<i>F6P</i> → <i>G6P</i>	0,395	0,366
<i>FBP</i> → <i>F6P</i>	0,145	0,136
<i>GAP</i> → <i>DHAP</i>	0,938	0,937
<i>PGA</i> → <i>GAP</i>	2,166	2,167
<i>PGA</i> → 2 <i>PG</i>	0,192	0,192
2 <i>PG</i> → <i>PEP</i>	0,193	0,192
<i>PYR</i> → <i>PEP</i>	0,444	0,406
<i>GLU</i> → <i>AKG</i>	0,042	0,042
<i>SUC</i> → <i>FUM</i>	0,028	0,027
<i>FUM</i> → <i>MAL</i>	1,081	0,039
<i>MAL</i> → <i>OAA</i>	0,498	0,049
<i>X5P</i> → <i>RU5P</i>	0,569	0,572
<i>R5P</i> → <i>RU5P</i>	0,269	0,269
<i>S7P</i> + <i>GAP</i> → <i>R5P</i> + <i>X5P</i>	0,282	0,281
<i>F6P</i> + <i>GAP</i> → <i>E4P</i> + <i>X5P</i>	0,288	0,29
<i>S7P</i> + <i>GAP</i> → <i>E4P</i> + <i>F6P</i>	0,539	0,521
<i>G6P</i> → <i>GLYC</i>	0,37	0,372

Con el modelo ya validado se considera el caso de limitación de nitrógeno con una cota superior de 0,135 mmol gPS⁻¹ h⁻¹, para asegurar que el caso de captación es factible experimentalmente. Para esta condición, el crecimiento es de 0,015 h⁻¹. Ambos valores son

fijados en el modelo y la producción de ATP se minimiza por medio de FBA. Los resultados indican una producción de ATP mínima requerida de $6,285 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una producción de etanol de $1,547 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

4.3.2.2.2. Condiciones de limitación por fósforo

Para estudiar la producción de etanol en dos etapas por limitación de fósforo se estudiaron seis escenarios diferentes de captación de fósforo ya que no existe para nuestro conocimiento información experimental de crecimiento fotoautotrófico en estas condiciones. Los valores de captación considerados son: 0,03, 0,025, 0,02, 0,015, 0,01 y 0,005 $\text{mmol gPS}^{-1}\text{h}^{-1}$. Para cada uno de estos valores se calcula el crecimiento máximo y la producción máxima de etanol (Figura 4.11). Se observa que a medida que disminuye la cota superior sobre la captación de fósforo, la producción máxima de biomasa también lo hace, dejando más flujo de carbono disponible para desviar a la producción de etanol, que se incrementa a medida que disminuye el fósforo disponible. La producción mínima de ATP requerida para cada estado presenta la misma tendencia que el crecimiento, debido a que la vía de producción de etanol requiere menores niveles de ATP que la de producción de biomasa. Para el análisis de producción de etanol en dos etapas se selecciona el caso de 0,01 $\text{mmol gPS}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Para el caso seleccionado se obtiene por medio del GEM una producción de etanol de 1,57 $\text{mmol gPS}^{-1}\text{h}^{-1}$ y una producción de ATP de $6,269 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

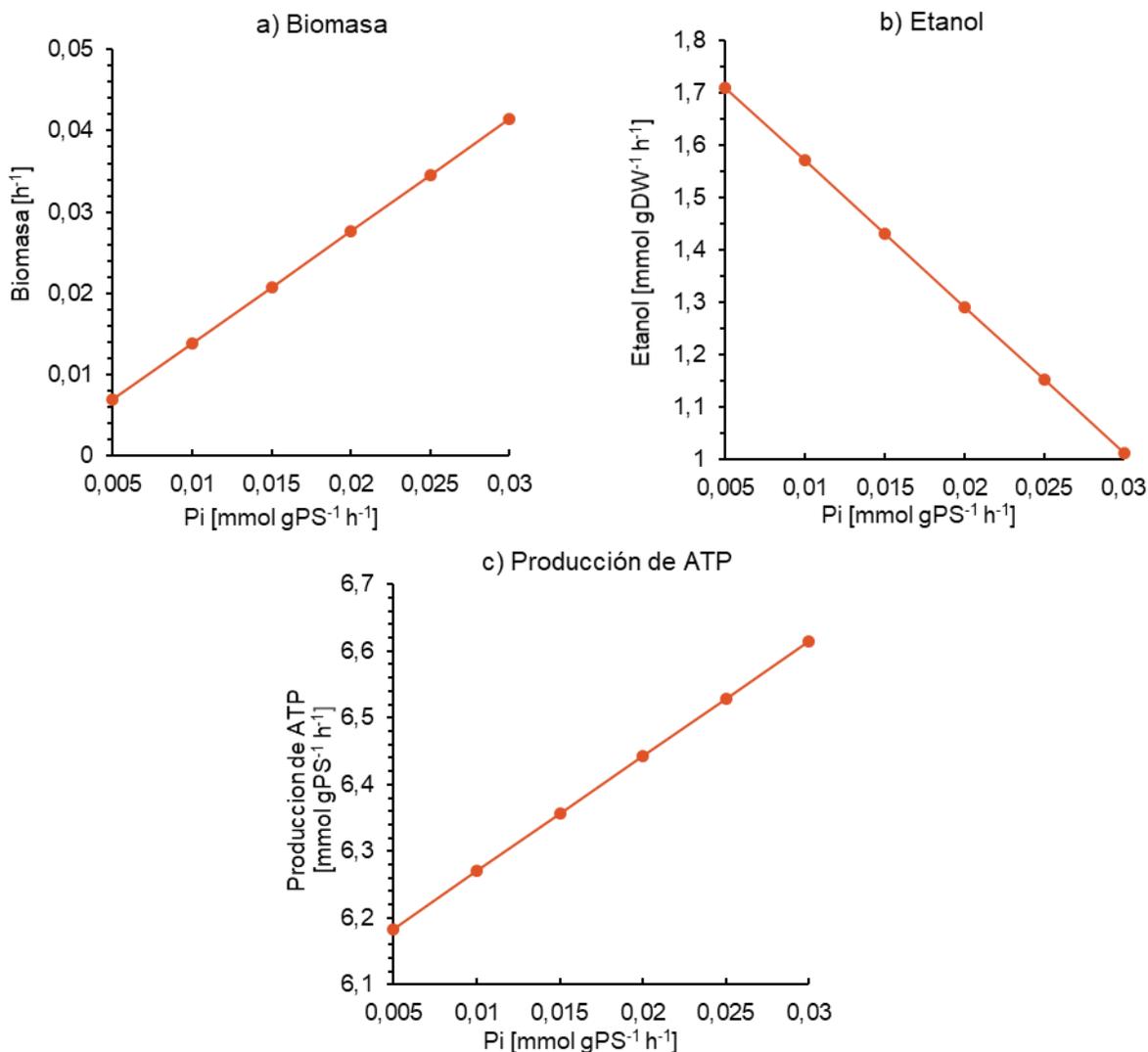


Figura 4.11. Tasa de crecimiento **(a)**, producción máxima de etanol **(b)**, y producción mínima de ATP **(c)** requerida para seis escenarios diferentes de captación de fósforo.

4.3.2.2.3. Análisis de las dos etapas

Para la primera etapa, que es equivalente para los dos casos de limitación, se considera crecimiento en fase exponencial con una tasa de crecimiento (μ) de 0,089 h⁻¹, obtenida en el Capítulo 3, y se supone un tiempo de cultivo de 2 días (t). La concentración de biomasa inicial (X_0) de 0,078 gPS L⁻¹, al igual que para el caso acoplado. Utilizando el modelo que se describió en la Sección 4.3.2.1.6, la concentración de biomasa final es de 5,589 gPS L⁻¹, la cual es válida para los dos casos de limitación de nutrientes considerados.

Para la segunda etapa se considera que el cultivo se encuentra en fase estacionaria, por lo que el crecimiento neto es cero. Con esta suposición, la producción de etanol se calcula en base a la concentración final de biomasa de la primera etapa, con un tiempo de cultivo de un día. La tasa de producción de etanol obtenida para el caso con limitación de nitrógeno y fósforo se afecta por la concentración constante de biomasa (fase estacionaria del crecimiento) y por el tiempo de cultivo, para obtener una concentración en g L^{-1} .

La producción de etanol para ambos casos de limitación se muestra en la Figura 4.12, comparada con la producción obtenida para el mutante M2, la cual lógicamente se desarrolla en una etapa ya que la producción del compuesto de interés está acoplada al mismo. Los resultados *in silico* obtenidos muestran una producción de etanol muy similar para los casos de nitrógeno y fósforo, con un aumento de solo 1,5% para el caso de fósforo. Las tasas de producción de etanol obtenidas para ambos casos son mayores que las obtenidas por Namakoshi *et al.* (2016), que fueron de 332 mg L^{-1} . Sin embargo, si se relacionan estos resultados a los obtenidos en la Sección 4.3.2.1.6 se puede ver que los resultados obtenidos para el caso de dos etapas son más prometedores, y no implican la modificación genética de la cepa. Sería necesario realizar un estudio técnico económico de los dos enfoques para evaluar el costo de producción de cada uno.

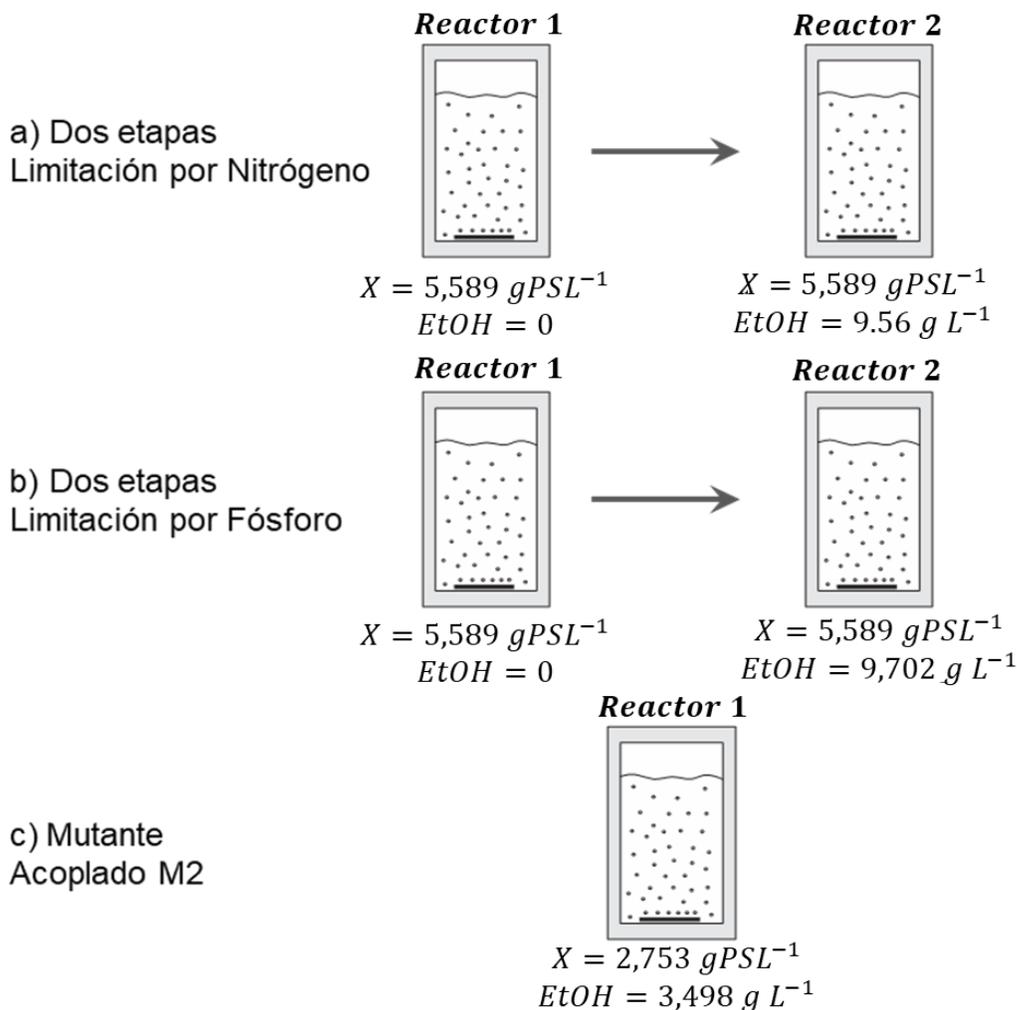


Figura 4.12. Resultados para los casos de limitación en dos etapas con limitación de nitrógeno **(a)** y fósforo **(b)** comparados con los resultados del mutante acoplado M2 **(c)**.

4.4. Conclusiones

En este capítulo se abordó el estudio de la producción fotosintética de etanol con *Synechocystis* por medio de dos estrategias diferentes. La primera, que considera el acoplamiento de la producción de etanol al crecimiento, llevó al desarrollo de una nueva formulación de programación binivel que incluye el mapeo GPR y de esa forma relaciona las variables binarias con genes en lugar de reacciones, a diferencia de los algoritmos *OptKnock* y *OptForce*. Los resultados obtenidos tienen mayor sentido biológico para su implementación en una estrategia de ingeniería metabólica.

Los resultados numéricos muestran que el mutante acoplado más atractivo desde el punto de vista biotecnológico se obtiene con 13 *knock-outs* y provee una producción teórica máxima de etanol *in silico* un 235% más elevada que la mejor obtenida experimentalmente por Dienst *et al.* (2014).

Este resultado es atractivo porque presenta fenotipos más estables (Hendry *et al.*, 2016). Los resultados numéricos obtenidos en esta tesis y en otros estudios (Erdrich *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2013) muestran que el mínimo número de intervenciones genéticas requeridas para obtener el mutante que acople el crecimiento a la producción biotecnológica es elevado. Sin embargo, actualmente se encuentran en desarrollo nuevas herramientas de edición genética para cianobacterias basadas en la tecnología *CRISPR* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que permitirán lograr modificaciones genéticas complejas con manipulación simultánea de múltiples genes (Behler *et al.*, 2018; Ungerer & Pakrasi, 2016). Esto vislumbra un futuro prometedor en el diseño de fábricas celulares basadas en cianobacterias.

La idea de producir etanol en dos etapas bajo limitación de nutrientes surge a partir de datos de bibliografía que presentan producción de etanol en *Synechocystis* en condiciones de limitación por nitrógeno. Los resultados obtenidos por medio de estos estudios son aún más prometedores que los obtenidos para el mutante acoplado, brindando una producción un 177% más elevada en el caso del fósforo, y un 142% en el caso del nitrógeno. Aunque estos resultados fueron obtenidos modelos simplificados, son alentadores para analizarlos experimentalmente con mayor profundidad.

Producción fotosintética de PHB

5.1. Introducción

Desde el año 1950 el uso de plásticos derivados del petróleo se ha vuelto indispensable en las actividades diarias de la población mundial (Bhati, 2019) y por lo tanto, su producción ha crecido ininterrumpidamente hasta la actualidad. A pesar de que cuentan con las ventajas de ser inertes, versátiles y durables, estos polímeros tienen características negativas que se hicieron notables lo largo de décadas de uso, generando graves problemas ambientales. Además de ser producidos a partir de combustibles fósiles, al no ser biodegradables se generan efectos ambientales negativos en el momento en que se descartan, generándose emisiones de CO₂ que contribuyen al efecto invernadero al incinerarse, y también produciendo acumulación de sustancias tóxicas en el medio ambiente, principalmente por la depósitos en ambientes marinos y en rellenos sanitarios (Kamravamanesh *et al.*, 2018). Desde 1950, cuando la producción total de plásticos alcanzaba 1,5 MMt, se ha observado un aumento anual del 9%, exceptuando las crisis mundiales del petróleo en 1973 y financiera del 2007, hasta alcanzar 359 MMt en el año 2018 (Plastics Europe, 2019) (Figura 5.1). A partir de ellos se generan desechos no biodegradables a una tasa de 34 MMt/año, de los cuales un 93% son dispuestos en rellenos sanitarios (Ramos, 2019). Dentro de los plásticos derivados del petróleo los más abundantes son el polietileno (PE), polipropileno (PP), y polietilentereftalato (PET). Una alternativa a estos materiales son los bioplásticos que son plásticos derivados de biomasa, y pueden ser o no biodegradables.

Dentro de los bioplásticos no biodegradables se encuentran el elastómero de poliéster termoplástico y variaciones de los mencionados PE, PP y PET que también pueden producirse a partir de biomasa. La mejor opción desde el punto de vista medioambiental son los plásticos producidos a partir de biomasa y que son, a la vez, biodegradables. En esta categoría se encuentran los polihidroxicanoatos (PHAs), el ácido poliláctico y el polibutileno. La producción actual de bioplásticos representa solo un 1% del total de producción de plásticos a nivel mundial, pero se espera que tenga un aumento del 15% en los próximos cinco años de acuerdo a *European Bioplastics*. De este 1%, alrededor de un 55% corresponde a bioplásticos biodegradables. (European Bioplastics, 2018).

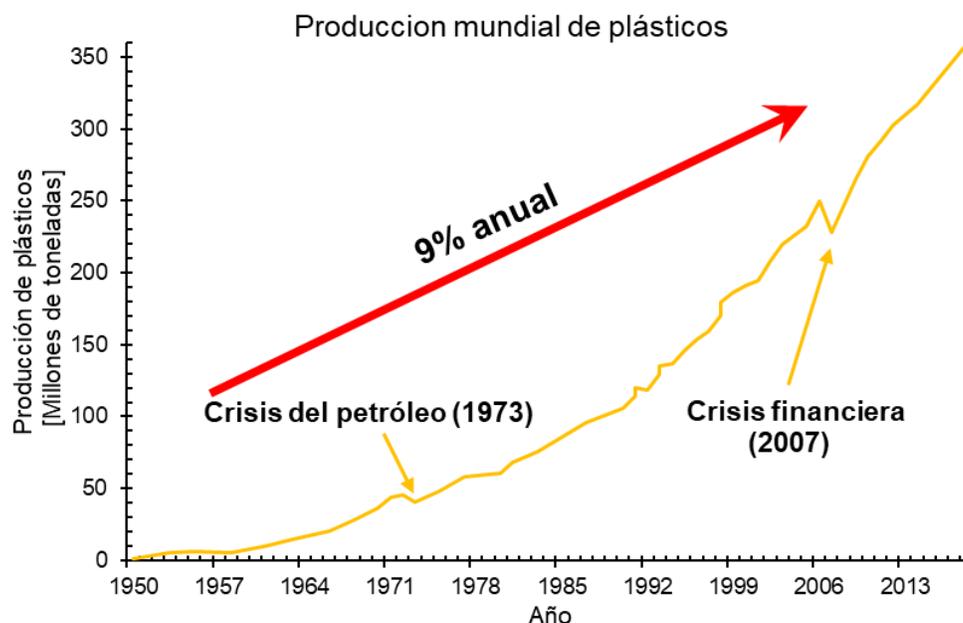


Figura 5.1. Producción mundial de plásticos hasta el año 2018. Adaptado de Crawford & Quinn (2016)

La opción de reemplazo a los plásticos convencionales más investigada frente a la necesidad de producir nuevos plásticos biodegradables y derivados de la biomasa son los PHAs (Meixner *et al.*, 2018), ya que presentan propiedades similares al polipropileno. Y, por lo tanto, pueden procesarse de formas similares por extrusión, inyección y *spinning*, siendo completamente biodegradables por microorganismos del suelo (Troschl *et al.*, 2017).

En condiciones aeróbicas se degradan a CO₂ y agua, mientras que en condiciones anaeróbicas son degradados a metano (Bhati, 2019). Los PHAs son sintetizados y acumulados como inclusiones celulares por varios microorganismos, por lo cual se encuentran dentro de la categoría de biopolímeros microbianos. Se sintetizan como compuesto de reserva de carbono y energía, y debido a que no afectan el balance osmótico de la célula, pueden alcanzar hasta un 80% del peso celular (Costa *et al.*, 2019). Dentro de la gran familia de los PHAs, el Poli(3-hidroxiбутirato) (PHB) es el más estudiado debido a su alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. El PHB posee características similares al polipropileno, lo que hace que pueda reemplazar a los plásticos convencionales en muchas aplicaciones. Actualmente, se produce comercialmente a partir de bacterias heterotróficas tales como *Cupriavidus necator* y *Escherichia coli* utilizando fuentes de carbono orgánicas tales como azúcares y ácidos grasos. Su producción se encuentra limitada por los altos costos del proceso, debidos fundamentalmente a las fuentes de carbono, demanda de energía, y compuestos químicos para el post tratamiento (Kamravamanesh *et al.*, 2018, Ramos, 2019).

Es debido a esto que se estudia la posibilidad de la producción de PHB a partir de cianobacterias, con el objetivo de disminuir los costos de los sustratos, y a la vez contribuir a la disminución de los niveles de CO₂ en la atmosfera. Sin embargo, los rendimientos obtenidos hasta el momento son bajos para considerar la producción fotosintética de PHB a escala industrial, teniendo en cuenta que el PHB no es un producto de alto valor de venta (Meixner *et al.*, 2018).

Synechocystis cuenta con la capacidad de producir PHB naturalmente (Hein *et al.*, 1998), y lo produce en condiciones de limitación de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Wu *et al.*, 2001), como fuente de almacenamiento de carbono. En los últimos años, se han realizado

numerosos estudios con el objetivo de mejorar la producción de PHB en *Synechocystis* por medio de optimización de las condiciones de cultivo y modificaciones genéticas (Carpine *et al.*, 2017; Hauf *et al.*, 2013; Hirai *et al.*, 2019; Kamravamanesh *et al.*, 2018; Khetkorn *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2019), pero aún no se han alcanzado niveles de producción que justifiquen llevar el proceso a escala industrial.

En este capítulo se estudia la posibilidad de acoplar la producción fotosintética de PHB al crecimiento a partir de la formulación de problemas binivel con el objetivo de analizar si es posible producir PHB con *Synechocystis* para mejorar la tasa de producción y, a la vez, sin que se requiera limitación de nutrientes.

5.2. Materiales y Métodos

En este capítulo se utilizan formulaciones binivel para la búsqueda de mutantes que produzcan PHB acoplando su producción al crecimiento. Dichas formulaciones han sido descritas en detalle en el Capítulo 4.

5.2.1. Producción teórica máxima de PHB

En primer lugar, se calcula, al igual que para el caso de la producción de bioetanol, los valores que podría tomar la producción de PHB en el GEM. Para este análisis se consideran diferentes valores para la tasa de crecimiento, desde su máximo hasta 0, y se resuelve un FBA para cada uno, utilizando como función objetivo la maximización de la tasa de producción de PHB. Los resultados se muestran en la Figura 5.2. La producción máxima de PHB calculada *in silico*, para crecimiento nulo, es de $0,925 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Este valor es un 50% menor que el máximo teórico que obtenido para etanol. Esto es lógico ya que al comparar las vías se ve que para la producción de PHB se requieren dos moléculas de

acetil-CoA como precursores (Figura 2.7), mientras que para la producción de etanol se requiere solo una (Figura 2.6).

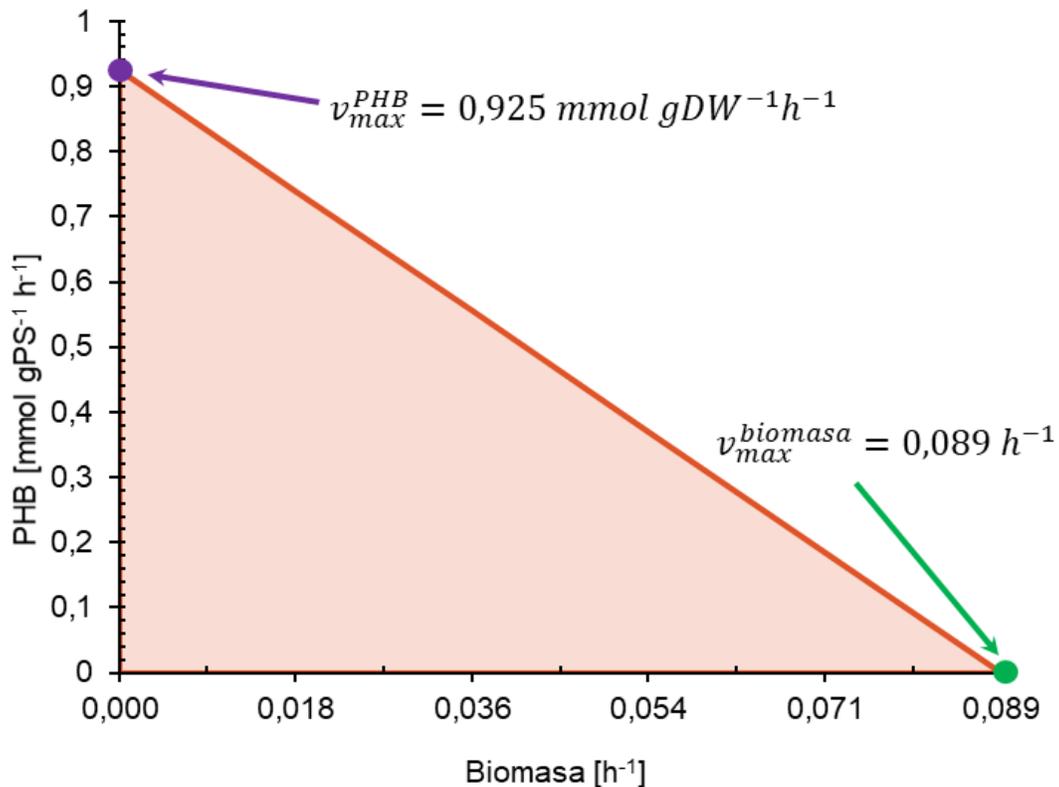


Figura 5.2. Trade-off entre el crecimiento y la producción de PHB para *Synechocystis*.

Esta diferencia entre los requerimientos de precursores entre los dos productos considerados indica que la productividad que podrá obtenerse en el caso del PHB es menor que la que se pudo obtener para etanol. Además, lleva a pensar que desviar el flujo de carbono a esta vía tendrá una complejidad mayor si se tiene en cuenta que el precursor también es necesario para otras vías metabólicas esenciales para el crecimiento.

5.2.2. Producción de PHB acoplada al crecimiento

En este caso, se seleccionó al PHB como producto y se utilizaron las formulaciones desarrolladas en el Capítulo 4 para la búsqueda de mutantes. Se debe tener en cuenta en este caso que la reacción de producción de PHB que se utiliza es ficticia, ya que, a

diferencia del etanol, el PHB es un metabolito que se acumula intracelularmente. Con fines de modelado, la forma de indicar su producción es representándolo como un metabolito que se excreta, y que por lo tanto existe una reacción de excreción de PHB.

Para encontrar la estrategia de ingeniería metabólica que acopla la producción de PHB al crecimiento en *Synechocystis* se utilizó en primer lugar la Formulación 1 presentada en la Tabla 4.1, con el objetivo de determinar las mínimas intervenciones necesarias para obtener la producción acoplada. Para ello se fija la producción de PHB en un valor de $0,01 \text{ mmol PHB gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y además un mínimo requerido de biomasa de $0,01 \text{ h}^{-1}$ para evitar soluciones con crecimiento 0. El set de genes esenciales que quedan excluidos de las opciones de *knock-out* es el mismo que para el caso de etanol ya que también se considera crecimiento fotoautotrófico. Se obtuvo de esta forma un primer mutante, al que se llamara M3, para el cual se requieren 14 intervenciones genéticas que corresponden a la eliminación de 18 reacciones del GEM (Tabla 5.1). Una vez obtenido este resultado, conociendo el número mínimo de intervenciones requeridas, se utilizó la Formulación 2 para intentar obtener una mejor producción de PHB. En este caso, no fue posible obtener ningún resultado con los medios computacionales disponibles. Debido a esto, se utilizó la Formulación 1 modificando los mínimos de PHB y de biomasa. El único caso que llevó a un resultado diferente del obtenido previamente fue para una producción mínima de $0,01 \text{ mmol PHB gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y un crecimiento mínimo de $0,02 \text{ h}^{-1}$. En este caso se obtuvo un nuevo mutante (M4) que requiere 16 intervenciones genéticas correspondientes a 19 reacciones del GEM. En la Tabla 5.1 se presentan las tasas de crecimiento y producción de PHB de ambos mutantes. Los dos comparten la mayoría de los *knock-outs*, por lo cual se analizarán en conjunto indicando las pocas diferencias. Es importante notar que los tiempos de resolución de estos problemas fueron en todos los casos mayores que para etanol (~4 horas).

Tabla 5.1. Mutantes que acoplan el crecimiento a la producción de PHB en *Synechocystis*

Mutante	Knock-outs	$v_{biomasa}$ [h ⁻¹]	v_{PHB} [mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹]
M3	14	0,0625	0,1059
M4	16	0,0607	0,1292

5.2.2.1. Análisis de las estrategias de acoplamiento

En la Tabla 5.2 se presentan las estrategias metabólicas obtenidas resolviendo el problema binivel para los mutantes M3 y M4, con sus números de reacción, genes, enzimas y fórmulas de reacción respectivos. Se discuten a continuación las reacciones en común de los dos mutantes.

En ambos mutantes es necesario eliminar el gen *sl1561* (Tabla 5.2) que codifica para un complejo enzimático multifuncional asociado a cinco reacciones. Por otro lado, el mutante M4 incluye una reacción que puede ser catalizada por dos isoenzimas codificadas por dos genes diferentes, lo cual implica que, si ambos genes se expresan durante el crecimiento autotrófico, para eliminar efectivamente dicha reacción se deben realizar dos *knock-outs*. Estas dos situaciones son correctamente identificadas por la resolución del modelo debido a la inclusión del mapeo GPR en la formulación.

El segundo paso en la vía de producción de PHB consume NADPH para formar el intermediario (R)-3-Hydroxybutanoyl-CoA a partir de Acetoacetyl-CoA. Los *knock-outs* propuestos están relacionados con la disminución de la producción de NADH para favorecer las vías de producción de NADPH. El gen *slr1239*, que codifica la interconversión entre NADPH y NADH, es un *knock-out* seleccionado en ambos mutantes. Esta reacción es reversible, pero si se observan los flujos de la cepa silvestre (Apéndice E) se observa que toma como dirección la producción de NADH a partir de NADPH. Por otro lado, la

eliminación del gen *sl1561* implica la eliminación de las reacciones R32, R33, R34, R35 y R61 (Tabla 5.2) que se encuentran involucradas en las vías de síntesis de los aminoácidos arginina, prolina, glutamato y glutamina. De este grupo, las reacciones R32, R33 y R61 producen NADH. En los resultados para la cepa silvestre, solo se observa flujo en la reacción R32, pero observando las cotas obtenidas por FVA se ve que el modelo podría utilizar indistintamente cualquiera de las tres vías. La eliminación del gen *slr1755* (R263) también involucra la producción de NADH y se encuentra también incluido en el set seleccionado de *knock-outs* en el caso de producción acoplada de etanol. El *knock-out* del gen *sl1342* tiene relación con lo mismo, ya que la reacción R231 es una vía de consumo de NADPH, que compete con la vía de producción de PHB, y además como forma parte de la glucólisis evita que el flujo se dirija aguas arriba. En base a lo explicado, se puede decir, en resumen, que los *knock-outs* de las reacciones R32, R33, R34, R35, R61, R263 y R231 están relacionados con modificar el balance entre el NADH y el NADPH de la célula para favorecer de esta forma la disponibilidad de NADPH en la vía de producción de PHB.

La supresión del gen *slr0301* (R506) evita la formación de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato para evitar el flujo de carbono hacia la glucólisis superior forzarlo, favoreciendo de esta manera la producción de acetil-CoA, principal precursor de la síntesis de PHB. Un caso similar lo constituye la reacción R230 codificada con el gen *slr0783*.

En ambos mutantes, el ciclo de Krebs se ve interrumpido por la eliminación del gen *slr0018*, que codifica para la enzima fumarasa (*fumC*) que cataliza la conversión reversible de malato en fumarato. Esta eliminación impide la producción de fumarato, el cual debe sintetizarse a través de las vías metabólicas implicadas en la síntesis de arginina y del metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato. Para evitar el *overflow* de fumarato y su reutilización convirtiéndolo en succinato, el problema binivel selecciona la eliminación del transportador

de membrana del fumarato (R823). La reacción R823 no tiene un gen asociado ya que no se encuentra identificado, pero tanto la excreción de fumarato, como su acumulación frente a la eliminación de la enzima *fumC* se vieron experimentalmente en un estudio reciente de Du *et al.* (2019). Si bien esta modificación evita el *overflow* de fumarato, los resultados numéricos indican que la célula excreta succinato al medio de cultivo.

Por último, la eliminación de la reacción de excreción de acetato se relaciona con que este compuesto es el metabolito precursor de la producción de acetil-CoA, molécula necesaria para la producción de PHB. Eliminando esta reacción, el acetato se utiliza exclusivamente en la reacción R499 de producción de acetil-CoA evitando su *overflow*.

El mutante M3 incluye, además de los *knock-outs* mencionados, la supresión del gen *slr0381* (R435) cuya reacción asociada es precursora de la vía de producción de lactato.

En el mutante M4 se incluyen los *knock-outs* de las reacciones R434 y R301. La reacción R301, que requiere de la eliminación de dos genes (*slr1564* ó *slr0186*), es una vía alternativa de consumo de Acetil-CoA, lo cual perjudica a la producción de PHB. La eliminación de la reacción R434 codificada por el gen *slr0036* permite que no se emplee flujo de dihidroxiacetona fosfato en la producción de metilglioxal, para que pueda utilizarse en la vía de las pentosas fosfato.

Tabla 5.2. Reacciones, enzimas y genes involucrados en los mutantes con crecimiento y producción de PHB acoplados.

Genes	Rxn	Numero E.C.	Enzima	Formula de reacción	Cepa
<i>slr1840</i>	R199	2.7.1.165	Glicerato 2-kinasa	ATP(cyt) + D-Glycerate(cyt) → ADP(cyt) + 2-Phospho-D-glycerate(cyt)	M3/M4
<i>slr1755</i>	R263	1.1.1.94	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa [NAD(P) ⁺]	sn-Glycerol 3-phosphate(cyt) + NAD ⁺ (cyt) ↔ Glycerone phosphate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)	M3/M4
<i>slr1239</i>	R155	1.6.1.2	NAD(P) ⁺ transhidrogenasa	NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt) + NAD ⁺ (cyt) ↔ NADP ⁺ (cyt) + H ⁺ (cyt) + NADH(cyt)	M3/M4
<i>slr0783</i>	R230	5.3.1.1	Triosa-fosfato isomerasa	D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) ↔ Glycerone phosphate(cyt)	M3/M4
<i>slr0301</i>	R506	2.7.9.2	Fosfoenolpiruvato sintasa	ATP(cyt) + Pyruvate(cyt) + H ₂ O(cyt) → AMP(cyt) + Phosphoenolpyruvate(cyt) + P _i (cyt)	M3/M4
<i>slr0214</i>	R195	2.1.1.37	ADN citosina metilasa	S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + DNA cytosine(cyt) → S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + DNA 5-methylcytosine(cyt)	M3/M4
<i>slr0018</i>	R512	4.2.1.2	Fumarasa	(S)-Malate(cyt) ↔ Fumarate(cyt) + H ₂ O(cyt)	M3/M4
<i>sll1561</i>	R32	1.2.1.88*	1-pirrolina deshidrogenasa	L-Glutamate 5-semialdehyde(cyt) + NAD ⁺ (cyt) + H ₂ O(cyt) → L-Glutamate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)	M3/M4
<i>sll1561</i>	R33	1.2.1.88*	1-pirrolina deshidrogenasa	(S)-1-Pyrroline-5-carboxylate(cyt) + NAD ⁺ (cyt) + 2 H ₂ O(cyt) → L-Glutamate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)	M3/M4
<i>sll1561</i>	R34	1.5.5.2*	Prolina deshidrogenasa	L-Proline(cyt) + PQ(tlm) → (S)-1-Pyrroline-5-carboxylate(cyt) + PQH2(tlm)	M3/M4
<i>sll1561</i>	R35	1.5.5.2*	Prolina deshidrogenasa	L-Proline(cyt) + PQ(cym) → (S)-1-Pyrroline-5-carboxylate(cyt) + PQH2(cym)	M3/M4
<i>sll1561</i>	R61	1.2.1.88*	1-pirrolina deshidrogenasa	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate(cyt) + NAD ⁺ (cyt) + 2 H ₂ O(cyt) → L-erythro-4-Hydroxyglutamate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)	M3/M4
<i>sll1359</i>	R525	1.2.2.1	Formato deshidrogenasa	Formate(cyt) + 2 Ferricytochrome b1(cyt) → CO ₂ (cyt) + 2 Ferrocyclochrome b1(cyt) + 2 H ⁺ (cyt)	M3/M4
<i>sll1342</i>	R231	1.2.1.59	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (NAD(P) ⁺)	D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) + Orthophosphate(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ← 3-Phospho-D-glyceroyl phosphate(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)	M3/M4
<i>sll0006</i>	R206	2.6.1.4	Glicina transaminasa	Glycine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ Glyoxylate(cyt) + L-Glutamate(cyt)	M3/M4
<i>g823</i>	R823	-	-	Fumarate(cyt) → Fumarate(ext)	M3/M4
<i>g820</i>	R820	-	-	Acetate(cyt) → Acetate(ext)	M3/M4
<i>slr0381</i>	R435	4.4.1.5	Metilgloxilasa	(R)-S-Lactoylglutathione(cyt) ↔ Glutathione(cyt) + Methylglyoxal(cyt)	M3
<i>sll0036</i>	R434	4.2.3.3	Metilgloxal sintasa	Glycerone phosphate(cyt) → Methylglyoxal(cyt) + Orthophosphate(cyt)	M4
<i>sll1564</i> ó <i>slr0186</i>	R301	2.3.1.182	(R)-citramalato sintasa	Acetyl-CoA(cyt) + Pyruvate(cyt) + H ₂ O(cyt) → (R)-2-Methylmalate(cyt) + CoA(cyt)	M4

*Los números E.C. de las reacciones R32, R33, R34, R35 y R61 se encontraban obsoletos. E.C 1.5.1.12 fue modificado a 1.2.1.88, y E.C. 1.5.99.8 a 1.5.5.2 de acuerdo a KEGG

5.2.2.2. Análisis de tasa de producción y espacios de flujos

Ambos mutantes presentan tasas de crecimiento y de producción de PHB máximas muy similares (Tabla 5.1). Para compararlos se puede calcular cuánto PHB se produce por gPS de biomasa, llamándole P a esta cantidad:

$$P = \frac{v_{PHB}}{\mu} = \left[\frac{mmol \ gPS^{-1} h^{-1}}{h^{-1}} \right] = \frac{mmol \ PHB}{gPS} \quad (5.1)$$

De aquí se obtiene que P_{M3} es de 1,69 mmol PHB/gPS y P_{M4} , 2,12 mmol PHB/gPS, lo cual en términos de porcentajes representa que la producción de PHB por gramo de biomasa es un 25% mayor en M4 que en M3. Debido a esto se discutirán con mayor profundidad los resultados obtenidos para M4. En la Figura 5.3 se presenta entonces el espacio de flujos para M4, que se obtiene por medio de FBA para diferentes valores de tasa de crecimiento. Allí puede observarse la producción de PHB está completamente acoplada al crecimiento, ya que no se observa ningún valor de crecimiento en el que la producción de PHB sea nula. Al igual que para el caso de etanol, se realizó un análisis con el algoritmo MOMA que muestra que el mutante es viable y los valores obtenidos resultan aún más optimistas que los que brinda un FBA en las mismas condiciones, con mayor producción de PHB para menor producción de biomasa.

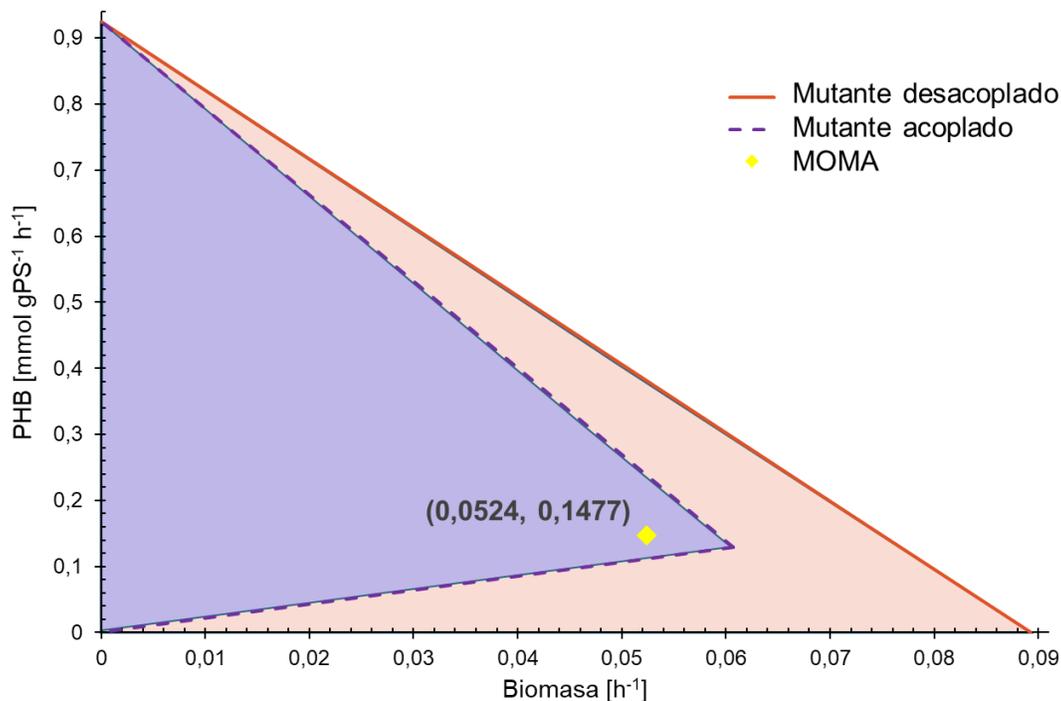


Figura 5.3. Espacio de flujos para el mutante acoplado M4

Los resultados del análisis de sensibilidad de las tasas de producción de biomasa y PHB considerando variaciones en el flujo de carbono inorgánico, de luz y el flujo de ATP destinado a mantenimiento pueden verse en la Figura 5.4. No se observa ningún cambio de pendiente frente a la variación de carbono inorgánico disponible, presentándose en todo el rango una disminución de las tasas de crecimiento y producción de PHB frente a la disminución del carbono inorgánico disponible. Con respecto a la luz, no se observan diferencias en este caso respecto a lo analizado para el mutante no acoplado. Por último, en el caso del ATP utilizado para mantenimiento celular se observa que este valor comienza a afectar el crecimiento y la producción de PHB para un valor alto, de alrededor de $38 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$. Este valor es equivalente al de la cepa no acoplada, por lo tanto, se debe notar que las intervenciones de M4 no afectan el balance de ATP, a diferencia de lo que ocurre en el caso de producción acoplada de etanol (Capítulo 4).

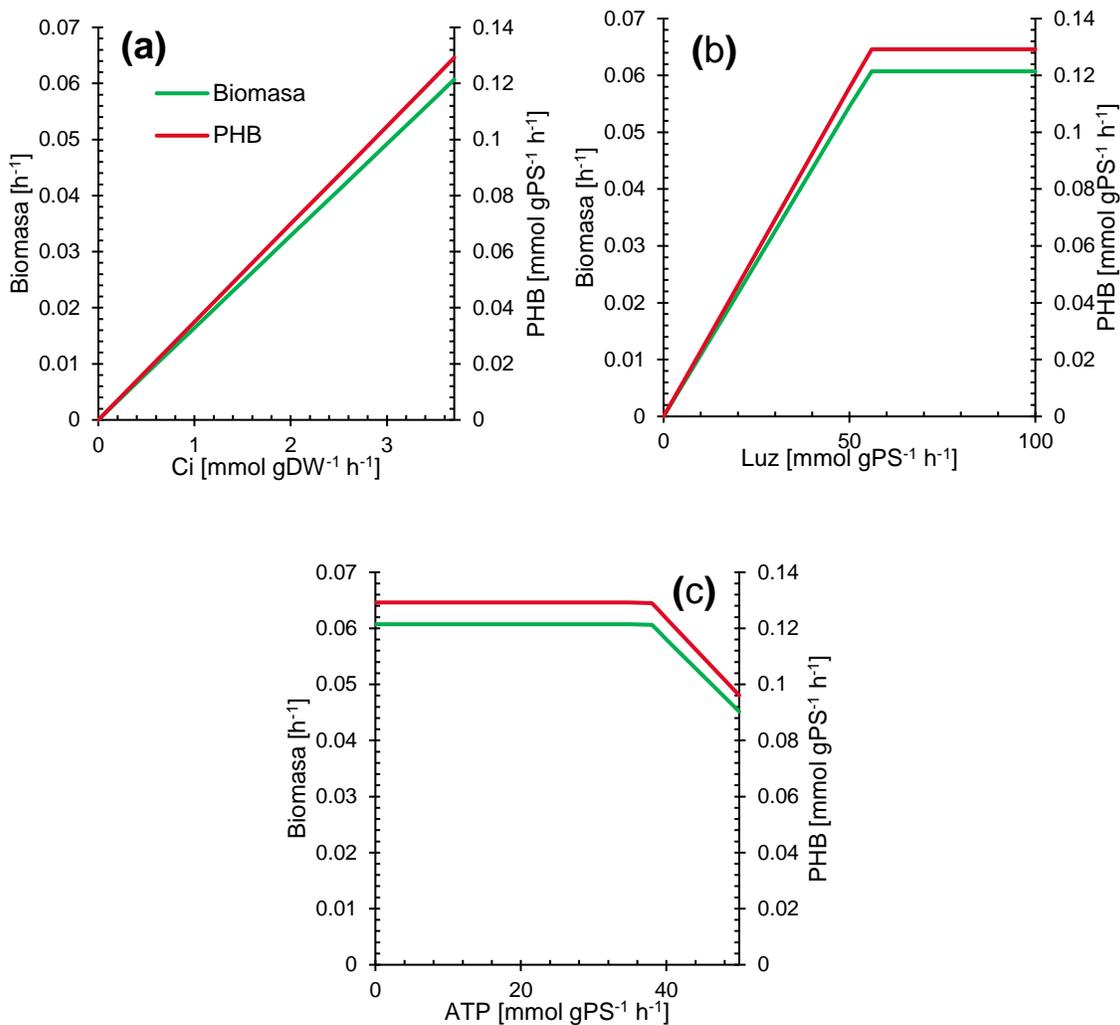


Figura 5.4. Análisis de sensibilidad sobre los flujos de biomasa y PHB para el mutante acoplado M4 considerando variaciones en las captaciones de luz **(b)**, el carbono inorgánico **(a)** y el ATP para mantenimiento celular **(c)**.

5.2.2.3. Análisis de distribución de flujos para M4

Se analizan, en primer lugar, las entradas y salidas del modelo al resolver un FBA para maximización de biomasa (Figura 5.5). Se puede ver que el mutante tiene un menor requerimiento de fuente de nitrógeno que la cepa silvestre y un aumento de los requerimientos de fósforo y sulfato.

Como se mencionó anteriormente, se observa también la producción de succinato como subproducto del crecimiento, además de PHB. Esto se relaciona con el hecho que hay un exceso de flujo de carbono que no puede dirigirse a la formación de biomasa o PHB, posiblemente por limitación de poder reductor (NADPH).

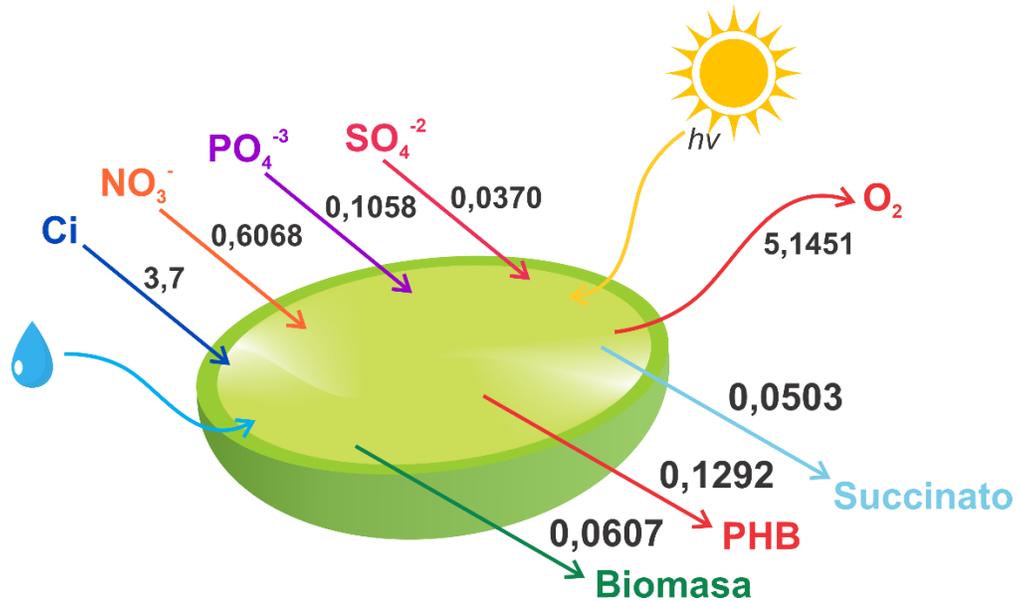


Figura 5.5. Entradas y salidas para el mutante acoplado M4.

Luego de analizar las salidas y entradas, se calcularon los parámetros fotosintéticos como se ha realizado en los Capítulos 3 y 4 con la cepa silvestre y el mutante acoplado de etanol M2. En la Tabla 5.3 se presentan estos resultados comparados con los de la cepa silvestre. Se observa que ambas relaciones ATP/NADPH son mayores en el mutante M4. Resulta interesante que la relación de ATP/NADPH alcanza un valor mayor a 1,5 sin incluir las vías alternativas de transporte de electrones. Esto podría deberse a que la producción de PHB en sí misma actúa consumiendo NADPH tal como lo hacen las vías de disipación de energía. Es de esperar, además, que el consumo de NADPH del mutante sea mayor debido a que la vía de producción de PHB consume NADPH. Con respecto a la relación entre los flujos de ambos fotosistemas se observa que la partición es más pareja que para la cepa silvestre. El flujo de O₂ producido y el consumo de fotones son similares en ambos casos.

Por último, considerando que la energía disponible es la misma en ambos casos se puede observar que la energía disipada por medio de las vías de consumo de NADPH es menor que en la cepa silvestre, lo cual, como se mencionó anteriormente, guarda relación con que una parte del consumo de NADPH ocurre en la vía de producción de PHB que no se tiene en cuenta en el análisis de los parámetros fotosintéticos.

Tabla 5.3. Parámetros fotosintéticos para el mutante productor de PHB acoplado M4, comparados a los de la cepa silvestre desacoplada

	<i>Cepa silvestre</i>	<i>M4</i>
Tasa de Crecimiento [h⁻¹]	0,089	0,0607
RuBisCO	4,75	4,2243
ATP/NADP (LEF)	1,302	1,657
ATP/NADP (LEF + AEF)	1,713	2,220
PSI/PSII	2,037	1,144
hv/O₂	17,87	19,436
hvi/hvo	0,145	0,111

ATP/NADPH (LEF): ATP producido/NADPH consumido en vía de transporte de electrones lineal.

ATP/NADPH (LEF + AEF): ATP producido/NADPH consumido in vías de transporte de electrones lineal y alternativa.

PSI/PSII: Relación entre los flujos de los fotosistemas I y II.

hv/O₂: mmol de fotones consumidos/mmol de O₂ producidos.

hvi/hvo: Energía disipada/Energía Total disponible (en forma de fotones)

En la Figura 5.6 se presenta el mapa de flujos simplificado para el mutante M4. Debe notarse que el mapa presenta algunas modificaciones respecto al presentado en capítulos anteriores que se discuten a continuación. Se resolvió un FBA, considerando flujos de valor 0 a las reacciones correspondientes a los *knock-outs* al GEM, habiendo previamente realizado un FVA en las mismas condiciones para limitar el espacio de flujos. Este mapa representa el metabolismo central del carbono de *Synechocystis* y en este caso, en él se indican tres de los *knock-outs*. Esto da una primera idea de que la complejidad metabólica de este mutante es mayor a los obtenidos anteriormente para la producción de etanol.

Se observa que el mutante acoplado produce la fructosa 6-fosfato requerida en la glucólisis por medio de una desviación (indicada con una línea punteada roja en la

Figura 5.6) y a partir de la vía PPP, en lugar de hacerlo por la vía habitual, ya que el intermediario necesario (fructosa 1,6-bisfosfato) no se produce. Este tipo de desviación también ocurre en soluciones de FBA de la cepa salvaje, pero se modifican al agregar datos experimentales de fluxómica, que proveen cotas para la mayoría de las reacciones involucradas en la vía PPP. Se fijó una cota inferior distinta de 0 a la reacción de conversión de FBP en F6P, para analizar si se encuentra bloqueada. Los resultados indican que no lo está y no muestran ninguna modificación en el crecimiento ni en la tasa de producción de PHB. Solo se observa una disminución general en los flujos de las reacciones pertenecientes a la vía PPP. Se requeriría información de la capacidad de cada una de las enzimas para poder determinar una distribución de flujo más cercana a la que se esperaría observar *in vivo*.

En la glucólisis inferior se observa el *knock-out* de la reacción R230, que convierte G3P en DHAP. Esto fuerza a que se produzca DHAP a partir de L-serina, proveniente de la vía de síntesis independiente de la luz. Debido a esto, una gran parte del 3PG producido en la RuBisCO se dirige a esta vía, dejando menos disponible para la glucólisis inferior. Esta modificación es la causante de que la producción de piruvato ocurra a partir de L-serina, y no a partir de fosfoenolpiruvato (flecha roja en la Figura 5.6 a partir de SER). En el Capítulo 4 se discutieron dos casos de vías de producción de PYR, aquí se observa una nueva que aún no había sido considerada. La vía alternativa a partir de (S)-malato no es viable en este caso debido al *knock-out* de la reacción R512.

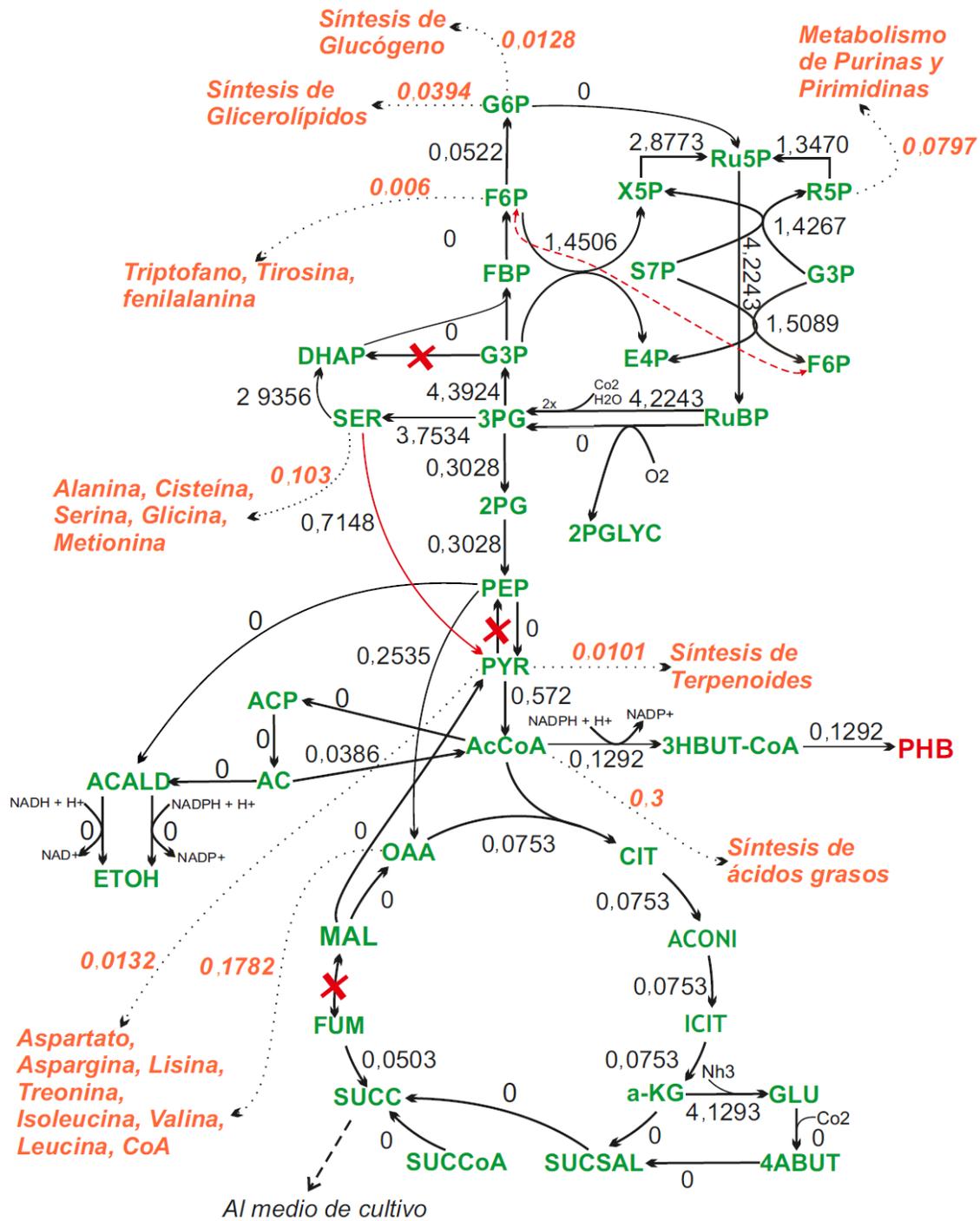


Figura 5.6. Distribución de flujo optimizada para tasa de crecimiento máxima en estado de limitación por carbono para el mutante acoplado M2 con 10 *knock-outs*. Los valores de flujo están dados en $\text{mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$. La tasa de captación de carbono inorgánico como CO_2 es $0,336 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$ y $3,364 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$ como HCO_3^- ; $v_{\text{CO}_2} + v_{\text{HCO}_3^-} \leq 3,7 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$. El flujo de fotones es $100 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{h}^{-1}$. Las captaciones de fósforo, nitrógeno y sulfato no están restringidas.

Para tener una mejor comprensión de lo que ocurre con el piruvato en el mutante acoplado, se resolvió un FBA incluyendo una cota inferior al flujo catalizado por piruvato quinasa (R495) con el mismo valor que el flujo de PEP proveniente de 2PG que se muestra en la Figura 5.6. Se obtiene una disminución del crecimiento de 16% y un aumento al doble de la tasa de producción de PHB. También aumenta un 5% el carbono fijado por la RuBisCO, y la velocidad de producción de succinato resulta un 16% menor. Igualmente, la reacción de SER a PYR continúa activa con un flujo menor. No puede determinarse nada más sin contar con información experimental sobre estas vías, pero los resultados obtenidos son muy alentadores respecto de la producción de PHB si se considera que es esperable que en un caso *in vivo* la vía clásica de producción de PYR a partir de PEP se encuentre activa.

Se observa también que el acetato producido se dirige a la producción de acetyl-CoA. Es esperable que este aumento en el flujo de producción de acetato se liberara al medio de existir la posibilidad, lo cual guarda relación con el *knock-out* de la reacción de excreción de acetato, que al no estar activa, fuerza la reacción que transforma este compuesto acetyl-CoA.

El ciclo de Krebs se encuentra interrumpido por el *knock-out* de la reacción de conversión de fumarato en (S)-malato. Esto ocasiona que la producción de fumarato no ocurra en este ciclo, sino a partir de un desvío en las vías de producción de aminoácidos y purinas (R45, R546 y R542). Estas reacciones también se encuentran activas en la cepa silvestre, pero la producción de fumarato es mayor debido a la producción a partir de succinato. Se analiza un caso sin el *knock-out* de la excreción de fumarato y se obtiene que la producción de PHB continúa acoplada al crecimiento, pero la relación entre ambas tasas favorece la producción de biomasa, y se observa excreción de fumarato al medio. Según estudios experimentales existe excreción de fumarato (Du *et al.*, 2019) y de succinato (Hasunuma *et al.*, 2016b) al

medio en condiciones de oscuridad en *Synechocystis*, lo cual vuelve viable *in vivo* a cualquiera de estos dos escenarios.

5.2.3. Estimación de productividad

Se utiliza el modelo extracelular descrito en la Sección 4.3.2.2 del Capítulo 4 para estimar productividades y concentraciones que podrían obtenerse con la cepa acoplada, a partir de las tasas obtenidas por FBA. Dicho modelo implementado en gPROMS se resuelve para un horizonte de tiempo de dos días, considerando disminución de la disponibilidad luz. El período de dos días se seleccionó según la duración de la fase exponencial en el trabajo publicado por Foster *et al.* (2007). Con fines comparativos, para realizar la conversión de mmol PHB L⁻¹ a g L⁻¹ (unidades de los datos experimentales) se utiliza el peso molecular del monómero de PHB (86 g mol⁻¹).

En la Figura 5.7 se presentan los perfiles del modelo extracelular obtenidos a partir de las tasas calculadas por el GEM de M4. Las concentraciones finales de biomasa y PHB fueron de 1,344 gPS L⁻¹ y 237,66 mg L⁻¹, respectivamente. Considerando el tiempo de cultivo, se puede decir entonces que la productividad del mutante M4 es de 118,68 mg L⁻¹ día⁻¹. Este valor resulta un 35% menor que el mejor reportado a la fecha para *Synechocystis* (Wang *et al.*, 2018). Dicho valor fue obtenido en un mutante con sobreexpresión del gen que codifica para la enzima acetoacetil-CoA reductasa, sin considerar limitación de nutrientes.

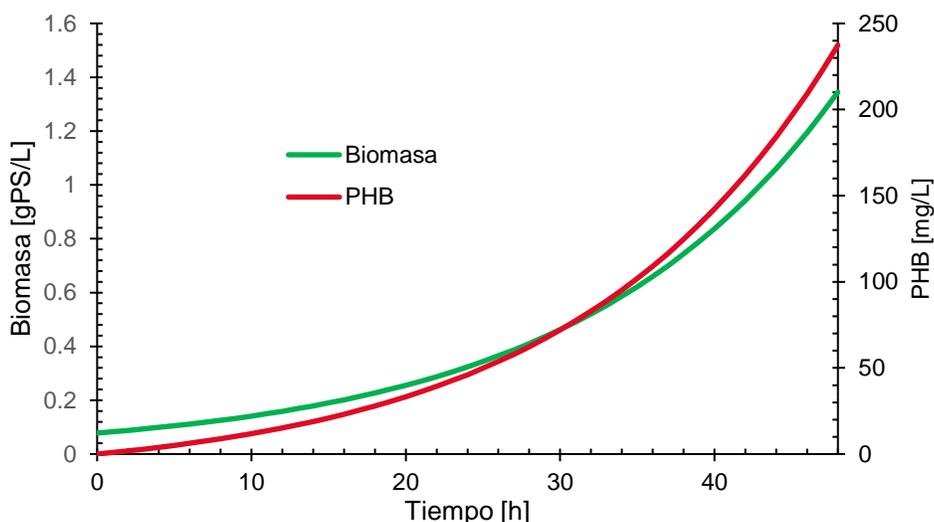


Figura 5.7. Perfiles de concentración obtenidos del modelo en gPROMS

La mayor parte de los estudios de producción de PHB en *Synechocystis* se encuentran realizados en condiciones de limitación de nitrógeno (Troschl *et al.*, 2017), fosfato y sulfato (Hirai *et al.*, 2019). Debido a esto, se evalúa el comportamiento de *Synechocystis* bajo condiciones de limitación de nitrógeno, fósforo y sulfato para estimar las productividades por medio del modelo dinámico de crecimiento. Los resultados numéricos obtenidos se presentan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Tasas de crecimiento máxima y de producción de PHB para diferentes valores de captación de nitrógeno, fósforo y azufre

	$v_{captación}$ [mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹]	$v_{biomasa}$ [h ⁻¹]	v_{PHB} [mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹]
Nitrógeno			
	0,5	0,05	0,1812
	0,4	0,04	0,085
	0,3	0,03	0,063
Fósforo			
	0,08	0,0458	0,2108
	0,06	0,0344	0,2736
	0,04	0,0229	0,3366
Sulfato			
	0,02	0,0601	0,1366
	0,01	0,0559	0,1613

Se encontró que la limitación por nitrógeno no favorece al mutante obtenido, aunque sí lo hace en los estudios experimentales de *Synechocystis* sin acoplar. El caso del fósforo resulta interesante, ya que cuanto menor es la disponibilidad de este nutriente, menor es el crecimiento y mayor la producción de PHB, lo cual plantea una situación favorable desde el punto de vista biotecnológico. Con el sulfato la situación es la misma, pero en un porcentaje notablemente menor. Estos resultados son alentadores para la producción fotosintética de PHB con *Synechocystis*, dado que podría cultivarse el mutante M4 con deficiencia de fuente de fósforo o azufre para obtener una mayor productividad, pero teniendo en consideración que la fuente de nitrógeno no resulte limitante.

Los resultados numéricos obtenidos con gPROMS con limitación de fosfato de 0,04 mmol gPS⁻¹ h⁻¹ muestran que debido a la disminución en la tasa de crecimiento, la productividad es menor, tomando un valor de 97,97 mg L⁻¹ día⁻¹, pero el contenido de PHB de las células es elevado, tomando un valor de ~85% g_{PHB}/gPS. Se debe tener en cuenta que para una disminución del 62% en la tasa de crecimiento, la disminución de la productividad es de solo un 17%.

No puede decirse que estos resultados sean mejores que los obtenidos experimentalmente en distintos estudios, pero tampoco son directamente comparables ya que en general los estudios se llevan a cabo por períodos muy prologados de tiempo, con el cultivo saliendo de fase exponencial. En el estudio de Wang *et al.* (2018), el alto contenido de PHB que se obtiene en el caso de limitación por fósforo y sulfato resulta alentador, siendo mayor que valores obtenidos para bacteria heterotróficas (Ramos, 2019). Por lo tanto, para el caso del PHB la opción de un mutante acoplado a través de varias intervenciones genéticas parece ser menos atractiva que un enfoque más simple de ingeniería metabólica donde se sobreexpresa el gen que codifica para la acetoacetyl-CoA reductasa (Wang *et al.*, 2018).

5.3. Conclusiones

Motivado por la necesidad de reemplazar los plásticos fósiles por plásticos biodegradables y de producción sustentable, en este capítulo se estudió la producción fotosintética de PHB, a partir de las formulaciones de problemas binivel desarrolladas en el Capítulo 4.

Se obtuvieron dos mutantes que acoplan la producción de PHB al crecimiento, con estrategias muy similares, siendo el más alentador el que se obtiene por medio de 16 *knock-outs*, ya que brinda una producción de PHB por gramo de biomasa un 25% mayor. El número de intervenciones resulta más elevado que en el caso de los mutantes que acoplan producción de etanol, lo cual podría relacionarse con la mayor complejidad metabólica que presenta la producción de PHB, que se ve reflejada en el aumento del tiempo de resolución de los problemas MILP asociados a este producto. Como se mencionó en el capítulo anterior, se espera que las nuevas tecnologías *CRISPR* permitan realizar modificaciones genéticas simultáneas en cianobacterias.

Aunque la productividad obtenida con el mutante M4 es menor que la mejor reportada experimentalmente, los resultados numéricos indican una acumulación de PHB un 58% más elevada que los datos experimentales.

Conclusiones

6.1. Conclusiones generales

En esta tesis se han realizado contribuciones al estudio de la producción fotosintética de combustibles de cuarta generación y de bioplásticos biodegradables, mediante el desarrollo de modelos matemáticos metabólicos a escala genómica. Los GEMs desarrollados han sido curados frente a bibliografía actualizada y, evaluados y validados frente a datos experimentales fisiológicos y ómicos.

Con el modelo curado y validado, se han formulado problemas de programación binivel con el objetivo de buscar estrategias de acoplamiento, a través de la supresión de genes, entre el crecimiento y la producción del compuesto de interés con el objetivo de convertir el metabolito deseado en un subproducto obligado del crecimiento y en consecuencia, su producción resulta una parte integral de la función metabólica del organismo. Dichos problemas se han aplicado exitosamente al diseño de cepas productoras de etanol y PHB. Además, se han evaluado estrategias de producción en dos etapas para estos compuestos, y sus índices de producción han sido comparados con los obtenidos en la bibliografía y con las respectivas cepas acopladas.

Los modelos desarrollados y validados representan herramientas útiles para el diseño de cepas industriales para la producción fotosintética no solo de biocombustibles y bioplásticos, sino también de compuestos de interés en una gran variedad de industrias como la farmacéutica, la nutracéutica, de biofertilizantes, entre otros.

6.2. Conclusiones particulares

En el **Capítulo 2** se curó manualmente un modelo de *Synechocystis* existente para obtener una herramienta que brinde resultados más precisos al determinar flujos metabólicos bajo diferentes condiciones ambiental y para el diseño de cepas *in silico*. Esta curación se realizó a partir de la incorporación de información experimental de bibliografía específica actualizada. Se incluyeron modificaciones en el mecanismo de concentración del carbono, en ambas vías de producción de etanol (heteróloga y natural), en la vía de producción de acetato, en el ciclo de Krebs, en la vía de producción de glucógeno y finalmente, se validó la vía de producción de L-serina independiente de la luz. El GEM obtenido cuenta con 704 reacciones y 535 metabolitos.

En el **Capítulo 3** se realizó un análisis detallado del GEM curado a partir de información fisiológica y fluxómica de *Synechocystis*, disponibles en el grupo y en bibliografía, respectivamente. Los resultados obtenidos por FBA para el GEM son consistentes con dicha información experimental, y también son mejores que las predicciones obtenidas en trabajos anteriores de literatura asociada. Los datos de ^{13}C MFA que se agregaron al modelo permitieron obtener cotas más significativas biológicamente para el GEM de *Synechocystis* en condiciones de crecimiento fotoautotrófico. Por medio de un análisis de los parámetros fotosintéticos se pudo observar que la relación necesaria de ATP/NADPH no se alcanza por medio de la vía lineal de transporte de electrones, lo cual vuelve necesario el aporte de las vías alternativas para alcanzar una relación óptima de ATP/NADPH que asegure la fijación de carbono en el ciclo de Calvin. En base a estudios computacionales e información experimental, se determinó fijar a la reacción tipo Mehler un flujo correspondiente a un 20% de la evolución de O_2 en el fotosistema II, lo cual ocasiona un aumento en el flujo de fotones que ingresan a dicho fotosistema. Se pudo ver que la mayor

parte del carbono fijado a través de la enzima RuBisCO se utiliza en la producción de aminoácidos, nucleótidos y glicerolípidos, tres tipos de macromoléculas precursoras de la biomasa. El carbono fijado restante se divide entre el metabolismo del piruvato, la formación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs, donde se sintetizan moléculas precursoras de aminoácidos, y la vía de producción de L-serina independiente de la luz.

Considerando todos los análisis desarrollados, se pudo determinar que el GEM curado resulta una herramienta fiable para el diseño de cepas productoras de bioproductos, debido a que los resultados obtenidos muestran que representa correctamente la información biológica disponible.

En el **Capítulo 4** se estudió la producción fotosintética de etanol con *Synechocystis* por dos estrategias diferentes: producción acoplada al crecimiento y producción en dos etapas. La primera estrategia se basa en lograr que el microorganismo se encuentre obligado a producir el compuesto de interés para crecer, y matemáticamente se logró por medio del desarrollo de una nueva formulación de un problema de programación binivel en el que se relacionan las variables binarias a genes y no a reacciones como en los algoritmos disponibles OptKnock y OptForce. Esto se logró mediante la inclusión del mapeo GPR al problema, lo cual aporta un mayor sentido biológico a los resultados tendiente a implementarlos en una estrategia de ingeniería metabólica *in vivo*. La segunda estrategia implica la producción de biomasa en un primer reactor y la producción de etanol en un segundo biorreactor donde las condiciones estén dadas para que el cultivo se encuentra en fase estacionaria. Esta estrategia surge de estudios experimentales de bibliografía que muestran una atractiva producción de etanol con *Synechocystis* bajo condiciones de limitación de nitrógeno.

Se obtuvieron dos mutantes acoplados, de los cuales el más atractivo desde el punto de vista de biotecnológico cuenta con 13 knock-outs, y brinda una producción teórica máxima de etanol un 235% más elevada que la mejor obtenida experimentalmente. Los mutantes acoplados son atractivos porque resultan en fenotipos más estables, pero el número de intervenciones obtenidos es elevado. Sin embargo, nuevas herramientas de modificación genética de cianobacterias (tecnología CRISPR) que se encuentran en desarrollo permitiría la modificación simultánea de múltiples genes, lo cual permitiría el desarrollo de este tipo de mutantes acoplados.

Los resultados obtenidos para la estrategia de dos etapas muestran una producción un 177% más elevada en el caso de limitación por fósforo, y un 142% en el caso de limitación por nitrógeno, ambos casos respecto al mutante acoplado. Estos valores resultan alentadores para analizarlos en mayor detalle de forma experimental, aunque debe tener en cuenta que se obtuvieron con modelos simplificados.

En conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo son alentadores respecto al diseño de fábricas celulares basadas en cianobacterias.

En el **Capítulo 5** en base a los resultados experimentales de producción de PHB bajo condiciones de limitación de nutrientes observados en bibliografía específica, se utilizaron las formulaciones binivel desarrolladas en el Capítulo 4 con el objetivo de acoplar la producción fotosintética de PHB al crecimiento, en el marco de la necesidad de reemplazo de los plásticos fósiles por una alternativa biodegradable y sustentable.

Fue posible conseguir dos mutantes con producción de PHB acoplada al crecimiento, de los cuales el más atractivo se obtiene por medio de 16 intervenciones genéticas. A

diferencia del caso de etanol, las estrategias son muy similares, con solamente dos *knock-outs* de diferencia.

El análisis de la distribución de flujos del mutante seleccionado muestra mayores desviaciones respecto a la cepa silvestre que el mutante que acopla producción de etanol, lo cual revela una mayor complejidad metabólica de la síntesis de PHB. Este hecho también se ve reflejado en el aumento en el tiempo de resolución del problema MILP proveniente del problema binivel reformulado.

La comparación de la tasa de producción de PHB de la cepa acoplada muestra valores menores a los mejores obtenidos experimentalmente, pero debe tenerse en cuenta que los estudios experimentales se llevan a cabo por un tiempo más prolongado que el considerado para los modelos simplificados utilizados para la estimación. Igualmente, los gramos de PHB acumulados por gramo de biomasa resultan un 58% más elevados que los mejores datos experimentales de bibliografía.

6.3. Proyecciones

En el diseño de un nuevo bioproceso, es fundamental identificar los valores target de producción para alcanzar la viabilidad económica del proyecto (Figura 1.2). Para ello, es esencial realizar una evaluación de la factibilidad técnico-económica del bioproceso bajo las condiciones tecnológicas, económicas, regulatorias y de mercado actuales. Se propone la realización del análisis técnico-económico de la producción fotosintética de etanol en base a modelos de superestructura que integren los balances de masa, energía y las ecuaciones de diseño de equipos para evaluar los enfoques de producción de etanol acoplada al crecimiento y en dos etapas en base a los resultados obtenidos en esta tesis.

Por otra parte, se propone implementar distintos algoritmos de programación matemática para integrar datos cuantitativos de ómicas disponibles en la literatura (Borirak *et al.*, 2015; Maruyama *et al.*, 2019; Werner *et al.*, 2019; Yoshikawa *et al.*, 2013; You *et al.*, 2014) al GEM desarrollado de *Synechocystis* con el objetivo de mejorar las predicciones fenotípicas de la especie. Dentro de los algoritmos a implementar se pueden mencionar los métodos GIMME e iMAT para datos de transcriptómica, IOMA para datos de proteómica y metabolómica, y E-flux para datos de fluxómica (Fondi & Liò, 2015).

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

A continuación, se presentan los trabajos y publicaciones a congresos generados a partir del presente trabajo de tesis:

PUBLICACIONES EN REVISTAS CON REFERATO

- **Lasry Testa, R.**, Delpino, C., Estrada, V. y Díaz, M. S. 2019. "In Silico Strategies to Couple Production of Bioethanol with Growth in Cyanobacteria". *Biotechnology & Bioengineering*.
- **Lasry Testa, R.**, Delpino, C., Estrada, V., Diaz, M.S., 2019, "Bioethanol Production with Cyanobacteria by a Two-stage Fermentation Strategy". *Computer Aided Chemical Engineering*.
- **Lasry Testa, R.**, Delpino, C., Estrada, V. y Díaz, M. S. 2017. "Metabolic Network design of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to obtain bioethanol under autotrophic conditions". *Computer Aided Chemical Engineering*, 40: 2857-2862.

CONGRESOS INTERNACIONALES

- **Lasry Testa, R.**, Delpino, C., Estrada, V., Diaz, M.S., 2016, "Metabolic Network Design for Ethanol Production by *Synechocystis* sp. PCC 6803", AIChE Annual meeting, 13-18 Nov., San Francisco, Estados Unidos.
- **Lasry Testa, R.**, Delpino, C., Durruty, G., Estrada, V., Diaz, M.S., 2016, "Fourth Generation Biofuels: Metabolic Modelling of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for Ethanol Production", 2nd RCN Conference on Pan American Biofuels & Bioenergy Sustainability, 13-16 Sep, Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- **R. Lasry**, C. Delpino, V. Estrada, J. Laiglecia, R. Vidal Vidal, F. Florencio, M. García Guerrero, M. Soledad Diaz, 2016, "Dynamic Flux Balance Analysis of a Genetic Engineered Cyanobacterium: Integration of Metabolic Network and Photobioreactor Model". Invited lecture in: XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología – XIV Congreso Argentino de Microbiología, 26-30 Sep, Rosario, Santa Fe, Argentina.

CONGRESOS NACIONALES

- **Lasry Testa, R.**, Diaz, M.S., Estrada, V., Delpino, C., 2017, “Producción de bioetanol a partir de cianobacterias por medio de estrategias de optimización aplicando modelos de redes metabólicas”, X Simposio REDBIO, 11 – 13 Septiembre, Bahía Blanca, Buenos Aires.
- Estrada, V., Delpino, C., **Lasry Testa, R.**, García Prieto, C.V., Ramos, F.D., Di Maggio, J., Díaz, M.S., 2017, “Estrategias de modelado matemático para el diseño y optimización de sistemas biotecnológicos” (Mesa Panel: "Biotecnología Industrial y Bioenergías"), X Simposio REDBIO, 11 – 13 Septiembre, Bahía Blanca, Buenos Aires.
- **Lasry Testa, R.**, Diaz, M.S., Estrada, V., Delpino, C., 2017, “Estrategias de Optimización Aplicadas a Modelos de Redes Metabólicas de Cianobacterias para Mejorar la Producción de Bioetanol”, IX CAIQ, 6 – 9 Agosto., Bahía Blanca, Buenos Aires.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Alberto, J., Costa, V., Moreira, J.B., Lucas, F., Braga, S., Paula, A., Cassuriaga, A., Morais, M.G. De, Al, C.E.T., 2018. Recent Advances and Future Perspectives of PHB Production by Cyanobacteria 1214, 249–256. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0017>
- Ali Shah, S.A., Akhter, N., Auckloo, B.N., Khan, I., Lu, Y., Wang, K., Wu, B., Guo, Y.W., 2017. Structural diversity, biological properties and applications of natural products from cyanobacteria. A review. *Mar. Drugs* 15. <https://doi.org/10.3390/md15110354>
- Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., Cournac, L., Aro, E.M., 2011. Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 286, 24007–24014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223289>
- Angione, C., Conway, M., Lió, P., 2016. Multiplex methods provide effective integration of multi-omic data in genome-scale models. *BMC Bioinformatics* 17. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0912-1>
- Aro, E.M., 2016. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio* 45, 24–31. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>
- Arteni, A.A., Ajlani, G., Boekema, E.J., 2009. Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1787, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.009>
- Atsumi, S., Higashide, W., Liao, J.C., 2009. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat. Biotechnol.* 27, 1177–1180. <https://doi.org/10.1038/nbt.1586>

B

- Badger, M.R., Price, G.D., 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution 54, 609–622. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg076>

- Baroukh, C., Muñoz-Tamayo, R., Steyer, J.P., Bernard, O., 2015. A state of the art of metabolic networks of unicellular microalgae and cyanobacteria for biofuel production. *Metab. Eng.* 30, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.019>
- Becker, J., Reinefeld, J., Stellmacher, R., Schäfer, R., Lange, A., Meyer, H., Lalk, M., Zelder, O., von Abendroth, G., Schröder, H., Haefner, S., Wittmann, C., 2013. Systems-wide analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in bio-succinate producing *Basfia succiniciproducens*. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 3013–3023. <https://doi.org/10.1002/bit.24963>
- Becker, J., Zelder, O., Häfner, S., Schröder, H., Wittmann, C., 2011. From zero to hero- Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-lysine production. *Metab. Eng.* 13, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.01.003>
- Behler, J., Vijay, D., Hess, W.R., Akhtar, M.K., 2018. CRISPR-Based Technologies for Metabolic Engineering in Cyanobacteria. *Trends Biotechnol.* 36, 996–1010. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.011>
- Bhati, R., 2019. Biodegradable Plastics Production by Cyanobacteria, in: *Biotechnology Products in Everyday Life*. Springer International Publishing, pp. 131–143. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-92399-4>
- Borirak, O., de Koning, L. J., van der Woude, A. D., Hoefsloot, H. C. J., Dekker, H. L., Roseboom, W., ... Hellingwerf, K. J. (2015). Quantitative proteomics analysis of an ethanol- and a lactate-producing mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0294-z>
- Botana, L.M., Alfonso, A., 2015. *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- BP Statistical Review of World Energy, 2019. *BP Statistical Review of World Energy Statistical Review of World*. Spencer, Dale 1–69.
- Burgard, A.P., Pharkya, P., Maranas, C.D., 2003. OptKnock: A Bilevel Programming Framework for Identifying Gene Knockout Strategies for Microbial Strain Optimization. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 647–657. <https://doi.org/10.1002/bit.10803>

C

- Carpine, R., Du, W., Olivieri, G., Pollio, A., Hellingwerf, K.J., Marzocchella, A., Branco dos Santos, F., 2017. Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly- β -hydroxybutyrate overproduction. *Algal Res.* 25, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.013>
- Carrieri, D., Lombardi, T., Paddock, T., Cano, M., Goodney, G.A., Nag, A., Old, W., Maness, P.C., Seibert, M., Ghirardi, M., Yu, J., 2017. Transcriptome and proteome analysis of nitrogen starvation responses in *Synechocystis* 6803 Δ glgC, a mutant incapable of glycogen storage. *Algal Res.* 21, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.003>
- Caspi, R., Hartmut, F., Carol A., F., Hopkinson, R., Ingraham, J., Kaipa, P., Krummenacker, M., Paley, S., Pick, J., Y. Rhee, S., Tissier, C., Peifen, Z., D.Karp, P., 2006. MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res.* 34, D511–D516. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj128>
- Chae, T.U., Choi, S.Y., Kim, J.W., Ko, Y., 2017. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 47, 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.06.007>
- Choi, K.R., Jang, W.D., Yang, D., Cho, J.S., Park, D., Lee, S.Y., 2019. Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic Engineering. *Trends Biotechnol.* 37, 817–837. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.01.003>
- Chowdhury, A., Zomorodi, A.R., Maranas, C.D., 2015. Bilevel optimization techniques in computational strain design. *Comput. Chem. Eng.* 72, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2014.06.007>
- Cohen, S. E., & Golden, S. S. (2015). Circadian rhythms in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(4), 373–385. <https://doi.org/10.1128/mubr.00036-15>
- Costa, S.S., Miranda, A.L., de Morais, M.G., Costa, J.A.V., Druzian, J.I., 2019. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 131, 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099>
- Crawford, C. B., & Quinn, B. (2016). *Microplastic Pollutants*, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/c2015-0-04315-5>
- Crown, S.P., Long, C.P., Antoniewicz, M.R., 2016. Optimal tracers for parallel labeling

experiments and 13 C metabolic flux analysis: A new precision and synergy scoring system. *Metab. Eng.* 30, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

D

- Davies, F.K., Work, V.H., Beliaev, A.S., Posewitz, M.C., 2014. Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00021>
- Deng, M. De, Coleman, J.R., 1998. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 523–528.
- Dexter, J., Armshaw, P., Sheahan, C., Pembroke, J.T., 2015. The state of autotrophic ethanol production in Cyanobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 119, 11–24. <https://doi.org/10.1111/jam.12821>
- Dexter, J., Fu, P., 2009. Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. *Energy Environ. Sci.* 2, 857. <https://doi.org/10.1039/b811937f>
- Di Maggio, J., Blanco, A.M., Bandoni, J.A., Díaz Ricci, J.C., Diaz, M.S., 2017. Design of stable metabolic networks. *Eng. Life Sci.* 17, 908–915. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700065>
- Di Maggio, J., Diaz Ricci, J.C., Diaz, M.S., 2010. Global sensitivity analysis in dynamic metabolic networks. *Comput. Chem. Eng.* 34, 770–781. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2010.01.006>
- Di Maggio, J., Paulo, C., Estrada, V., Perotti, N., Diaz Ricci, J.C., Diaz, M.S., 2014. Parameter estimation in kinetic models for large scale biotechnological systems with advanced mathematical programming techniques. *Biochem. Eng. J.* 83, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.12.012>
- Di Maggio, J.A., 2012. Análisis, Modelamiento Y Optimización De Caminos Metabólicos 203.
- Dienst, D., Georg, J., Abts, T., Jakorew, L., Kuchmina, E., Börner, T., Wilde, A., Dühring, U., Enke, H., Hess, W.R., 2014. Transcriptomic response to prolonged ethanol production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol. Biofuels* 7, 21. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-21>

- Dittmann, E., Fewer, D.P., Neilan, B.A., 2013. Cyanobacterial toxins: Biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 23–43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.12000.x>
- Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K., Fewer, D.P., 2015. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 23, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.008>
- Du, W., Jongbloets, J.A., Guillaume, M., Van De Putte, B., Battaglino, B., Hellingwerf, K.J., Branco Dos Santos, F., 2019. Exploiting Day- And Night-Time Metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for Fitness-Coupled Fumarate Production around the Clock. *ACS Synth. Biol.* 8, 2263–2269. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00289>
- Ducat, D.C., Avelar-Rivas, J.A., Way, J.C., Silvera, P.A., 2012. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2660–2668. <https://doi.org/10.1128/AEM.07901-11>
- Duehring, U., Baier, K., Germer, F., Shi, T., 2012. Genetically enhanced cyanobacteria for the production of a first chemical compound harbouring zn²⁺, c^o2⁺ or ni²⁺ -inducible promoters. WO 2013/098267 A1.
- Duehring, U., Lee, J., Bai, 2014. Genetically enhanced cyanobacteria lacking functional genes conferring bocde resistance for the production of chemical compounds. US 2014/0154762 A1.

E

- Erdrich, P., Knoop, H., Steuer, R., Klamt, S., 2014. Cyanobacterial biofuels: new insights and strain design strategies revealed by computational modeling. *Microb. Cell Fact.* 13, 128. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0128-x>
- European Bioplastics, 2018. Bioplastics market development update 2018 2019, 2018–2019.
- ExxonMobil, 2017. ExxonMobil Algae Biofuels Research and Development Programme.

F

- Fondi, M., & Liò, P. (2015). Multi -omics and metabolic modelling pipelines: Challenges and tools for systems microbiology. *Microbiological Research*, 171, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.003>
- Fondi, M., 2018. *Metabolic Network Reconstruction and Modeling*. Springer Science.
- Fong, S.S., Burgard, A.P., Herring, C.D., Knight, E.M., Blattner, F.R., Maranas, C.D., Palsson, B.O., 2005. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 643–648. <https://doi.org/10.1002/bit.20542>
- Formighieri, C., 2015. Solar-to-fuel conversion in algae and cyanobacteria. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16730-5>
- Formighieri, C., Melis, A., 2014. Regulation of β -phellandrene synthase gene expression, recombinant protein accumulation, and monoterpene hydrocarbons production in *Synechocystis* transformants. *Planta* 240, 309–324. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2080-8>
- Foster, J.S., Singh, A.K., Rothschild, L.J., Sherman, L.A., 2007. Growth-phase dependent differential gene expression in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and regulation by a group 2 sigma factor. *Arch. Microbiol.* 187, 265–279. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0193-6>
- Fu, P., 2009. Genome-scale modeling of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and prediction of pathway insertion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 473–483. <https://doi.org/10.1002/jctb.2065>
- Fujisawa, T., Narikawa, R., Maeda, S.I., Watanabe, S., Kanesaki, Y., Kobayashi, K., Nomata, J., Hanaoka, M., Watanabe, M., Ehira, S., Suzuki, E., Awai, K., Nakamura, Y., 2017. CyanoBase: A large-scale update on its 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* 45, D551–D554. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1131>

G

- Gao, Z., Zhao, H., Lia, Z., Tana, X., Lu, X., 2012. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy Environ. Sci.* 5, 9857–9865. <https://doi.org/10.1039/C2EE22675H>
- García Prieto, C. V., 2018. Diseño Óptimo de Biorrefinerías Integradas Basadas en Microalgas. Universidad Nacional del Sur.
- García Sánchez, C.E., Torres Sáez, R.G., 2014. Comparison and analysis of objective functions in flux balance analysis. *Biotechnol. Prog.* 30, 985–991. <https://doi.org/10.1002/btpr.1949>
- Glover, F., 1975. Improved linear integer programming formulations of nonlinear integer problems. *Manag. Sci.* 22, 455–460. <https://doi.org/10.1287/mnsc.22.4.455>

H

- Hallenbeck, P.C., 2017. Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes.
- Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Turner, S., Swainston, N., Mendes, P., Steinbeck, C., 2016. ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Res.* 44, D1214–D1219. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1031>
- Hasunuma, T., Matsuda, M., Kondo, A., 2016a. Improved sugar-free succinate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 following identification of the limiting steps in glycogen catabolism. *Metab. Eng. Commun.* 3, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.04.003>
- Hasunuma, T., Matsuda, M., Kondo, A., 2016b. Improved sugar-free succinate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 following identification of the limiting steps in glycogen catabolism. *Metab. Eng. Commun.* 3, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.04.003>
- Hauf, W., Schlebusch, M., Hüge, J., Kopka, J., Hagemann, M., Forchhammer, K., 2013. Metabolic Changes in *Synechocystis* PCC6803 upon Nitrogen-Starvation: Excess

- NADPH Sustains Polyhydroxybutyrate Accumulation. *Metabolites* 3, 101–118. <https://doi.org/10.3390/metabo3010101>
- Hein, S., Tran, H., Steinbüchel, A., 1998. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 170, 162–170. <https://doi.org/10.1007/s002030050629>
- Hendry, J.I., Prasannan, C.B., Joshi, A., Dasgupta, S., Wangikar, P.P., 2016. Metabolic model of *Synechococcus* sp. PCC 7002: Prediction of flux distribution and network modification for enhanced biofuel production. *Bioresour. Technol.* 213, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.128>
- Hernandez-prieto, M.A., Futschik, M.E., 2012. CyanoEXpress: A web database for exploration and visualisation of the integrated transcriptome of. *Bioinformatics* 8.
- Hirai, K., Nojo, M., Sato, Y., Tsuzuki, M., Sato, N., 2019. Contribution of protein synthesis depression to poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under nutrient-starved conditions. *Sci. Rep.* 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56520-w>
- Hirokawa, Y., Suzuki, I., Hanai, T., 2015. Optimization of isopropanol production by engineered cyanobacteria with a synthetic metabolic pathway. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.10.005>
- Hjersted, J.L., Henson, M.A., 2008. Optimization of Fed-Batch *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Using Dynamic Flux Balance Models. *Biotechnol. Prog.* 22, 1239–1248. <https://doi.org/10.1021/bp060059v>
- Hong, K.K., Nielsen, J., 2012. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: A key cell factory platform for future biorefineries. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2671–2690. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0945-1>
- Hong, S.J., Lee, C.G., 2007. Evaluation of central metabolism based on a genomic database of *Synechocystis* PCC6803. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12, 165–173. <https://doi.org/10.1007/BF03028644>
- Hu, G., Li, Y., Ye, C., Liu, L., Chen, X., 2019. Engineering Microorganisms for Enhanced CO₂ Sequestration. *Trends Biotechnol.* 37, 532–547. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.008>
- Hucka, M., Finney, A., Sauro, H.M., Bolouri, H., Doyle, J.C., 2003. The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models 19, 524–531. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg015>
- Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H., Visser, P.M.,

2018. Cyanobacterial blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 471–483.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>

I

I

gnizio, J.P., Cavalier, T.M., 1994. *Linear Programming*. Pearson.

Ihlenfeldt, M.J.A., Gibson, J., 1977. Acetate Uptake by the Unicellular Cyanobacteria *Synechococcus* and *Aphanocapsa*. *Arch. Microbiol.* 113, 231–241.

IPCC, 2014. Summary for policymakers. *Clim. Chang. 2014 Mitig. Clim. Chang. Contrib. Work. Gr. III to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.* [Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, 16–33.
https://doi.org/http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg2/en/spm.html

J

Jacobsen, J.H., Frigaard, N.U., 2014. Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO₂ in a cyanobacterium. *Metab. Eng.* 21, 60–70.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.11.004>

Jantaro, S., Mäenpää, P., Mulo, P., Incharoensakdi, A., 2003. Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 228, 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00747-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00747-X)

K

Kamravamanesh, D., Lackner, M., Herwig, C., 2018. Bioprocess engineering aspects of sustainable polyhydroxyalkanoate production in cyanobacteria. *Bioengineering* 5, 1–18. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING5040111>

Kanehisa, M., Goto, S., 1999. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic*

- Acids Res. 27, 29–34. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Yamada, M., Tabata, S., 2003. Structural Analysis of Four Large Plasmids Harboring in a Unicellular Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 10, 221–228. <https://doi.org/10.1093/dnares/10.5.221>
- Kaneko, T., Tanaka, A., Sato, S., Kotani, H., Sazuka, T., Miyajima, N., Sugiura, M., Tabata, S., 1997. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 680. Sequence features in the Mb1 region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Res.* 2, 153–166.
- Khanna, N., Lindblad, P., 2015. Cyanobacterial hydrogenases and hydrogen metabolism revisited: Recent progress and future prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 10537–10561. <https://doi.org/10.3390/ijms160510537>
- Khetkorn, W., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Jantaro, S., 2016. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes, *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., Bolton, E.E., 2019. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* 47, D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
- Kim, W.J., Kim, H.U., Lee, S.Y., 2017. Current state and applications of microbial genome-scale metabolic models. *Curr. Opin. Syst. Biol.* 2, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.03.001>
- Kind, S., Neubauer, S., Becker, J., Yamamoto, M., Völkert, M., Abendroth, G. von, Zelder, O., Wittmann, C., 2014. From zero to hero - Production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 25, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.05.007>
- Kitano, H., 2015. Accelerating systems biology research and its real world deployment. *npj Syst. Biol. Appl.* 1, 15009. <https://doi.org/10.1038/npjbsa.2015.9>
- Klamt, S., Mahadevan, R., 2015. On the feasibility of growth-coupled product synthesis in microbial strains. *Metab. Eng.* 30, 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.05.006>
- Klemenčič, M., Nielsen, A.Z., Sakuragi, Y., Frigaard, N.U., Čelešnik, H., Jensen, P.E., Dolinar, M., 2017. Synthetic biology of cyanobacteria for production of biofuels and

- high-value products, in: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*. pp. 305–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00013-3>
- Klemke, F., Baier, A., Knoop, H., Kern, R., Jablonsky, J., Beyer, G., Volkmer, T., Steuer, R., Lockau, W., Hagemann, M., 2015. Identification of the light-independent phosphoserine pathway as an additional source of serine in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 161, 1050–1060. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000055>
- Klipp, E., Liebermeister, W., Wierling, C., Kowald, A., Lehrach, H., Herwig, R., 2009. *Systems Biology: A Textbook*, Time. Wiley-VCH.
- Knoop, H., Gründel, M., Zilliges, Y., Lehmann, R., Hoffmann, S., Lockau, W., Steuer, R., 2013a. Flux Balance Analysis of Cyanobacterial Metabolism: The Metabolic Network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS Comput. Biol.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003081>
- Knoop, H., Gründel, M., Zilliges, Y., Lehmann, R., Hoffmann, S., Lockau, W., Steuer, R., 2013b. Flux Balance Analysis of Cyanobacterial Metabolism: The Metabolic Network of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS Comput. Biol.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003081>
- Knoop, H., Zilliges, Y., Lockau, W., Steuer, R., 2010. The metabolic network of *Synechocystis* sp. PCC 6803: systemic properties of autotrophic growth. *Plant Physiol.* 154, 410–422. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157198>
- Knoot, C.J., Ungerer, J., Wangikar, P.P., Pakrasi, H.B., 2018. Cyanobacteria: Promising biocatalysts for sustainable chemical production. *J. Biol. Chem.* 293, 5044–5052. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.815886>
- Koch, M., Doello, S., Gutekunst, K., Forchhammer, K., 2019. PHB is produced from Glycogen turn-over during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20081942>
- Komárek, J., 2003. Coccoid and Colonial Cyanobacteria, in: *Freshwater Algae of North America*. pp. 59–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-741550-5.50004-0>
- Kramer, D.M., Evans, J.R., 2011. The Importance of Energy Balance in Improving Photosynthetic Productivity. *Plant Physiol.* 155, 70–78. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166652>
- Krömer, J., Quek, L.-E., Nielsen, L., 2009. ¹³C-Fluxomics: a tool for measuring metabolic phenotypes. *Aust. Biochem.* 40, 17–20.

Kufryk, G.I., Sachet, M., Schmetterer, G., Vermaas, W.F.J., 2002. Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a tool for genetic mapping: Optimization of efficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 215–219. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00540-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00540-7)

L

Laerke Hansen, A.S., Lennen, R.M., Sonnenschein, N., Herrgard, M.J., 2017. Systems biology solutions for biochemical production challenges. *Curr. Opin. Biotechnol.* 85–91.

Lagarde, D., Beuf, L., 2000. Increased Production of Zeaxanthin and Other Pigments by Application of Genetic Engineering Techniques to *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 *66*, 64–72.

Lai, M.C., Lan, E.I., 2015. Advances in metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic biochemical production. *Metabolites* 5, 636–658. <https://doi.org/10.3390/metabo5040636>

Laiglecia, J., Estrada, V., Vidal, R., Florencio, F.J., 2013. Dynamic Flux Balance Analysis of a Genetic Engineered Cyanobacterium for Ethanol Production. *Chem. Eng. Trans.* 32, 955–960. <https://doi.org/doi:10.3303/CET1332160>

Lan, E.I., Liao, J.C., 2011. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. *Metab. Eng.* 13, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.04.004>

Lee, J.W., Choi, S., Park, J.H., Vickers, C.E., Nielsen, L.K., Lee, S.Y., 2010. Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning β -fructofuranosidases and its application for L-threonine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 905–913. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2825-7>

Lee, S.Y., Kim, H.U., 2015. Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nat. Biotechnol.* 33, 1061–1072. <https://doi.org/10.1038/nbt.3365>

Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R., Pakrasi, H.B., 2006. Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma* 227, 129–138. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0145-7>

Lindberg, P., Park, S., Melis, A., 2010. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab. Eng.*

12, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.10.001>

Liu, X., Sheng, J., Curtiss, R., 2011. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6899–6904. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103014108>

Liu, Y., Nielsen, J., 2019. Recent trends in metabolic engineering of microbial chemical factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* 60, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.05.010>

Luo, R.Y., Liao, S., Tao, G.Y., Li, Y.Y., Zeng, S., Li, Y.X., Luo, Q., 2006. Dynamic analysis of optimality in myocardial energy metabolism under normal and ischemic conditions. *Mol. Syst. Biol.* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1038/msb4100071>

M

MacColl, R., 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* 124, 311–334. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4062>

Machado, D., Herrgård, M., 2015. Co-evolution of strain design methods based on flux balance and elementary mode analysis. *Metab. Eng. Commun.* 2, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2015.04.001>

Machado, D., Herrgård, M.J., Rocha, I., 2016. Stoichiometric Representation of Gene–Protein–Reaction Associations Leverages Constraint-Based Analysis from Reaction to Gene-Level Phenotype Prediction. *PLoS Comput. Biol.* 12, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005140>

Maeda, S.I., Badger, M.R., Price, G.D., 2002. Novel gene products associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO₂ hydration in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol. Microbiol.* 43, 425–435. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02753.x>

Mahadevan, R., Edwards, J.S., Doyle, F.J., 2002. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 83, 1331–1340. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73903-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73903-9)

Mahadevan, R., Schilling, C.H., 2003. The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab. Eng.* 5, 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2003.09.002>

- Maranas, C.D., Zomorodi, A.R., 2016. Optimization Methods in Metabolic Networks. John Wiley & Sons, Inc.
- Maruyama, M., Nishiguchi, H., Toyoshima, M., Okahashi, N., Matsuda, F., & Shimizu, H. (2019). Time-resolved analysis of short term metabolic adaptation at dark transition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xxx(xxx). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.016>
- Meixner, K., Kovalcik, A., Sykacek, E., Gruber-brunhumer, M., Zeilinger, W., Markl, K., 2018. Cyanobacteria Biorefinery — Production of poly (3-hydroxybutyrate) with *Synechocystis salina* and utilisation of residual biomass. *J. Biotechnol.* 265, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.10.020>
- Montagud, A., Navarro, E., Fernández de Córdoba, P., Urchueguía, J.F., Patil, K.R., 2010. Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic model of a photosynthetic bacterium. *BMC Syst. Biol.* 4, 156. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-156>

N

- Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Matsuda, F., Shimizu, H., 2017. Metabolic flux analysis of the *synechocystis* sp. PCC 6803 Δ nrtABCD mutant reveals a mechanism for metabolic adaptation to nitrogen-limited conditions. *Plant Cell Physiol.* 58, 537–545. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw233>
- Nakamura, A., Akai, M., Yoshida, E., Taki, T., Watanabe, T., 2003. Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll *a'* and phylloquinone in Photosystem I of oxygenic photosynthetic organisms: Universal existence of one chlorophyll *a'* molecule in Photosystem I. *Eur. J. Biochem.* 270, 2446–2458. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03616.x>
- Namakoshi, K., Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Shimizu, H., 2016. Combinatorial deletions of *glgC* and *phaCE* enhance ethanol production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biotechnol.* 239, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.016>
- NASA, 2020. NASA: Climate Change and Global Warming [WWW Document]. URL <https://climate.nasa.gov/> (accessed 2.8.20).
- Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M., 1992. *Physiology of the Bacterial Cell: A Molecular Approach* 20, 124–125.

- Ng, C.Y., Jung, M.Y., Lee, J., Oh, M.K., 2012. Production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by in silico aided metabolic engineering. *Microb. Cell Fact.* 11, 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-68>
- Niederholtmeyer, H., Wolfstädter, B.T., Savage, D.F., Silver, P.A., Way, J.C., 2010. Engineering cyanobacteria to synthesize and export hydrophilic products. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3462–3466. <https://doi.org/10.1128/AEM.00202-10>
- Nielsen, J., 2017. Systems Biology of Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 1–35. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044757>
- Nielsen, J., Hohmann, S., 2017. *Systems Biology*. Wiley-VCH.
- Nikoloski, Z., Perez-Storey, R., Sweetlove, L.J., 2015. Inference and prediction of metabolic network fluxes. *Plant Physiol.* 169, 1443–1455. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01082>
- Nogales, J., Gudmundsson, S., Knight, E.M., Palsson, B.O., Thiele, I., 2012. Detailing the optimality of photosynthesis in cyanobacteria through systems biology analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2678–2683. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117907109>
- Noor, E., Cherkaoui, S., Sauer, U., 2019. Biological insights through omics data integration. *Curr. Opin. Syst. Biol.* 15, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2019.03.007>

O

- Okazaki, K., Sato, N., Tsuji, N., Tsuzuki, M., Nishida, I., 2006. The significance of C16 fatty acids in the sn-2 positions of glycerolipids in the photosynthetic growth of *synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Physiol.* 141, 546–556. <https://doi.org/10.1104/pp.105.075796>
- Oliver, J.W.K., Machado, I.M.P., Yoneda, H., Atsumi, S., 2013. Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1249–1254. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213024110>
- Omata, T., Price, G.D., Badger, M.R., Okamura, M., Gohta, S., Ogawa, T., 1999. Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13571–13576. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13571>
- Orth, J.D., Thiele, I., Palsson, B.O., 2010. What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* 28, 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Otero, J.M., Cimini, D., Patil, K.R., Poulsen, S.G., Olsson, L., Nielsen, J., 2013. Industrial

Systems Biology of *Saccharomyces cerevisiae* Enables Novel Succinic Acid Cell Factory. PLoS One 8, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054144>

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F., Stevens, R., 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res. 42, 206–214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>

P

Paddon, C.J., Keasling, J.D., 2014. Semi-synthetic artemisinin: A model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. Nat. Rev. Microbiol. 12, 355–367. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3240>

Palsson, B.Ø., 2006. Systems Biology: Properties of reconstructed networks.

Panda, B., Mallick, N., 2007. Enhanced poly-3-hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. Lett. Appl. Microbiol. 44, 194–198. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x>

Park, J.H., Jang, Y.S., Lee, J.W., Lee, S.Y., 2011. *Escherichia coli* W as a new platform strain for the enhanced production of L-Valine by systems metabolic engineering. Biotechnol. Bioeng. 108, 1140–1147. <https://doi.org/10.1002/bit.23044>

Park, S.H., Kim, H.U., Kim, T.Y., Park, J.S., Kim, S.S., Lee, S.Y., 2014. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. Nat. Commun. 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5618>

Plastics Europe, 2019. Plastics - the Facts 2019.

Price, G.D., Badger, M.R., Woodger, F.J., Long, B.M., 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating- mechanism (CCM): Functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. J. Exp. Bot. 59, 1441–1461. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm112>

Price, G.D., Woodger, F.J., Badger, M.R., Howitt, S.M., Tucker, L., 2004. Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 18228–18233. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405211101>

Prommeenate, P., Lennon, A.M., Markert, C., Hippler, M., Nixon, P.J., 2004. Subunit

composition of NDH-1 complexes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Identification of two new *ndh* gene products with nuclear-encoded homologues in the chloroplast Ndh complex. *J. Biol. Chem.* 279, 28165–28173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401107200>

R

- Ramos, F.D., 2019. Producción de poli(hidroxialcanoato)s (PHA)s: estudios experimentales y diseño óptimo de biorrefinerías.
- Ranganathan, S., Suthers, P.F., Maranas, C.D., 2010. OptForce: An Optimization Procedure for Identifying All Genetic Manipulations Leading to Targeted Overproductions. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000744. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000744>
- Reppas, N., Ridley, C., 2010. (12) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2010/0330642 A1 1.
- Royal Society, 2020. Climate change: evidence and causes | Royal Society [WWW Document]. URL <https://royalsociety.org/topics-policy/projects/climate-change-evidence-causes/basics-of-climate-change/> (accessed 2.8.20).

S

- Saha, R., Verseput, A.T., Berla, B.M., Mueller, T.J., Pakrasi, H.B., Maranas, C.D., 2012. Reconstruction and Comparison of the Metabolic Potential of Cyanobacteria *Cyanothece* sp. ATCC 51142 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048285>
- Sainis, I., Fokas, D., Vareli, K., Tzakos, A.G., Kounnis, V., Briasoulis, E., 2010. Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs. *Mar. Drugs* 8, 629–657. <https://doi.org/10.3390/md8030629>
- Sánchez, B.J., Zhang, C, Nilsson, A., Lahtvee, P-J., Kerkhoven, E. J. & Nielsen, J. (2017) Improving the phenotype predictions of a yeast genome-scale metabolic model by incorporating enzymatic constraints. *Mol. Syst. Biol.* 13, 935-951

- Sandberg, T.E., Salazar, M.J., Weng, L.L., Palsson, B.O., Feist, A.M., 2019. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metab. Eng.* 56, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.004>
- Santos-Merino, M., Singh, A.K., Ducat, D.C., 2019. New applications of synthetic biology tools for cyanobacterial metabolic engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00033>
- Sarkar, D., Mueller, T.J., Liu, D., Pakrasi, H.B., Id, D.M., 2019. A diurnal flux balance model of *Synechocystis* sp. PCC 6803 metabolism 1–29.
- Sarma, M.K., Kaushik, S., Goswami, P., 2016. Cyanobacteria: A metabolic power house for harvesting solar energy to produce bio-electricity and biofuels. *Biomass and Bioenergy* 90, 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.03.043>
- Savakis, P., Hellingwerf, K.J., 2015. Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO₂. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.09.007>
- Savinell, J.M., Palsson, B.O., 1992. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. I. Development of mathematical formalism. *J. Theor. Biol.* 154, 421–454. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80161-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80161-4)
- Schellenberger, J., Lewis, N.E., Palsson, B., 2011a. Elimination of thermodynamically infeasible loops in steady-state metabolic models. *Biophys. J.* 100, 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3707>
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R.M.T., Thiele, I., Orth, J.D., Feist, A.M., Zielinski, D.C., Bordbar, A., Lewis, N.E., Rahmanian, S., Kang, J., Hyduke, D.R., Palsson, B.Ø., 2011b. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Protoc.* 6, 1290–1307. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.308>
- Schledz, M., Seidler, A., Beyer, P., Neuhaus, G., 2001. A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosynthesis. *FEBS Lett.* 499, 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02508-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02508-X)
- Schomburg, I., Chang, A., Hofmann, O., Ebeling, C., Ehrentreich, F., Schomburg, D., 2002. BRENDA: A resource for enzyme data and metabolic information. *Trends Biochem. Sci.* 27, 54–56. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)02027-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)02027-8)
- Seckbach, J., Oren, A., 2007. Oxygenic Photosynthetic Microorganisms in Extreme Environments 3–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6112-7_1

- Segrè, D., Vitkup, D., Church, G.M., 2002. Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15112–15117. <https://doi.org/10.1073/pnas.232349399>
- Shabestary, K., Hudson, E.P., 2016. Computational metabolic engineering strategies for growth-coupled biofuel production by *Synechocystis*. *Metab. Eng. Commun.* 3, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.07.003>
- Shastri, A. a, Morgan, J. a, 2005. Flux balance analysis of photoautotrophic metabolism. *Biotechnol. Prog.* 21. <https://doi.org/10.1021/bp050246d>
- Shibata, M., Katoh, H., Sonoda, M., Ohkawa, H., Shimoyama, M., Fukuzawa, H., Kaplan, A., Ogawa, T., 2002. Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: Function and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.* 277, 18658–18664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112468200>
- Smith, A.J., London, J., Stanier, R.Y., 1967. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *J. Bacteriol.* 94, 972–983. <https://doi.org/10.1128/jb.94.4.972-983.1967>
- Stal, L.J., Moezelaar, R., 1997. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 179–211. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(97\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(97)00056-9)
- Steuer, R., Knoop, H., MacHné, R., 2012. Modelling cyanobacteria: From metabolism to integrative models of phototrophic growth. *J. Exp. Bot.* 63, 2259–2274. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers018>

T

- Takenaka, H., Yamaguchi, Y., 2013. Commercial-scale culturing of cyanobacteria: An industrial experience. *Cyanobacteria An Econ. Perspect.* 293–301. <https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch18>
- Takeya, M., Hirai, M.Y., Osanai, T., 2017. Allosteric inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylases is determined by a single amino acid residue in cyanobacteria. *Sci. Rep.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep41080>
- Thiel, K., Patrikainen, P., Nagy, C., Fitzpatrick, D., Pope, N., Aro, E.M., Kallio, P., 2019. Redirecting photosynthetic electron flux in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the deletion of flavodiiron protein Flv3. *Microb. Cell Fact.* 1–16.

<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1238-2>

Thiel, K., Vuorio, E., Aro, E.-M., Kallio, P.T., 2017. The effect of enhanced acetate influx on *Synechocystis* sp. PCC 6803 metabolism. *Microb. Cell Fact.* 16, 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0640-x>

Thiele, I., Palsson, B., 2010. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc* 5, 93–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203.A>

Thomas, A., Rahmanian, S., Bordbar, A., Palsson, B., Jamshidi, N., 2015. Network reconstruction of platelet metabolism identifies metabolic signature for aspirin resistance. *Sci. Rep.* 4. <https://doi.org/10.1038/srep03925>

Trinh, C.T., Unrean, P., Srienc, F., 2008. Minimal *Escherichia coli* cell for the most efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3634–3643. <https://doi.org/10.1128/AEM.02708-07>

Troschl, C., Meixner, K., Drosig, B., 2017. Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering* 4, 26. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020026>

U

Ungerer, J., Pakrasi, H.B., 2016. Cpf1 Is A Versatile Tool for CRISPR Genome Editing Across Diverse Species of Cyanobacteria. *Sci. Rep.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep39681>

V

van der Woude, A.D., Perez Gallego, R., Vreugdenhil, A., Puthan Veetil, V., Chroumpi, T., Hellingwerf, K.J., 2016. Genetic engineering of *Synechocystis* PCC6803 for the photoautotrophic production of the sweetener erythritol. *Microb. Cell Fact.* 15, 60. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0458-y>

Vidal Vidal, R., 2009. Producción fotosintética de etanol por la cianobacteria *Synechocystis*

sp. PCC6803.

- Von Kamp, A., Klamt, S., 2017. Growth-coupled overproduction is feasible for almost all metabolites in five major production organisms. *Nat. Commun.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms15956>
- Vu, T.T., Hill, E.A., Kucek, L.A., Konopka, A.E., Beliaev, A.S., Reed, J.L., 2013. Computational evaluation of *Synechococcus* sp. PCC 7002 metabolism for chemical production. *Biotechnol. J.* 8, 619–630. <https://doi.org/10.1002/biot.201200315>

W

- Wang, B., Xiong, W., Yu, J., Maness, P.C., Meldrum, D.R., 2018. Unlocking the photobiological conversion of CO₂ to (R)-3-hydroxybutyrate in cyanobacteria. *Green Chem.* 20, 3772–3782. <https://doi.org/10.1039/c8gc01208c>
- Wang, W., Liu, Y., Geng, L., Yang, Z., Chen, Y., 2011. The effect of nitrogen concentration and its interaction with light intensity on population dynamics and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* 37–41. <https://doi.org/10.1080/02705060.2011.555205>
- WEF, 2016. These are the top 10 emerging technologies of 2016 | World Economic Forum [WWW Document]. URL <https://www.weforum.org/agenda/2016/06/top-10-emerging-technologies-2016/> (accessed 2.8.20).
- Werner, A., Broeckling, C. D., Prasad, A., & Peebles, C. A. M. (2019). A comprehensive time-course metabolite profiling of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under diurnal light:dark cycles. *Plant Journal*, 0–2. <https://doi.org/10.1111/tpj.14320>
- Woods, R.P., Coleman, J.R., Deng, M. De, 2004. (12) United States Patent. US 6,699,696 B2.
- Wu, G.F., Wu, Q.Y., Shen, Z.Y., 2001. Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresour. Technol.* 76, 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00099-7)

X

- Xiong, W., Brune, D., Vermaas, W.F.J., 2014. The γ -aminobutyric acid shunt contributes to closing the tricarboxylic acid cycle in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 93, 786–796. <https://doi.org/10.1111/mmi.12699>
- Xiong, W., Lee, T.-C., Rommelfanger, S., Gjersing, E., Cano, M., Maness, P.-C., Ghirardi, M., Yu, J., 2015. Phosphoketolase pathway contributes to carbon metabolism in cyanobacteria. *Nat. Plants* 2, 15187. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.187>

Y

- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K., 2002. Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from ^{13}C -labeled glucose. *Metab. Eng.* 4, 202–216. <https://doi.org/10.1006/mben.2002.0226>
- Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J.D., Osterhout, R.E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H.B., Andrae, S., Yang, T.H., Lee, S.Y., Burk, M.J., Van Dien, S., 2011. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat. Chem. Biol.* 7, 445–452. <https://doi.org/10.1038/nchembio.580>
- Yoo, S.H., Spalding, M.H., Jane, J. lin, 2002. Characterization of cyanobacterial glycogen isolated from the wild type and from a mutant lacking of branching enzyme. *Carbohydr. Res.* 337, 2195–2203. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00228-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00228-8)
- Yoshikawa, K., Kojima, Y., Nakajima, T., Furusawa, C., Hirasawa, T., Shimizu, H., 2011. Reconstruction and verification of a genome-scale metabolic model for *Synechocystis* sp. PCC6803. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 347–358. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3559-x>
- Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Ogawa, K., Hidaka, Y., Nakajima, T., Furusawa, C., & Shimizu, H. (2013). Integrated transcriptomic and metabolomic analysis of the central metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under different trophic conditions. *Biotechnology Journal*, 8(5), 571–580. <https://doi.org/10.1002/biot.201200235>

- You, L., Berla, B., He, L., Pakrasi, H. B., & Tang, Y. J. (2014). ¹³C-MFA delineates the photomixotrophic metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under light- and carbon-sufficient conditions. *Biotechnology Journal*, 9(5), 684–692. <https://doi.org/10.1002/biot.201300477>
- Young, J.D., Shastri, A.A., Stephanopoulos, G., Morgan, J.A., 2011. Mapping photoautotrophic metabolism with isotopically nonstationary ¹³C flux analysis. *Metab. Eng.* 13, 656–665. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.08.002>
- Young, J.D., Walther, J.L., Antoniewicz, M.R., Yoo, H., Stephanopoulos, G., 2008. An Elementary Metabolite Unit (EMU) Based Method of Isotopically Nonstationary Flux Analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 686–699. <https://doi.org/10.1002/bit.21632>

Z

- Zhang, L., Selão, T.T., Selstam, E., Norling, B., 2015. Subcellular localization of carotenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130904>
- Zhang, P., Battchikova, N., Jansen, T., Appel, J., Ogawa, T., Aro, E.M., 2004. Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/SII1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 16, 3326–3340. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026526>
- Zhang, S., Bryant, D., 2011. The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* (80-.). 7002, 1551–1554. <https://doi.org/10.1126/science.1210858>
- Zhou, Y., Nguyen, B.T., Zhou, C., Straka, L., Lai, Y.J.S., Xia, S., Rittmann, B.E., 2017. The distribution of phosphorus and its transformations during batch growth of *Synechocystis*. *Water Res.* 122, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.017>

APÉNDICE A

GEM de *Synechocystis*: reacciones y fórmulas de reacción

En este Apéndice se presenta una lista de todas las reacciones incluidas en el GEM curado junto a sus fórmulas de reacción. Se utilizan algunas de las abreviaturas comunes presentadas al comienzo de esta tesis.

Las reacciones desde R82 a R90 no se encuentran incluidas en este listado debido a que son las involucradas en la síntesis de biomasa y se presentarán en detalle en el Apéndice C.

A continuación, en la Tabla A.1 se presenta el modelo:

Tabla A.1. GEM de *Synechocystis*: Reacciones y fórmulas de reacción.

<i>Rxn</i>	<i>Formula de reacción</i>
Amino ácidos aromáticos	
R1	L-Phenylalanine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ Phenylpyruvate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R2	L-Phenylalanine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ Phenylpyruvate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R3	L-Tyrosine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ 3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R4	Phosphoenolpyruvate(cyt) + D-Erythrose 4-phosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → 2-Dehydro-3-deoxy-D-arabino-heptonate 7-phosphate(cyt) + Pi(cyt)
R5	2-Dehydro-3-deoxy-D-arabino-heptonate 7-phosphate(cyt) → 3-Dehydroquinolate(cyt) + Pi(cyt)
R6	3-Dehydroquinolate(cyt) ↔ 3-Dehydroshikimate(cyt) + H ₂ O(cyt)
R7	Shikimate(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ↔ 3-Dehydroshikimate(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R8	ATP(cyt) + Shikimate(cyt) → ADP(cyt) + Shikimate 3-phosphate(cyt)
R9	Phosphoenolpyruvate(cyt) + Shikimate 3-phosphate(cyt) ↔ Pi(cyt) + 5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate(cyt)
R10	5-O-(1-Carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate(cyt) → Chorismate(cyt) + Pi(cyt)
R11	Chorismate(cyt) + L-Glutamine(cyt) → Anthranilate(cyt) + Pyruvate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R12	Chorismate(cyt) + NH ₃ (cyt) → Anthranilate(cyt) + Pyruvate(cyt) + H ₂ O(cyt)
R13	N-(5-Phospho-D-ribose)anthranilate(cyt) + PPI(cyt) ← Anthranilate(cyt) + 5-Phospho-alpha-D-ribose 1-PPI(cyt)
R14	N-(5-Phospho-D-ribose)anthranilate(cyt) → 1-(2-Carboxyphenylamino)-1'-deoxy-D-ribulose 5'-phosphate(cyt)
R15	1-(2-Carboxyphenylamino)-1'-deoxy-D-ribulose 5'-phosphate(cyt) → Indoleglycerol phosphate(cyt) + CO ₂ (cyt) + H ₂ O(cyt)
R16	Indoleglycerol phosphate(cyt) → Indole(cyt) + D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt)
R17	L-Serine(cyt) + Indoleglycerol phosphate(cyt) → L-Tryptophan(cyt) + D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) + H ₂ O(cyt)
R18	L-Serine(cyt) + Indole(cyt) ↔ L-Tryptophan(cyt) + H ₂ O(cyt)
R19	Chorismate(cyt) ↔ Prephenate(cyt)
R20	Prephenate(cyt) → Phenylpyruvate(cyt) + H ₂ O(cyt) + CO ₂ (cyt)
R21	Prephenate(cyt) + NAD ⁺ (cyt) → 3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvate(cyt) + CO ₂ (cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)
Arginina, Glutamato, Glutamine y Prolina	
R22	N-Acetylornithine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ N-Acetyl-L-glutamate 5-semialdehyde(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R23	N-Acetylornithine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ N-Acetyl-L-glutamate 5-semialdehyde(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R24	2 L-Glutamate(cyt) + NAD ⁺ (cyt) ← L-Glutamine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R25	ATP(cyt) + L-Glutamate(cyt) + NH ₃ (cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + L-Glutamine(cyt)
R26	ATP(cyt) + L-Glutamate(cyt) + NH ₃ (cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + L-Glutamine(cyt)
R27	L-Glutamine(cyt) + H ₂ O(cyt) ↔ L-Glutamate(cyt) + NH ₃ (cyt)

R28	$L\text{-Glutamate}(\text{cyt}) + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow 2\text{-Oxoglutarate}(\text{cyt}) + \text{NH}_3(\text{cyt}) + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R29	$\text{ATP}(\text{cyt}) + L\text{-Glutamate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + L\text{-Glutamyl 5-phosphate}(\text{cyt})$
R30	$L\text{-Glutamate 5-semialdehyde}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftarrow L\text{-Glutamyl 5-phosphate}(\text{cyt}) + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R31	$L\text{-Glutamate 5-semialdehyde}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftarrow L\text{-Glutamyl 5-phosphate}(\text{cyt}) + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R32	$L\text{-Glutamate 5-semialdehyde}(\text{cyt}) + \text{NAD}^+(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow L\text{-Glutamate}(\text{cyt}) + \text{NADH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R33	$(S)\text{-1-Pyrroline-5-carboxylate}(\text{cyt}) + \text{NAD}^+(\text{cyt}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow L\text{-Glutamate}(\text{cyt}) + \text{NADH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R34	$L\text{-Proline}(\text{cyt}) + \text{PQ}(\text{tIm}) \rightarrow (S)\text{-1-Pyrroline-5-carboxylate}(\text{cyt}) + \text{PQH}_2(\text{tIm})$
R35	$L\text{-Proline}(\text{cyt}) + \text{PQ}(\text{cym}) \rightarrow (S)\text{-1-Pyrroline-5-carboxylate}(\text{cyt}) + \text{PQH}_2(\text{cym})$
R36	$L\text{-Proline}(\text{cyt}) + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftarrow (S)\text{-1-Pyrroline-5-carboxylate}(\text{cyt}) + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R37	$\text{Acetyl-CoA}(\text{cyt}) + L\text{-Glutamate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{CoA}(\text{cyt}) + \text{N-Acetyl-L-glutamate}(\text{cyt})$
R38	$\text{N-Acetylornithine}(\text{cyt}) + L\text{-Glutamate}(\text{cyt}) \rightarrow L\text{-Ornithine}(\text{cyt}) + \text{N-Acetyl-L-glutamate}(\text{cyt})$
R39	$\text{N-Acetylornithine}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Acetate}(\text{cyt}) + L\text{-Ornithine}(\text{cyt})$
R40	$\text{N-Acetylornithine}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Acetate}(\text{cyt}) + L\text{-Ornithine}(\text{cyt})$
R41	$(S)\text{-1-Pyrroline-5-carboxylate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow L\text{-Glutamate 5-semialdehyde}(\text{cyt})$
R42	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{N-Acetyl-L-glutamate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{N-Acetyl-L-glutamate 5-phosphate}(\text{cyt})$
R43	$\text{N-Acetyl-L-glutamate 5-semialdehyde}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{N-Acetyl-L-glutamate 5-phosphate}(\text{cyt}) + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R44	$\text{Carbamoyl phosphate}(\text{cyt}) + L\text{-Ornithine}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Pi}(\text{cyt}) + L\text{-Citrulline}(\text{cyt})$
R45	$\text{N-(L-Arginino)succinate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Fumarate}(\text{cyt}) + L\text{-Arginine}(\text{cyt})$
R46	$\text{ATP}(\text{cyt}) + L\text{-Citrulline}(\text{cyt}) + L\text{-Aspartate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{AMP}(\text{cyt}) + \text{PPI}(\text{cyt}) + \text{N-(L-Arginino)succinate}(\text{cyt})$
R47	$2 \text{ATP}(\text{cyt}) + L\text{-Glutamine}(\text{cyt}) + \text{HCO}_3^-(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \rightarrow 2 \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + L\text{-Glutamate}(\text{cyt}) + \text{Carbamoyl phosphate}(\text{cyt})$
R48	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{NH}_3(\text{cyt}) + \text{CO}_2(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{Carbamoyl phosphate}(\text{cyt})$
R49	$\text{Nitrite}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) + 2 \text{Fd}^+(\text{cyt}) \leftarrow \text{Nitrate}(\text{cyt}) + 2 \text{Fd}(\text{cyt}) + 2 \text{H}^+(\text{cyt})$
R50	$\text{NH}_3(\text{cyt}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) + 6 \text{Fd}^+(\text{cyt}) \leftarrow \text{Nitrite}(\text{cyt}) + 6 \text{Fd}(\text{cyt}) + 7 \text{H}^+(\text{cyt})$
R51	$2 L\text{-Glutamate}(\text{cyt}) + 2 \text{Fd}^+(\text{cyt}) \leftarrow L\text{-Glutamine}(\text{cyt}) + 2\text{-Oxoglutarate}(\text{cyt}) + 2 \text{Fd}(\text{cyt}) + 2 \text{H}^+(\text{cyt})$
R52	$L\text{-Arginine}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow L\text{-Citrulline}(\text{cyt}) + \text{NH}_3(\text{cyt})$
R53	$L\text{-Ornithine}(\text{cyt}) + 2\text{-Oxoglutarate}(\text{cyt}) \leftrightarrow L\text{-Glutamate 5-semialdehyde}(\text{cyt}) + L\text{-Glutamate}(\text{cyt})$
R54	$L\text{-Arginine}(\text{cyt}) + \text{PQ}(\text{tIm}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow 5\text{-Guanidino-2-oxopentanoate}(\text{cyt}) + \text{NH}_3(\text{cyt}) + \text{PQH}_2(\text{tIm})$
R55	$L\text{-Arginine}(\text{cyt}) + \text{PQ}(\text{cym}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow 5\text{-Guanidino-2-oxopentanoate}(\text{cyt}) + \text{NH}_3(\text{cyt}) + \text{PQH}_2(\text{cym})$
R56	$5\text{-Guanidino-2-oxopentanoate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}_2(\text{cyt}) \rightarrow 4\text{-Guanidinobutanoate}(\text{cyt}) + \text{CO}_2(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R57	$4\text{-Guanidinobutanoate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow 4\text{-Aminobutanoate}(\text{cyt}) + \text{Urea}(\text{cyt})$
R58	$\text{Urea}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{CO}_2(\text{cyt}) + 2 \text{NH}_3(\text{cyt})$

R59	L-Proline(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) + O ₂ (cyt) → trans-4-Hydroxy-L-proline(cyt) + Succinate(cyt) + CO ₂ (cyt)
R60	trans-4-Hydroxy-L-proline(cyt) + NADP ⁺ (cyt) → L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R61	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate(cyt) + NAD ⁺ (cyt) + 2 H ₂ O(cyt) → L-erythro-4-Hydroxyglutamate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R62	L-erythro-4-Hydroxyglutamate(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ D-4-Hydroxy-2-oxoglutarate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R63	D-4-Hydroxy-2-oxoglutarate(cyt) → Pyruvate(cyt) + Glyoxylate(cyt)
R64	L-Arginine(cyt) → Agmatine(cyt) + CO ₂ (cyt)
Asparagina, Aspartato, Lisina y Treonina	
R65	L-Threonine(cyt) → 2-Oxobutanoate(cyt) + NH ₃ (cyt)
R66	O-Phospho-L-homoserine(cyt) + H ₂ O(cyt) → L-Threonine(cyt) + Pi(cyt)
R67	O-Phospho-L-homoserine(cyt) + H ₂ O(cyt) → L-Threonine(cyt) + Pi(cyt)
R68	ATP(cyt) + L-Homoserine(cyt) → ADP(cyt) + O-Phospho-L-homoserine(cyt)
R69	L-Homoserine(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ← L-Aspartate 4-semialdehyde(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R70	L-Aspartate 4-semialdehyde(cyt) + Pi(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ← 4-Phospho-L-aspartate(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R71	ATP(cyt) + L-Aspartate(cyt) → ADP(cyt) + 4-Phospho-L-aspartate(cyt)
R72	L-Aspartate 4-semialdehyde(cyt) + Pyruvate(cyt) → L-2,3-Dihydrodipicolinate(cyt) + 2 H ₂ O(cyt)
R73	2,3,4,5-Tetrahydrodipicolinate(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ← L-2,3-Dihydrodipicolinate(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R74	LL-2,6-Diaminoheptanedioate(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ← 2,3,4,5-Tetrahydrodipicolinate(cyt) + L-Glutamate(cyt) + H ₂ O(cyt)
R75	LL-2,6-Diaminoheptanedioate(cyt) ↔ meso-2,6-Diaminoheptanedioate(cyt)
R76	meso-2,6-Diaminoheptanedioate(cyt) → L-Lysine(cyt) + CO ₂ (cyt)
R77	ATP(cyt) + L-Aspartate(cyt) + L-Glutamine(cyt) + H ₂ O(cyt) → AMP(cyt) + PPI(cyt) + L-Asparagine(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R78	L-Asparagine(cyt) + H ₂ O(cyt) → L-Aspartate(cyt) + NH ₃ (cyt)
R79	L-Asparagine(cyt) + H ₂ O(cyt) → L-Aspartate(cyt) + NH ₃ (cyt)
R80	L-Threonine(cyt) + ATP(cyt) → L-Threonine O-3-phosphate(cyt) + ADP(cyt)
R81	L-Threonine O-3-phosphate(cyt) → D-1-Aminopropan-2-ol O-phosphate(cyt) + CO ₂ (cyt)
Carotenoides	
R91	2 Geranylgeranyl PPI(cyt) → PPI(cyt) + Prephytoene PPI(cyt)
R92	Prephytoene PPI(cyt) → Phytoene(cyt) + PPI(cyt)
R93	Phytoene(cyt) + NADP ⁺ (cyt) → all-trans-Phytofluene(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R94	all-trans-Phytofluene(cyt) + NADP ⁺ (cyt) → all-trans-zeta-Carotene(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R95	all-trans-zeta-Carotene(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt) + O ₂ (cyt) → all-trans-Neurosporene(cyt) + 2 H ₂ O(cyt) + NADP ⁺ (cyt)
R96	all-trans-Neurosporene(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt) + O ₂ (cyt) → Lycopene(cyt) + 2 H ₂ O(cyt) + NADP ⁺ (cyt)

R97	Lycopene(cyt) ↔ gamma-Carotene(cyt)
R98	gamma-Carotene(cyt) ↔ beta-Carotene(cyt)
R99	beta-Carotene(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → beta-Cryptoxanthin(cyt) + NAD+(cyt) + H2O(cyt)
R100	beta-Cryptoxanthin(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → Zeaxanthin(cyt) + NAD+(cyt) + H2O(cyt)
R101	Echinenone(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → 3-Hydroxyechinenone(cyt) + NAD+(cyt) + H2O(cyt)
R102	beta-Carotene(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → Echinenone(cyt) + NADP+(cyt) + H2O(cyt) + H+(cyt)
Clorofila	
R103	tRNA(Glu)(cyt) + L-Glutamate(cyt) + ATP(cyt) → L-Glutamyl-tRNA(Glu)(cyt) + PPI(cyt) + AMP(cyt)
R104	L-Glutamyl-tRNA(Glu)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) → (S)-4-Amino-5-oxopentanoate(cyt) + tRNA(Glu)(cyt) + NADP+(cyt)
R105	5-Aminolevulinate(cyt) ↔ (S)-4-Amino-5-oxopentanoate(cyt)
R106	2 5-Aminolevulinate(cyt) → Porphobilinogen(cyt) + 2 H2O(cyt)
R107	4 Porphobilinogen(cyt) + H2O(cyt) ↔ Hydroxymethylbilane(cyt) + 4 NH3(cyt)
R108	Hydroxymethylbilane(cyt) → Uroporphyrinogen III(cyt) + H2O(cyt)
R109	Uroporphyrinogen III(cyt) → Coproporphyrinogen III(cyt) + 4 CO2(cyt)
R110	Coproporphyrinogen III(cyt) + O2(cyt) → Protoporphyrinogen IX(cyt) + 2 CO2(cyt) + 2 H2O(cyt)
R111	Coproporphyrinogen III(cyt) + 2 S-Adenosyl-L-methionine(cyt) → Protoporphyrinogen IX(cyt) + 2 CO2(cyt) + 2 L-Methionine(cyt) + 2 5'-Deoxyadenosine(cyt)
R112	Coproporphyrinogen III(cyt) + 2 S-Adenosyl-L-methionine(cyt) → Protoporphyrinogen IX(cyt) + 2 CO2(cyt) + 2 L-Methionine(cyt) + 2 5'-Deoxyadenosine(cyt)
R113	2 Protoporphyrinogen IX(cyt) + 3 O2(cyt) ↔ 2 Protoporphyrin(cyt) + 6 H2O(cyt)
R114	2 Protoporphyrinogen IX(cyt) + 3 O2(cyt) ↔ 2 Protoporphyrin(cyt) + 6 H2O(cyt)
R115	ATP(cyt) + Protoporphyrin(cyt) + Magnesium(cyt) + H2O(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + Magnesium protoporphyrin(cyt) + 2 H+(cyt)
R116	S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + Magnesium protoporphyrin(cyt) → S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + Magnesium protoporphyrin monomethyl ester(cyt)
R117	Magnesium protoporphyrin monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → 13(1)-Hydroxy-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADP+(cyt) + H2O(cyt)
R118	Magnesium protoporphyrin monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → 13(1)-Hydroxy-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADP+(cyt) + H2O(cyt)
R119	Magnesium protoporphyrin monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → 13(1)-Hydroxy-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADP+(cyt) + H2O(cyt)
R120	13(1)-Hydroxy-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → 13(1)-Oxo-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADP+(cyt) + 2 H2O(cyt)
R121	13(1)-Hydroxy-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → 13(1)-Oxo-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADP+(cyt) + 2 H2O(cyt)
R122	13(1)-Hydroxy-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → 13(1)-Oxo-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADP+(cyt) + 2 H2O(cyt)

R123	13(1)-Oxo-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → Divinylprotochlorophyllide(cyt) + NADP+(cyt) + 2 H2O(cyt)
R124	13(1)-Oxo-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → Divinylprotochlorophyllide(cyt) + NADP+(cyt) + 2 H2O(cyt)
R125	13(1)-Oxo-magnesium-protoporphyrin IX 13-monomethyl ester(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) + O2(cyt) → Divinylprotochlorophyllide(cyt) + NADP+(cyt) + 2 H2O(cyt)
R126	Divinylprotochlorophyllide(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) → Protochlorophyllide(cyt) + NADP+(cyt)
R127	Chlorophyllide(cyt) + NADP+(cyt) ← Protochlorophyllide(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R128	Protochlorophyllide(cyt) + Fd+(cyt) + 2 ADP(cyt) + 2 Pi(cyt) → Chlorophyllide(cyt) + Fd(cyt) + 2 ATP(cyt)
R129	Chlorophyllide(cyt) + Phytyl PPI(cyt) → Chlorophyll a(cyt) + PPI(cyt)
Folato	
R130	5-Methyltetrahydrofolate(cyt) + NADP+(cyt) ← 5,10-Methylenetetrahydrofolate(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R131	GTP(cyt) + H2O(cyt) → 2-Amino-4-hydroxy-6-(erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)dihydropteridine triphosphate(cyt) + Formate(cyt)
R132	2-Amino-4-hydroxy-6-(erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)dihydropteridine triphosphate(cyt) + H2O(cyt) → Dihydroneopterin phosphate(cyt) + PPI(cyt)
R133	2-Amino-4-hydroxy-6-(D-erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)-7,8-dihydropteridine(cyt) + Pi(cyt) ← Dihydroneopterin phosphate(cyt) + H2O(cyt)
R134	2-Amino-4-hydroxy-6-(D-erythro-1,2,3-trihydroxypropyl)-7,8-dihydropteridine(cyt) → Glycolaldehyde(cyt) + 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine(cyt)
R135	Glycolaldehyde(cyt) + NAD+(cyt) + H2O(cyt) → Glycolate(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
R136	ATP(cyt) + 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine(cyt) → AMP(cyt) + 2-Amino-7,8-dihydro-4-hydroxy-6-(diphosphooxymethyl)pteridine(cyt)
R137	2-Amino-7,8-dihydro-4-hydroxy-6-(diphosphooxymethyl)pteridine(cyt) + 4-Aminobenzoate(cyt) → PPI(cyt) + Dihydropteroate(cyt)
R138	2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine(cyt) + 4-Aminobenzoate(cyt) → Dihydropteroate(cyt) + H2O(cyt)
R139	4-Amino-4-deoxychorismate(cyt) → 4-Aminobenzoate(cyt) + Pyruvate(cyt)
R140	Chorismate(cyt) + L-Glutamine(cyt) → 4-Amino-4-deoxychorismate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R141	ATP(cyt) + Dihydropteroate(cyt) + L-Glutamate(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + Dihydrofolate(cyt)
R142	ATP(cyt) + Dihydropteroate(cyt) + L-Glutamate(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + Dihydrofolate(cyt)
R143	Tetrahydrofolate(cyt) + NADP+(cyt) ← Dihydrofolate(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R144	10-Formyltetrahydrofolate(cyt) + H2O(cyt) → Formate(cyt) + Tetrahydrofolate(cyt)
R145	5,10-Methenyltetrahydrofolate(cyt) + H2O(cyt) ↔ 10-Formyltetrahydrofolate(cyt) + H+(cyt)
R146	5,10-Methylenetetrahydrofolate(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 5,10-Methenyltetrahydrofolate(cyt) + NADPH(cyt)
Generales	
R147	1 ATP(cyt) + H2O(cyt) → 1 ADP(cyt) + Pi(cyt)

R148	$1 \text{ HCO}_3\text{-(cax)} + 1 \text{ H}^+\text{(cax)} \leftrightarrow 1 \text{ H}_2\text{CO}_3\text{(cax)}$
R149	$\text{Thioredoxin(cyt)} + \text{NADP}^+\text{(cyt)} \leftarrow \text{Thioredoxin disulfide(cyt)} + \text{NADPH(cyt)} + \text{H}^+\text{(cyt)}$
R150	$\text{H}_2\text{CO}_3\text{(cax)} \leftrightarrow \text{CO}_2\text{(cax)} + \text{H}_2\text{O(cax)}$
R151	$\text{H}_2\text{CO}_3\text{(cax)} \leftrightarrow \text{CO}_2\text{(cax)} + \text{H}_2\text{O(cax)}$
R152	$\text{PPI(cyt)} + \text{H}_2\text{O(cyt)} \rightarrow 2 \text{ Pi(cyt)}$
R153	$\text{ATP(cyt)} + \text{PPI(cyt)} \leftrightarrow \text{ADP(cyt)} + \text{Triphosphate(cyt)}$
R154	$\text{ATP(cyt)} + \text{Pi(cyt)} \leftrightarrow \text{ADP(cyt)} + \text{PPI(cyt)}$
R155	$\text{NADPH(cyt)} + \text{H}^+\text{(cyt)} + \text{NAD}^+\text{(cyt)} \leftrightarrow \text{NADP}^+\text{(cyt)} + \text{H}^+\text{(cyt)} + \text{NADH(cyt)}$
R156	$2 \text{ Superoxide anion(cyt)} + 2 \text{ H}^+\text{(cyt)} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2\text{(cyt)} + \text{O}_2\text{(cyt)}$
R157	$2 \text{ H}_2\text{O}_2\text{(cyt)} \rightarrow \text{O}_2\text{(cyt)} + 2 \text{ H}_2\text{O(cyt)}$
R158	$\text{H}_2\text{O}_2\text{(cyt)} + 2 \text{ Glutathione(cyt)} \rightarrow \text{Glutathione disulfide(cyt)} + 2 \text{ H}_2\text{O(cyt)}$
R159	$\text{H}_2\text{O}_2\text{(cyt)} + 2 \text{ Glutathione(cyt)} \rightarrow \text{Glutathione disulfide(cyt)} + 2 \text{ H}_2\text{O(cyt)}$
R160	$2 \text{ Glutathione(cyt)} + \text{NADP}^+\text{(cyt)} \leftrightarrow \text{Glutathione disulfide(cyt)} + \text{NADPH(cyt)} + \text{H}^+\text{(cyt)}$
R161	$\text{NH}_4^+\text{(cyt)} \leftrightarrow \text{NH}_3\text{(cyt)} + \text{H}^+\text{(cyt)}$
Glicerolípidos	
R162	$1.2759 \text{ sn-Glycerol 3-phosphate(cyt)} + 1.3302 \text{ Hexadecanoyl-(acp)(cyt)} + 0.0774 \text{ Hexadecenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0034 \text{ Octadecanoyl-(acp)(cyt)} + 0.0635 \text{ Oleoyl-(acyl-carrier protein(cyt)} + 0.4236 \text{ Linoleoyl-(acp)(cyt)} + 0.6315 \text{ gamma-Linolenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0032 \text{ alpha-Linolenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0190 \text{ Stearidonoyl-(acp)(cyt)} \rightarrow \text{PhosphatidateMGDG(cyt)} + 2.5518 \text{ Acyl-carrier protein(cyt)}$
R163	$1.2954 \text{ sn-Glycerol 3-phosphate(cyt)} + 1.3061 \text{ Hexadecanoyl-(acp)(cyt)} + 0.0965 \text{ Hexadecenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0223 \text{ Octadecanoyl-(acp)(cyt)} + 0.0584 \text{ Oleoyl-(acyl-carrier protein(cyt)} + 0.3334 \text{ Linoleoyl-(acp)(cyt)} + 0.7253 \text{ gamma-Linolenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0095 \text{ alpha-Linolenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0393 \text{ Stearidonoyl-(acp)(cyt)} \rightarrow \text{PhosphatidateDGDG(cyt)} + 2.5908 \text{ Acyl-carrier protein(cyt)}$
R164	$1.3747 \text{ sn-Glycerol 3-phosphate(cyt)} + 1.5612 \text{ Hexadecanoyl-(acp)(cyt)} + 0.1804 \text{ Hexadecenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0434 \text{ Octadecanoyl-(acp)(cyt)} + 0.4011 \text{ Oleoyl-(acyl-carrier protein(cyt)} + 0.5331 \text{ Linoleoyl-(acp)(cyt)} + 0.0228 \text{ gamma-Linolenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0165 \text{ alpha-Linolenoyl-(acp)(cyt)} \rightarrow \text{PhosphatidateSQDG(cyt)} + 2.7494 \text{ Acyl-carrier protein(cyt)}$
R165	$1.32535 \text{ sn-Glycerol 3-phosphate(cyt)} + 1.3327 \text{ Hexadecanoyl-(acp)(cyt)} + 0.0227 \text{ Hexadecenoyl-(acp)(cyt)} + 0.0457 \text{ Octadecanoyl-(acp)(cyt)} + 0.1701 \text{ Oleoyl-(acyl-carrier protein(cyt)} + 0.8637 \text{ Linoleoyl-(acp)(cyt)} + 0.2158 \text{ gamma-Linolenoyl-(acp)(cyt)} \rightarrow \text{PhosphatidatePG(cyt)} + 2.6507 \text{ Acyl-carrier protein(cyt)}$
R166	$\text{PhosphatidateMGDG(cyt)} + \text{H}_2\text{O(cyt)} \rightarrow 1,2\text{-Diacyl-sn-glycerolMGDG(cyt)} + \text{Pi(cyt)}$
R167	$\text{PhosphatidateDGDG(cyt)} + \text{H}_2\text{O(cyt)} \rightarrow 1,2\text{-Diacyl-sn-glycerolDGDG(cyt)} + \text{Pi(cyt)}$
R168	$\text{PhosphatidateSQDG(cyt)} + \text{H}_2\text{O(cyt)} \rightarrow 1,2\text{-Diacyl-sn-glycerolSQDG(cyt)} + \text{Pi(cyt)}$
R169	$\text{ATP(cyt)} + 1,2\text{-Diacyl-sn-glycerolMGDG(cyt)} \rightarrow \text{ADP(cyt)} + \text{PhosphatidateMGDG(cyt)}$
R170	$\text{ATP(cyt)} + 1,2\text{-Diacyl-sn-glycerolDGDG(cyt)} \rightarrow \text{ADP(cyt)} + \text{PhosphatidateDGDG(cyt)}$
R171	$\text{ATP(cyt)} + 1,2\text{-Diacyl-sn-glycerolSQDG(cyt)} \rightarrow \text{ADP(cyt)} + \text{PhosphatidateSQDG(cyt)}$

R172	CTP(cyt) + PhosphatidatePG(cyt) → PPI(cyt) + CDP-diacylglycerolPG(cyt)
R173	CDP-diacylglycerolPG(cyt) + sn-Glycerol 3-phosphate(cyt) → CMP(cyt) + PhosphatidylglycerophosphatePG(cyt)
R174	PhosphatidylglycerophosphatePG(cyt) + H ₂ O(cyt) → PhosphatidylglycerolPG(cyt) + Pi(cyt)
R175	UDP-glucose(cyt) + Sulfite(cyt) → UDP-6-sulfoquinovose(cyt) + H ₂ O(cyt)
R176	UDP-6-sulfoquinovose(cyt) + 1,2-Diacyl-sn-glycerolSQDG(cyt) → SulfoquinovosyldiacylglycerolSQDG(cyt) + UDP(cyt)
R177	UDP-glucose(cyt) + 1,2-Diacyl-sn-glycerolMGDG(cyt) → UDP(cyt) + 3-D-Glucosyl-1,2-diacylglycerolMGDG(cyt)
R178	UDP-glucose(cyt) + 1,2-Diacyl-sn-glycerolDGDG(cyt) → UDP(cyt) + 3-D-Glucosyl-1,2-diacylglycerolDGDG(cyt)
R179	3-D-Glucosyl-1,2-diacylglycerolMGDG(cyt) ↔ 1,2-Diacyl-3-beta-D-galactosyl-sn-glycerolMGDG(cyt)
R180	3-D-Glucosyl-1,2-diacylglycerolDGDG(cyt) ↔ 1,2-Diacyl-3-beta-D-galactosyl-sn-glycerolDGDG(cyt)
R181	2 1,2-Diacyl-3-beta-D-galactosyl-sn-glycerolDGDG(cyt) → Digalactosyl-diacylglycerolDGDG(cyt) + 1,2-Diacyl-sn-glycerolDGDG(cyt)
Cisteína, Glicina, Metionina y Serina	
R182	L-Serine(cyt) + Acetyl-CoA(cyt) → O-Acetyl-L-serine(cyt) + CoA(cyt)
R183	O-Acetyl-L-serine(cyt) + Hydrogen sulfide(cyt) → L-Cysteine(cyt) + Acetate(cyt)
R184	O-Acetyl-L-serine(cyt) + Hydrogen sulfide(cyt) → L-Cysteine(cyt) + Acetate(cyt)
R185	ATP(cyt) + Sulfate(cyt) → PPI(cyt) + Adenylyl sulfate(cyt)
R186	ATP(cyt) + Adenylyl sulfate(cyt) → ADP(cyt) + 3'-Phosphoadenylyl sulfate(cyt)
R187	Thioredoxin(cyt) + 3'-Phosphoadenylyl sulfate(cyt) → Thioredoxin disulfide(cyt) + Sulfite(cyt) + Adenosine 3',5'-bisphosphate(cyt)
R188	Adenosine 3',5'-bisphosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → AMP(cyt) + Pi(cyt)
R189	Hydrogen sulfide(cyt) + 6 Fd ⁺ (cyt) + 3 H ₂ O(cyt) ← Sulfite(cyt) + 6 Fd(cyt) + 6 H ⁺ (cyt)
R190	L-Serine(cyt) → Pyruvate(cyt) + NH ₃ (cyt)
R191	5,10-Methylenetetrahydrofolate(cyt) + Glycine(cyt) + H ₂ O(cyt) ↔ Tetrahydrofolate(cyt) + L-Serine(cyt)
R192	Glycine(cyt) + Tetrahydrofolate(cyt) + NAD ⁺ (cyt) → 5,10-Methylenetetrahydrofolate(cyt) + NH ₃ (cyt) + CO ₂ (cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R193	5-Methyltetrahydrofolate(cyt) + L-Homocysteine(cyt) → Tetrahydrofolate(cyt) + L-Methionine(cyt)
R194	S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + H ₂ O(cyt) → Adenosine(cyt) + L-Homocysteine(cyt)
R195	S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + DNA cytosine(cyt) → S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + DNA 5-methylcytosine(cyt)
R196	Pi(cyt) + PPI(cyt) + S-Adenosyl-L-methionine(cyt) ← ATP(cyt) + L-Methionine(cyt) + H ₂ O(cyt)
R197	D-Glycerate(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ↔ Hydroxypyruvate(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R198	L-Serine(cyt) + Glyoxylate(cyt) ↔ Hydroxypyruvate(cyt) + Glycine(cyt)
R199	ATP(cyt) + D-Glycerate(cyt) → ADP(cyt) + 2-Phospho-D-glycerate(cyt)
R200	D-Glycerate(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ← Tartronate semialdehyde(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R201	2 Glyoxylate(cyt) → Tartronate semialdehyde(cyt) + CO ₂ (cyt)

R202	Glyoxylate(cyt) + O ₂ (cyt) + H ₂ O(cyt) → Oxalate(cyt) + H ₂ O ₂ (cyt)
R203	L-Cysteine(cyt) + (enzyme)-cysteine(cyt) → L-Alanine(cyt) + (enzyme)-S-sulfanylcysteine(cyt)
R204	L-Cysteine(cyt) + (enzyme)-cysteine(cyt) → L-Alanine(cyt) + (enzyme)-S-sulfanylcysteine(cyt)
R205	L-Cysteine(cyt) + (enzyme)-cysteine(cyt) → L-Alanine(cyt) + (enzyme)-S-sulfanylcysteine(cyt)
R206	Glycine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ Glyoxylate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R207	Acetyl-CoA(cyt) + L-Homoserine(cyt) → CoA(cyt) + O-Acetyl-L-homoserine(cyt)
R208	O-Acetyl-L-homoserine(cyt) + Hydrogen sulfide(cyt) → L-Homocysteine(cyt) + Acetate(cyt)
R209	Glycine(cyt) + H ₂ O(cyt) + O ₂ (cyt) → Glyoxylate(cyt) + NH ₃ (cyt) + H ₂ O ₂ (cyt)
R210	3'-Phosphoadenylyl sulfate(cyt) + H ₂ O(cyt) → Adenylyl sulfate(cyt) + Pi(cyt)
R211	Glycine(cyt) + H ₂ O(cyt) + NAD ⁺ (cyt) ↔ Glyoxylate(cyt) + NH ₃ (cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R212	S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + H ⁺ (cyt) → S-Adenosylmethioninamine(cyt) + CO ₂ (cyt)
R213	ATP(cyt) + L-Glutamate(cyt) + L-Cysteine(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + gamma-L-Glutamyl-L-cysteine(cyt)
R214	ATP(cyt) + gamma-L-Glutamyl-L-cysteine(cyt) + Glycine(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + Glutathione(cyt)
R215	Glutathione(cyt) + H ₂ O(cyt) → Cys-Gly(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R216	Cys-Gly(cyt) + H ₂ O(cyt) → L-Cysteine(cyt) + Glycine(cyt)
R217	Cys-Gly(cyt) + H ₂ O(cyt) → L-Cysteine(cyt) + Glycine(cyt)
R218	3-Phospho-D-glycerate(cyt) + NAD ⁺ (cyt) ↔ 3-Phosphonooxypyruvate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R219	O-Phospho-L-serine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ 3-Phosphonooxypyruvate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R220	O-Phospho-L-serine(cyt) + H ₂ O(cyt) → L-Serine(cyt) + Pi(cyt)
Glucólisis y Azúcares	
R221	ATP(cyt) + D-Glucose(cyt) → ADP(cyt) + D-Glucose 6-phosphate(cyt)
R222	ATP(cyt) + D-Glucose(cyt) → ADP(cyt) + D-Glucose 6-phosphate(cyt)
R223	D-Glucose 6-phosphate(cyt) ↔ D-Fructose 6-phosphate(cyt)
R224	D-Fructose 1,6-bisphosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → D-Fructose 6-phosphate(cyt) + Pi(cyt)
R225	D-Fructose 1,6-bisphosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → D-Fructose 6-phosphate(cyt) + Pi(cyt)
R226	ATP(cyt) + D-Fructose 6-phosphate(cyt) → ADP(cyt) + D-Fructose 1,6-bisphosphate(cyt)
R227	ATP(cyt) + D-Fructose 6-phosphate(cyt) → ADP(cyt) + D-Fructose 1,6-bisphosphate(cyt)
R228	D-Fructose 1,6-bisphosphate(cyt) ↔ Glycerone phosphate(cyt) + D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt)
R229	D-Fructose 1,6-bisphosphate(cyt) ↔ Glycerone phosphate(cyt) + D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt)
R230	D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) ↔ Glycerone phosphate(cyt)
R231	D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) + Pi(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ← 3-Phospho-D-glyceroyl phosphate(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)

R232	D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) + Pi(cyt) + NAD ⁺ (cyt) → 3-Phospho-D-glyceroyl phosphate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R233	ATP(cyt) + 3-Phospho-D-glycerate(cyt) ↔ ADP(cyt) + 3-Phospho-D-glyceroyl phosphate(cyt)
R234	2-Phospho-D-glycerate(cyt) ↔ 3-Phospho-D-glycerate(cyt)
R235	2-Phospho-D-glycerate(cyt) ↔ 3-Phospho-D-glycerate(cyt)
R236	2-Phospho-D-glycerate(cyt) ↔ 3-Phospho-D-glycerate(cyt)
R237	2-Phospho-D-glycerate(cyt) ↔ 3-Phospho-D-glycerate(cyt)
R238	2-Phospho-D-glycerate(cyt) ↔ Phosphoenolpyruvate(cyt) + H ₂ O(cyt)
R239	D-Glucose 1-phosphate(cyt) ↔ D-Glucose 6-phosphate(cyt)
R240	ATP(cyt) + D-Fructose(cyt) ↔ ADP(cyt) + D-Fructose 6-phosphate(cyt)
R241	D-Mannose 6-phosphate(cyt) ↔ D-Fructose 6-phosphate(cyt)
R242	D-Mannose 6-phosphate(cyt) ↔ D-Mannose 1-phosphate(cyt)
R243	D-Mannose 6-phosphate(cyt) ↔ D-Mannose 1-phosphate(cyt)
R244	GTP(cyt) + D-Mannose 1-phosphate(cyt) → PPI(cyt) + GDP-mannose(cyt)
R245	GTP(cyt) + D-Mannose 1-phosphate(cyt) → PPI(cyt) + GDP-mannose(cyt)
R246	GDP(cyt) + D-Mannose 1-phosphate(cyt) → Pi(cyt) + GDP-mannose(cyt)
R247	GDP(cyt) + D-Mannose 1-phosphate(cyt) → Pi(cyt) + GDP-mannose(cyt)
R248	dTTP(cyt) + D-Glucose 1-phosphate(cyt) → PPI(cyt) + dTDP-glucose(cyt)
R249	CTP(cyt) + D-Glucose 1-phosphate(cyt) → PPI(cyt) + CDP-glucose(cyt)
R250	dTDP-glucose(cyt) ↔ dTDP-galactose(cyt)
R251	dTDP-glucose(cyt) ↔ dTDP-galactose(cyt)
R252	dTDP-glucose(cyt) ↔ dTDP-galactose(cyt)
R253	dTDP-glucose(cyt) → 4,6-Dideoxy-4-oxo-dTDP-D-glucose(cyt) + H ₂ O(cyt)
R254	dTDP-glucose(cyt) → 4,6-Dideoxy-4-oxo-dTDP-D-glucose(cyt) + H ₂ O(cyt)
R255	4,6-Dideoxy-4-oxo-dTDP-D-glucose(cyt) → dTDP-4-dehydro-6-deoxy-L-mannose(cyt)
R256	4,6-Dideoxy-4-oxo-dTDP-D-glucose(cyt) → dTDP-4-dehydro-6-deoxy-L-mannose(cyt)
R257	dTDP-6-deoxy-L-mannose(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ← dTDP-4-dehydro-6-deoxy-L-mannose(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R258	UTP(cyt) + D-Glucose 1-phosphate(cyt) ↔ PPI(cyt) + UDP-glucose(cyt)
R259	UDP-glucose(cyt) ↔ UDP-D-galactose(cyt)
R260	D-Glyceraldehyde(cyt) + NAD ⁺ (cyt) + H ₂ O(cyt) ↔ D-Glycerate(cyt) + NADH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R261	Glycerol(cyt) + NADP ⁺ (cyt) ↔ D-Glyceraldehyde(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt)
R262	ATP(cyt) + Glycerol(cyt) → ADP(cyt) + sn-Glycerol 3-phosphate(cyt)

R263 sn-Glycerol 3-phosphate(cyt) + NAD⁺(cyt) ↔ Glycerone phosphate(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt)

R264 sn-Glycerol 3-phosphate(cyt) + PQ(tlm) → Glycerone phosphate(cyt) + PQH₂(tlm)

R265 sn-Glycerol 3-phosphate(cyt) + PQ(cym) → Glycerone phosphate(cyt) + PQH₂(cym)

R266 UDP-glucose(cyt) + D-Fructose 6-phosphate(cyt) → UDP(cyt) + Sucrose 6'-phosphate(cyt)

R267 Sucrose 6'-phosphate(cyt) + H₂O(cyt) → Sucrose(cyt) + Pi(cyt)

Clorofila

R268 Protoporphyrin(cyt) + Fe²⁺(cyt) → Heme(cyt) + 2 H⁺(cyt)

R269 Heme(cyt) + H₂O(cyt) + trans,trans-Farnesyl PPI(cyt) ↔ Heme O(cyt) + PPI(cyt)

R270 Heme O(cyt) + H₂O(cyt) ↔ Heme A(cyt) + 4 H⁺(cyt)

Histidina

R271 1-(5-Phospho-D-ribosyl)-ATP(cyt) + PPI(cyt) ← ATP(cyt) + 5-Phospho-alpha-D-ribose 1-PPI(cyt)

R272 1-(5-Phospho-D-ribosyl)-ATP(cyt) + H₂O(cyt) → Phosphoribosyl-AMP(cyt) + PPI(cyt)

R273 Phosphoribosyl-AMP(cyt) + H₂O(cyt) → 5-(5-Phospho-D-ribosylaminoformimino)-1-(5-phosphoribosyl)-imidazole-4-carboxamide(cyt)

R274 5-(5-Phospho-D-ribosylaminoformimino)-1-(5-phosphoribosyl)-imidazole-4-carboxamide(cyt) → N-(5'-Phospho-D-1'-ribulosylformimino)-5-amino-1-(5''-phospho-D-ribosyl)-4-imidazolecarboxamide(cyt)

R275 N-(5'-Phospho-D-1'-ribulosylformimino)-5-amino-1-(5''-phospho-D-ribosyl)-4-imidazolecarboxamide(cyt) + L-Glutamine(cyt) → D-erythro-1-(Imidazol-4-yl)glycerol 3-phosphate(cyt) + 1-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-4-imidazolecarboxamide(cyt) + L-Glutamate

R276 N-(5'-Phospho-D-1'-ribulosylformimino)-5-amino-1-(5''-phospho-D-ribosyl)-4-imidazolecarboxamide(cyt) + L-Glutamine(cyt) → D-erythro-1-(Imidazol-4-yl)glycerol 3-phosphate(cyt) + 1-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-4-imidazolecarboxamide(cyt) + L-Glutamate

R277 D-erythro-1-(Imidazol-4-yl)glycerol 3-phosphate(cyt) → 3-(Imidazol-4-yl)-2-oxopropyl phosphate(cyt) + H₂O(cyt)

R278 L-Histidinol phosphate(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ 3-(Imidazol-4-yl)-2-oxopropyl phosphate(cyt) + L-Glutamate(cyt)

R279 L-Histidinol phosphate(cyt) + H₂O(cyt) → L-Histidinol(cyt) + Pi(cyt)

R280 L-Histidinol(cyt) + NAD⁺(cyt) → L-Histidinal(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt)

R281 L-Histidinol(cyt) + NAD⁺(cyt) → L-Histidinal(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt)

R282 L-Histidinal(cyt) + H₂O(cyt) + NAD⁺(cyt) → L-Histidine(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt)

R283 L-Histidinal(cyt) + H₂O(cyt) + NAD⁺(cyt) → L-Histidine(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt)

Isoleucina, Leucina y Valina

R284 Pyruvate(cyt) + Thiamin PPI(cyt) → 2-(alpha-Hydroxyethyl)thiamine PPI(cyt) + CO₂(cyt)

R285 2-Acetolactate(cyt) + Thiamin PPI(cyt) ← 2-(alpha-Hydroxyethyl)thiamine PPI(cyt) + Pyruvate(cyt)

R286 2-Oxobutanoate(cyt) + 2-(alpha-Hydroxyethyl)thiamine PPI(cyt) → (S)-2-Aceto-2-hydroxybutanoate(cyt) + Thiamin PPI(cyt)

R287 2-Acetolactate(cyt) + NADPH(cyt) + H⁺(cyt) → 2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate(cyt) + NADP⁺(cyt)

R288	(S)-2-Aceto-2-hydroxybutanoate(cyt) → (R)-3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoate(cyt)
R289	(R)-2,3-Dihydroxy-3-methylpentanoate(cyt) + NADP+(cyt) ← (R)-3-Hydroxy-3-methyl-2-oxopentanoate(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R290	2,3-Dihydroxy-3-methylbutanoate(cyt) → 3-Methyl-2-oxobutanoic acid(cyt) + H ₂ O(cyt)
R291	(R)-2,3-Dihydroxy-3-methylpentanoate(cyt) → (S)-3-Methyl-2-oxopentanoic acid(cyt) + H ₂ O(cyt)
R292	L-Leucine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ 4-Methyl-2-oxopentanoate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R293	L-Valine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ 3-Methyl-2-oxobutanoic acid(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R294	L-Isoleucine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ (S)-3-Methyl-2-oxopentanoic acid(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R295	(2S)-2-Isopropylmalate(cyt) + CoA(cyt) ← Acetyl-CoA(cyt) + 3-Methyl-2-oxobutanoic acid(cyt) + H ₂ O(cyt)
R296	(2S)-2-Isopropylmalate(cyt) + CoA(cyt) ← Acetyl-CoA(cyt) + 3-Methyl-2-oxobutanoic acid(cyt) + H ₂ O(cyt)
R297	(2S)-2-Isopropylmalate(cyt) → 2-Isopropylmaleate(cyt) + H ₂ O(cyt)
R298	(2R,3S)-3-Isopropylmalate(cyt) ← 2-Isopropylmaleate(cyt) + H ₂ O(cyt)
R299	(2R,3S)-3-Isopropylmalate(cyt) + NAD+(cyt) → (2S)-2-Isopropyl-3-oxosuccinate(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
R300	4-Methyl-2-oxopentanoate(cyt) + CO ₂ (cyt) ← (2S)-2-Isopropyl-3-oxosuccinate(cyt)
R301	Acetyl-CoA(cyt) + Pyruvate(cyt) + H ₂ O(cyt) → (R)-2-Methylmalate(cyt) + CoA(cyt)
R302	(R)-2-Methylmalate(cyt) ↔ 2-Methylmaleate(cyt) + H ₂ O(cyt)
R303	2-Methylmaleate(cyt) + H ₂ O(cyt) ↔ D-erythro-3-Methylmalate(cyt)
R304	2-Oxobutanoate(cyt) + CO ₂ (cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt) ← D-erythro-3-Methylmalate(cyt) + NAD+(cyt)
Glucólisis y Azúcares	
R305	D-Glucose 6-phosphate(cyt) → 1D-myo-Inositol 3-phosphate(cyt)
R306	D-Glucose 6-phosphate(cyt) → 1D-myo-Inositol 3-phosphate(cyt)
R307	1D-myo-Inositol 3-phosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → myo-Inositol(cyt) + Pi(cyt)
R308	1D-myo-Inositol 3-phosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → myo-Inositol(cyt) + Pi(cyt)
R309	1D-myo-Inositol 3-phosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → myo-Inositol(cyt) + Pi(cyt)
Lípidos	
R310	Acetyl-CoA(cyt) + Acyl-carrier protein(cyt) → CoA(cyt) + Acetyl-(acp)(cyt)
R311	Acetyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → Acetoacetyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R312	Acetyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → Acetoacetyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R313	Acetyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → Acetoacetyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R314	ATP(cyt) + Acetyl-CoA(cyt) + HCO ₃ -(cyt) + H+(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + Malonyl-CoA(cyt)
R315	Malonyl-CoA(cyt) + Acyl-carrier protein(cyt) → CoA(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt)
R316	Butyryl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxohexanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)

R317	Butyryl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxohexanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R318	Hexanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxoocutanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R319	Hexanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxoocutanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R320	Octanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R321	Octanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R322	Decanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R323	Decanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R324	Dodecanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxotetradecanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R325	Dodecanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxotetradecanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R326	Tetradecanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxohexadecanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R327	Tetradecanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxohexadecanoyl-(acp)(cyt) + CO ₂ (cyt) + Acyl-carrier protein(cyt)
R328	Hexadecanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxostearyl-(acp)(cyt) + Acyl-carrier protein(cyt) + CO ₂ (cyt)
R329	Hexadecanoyl-(acp)(cyt) + Malonyl-(acp)(cyt) → 3-Oxostearyl-(acp)(cyt) + Acyl-carrier protein(cyt) + CO ₂ (cyt)
R330	(3R)-3-Hydroxybutanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ Acetoacetyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R331	(3R)-3-Hydroxybutanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ Acetoacetyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R332	(3R)-3-Hydroxybutanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ Acetoacetyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R333	(R)-3-Hydroxyhexanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxohexanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R334	(R)-3-Hydroxyhexanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxohexanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R335	(R)-3-Hydroxyhexanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxohexanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R336	(3R)-3-Hydroxyoctanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxoocutanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R337	(3R)-3-Hydroxyoctanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxoocutanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R338	(3R)-3-Hydroxyoctanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxoocutanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R339	(3R)-3-Hydroxydecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R340	(3R)-3-Hydroxydecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R341	(3R)-3-Hydroxydecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R342	(R)-3-Hydroxydodecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R343	(R)-3-Hydroxydodecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R344	(R)-3-Hydroxydodecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxododecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R345	(3R)-3-Hydroxytetradecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxotetradecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R346	(3R)-3-Hydroxytetradecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxotetradecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R347	(3R)-3-Hydroxytetradecanoyl-(acp)(cyt) + NADP+(cyt) ↔ 3-Oxotetradecanoyl-(acp)(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)

R348	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxypalmitoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow 3\text{-Oxohexadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R349	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxypalmitoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow 3\text{-Oxohexadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R350	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxypalmitoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow 3\text{-Oxohexadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R351	$3\text{-Oxostearoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow 3\text{-Hydroxyoctadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt})$
R352	$3\text{-Oxostearoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow 3\text{-Hydroxyoctadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt})$
R353	$3\text{-Oxostearoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow 3\text{-Hydroxyoctadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt})$
R354	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxybutanoyl-(acp)(cyt)} \leftrightarrow \text{But-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R355	$(R)\text{-}3\text{-Hydroxyhexanoyl-(acp)(cyt)} \leftrightarrow \text{trans-Hex-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R356	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxyoctanoyl-(acp)(cyt)} \leftrightarrow \text{trans-Oct-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R357	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxydecanoyl-(acp)(cyt)} \leftrightarrow \text{trans-Dec-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R358	$(R)\text{-}3\text{-Hydroxydodecanoyl-(acp)(cyt)} \leftrightarrow \text{trans-Dodec-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R359	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxytetradecanoyl-(acp)(cyt)} \leftrightarrow \text{trans-Tetradec-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R360	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxypalmitoyl-(acp)(cyt)} \leftrightarrow \text{trans-Hexadec-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R361	$3\text{-Hydroxyoctadecanoyl-(acp)(cyt)} \leftrightarrow (2E)\text{-Octadecenoyl-(acp)(cyt)} + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R362	$\text{Butyryl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{But-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R363	$\text{Hexanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{trans-Hex-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R364	$\text{Octanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{trans-Oct-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R365	$\text{Decanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{trans-Dec-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R366	$\text{Dodecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{trans-Dodec-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R367	$\text{Tetradecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{trans-Tetradec-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R368	$\text{Hexadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{trans-Hexadec-2-enoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R369	$(2E)\text{-Octadecenoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Octadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt})$
R370	$\text{Hexadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) + \text{O}_2(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Hexadecenoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R371	$\text{Octadecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) + \text{O}_2(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Oleoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R372	$\text{Oleoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) + \text{O}_2(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Linoleoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R373	$\text{Linoleoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) + \text{O}_2(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{gamma-Linolenoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R374	$\text{Linoleoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) + \text{O}_2(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{alpha-Linolenoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R375	$\text{alpha-Linolenoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) + \text{O}_2(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Stearidonoyl-(acp)(cyt)} + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + 2 \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R376	$(3R)\text{-}3\text{-Hydroxytetradecanoyl-(acp)(cyt)} + \text{UDP-N-acetyl-D-glucosamine}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Acyl-carrier protein}(\text{cyt}) + \text{UDP-3-O-(3-hydroxytetradecanoyl)-N-acetylglucosamine}(\text{cyt})$
R377	$\text{UDP-3-O-(3-hydroxytetradecanoyl)-N-acetylglucosamine}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{UDP-3-O-(3-hydroxytetradecanoyl)-D-glucosamine}(\text{cyt}) + \text{Acetate}(\text{cyt})$

R378 UDP-2,3-bis(3-hydroxytetradecanoyl)glucosamine(cyt) + Acyl-carrier protein(cyt) \leftarrow UDP-3-O-(3-hydroxytetradecanoyl)-D-glucosamine(cyt) + (3R)-3-Hydroxytetradecanoyl-(acp)(cyt)

R379 UDP-2,3-bis(3-hydroxytetradecanoyl)glucosamine(cyt) + Lipid X(cyt) \rightarrow UDP(cyt) + Lipid A disaccharide(cyt)

R380 UDP-2,3-bis(3-hydroxytetradecanoyl)glucosamine(cyt) + H₂O(cyt) \rightarrow UMP(cyt) + Lipid X(cyt)

Nicotinamida

R381 L-Aspartate(cyt) + O₂(cyt) \rightarrow Iminoaspartate(cyt) + H₂O₂(cyt)

R382 Pyridine-2,3-dicarboxylate(cyt) + 2 H₂O(cyt) + Pi(cyt) \leftarrow Iminoaspartate(cyt) + Glycerone phosphate(cyt)

R383 Nicotinate D-ribonucleotide(cyt) + PPI(cyt) + CO₂(cyt) \leftarrow Pyridine-2,3-dicarboxylate(cyt) + 5-Phospho-alpha-D-ribose 1-PPI(cyt) + H+(cyt)

R384 ATP(cyt) + Nicotinate D-ribonucleotide(cyt) \leftrightarrow PPI(cyt) + Deamino-NAD+(cyt)

R385 ATP(cyt) + Nicotinate D-ribonucleotide(cyt) \leftrightarrow PPI(cyt) + Deamino-NAD+(cyt)

R386 ATP(cyt) + Deamino-NAD+(cyt) + L-Glutamine(cyt) + H₂O(cyt) \rightarrow AMP(cyt) + PPI(cyt) + NAD+(cyt) + L-Glutamate(cyt)

R387 ATP(cyt) + NAD+(cyt) \rightarrow ADP(cyt) + NADP+(cyt)

R388 ATP(cyt) + NAD+(cyt) \rightarrow ADP(cyt) + NADP+(cyt)

R389 Nicotinate D-ribonucleotide(cyt) + PPI(cyt) \leftrightarrow Nicotinate(cyt) + 5-Phospho-alpha-D-ribose 1-PPI(cyt) + H+(cyt)

Pantotenato y Coenzima A

R390 L-Aspartate(cyt) \rightarrow beta-Alanine(cyt) + CO₂(cyt)

R391 L-Aspartate(cyt) \rightarrow beta-Alanine(cyt) + CO₂(cyt)

R392 5,10-Methylenetetrahydrofolate(cyt) + 3-Methyl-2-oxobutanoic acid(cyt) + H₂O(cyt) \rightarrow Tetrahydrofolate(cyt) + 2-Dehydropantoate(cyt)

R393 (R)-Pantoate(cyt) + NADP+(cyt) \leftrightarrow 2-Dehydropantoate(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)

R394 ATP(cyt) + (R)-Pantoate(cyt) + beta-Alanine(cyt) \rightarrow AMP(cyt) + PPI(cyt) + Pantothenate(cyt)

R395 ATP(cyt) + Pantothenate(cyt) \rightarrow ADP(cyt) + D-4'-Phosphopantothenate(cyt)

R396 (R)-4'-Phosphopantothenoyl-L-cysteine(cyt) \rightarrow Pantetheine 4'-phosphate(cyt) + CO₂(cyt)

R397 ATP(cyt) + D-4'-Phosphopantothenate(cyt) + L-Cysteine(cyt) \rightarrow AMP(cyt) + PPI(cyt) + (R)-4'-Phosphopantothenoyl-L-cysteine(cyt)

R398 CTP(cyt) + D-4'-Phosphopantothenate(cyt) + L-Cysteine(cyt) \rightarrow CMP(cyt) + PPI(cyt) + (R)-4'-Phosphopantothenoyl-L-cysteine(cyt)

R399 ATP(cyt) + Pantetheine 4'-phosphate(cyt) \rightarrow PPI(cyt) + Dephospho-CoA(cyt)

R400 ATP(cyt) + Dephospho-CoA(cyt) \rightarrow ADP(cyt) + CoA(cyt)

Peptidoglicanos

R401 L-Glutamine(cyt) + D-Fructose 6-phosphate(cyt) \leftrightarrow L-Glutamate(cyt) + D-Glucosamine 6-phosphate(cyt)

R402 alpha-D-Glucosamine 1-phosphate(cyt) \leftrightarrow D-Glucosamine 6-phosphate(cyt)

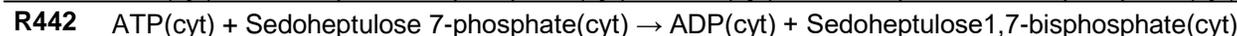
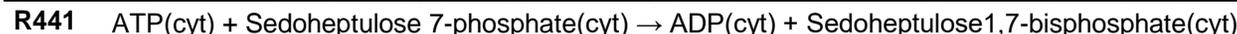
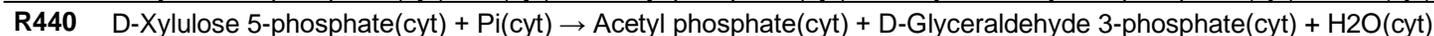
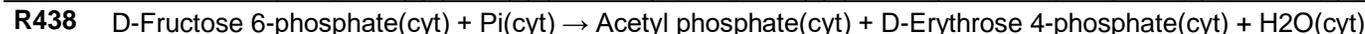
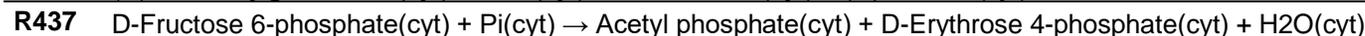
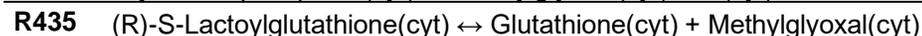
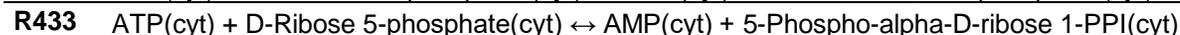
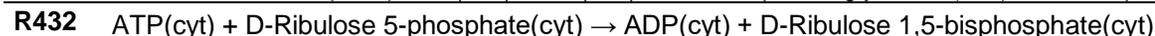
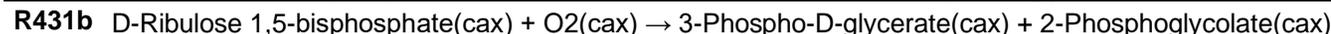
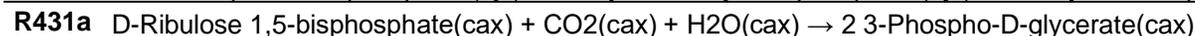
R403 Acetyl-CoA(cyt) + alpha-D-Glucosamine 1-phosphate(cyt) \rightarrow CoA(cyt) + N-Acetyl-alpha-D-glucosamine 1-phosphate(cyt)

R404 UTP(cyt) + N-Acetyl-alpha-D-glucosamine 1-phosphate(cyt) \rightarrow PPI(cyt) + UDP-N-acetyl-D-glucosamine(cyt)

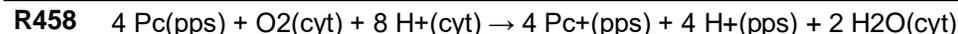
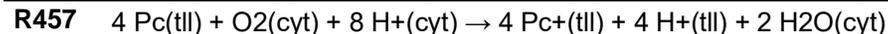
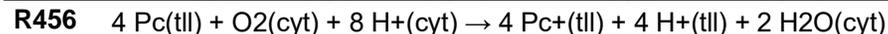
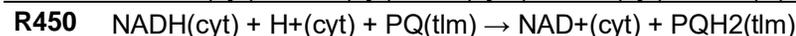
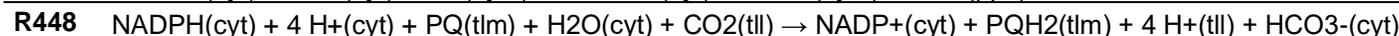
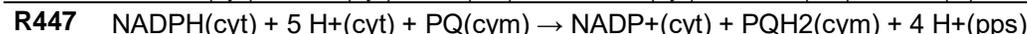
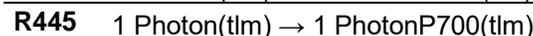
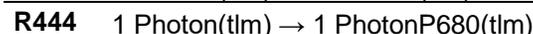
R405	Phosphoenolpyruvate(cyt) + UDP-N-acetyl-D-glucosamine(cyt) → UDP-N-acetyl-3-(1-carboxyvinyl)-D-glucosamine(cyt) + Pi(cyt)
R406	UDP-N-acetylmuramate(cyt) + NADP+(cyt) ↔ UDP-N-acetyl-3-(1-carboxyvinyl)-D-glucosamine(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R407	ATP(cyt) + UDP-N-acetylmuramate(cyt) + L-Alanine(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine(cyt)
R408	ATP(cyt) + UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine(cyt) + D-Glutamate(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate(cyt)
R409	ATP(cyt) + UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate(cyt) + meso-2,6-Diaminoheptanedioate(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-gamma-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelate(cyt)
R410	L-Glutamate(cyt) ↔ D-Glutamate(cyt)
R411	L-Alanine(cyt) ↔ D-Alanine(cyt)
R412	ATP(cyt) + 2 D-Alanine(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + D-Alanyl-D-alanine(cyt)
R413	ATP(cyt) + UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-gamma-glutamyl-meso-2,6-diaminopimelate(cyt) + D-Alanyl-D-alanine(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-6-carboxy-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine(cyt)
R414	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-6-carboxy-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine(cyt) + di-trans,poly-cis-Undecaprenyl phosphate(cyt) → UMP(cyt) + Undecaprenyl-diphospho-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine(cy)
R415	Undecaprenyl-diphospho-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine(cyt) + UDP-N-acetyl-D-glucosamine(cyt) → Undecaprenyl-diphospho-N-acetylmuramoyl-(N-acetylglucosamine)-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-
R416	Undecaprenyl-diphospho-N-acetylmuramoyl-(N-acetylglucosamine)-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine(cyt) + H ₂ O(cyt) → di-trans,poly-cis-Undecaprenyl PPI(cyt) + (GlcNAc-(1->4)-Mur2Ac(oyl-L-Ala-g-D-Glu-A2pm-D-Ala-D-Ala)
R417	Undecaprenyl-diphospho-N-acetylmuramoyl-(N-acetylglucosamine)-L-alanyl-D-glutamyl-meso-2,6-diaminopimeloyl-D-alanyl-D-alanine(cyt) + H ₂ O(cyt) → di-trans,poly-cis-Undecaprenyl PPI(cyt) + (GlcNAc-(1->4)-Mur2Ac(oyl-L-Ala-g-D-Glu-A2pm-D-Ala-D-Ala)
R418	di-trans,poly-cis-Undecaprenyl PPI(cyt) + H ₂ O(cyt) → di-trans,poly-cis-Undecaprenyl phosphate(cyt) + Pi(cyt)

Vía de las Pentosas Fosfato y Ciclo CBB

R419	D-Sedoheptulose 1,7-bisphosphate(cyt) ← Glycerone phosphate(cyt) + D-Erythrose 4-phosphate(cyt)
R420	D-Sedoheptulose 1,7-bisphosphate(cyt) ← Glycerone phosphate(cyt) + D-Erythrose 4-phosphate(cyt)
R421	D-Sedoheptulose 1,7-bisphosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → D-Sedoheptulose 7-phosphate(cyt) + Pi(cyt)
R422	D-Glucose 6-phosphate(cyt) + NADP+(cyt) → D-Glucono-1,5-lactone 6-phosphate(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R423	D-Glucono-1,5-lactone 6-phosphate(cyt) + H ₂ O(cyt) → 6-Phospho-D-gluconate(cyt)
R424	6-Phospho-D-gluconate(cyt) + NADP+(cyt) → D-Ribulose 5-phosphate(cyt) + CO ₂ (cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
R425	D-Ribose 5-phosphate(cyt) ↔ D-Ribulose 5-phosphate(cyt)
R426	D-Ribose 5-phosphate(cyt) ↔ D-Ribulose 5-phosphate(cyt)
R427	D-Sedoheptulose 7-phosphate(cyt) + D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) ↔ D-Ribose 5-phosphate(cyt) + D-Xylulose 5-phosphate(cyt)
R428	D-Fructose 6-phosphate(cyt) + D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) ↔ D-Erythrose 4-phosphate(cyt) + D-Xylulose 5-phosphate(cyt)
R429	D-Ribulose 5-phosphate(cyt) ↔ D-Xylulose 5-phosphate(cyt)



Fotosíntesis y Respiración



R459	$4 \text{ Pc(pps)} + \text{O}_2(\text{cyt}) + 8 \text{ H}^+(\text{cyt}) \rightarrow 4 \text{ Pc}^+(\text{pps}) + 4 \text{ H}^+(\text{pps}) + 2 \text{ H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R460	$2 \text{ PQH}_2(\text{tlm}) + \text{O}_2(\text{cyt}) + 4 \text{ H}^+(\text{cyt}) \rightarrow 2 \text{ PQ}(\text{tlm}) + 4 \text{ H}^+(\text{tll}) + 2 \text{ H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R461	$2 \text{ PQH}_2(\text{cym}) + \text{O}_2(\text{cyt}) + 4 \text{ H}^+(\text{cyt}) \rightarrow 2 \text{ PQ}(\text{cym}) + 4 \text{ H}^+(\text{pps}) + 2 \text{ H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R462	$\text{PQH}_2(\text{tlm}) + 2 \text{ Pc}^+(\text{tll}) \rightarrow \text{PQ}(\text{tlm}) + 2 \text{ Pc}(\text{tll}) + 2 \text{ H}^+(\text{tll})$
R463	$\text{PQH}_2(\text{cym}) + 2 \text{ Pc}^+(\text{pps}) \rightarrow \text{PQ}(\text{cym}) + 2 \text{ Pc}(\text{pps}) + 2 \text{ H}^+(\text{pps})$
R464	$\text{PQH}_2(\text{tlm}) + 1 \text{ Oxidized rieskeB6}(\text{tlm}) \rightarrow \text{PQHB6L}(\text{tlm}) + 1 \text{ Reduced rieskeB6}(\text{tlm}) + 1 \text{ H}^+(\text{tll})$
R465	$1 \text{ Reduced rieskeB6}(\text{tlm}) + 1 \text{ Pc}^+(\text{tll}) \rightarrow 1 \text{ Oxidized rieskeB6}(\text{tlm}) + 1 \text{ Pc}(\text{tll})$
R466	$\text{PQHB6L}(\text{tlm}) + 1 \text{ HB3pB6}(\text{tlm}) \rightarrow \text{PQB6S}(\text{tlm}) + 1 \text{ HB2pB6}(\text{tlm}) + 1 \text{ H}^+(\text{tll})$
R467	$\text{PQB6S}(\text{tlm}) \rightarrow \text{PQ}(\text{tlm})$
R468	$\text{PQB6S}(\text{tlm}) + 1 \text{ HB2pB6}(\text{tlm}) + 1 \text{ H}^+(\text{cyt}) \rightarrow \text{PQHB6S}(\text{tlm}) + 1 \text{ HB3pB6}(\text{tlm})$
R469	$\text{PQHB6S}(\text{tlm}) + 1 \text{ HB2pB6}(\text{tlm}) + 1 \text{ H}^+(\text{cyt}) \rightarrow \text{PQH}_2(\text{tlm}) + 1 \text{ HB3pB6}(\text{tlm})$
R470	$\text{PQH}_2(\text{cym}) + 1 \text{ Oxidized rieskeB6}(\text{cym}) \rightarrow \text{PQHB6L}(\text{cym}) + 1 \text{ Reduced rieskeB6}(\text{cym}) + 1 \text{ H}^+(\text{pps})$
R471	$1 \text{ Reduced rieskeB6}(\text{cym}) + 1 \text{ Pc}^+(\text{pps}) \rightarrow 1 \text{ Oxidized rieskeB6}(\text{cym}) + 1 \text{ Pc}(\text{pps})$
R472	$\text{PQHB6L}(\text{cym}) + 1 \text{ HB3pB6}(\text{cym}) \rightarrow \text{PQB6S}(\text{cym}) + 1 \text{ HB2pB6}(\text{cym}) + 1 \text{ H}^+(\text{pps})$
R473	$\text{PQB6S}(\text{cym}) \rightarrow \text{PQ}(\text{cym})$
R474	$\text{PQB6S}(\text{cym}) + 1 \text{ HB2pB6}(\text{cym}) + 1 \text{ H}^+(\text{cyt}) \rightarrow \text{PQHB6S}(\text{cym}) + 1 \text{ HB3pB6}(\text{cym})$
R475	$\text{PQHB6S}(\text{cym}) + 1 \text{ HB2pB6}(\text{cym}) + 1 \text{ H}^+(\text{cyt}) \rightarrow \text{PQH}_2(\text{cym}) + 1 \text{ HB3pB6}(\text{cym})$
R476	$1 \text{ PhotonP700}(\text{tlm}) + 1 \text{ P700}(\text{tlm}) + 1 \text{ Fd}^+(\text{cyt}) \rightarrow 1 \text{ P700p}(\text{tlm}) + 1 \text{ Fd}(\text{cyt})$
R477	$1 \text{ P700p}(\text{tlm}) + 1 \text{ Pc}(\text{tll}) \rightarrow 1 \text{ Pc}^+(\text{tll}) + 1 \text{ P700}(\text{tlm})$
R478	$2 \text{ Fd}(\text{cyt}) + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow 2 \text{ Fd}^+(\text{cyt}) + \text{NADPH}(\text{cyt})$
R479	$2 \text{ Fd}(\text{cyt}) + \text{Thioredoxin disulfide}(\text{cyt}) + 2 \text{ H}^+(\text{cyt}) \leftrightarrow 2 \text{ Fd}^+(\text{cyt}) + \text{Thioredoxin}(\text{cyt})$
R480	$1 \text{ PhotonP700}(\text{tlm}) + 1 \text{ P700}(\text{tlm}) + 1 \text{ O}_2(\text{cyt}) \rightarrow 1 \text{ P700p}(\text{tlm}) + 1 \text{ Superoxide anion}(\text{cyt})$
R481	$2 \text{ NADPH}(\text{cyt}) + 2 \text{ H}^+(\text{cyt}) + \text{O}_2(\text{cyt}) \rightarrow 2 \text{ NADP}^+(\text{cyt}) + 2 \text{ H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R482	$1 \text{ O}_2(\text{cyt}) + 1 \text{ QAnP680}(\text{tlm}) \rightarrow 1 \text{ Superoxide anion}(\text{cyt}) + 1 \text{ QAP680}(\text{tlm})$
R483	$\text{NADPH}(\text{cyt}) + 5 \text{ H}^+(\text{cyt}) + \text{PQ}(\text{tlm}) \rightarrow \text{NADP}^+(\text{cyt}) + \text{PQH}_2(\text{tlm}) + 4 \text{ H}^+(\text{tll})$
R484	$1 \text{ Photon680}(\text{tlm}) + 1 \text{ P680}(\text{tlm}) + 1 \text{ QAP680}(\text{tlm}) \rightarrow 1 \text{ P680p}(\text{tlm}) + 1 \text{ QAnP680}(\text{tlm})$
R485	$1 \text{ PQ}(\text{tlm}) + 1 \text{ QAnP680}(\text{tlm}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \rightarrow 1 \text{ PQnP680}(\text{tlm}) + 1 \text{ QAP680}(\text{tlm})$
R486	$1 \text{ PQnP680}(\text{tlm}) + 1 \text{ QAnP680}(\text{tlm}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \rightarrow 1 \text{ PQH}_2(\text{tlm}) + 1 \text{ QAP680}(\text{tlm})$
R487	$1 \text{ P680p}(\text{tlm}) + 1 \text{ S0P680}(\text{tlm}) \rightarrow 1 \text{ P680}(\text{tlm}) + 1 \text{ S1P680}(\text{tlm})$
R488	$1 \text{ P680p}(\text{tlm}) + 1 \text{ S1P680}(\text{tlm}) \rightarrow 1 \text{ P680}(\text{tlm}) + 1 \text{ S2P680}(\text{tlm})$
R489	$1 \text{ P680p}(\text{tlm}) + 1 \text{ S2P680}(\text{tlm}) \rightarrow 1 \text{ P680}(\text{tlm}) + 1 \text{ S3P680}(\text{tlm})$

- R490 1 P680p(tlm) + 1 S3P680(tlm) → 1 P680(tlm) + 1 S4P680(tlm)
- R491 1 S4P680(tlm) + 2 H2O(tll) → 1 S0P680(tlm) + O2(tll) + 4 H+(tll)
- R492 14 H+(tll) + 3 ADP(cyt) + 3 Pi(cyt) → 3 ATP(cyt) + 3 H2O(cyt) + 14 H+(cyt)
- R493 14 H+(pps) + 3 ADP(cyt) + 3 Pi(cyt) → 3 ATP(cyt) + 3 H2O(cyt) + 14 H+(cyt)

Piruvato y Ciclo TCA

- R494 ATP(cyt) + Pyruvate(cyt) ← ADP(cyt) + Phosphoenolpyruvate(cyt)
- R495 ATP(cyt) + Pyruvate(cyt) ← ADP(cyt) + Phosphoenolpyruvate(cyt)
- R496 Pyruvate(cyt) + CoA(cyt) + NAD+(cyt) → Acetyl-CoA(cyt) + CO2(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
- R497 Pyruvate(cyt) + CoA(cyt) + NAD+(cyt) → Acetyl-CoA(cyt) + CO2(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
- R498 Pyruvate(cyt) + CoA(cyt) + NAD+(cyt) → Acetyl-CoA(cyt) + CO2(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
- R499 ATP(cyt) + Acetate(cyt) + CoA(cyt) ↔ AMP(cyt) + PPI(cyt) + Acetyl-CoA(cyt)
- R500 Acetaldehyde(cyt) + NAD+(cyt) + H2O(cyt) ← Acetate(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
- R501 Ethanol(cyt) + NAD+(cyt) ← Acetaldehyde(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
- R502 Ethanol(cyt) + NADP+(cyt) ← Acetaldehyde(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
- R503 Pi(cyt) + Oxaloacetate(cyt) ← Phosphoenolpyruvate(cyt) + HCO3-(cyt) + H+(cyt)
- R504 (S)-Malate(cyt) + NAD+(cyt) ↔ Oxaloacetate(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
- R505 L-Aspartate(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ Oxaloacetate(cyt) + L-Glutamate(cyt)
- R506 ATP(cyt) + Pyruvate(cyt) + H2O(cyt) → AMP(cyt) + Phosphoenolpyruvate(cyt) + Pi(cyt)
- R507 L-Alanine(cyt) + NAD+(cyt) + H2O(cyt) ↔ Pyruvate(cyt) + NH3(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
- R508 Citrate(cyt) ↔ cis-Aconitate(cyt) + H2O(cyt)
- R509 Isocitrate(cyt) ↔ cis-Aconitate(cyt) + H2O(cyt)
- R510 Isocitrate(cyt) + NADP+(cyt) → 2-Oxoglutarate(cyt) + CO2(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
- R511 ATP(cyt) + Succinate(cyt) + CoA(cyt) ↔ ADP(cyt) + Pi(cyt) + Succinyl-CoA(cyt)
- R512 (S)-Malate(cyt) ↔ Fumarate(cyt) + H2O(cyt)
- R513 Succinate(cyt) + PQ(tlm) → PQH2(tlm) + Fumarate(cyt)
- R514 Succinate(cyt) + PQ(cym) → PQH2(cym) + Fumarate(cyt)
- R515 Citrate(cyt) + CoA(cyt) ← Acetyl-CoA(cyt) + H2O(cyt) + Oxaloacetate(cyt)
- R516 (R)-Lactate(cyt) + NAD+(cyt) ↔ Pyruvate(cyt) + NADH(cyt) + H+(cyt)
- R517 (S)-Malate(cyt) + NADP+(cyt) → Pyruvate(cyt) + CO2(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)
- R518 Acetyl-CoA(cyt) + Pi(cyt) ↔ CoA(cyt) + Acetyl phosphate(cyt)
- R519 ATP(cyt) + Acetate(cyt) ← ADP(cyt) + Acetyl phosphate(cyt)

R520	$2\text{-Phosphoglycolate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Glycolate}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt})$
R521	$2\text{-Phosphoglycolate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Glycolate}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt})$
R522	$2\text{-Phosphoglycolate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Glycolate}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt})$
R523	$2 \text{Fd}(\text{cyt}) + \text{Acetyl-CoA}(\text{cyt}) + \text{CO}_2(\text{cyt}) + 2 \text{H}^+(\text{cyt}) \leftarrow 2 \text{Fd}^+(\text{cyt}) + \text{Pyruvate}(\text{cyt}) + \text{CoA}(\text{cyt})$
R524	$\text{Oxalate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Formate}(\text{cyt}) + \text{CO}_2(\text{cyt})$
R525	$\text{Formate}(\text{cyt}) + 2 \text{Ferricytochrome b1}(\text{cyt}) \rightarrow \text{CO}_2(\text{cyt}) + 2 \text{Ferrocycytochrome b1}(\text{cyt}) + 2 \text{H}^+(\text{cyt})$
R526	$\text{L-Aspartate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) + \text{O}_2(\text{cyt}) \rightarrow \text{Oxaloacetate}(\text{cyt}) + \text{NH}_3(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}_2(\text{cyt})$
R527	$\text{L-Glutamate}(\text{cyt}) \rightarrow 4\text{-Aminobutanoate}(\text{cyt}) + \text{CO}_2(\text{cyt})$
R528	$2\text{-Oxoglutarate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Succinate semialdehyde}(\text{cyt}) + \text{CO}_2(\text{cyt})$
R529	$\text{Succinate semialdehyde}(\text{cyt}) + \text{NADP}^+(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Succinate}(\text{cyt}) + \text{NADPH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R530	$4\text{-Aminobutanoate}(\text{cyt}) + 2\text{-Oxoglutarate}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Succinate semialdehyde}(\text{cyt}) + \text{L-Glutamate}(\text{cyt})$
R531	$\text{Glycolate}(\text{cyt}) + \text{NAD}^+(\text{cyt}) \rightarrow \text{Glyoxylate}(\text{cyt}) + \text{NADH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R532	$\text{Glycolate}(\text{cyt}) + \text{NAD}^+(\text{cyt}) \rightarrow \text{Glyoxylate}(\text{cyt}) + \text{NADH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
Purina	
R533	$5\text{-Phosphoribosylamine}(\text{cyt}) + \text{PPI}(\text{cyt}) + \text{L-Glutamate}(\text{cyt}) \leftarrow \text{L-Glutamine}(\text{cyt}) + 5\text{-Phospho-alpha-D-ribose 1-PPI}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt})$
R534	$\text{ATP}(\text{cyt}) + 5\text{-Phosphoribosylamine}(\text{cyt}) + \text{Glycine}(\text{cyt}) \rightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + 5\text{-Phosphoribosylglycinamide}(\text{cyt})$
R535	$10\text{-Formyltetrahydrofolate}(\text{cyt}) + 5\text{-Phosphoribosylglycinamide}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Tetrahydrofolate}(\text{cyt}) + 5\text{-Phosphoribosyl-N-formylglycinamide}(\text{cyt})$
R536	$5\text{-Phosphoribosylglycinamide}(\text{cyt}) + 5,10\text{-Methenyltetrahydrofolate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow 5\text{-Phosphoribosyl-N-formylglycinamide}(\text{cyt}) + \text{Tetrahydrofolate}(\text{cyt})$
R537	$\text{ATP}(\text{cyt}) + 5\text{-Phosphoribosyl-N-formylglycinamide}(\text{cyt}) + \text{L-Glutamine}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + 2\text{-(Formamido)-N1-(5'-phosphoribosyl)acetamidine}(\text{cyt}) + \text{L-Glutamate}(\text{cyt})$
R538	$\text{ATP}(\text{cyt}) + 2\text{-(Formamido)-N1-(5'-phosphoribosyl)acetamidine}(\text{cyt}) \rightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + \text{Aminoimidazole ribotide}(\text{cyt})$
R539	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{Aminoimidazole ribotide}(\text{cyt}) + \text{HCO}_3^-(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt}) \rightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + 5\text{-Carboxyamino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole}(\text{cyt})$
R540	$5\text{-Carboxyamino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole}(\text{cyt}) \leftrightarrow 1\text{-(5-Phospho-D-ribosyl)-5-amino-4-imidazolecarboxylate}(\text{cyt})$
R541	$\text{ATP}(\text{cyt}) + 1\text{-(5-Phospho-D-ribosyl)-5-amino-4-imidazolecarboxylate}(\text{cyt}) + \text{L-Aspartate}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + 1\text{-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-4-(N-succinocarboxamide)-imidazole}(\text{cyt})$
R542	$1\text{-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-4-(N-succinocarboxamide)-imidazole}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Fumarate}(\text{cyt}) + 1\text{-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-4-imidazolecarboxamide}(\text{cyt})$
R543	$10\text{-Formyltetrahydrofolate}(\text{cyt}) + 1\text{-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-4-imidazolecarboxamide}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Tetrahydrofolate}(\text{cyt}) + 1\text{-(5'-Phosphoribosyl)-5-formamido-4-imidazolecarboxamide}(\text{cyt})$
R544	$\text{IMP}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow 1\text{-(5'-Phosphoribosyl)-5-formamido-4-imidazolecarboxamide}(\text{cyt})$
R545	$\text{GTP}(\text{cyt}) + \text{IMP}(\text{cyt}) + \text{L-Aspartate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{GDP}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt}) + \text{N}_6\text{-(1,2-Dicarboxyethyl)-AMP}(\text{cyt})$
R546	$\text{N}_6\text{-(1,2-Dicarboxyethyl)-AMP}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Fumarate}(\text{cyt}) + \text{AMP}(\text{cyt})$
R547	$\text{dADP}(\text{cyt}) + \text{Thioredoxin disulfide}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftarrow \text{Thioredoxin}(\text{cyt}) + \text{ADP}(\text{cyt})$

R548	$\text{dAMP}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Deoxyadenosine}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt})$
R549	$\text{dAMP}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Deoxyadenosine}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt})$
R550	$\text{dGDP}(\text{cyt}) + \text{Thioredoxin disulfide}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftarrow \text{GDP}(\text{cyt}) + \text{Thioredoxin}(\text{cyt})$
R551	$\text{AMP}(\text{cyt}) + \text{PPI}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Adenine}(\text{cyt}) + 5\text{-Phospho-alpha-D-ribose 1-PPI}(\text{cyt})$
R552	$\text{GTP}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{GMP}(\text{cyt}) + \text{PPI}(\text{cyt})$
R553	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{GDP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{GTP}(\text{cyt})$
R554	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{dADP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{dATP}(\text{cyt})$
R555	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{dGDP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{dGTP}(\text{cyt})$
R556	$5\text{'-Deoxyadenosine}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow 5\text{'-Deoxy-D-ribose}(\text{cyt}) + \text{Adenine}(\text{cyt})$
R557	$\text{AMP}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Adenosine}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt})$
R558	$\text{AMP}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Adenosine}(\text{cyt}) + \text{Pi}(\text{cyt})$
R559	$\text{IMP}(\text{cyt}) + \text{NAD}^+(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Xanthosine 5'-phosphate}(\text{cyt}) + \text{NADH}(\text{cyt}) + \text{H}^+(\text{cyt})$
R560	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{Xanthosine 5'-phosphate}(\text{cyt}) + \text{L-Glutamine}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{AMP}(\text{cyt}) + \text{PPI}(\text{cyt}) + \text{GMP}(\text{cyt}) + \text{L-Glutamate}(\text{cyt})$
R561	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{GMP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{GDP}(\text{cyt})$
R562	$5\text{'-Phosphoribosylglycinamide}(\text{cyt}) + \text{Formate}(\text{cyt}) + \text{ATP}(\text{cyt}) \rightarrow 5\text{'-Phosphoribosyl-N-formylglycinamide}(\text{cyt}) + \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{Orthophosphate}(\text{cyt})$
R563	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{AMP}(\text{cyt}) \leftrightarrow 2 \text{ADP}(\text{cyt})$
R564	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{AMP}(\text{cyt}) \leftrightarrow 2 \text{ADP}(\text{cyt})$
R565	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{dAMP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{dADP}(\text{cyt})$
R566	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{dAMP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{dADP}(\text{cyt})$
Pirimidina	
R567	$\text{UTP}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \rightarrow \text{UMP}(\text{cyt}) + \text{PPI}(\text{cyt})$
R568	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{dCDP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{dCTP}(\text{cyt})$
R569	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{dUDP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{dUTP}(\text{cyt})$
R570	$\text{Carbamoyl phosphate}(\text{cyt}) + \text{L-Aspartate}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Pi}(\text{cyt}) + \text{N-Carbamoyl-L-aspartate}(\text{cyt})$
R571	$(\text{S})\text{-Dihydroorotate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{N-Carbamoyl-L-aspartate}(\text{cyt})$
R572	$(\text{S})\text{-Dihydroorotate}(\text{cyt}) + \text{H}_2\text{O}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{N-Carbamoyl-L-aspartate}(\text{cyt})$
R573	$(\text{S})\text{-Dihydroorotate}(\text{cyt}) + \text{Fumarate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Orotate}(\text{cyt}) + \text{Succinate}(\text{cyt})$
R574	$(\text{S})\text{-Dihydroorotate}(\text{cyt}) + \text{Fumarate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{Orotate}(\text{cyt}) + \text{Succinate}(\text{cyt})$
R575	$\text{Orotidine 5'-phosphate}(\text{cyt}) + \text{PPI}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{Orotate}(\text{cyt}) + 5\text{-Phospho-alpha-D-ribose 1-PPI}(\text{cyt})$
R576	$\text{Orotidine 5'-phosphate}(\text{cyt}) \rightarrow \text{UMP}(\text{cyt}) + \text{CO}_2(\text{cyt})$
R577	$\text{ATP}(\text{cyt}) + \text{CMP}(\text{cyt}) \leftrightarrow \text{ADP}(\text{cyt}) + \text{CDP}(\text{cyt})$

R578	ATP(cyt) + UMP(cyt) ↔ ADP(cyt) + UDP(cyt)
R579	ATP(cyt) + UMP(cyt) ↔ ADP(cyt) + UDP(cyt)
R580	ATP(cyt) + UDP(cyt) ↔ ADP(cyt) + UTP(cyt)
R581	ATP(cyt) + CDP(cyt) ↔ ADP(cyt) + CTP(cyt)
R582	ATP(cyt) + UTP(cyt) + NH ₃ (cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + CTP(cyt)
R583	ATP(cyt) + UTP(cyt) + L-Glutamine(cyt) + H ₂ O(cyt) → ADP(cyt) + Pi(cyt) + CTP(cyt) + L-Glutamate(cyt)
R584	dCTP(cyt) + H ₂ O(cyt) → dUTP(cyt) + NH ₃ (cyt)
R585	CTP(cyt) + H ₂ O(cyt) → UTP(cyt) + NH ₃ (cyt)
R586	ATP(cyt) + dTMP(cyt) ↔ ADP(cyt) + dTDP(cyt)
R587	ATP(cyt) + dUMP(cyt) ↔ ADP(cyt) + dUDP(cyt)
R588	5,10-Methylenetetrahydrofolate(cyt) + dUMP(cyt) + NADPH(cyt) + H ⁺ (cyt) → Tetrahydrofolate(cyt) + dTMP(cyt) + NADP ⁺ (cyt)
R589	dUTP(cyt) + H ₂ O(cyt) → dUMP(cyt) + PPI(cyt)
R590	dCDP(cyt) + Thioredoxin disulfide(cyt) + H ₂ O(cyt) ← Thioredoxin(cyt) + CDP(cyt)
R591	dUDP(cyt) + Thioredoxin disulfide(cyt) + H ₂ O(cyt) ← Thioredoxin(cyt) + UDP(cyt)
R592	ATP(cyt) + dTDP(cyt) ↔ ADP(cyt) + dTTP(cyt)
Quinona y Tocoferol	
R593	Phytyl PPI(cyt) + Homogentisate(cyt) → 2-Methyl-6-phytylquinol(cyt) + PPI(cyt) + CO ₂ (cyt)
R594	2-Methyl-6-phytylquinol(cyt) ↔ delta-Tocopherol(cyt)
R595	2,3-Dimethyl-5-phytylquinol(cyt) ↔ gamma-Tocopherol(cyt)
R596	S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + gamma-Tocopherol(cyt) → S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + alpha-Tocopherol(cyt)
R597	delta-Tocopherol(cyt) + S-Adenosyl-L-methionine(cyt) → beta-Tocopherol(cyt) + S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt)
R598	4-Hydroxybenzoate(cyt) + Pyruvate(cyt) ← Chorismate(cyt)
R599	all-trans-Nonaprenyl PPI(cyt) + 4-Hydroxybenzoate(cyt) → PPI(cyt) + 3-Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate(cyt)
R600	3-Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate(cyt) + 4 H ⁺ (cyt) → 2-Methyl-6-solanyl-1,4-benzoquinol(cyt) + H ₂ O(cyt)
R601	2-Methyl-6-solanyl-1,4-benzoquinol(cyt) + S-Adenosyl-L-methionine(cyt) → Plastoquinone-9(cyt) + S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + 2 H ⁺ (cyt)
R602	2-Methyl-6-phytylquinol(cyt) + S-Adenosyl-L-methionine(cyt) → 2,3-Dimethyl-5-phytylquinol(cyt) + S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt)
R603	Chorismate(cyt) ↔ Isochorismate(cyt)
R604	Chorismate(cyt) ↔ Isochorismate(cyt)
R605	Isochorismate(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) → 2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate(cyt) + CO ₂ (cyt)
R606	2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate(cyt) + Pyruvate(cyt) → (1R,6R)-6-Hydroxy-2-succinylcyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate(cyt) +

- R607** (1R,6R)-6-Hydroxy-2-succinylcyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate(cyt) → 2-Succinylbenzoate(cyt) + H₂O(cyt)
- R608** ATP(cyt) + 2-Succinylbenzoate(cyt) + CoA(cyt) → AMP(cyt) + PPI(cyt) + 2-Succinylbenzoyl-CoA(cyt)
- R609** 2-Succinylbenzoyl-CoA(cyt) → 1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA(cyt) + H₂O(cyt)
- R610** 1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA(cyt) + H₂O(cyt) → 1,4-Dihydroxy-2-naphthoate(cyt) + CoA(cyt)
- R611** 1,4-Dihydroxy-2-naphthoate(cyt) + Phytyl PPI(cyt) → 2-Phytyl-1,4-naphthoquinone(cyt) + CO₂(cyt) + PPI(cyt) + 2 H⁺(cyt)
- R612** 2-Phytyl-1,4-naphthoquinone(cyt) + S-Adenosyl-L-methionine(cyt) → Phylloquinone(cyt) + S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt)
- R613** 3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvate(cyt) + O₂(cyt) → Homogentisate(cyt) + CO₂(cyt)

Riboflavina

- R614** GTP(cyt) + 3 H₂O(cyt) → Formate(cyt) + 2,5-Diamino-6-(5'-phosphoribosylamino)-4-pyrimidineone(cyt) + PPI(cyt)
- R615** 2,5-Diamino-6-(5'-phosphoribosylamino)-4-pyrimidineone(cyt) + H₂O(cyt) → 5-Amino-6-(5'-phosphoribosylamino)uracil(cyt) + NH₃(cyt)
- R616** 5-Amino-6-(5'-phosphoribitylamino)uracil(cyt) + H₂O(cyt) ↔ 5-Amino-6-(1-D-ribitylamino)uracil(cyt) + Pi(cyt)
- R617** 5-Amino-6-(5'-phosphoribitylamino)uracil(cyt) + NADP⁺(cyt) ← 5-Amino-6-(5'-phosphoribosylamino)uracil(cyt) + NADPH(cyt) + H⁺(cyt)
- R618** D-Ribulose 5-phosphate(cyt) → 3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate(cyt) + Formate(cyt)
- R619** 5-Amino-6-(1-D-ribitylamino)uracil(cyt) + 3,4-Dihydroxy-2-butanone 4-phosphate(cyt) → 6,7-Dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine(cyt) + 2 H₂O(cyt) + Pi(cyt)
- R620** 2 6,7-Dimethyl-8-(1-D-ribityl)lumazine(cyt) → Riboflavin(cyt) + 5-Amino-6-(1-D-ribitylamino)uracil(cyt)
- R621** ATP(cyt) + Riboflavin(cyt) → ADP(cyt) + FMN(cyt)
- R622** ATP(cyt) + FMN(cyt) → PPI(cyt) + FAD(cyt)
- R623** Reduced FMN(cyt) + NADP⁺(cyt) ↔ FMN(cyt) + NADPH(cyt) + H⁺(cyt)
- R624** Reduced FMN(cyt) + O₂(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt) → Dimethylbenzimidazole(cyt) + D-Erythrose 4-phosphate(cyt) + H₂O(cyt) + NAD⁺(cyt)

Generales

- R625** ADP-glucose(cyt) + sn-Glycerol 3-phosphate(cyt) → 2-(beta-D-Glucosyl)-sn-glycerol 3-phosphate(cyt) + ADP(cyt)
- R626** 2-(beta-D-Glucosyl)-sn-glycerol 3-phosphate(cyt) + H₂O(cyt) → 2-(beta-D-Glucosyl)-sn-glycerol(cyt) + Pi(cyt)
- R627** L-Lysine(cyt) → Cadaverine(cyt) + CO₂(cyt)
- R628** Agmatine(cyt) + H₂O(cyt) → Putrescine(cyt) + Urea(cyt)
- R629** S-Adenosylmethioninamine(cyt) + Putrescine(cyt) → 5'-Methylthioadenosine(cyt) + Spermidine(cyt) + H⁺(cyt)
- R630** S-Adenosylmethioninamine(cyt) + Spermidine(cyt) → 5'-Methylthioadenosine(cyt) + Spermine(cyt) + H⁺(cyt)
- R631** 5'-Methylthioadenosine(cyt) + Pi(cyt) → Adenine(cyt) + S-Methyl-5-thio-D-ribose 1-phosphate(cyt)
- R632** S-Methyl-5-thio-D-ribose 1-phosphate(cyt) ↔ S-Methyl-5-thio-D-ribulose 1-phosphate(cyt)

Glucólisis y Azúcares

- R633** ATP(cyt) + D-Glucose 1-phosphate(cyt) → PPI(cyt) + ADP-Glucose(cyt)
- R634** ADP-Glucose(cyt) → ADP(cyt) + Glycogen(cyt)

R635 ADP-Glucose(cyt) → ADP(cyt) + Glycogen(cyt)

R637 Glycogen(cyt) + Pi(cyt) → D-Glucose 1-phosphate(cyt)

R638 Glycogen(cyt) + Pi(cyt) → D-Glucose 1-phosphate(cyt)

Piruvato y Ciclo TCA

R643 2 Acetyl-CoA(cyt) ↔ CoA(cyt) + Acetoacetyl-Co(cyt)

R644 (R)-3-Hydroxybutanoyl-CoA(cyt) + NADP+(cyt) ↔ Acetoacetyl-CoA(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)

R645 (R)-3-Hydroxybutanoyl-CoA(cyt) ↔ Poly-beta-hydroxybutyrate(cyt) + CoA(cyt)

Aspargina, Aspartato, Lisina y Treonina

R646 1 L-Aspartate(cyt) + 1 L-Arginine(cyt) + 2 ATP(cyt) + Cyanophycin polymer(cyt) → Cyanophycin(cyt) + 2 Pi(cyt) + 2 ADP(cyt)

R647 Cyanophycine(cyt) + 2 H₂O(cyt) → 1 L-Aspartate(cyt) + 1 L-Arginine(cyt) + Cyanophycin polymer(cyt)

Terpenoides

R648 Pyruvate(cyt) + D-Glyceraldehyde 3-phosphate(cyt) → 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate(cyt) + CO₂(cyt)

R649 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate(cyt) + NADP+(cyt) ← 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)

R650 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate(cyt) + CTP(cyt) → 4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol(cyt) + PPI(cyt)

R651 4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol(cyt) + ATP(cyt) ↔ 2-Phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol(cyt) + ADP(cyt)

R652 2-Phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol(cyt) → 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cycloPPI(cyt) + CMP(cyt)

R653 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cycloPPI(cyt) + 2 Fd(cyt) + 2 H+(cyt) → 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-PPI(cyt) + H₂O(cyt) + 2 Fd+(cyt)

R654 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-PPI(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt) → Isopentenyl PPI(cyt) + NADP+(cyt) + H₂O(cyt)

R655 Dimethylallyl PPI(cyt) + NADP+(cyt) + H₂O(cyt) ← 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-PPI(cyt) + NADPH(cyt) + H+(cyt)

R656 Isopentenyl PPI(cyt) ↔ Dimethylallyl PPI(cyt)

R657 Dimethylallyl PPI(cyt) + Isopentenyl PPI(cyt) → PPI(cyt) + Geranyl PPI(cyt)

R658 Geranyl PPI(cyt) + Isopentenyl PPI(cyt) → PPI(cyt) + trans,trans-Farnesyl PPI(cyt)

R659 trans,trans-Farnesyl PPI(cyt) + Isopentenyl PPI(cyt) → PPI(cyt) + Geranylgeranyl PPI(cyt)

R660 trans,trans-Farnesyl PPI(cyt) + 8 Isopentenyl PPI(cyt) → di-trans,poly-cis-Undecaprenyl PPI(cyt) + 8 PPI(cyt)

R661 Geranylgeranyl PPI(cyt) + 3 H+(cyt) + 3 NADPH(cyt) → Phytyl PPI(cyt) + 3 NADP+(cyt)

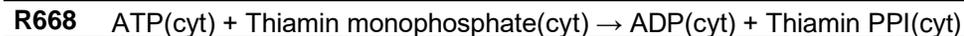
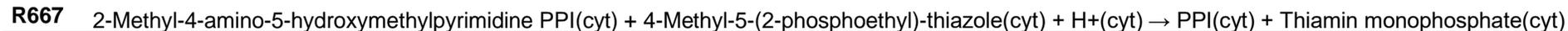
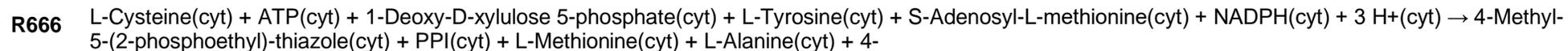
R662 Geranyl PPI(cyt) + 7 Isopentenyl PPI(cyt) → all-trans-Nonaprenyl PPI(cyt) + 7 PPI(cyt)

R663 Geranylgeranyl PPI(cyt) + 5 Isopentenyl PPI(cyt) → all-trans-Nonaprenyl PPI(cyt) + 5 PPI(cyt)

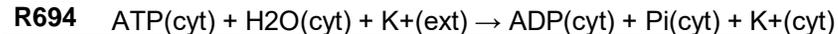
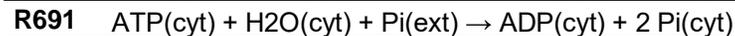
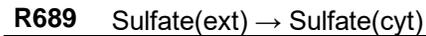
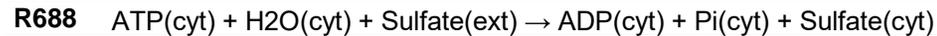
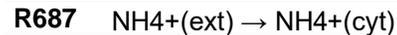
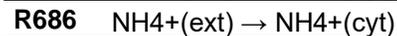
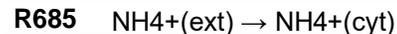
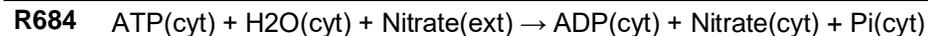
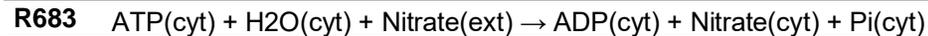
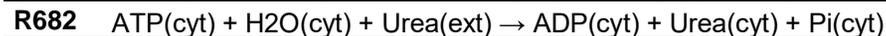
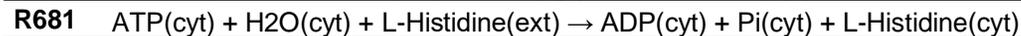
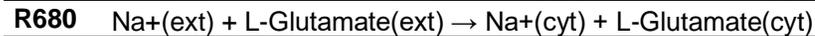
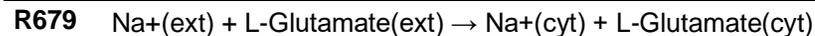
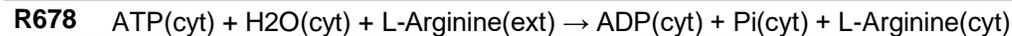
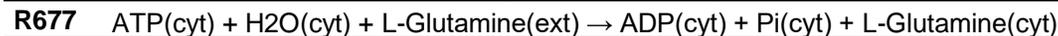
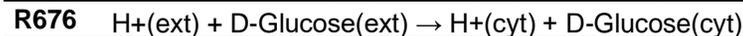
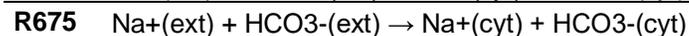
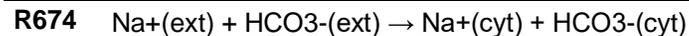
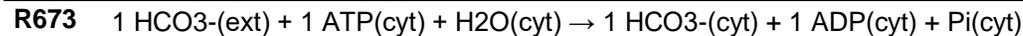
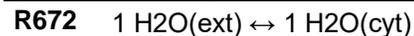
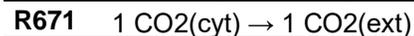
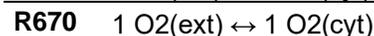
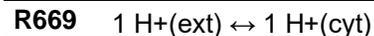
Cisteína, Glicina, Metionina y Serina

R664 Aminoimidazole ribotide(cyt) + S-Adenosyl-L-methionine(cyt) ↔ 4-Amino-2-methyl-5-phosphomethylpyrimidine(cyt) + L-Methionine(cyt) + 5'-Deoxyadenosine(cyt) + Formate(cyt) + Carbon monoxide(cyt)

R665 ATP(cyt) + 4-Amino-2-methyl-5-phosphomethylpyrimidine(cyt) → ADP(cyt) + 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine PPI(cyt)



Intercambio y Transporte



R695	$K^{+}(\text{ext}) + Na^{+}(\text{cyt}) \rightarrow Na^{+}(\text{ext}) + K^{+}(\text{cyt})$
R696	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Zn^{2+}(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Zn^{2+}(\text{cyt})$
R697	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Zn^{2+}(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Zn^{2+}(\text{cyt})$
R698	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Nickel(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Nickel(\text{cyt})$
R699	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Co^{2+}(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Co^{2+}(\text{cyt})$
R700	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Co^{2+}(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Co^{2+}(\text{cyt})$
R701	$GTP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Fe^{2+}(\text{ext}) \rightarrow GDP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Fe^{2+}(\text{cyt})$
R702	$Magnesium(\text{ext}) \rightarrow Magnesium(\text{cyt})$
R703	$Magnesium(\text{ext}) \rightarrow Magnesium(\text{cyt})$
R704	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Magnesium(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Magnesium(\text{cyt})$
R705	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Ca^{2+}(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Ca^{2+}(\text{cyt})$
R706	$Ca^{2+}(\text{ext}) + H^{+}(\text{cyt}) \leftrightarrow H^{+}(\text{ext}) + Ca^{2+}(\text{cyt})$
R707	$Na^{+}(\text{ext}) + H^{+}(\text{cyt}) \leftrightarrow H^{+}(\text{ext}) + Na^{+}(\text{cyt})$
R708	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Cu^{2+}(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Cu^{2+}(\text{cyt})$
R709	$1 \text{ Molybdate}(\text{ext}) + 1 ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) \rightarrow 1 \text{ Molybdate}(\text{cyt}) + 1 ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt})$
R710	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Fe^{3+}(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Fe^{3+}(\text{cyt})$
R711	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Fe^{3+}(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Fe^{3+}(\text{cyt})$
R712	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Putrescine(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Putrescine(\text{cyt})$
R713	$ATP(\text{cyt}) + H_2O(\text{cyt}) + Spermidine(\text{ext}) \rightarrow ADP(\text{cyt}) + Pi(\text{cyt}) + Spermidine(\text{cyt})$
R714	$5\text{-Deoxy-D-ribose}(\text{cyt}) \rightarrow 5\text{-Deoxy-D-ribose}(\text{ext})$
R715	$S\text{-Methyl-5-thio-D-ribulose 1-phosphate}(\text{cyt}) \rightarrow S\text{-Methyl-5-thio-D-ribulose 1-phosphate}(\text{ext})$
R716	$4\text{-Methylphenol}(\text{cyt}) \rightarrow 4\text{-Methylphenol}(\text{ext})$
R717	$Carbon\ oxide(\text{cyt}) \rightarrow Carbon\ oxide(\text{ext})$
R718	$H^{+}(\text{cyt}) \leftrightarrow H^{+}(\text{cax})$
R719	$O_2(\text{cyt}) \rightarrow O_2(\text{cax})$
R720	$HCO_3^{-}(\text{cyt}) \rightarrow HCO_3^{-}(\text{cax})$
R721	$D\text{-Ribulose 1,5-bisphosphate}(\text{cyt}) \rightarrow D\text{-Ribulose 1,5-bisphosphate}(\text{cax})$
R722	$3\text{-Phospho-D-glycerate}(\text{cax}) \rightarrow 3\text{-Phospho-D-glycerate}(\text{cyt})$
R723	$2\text{-Phosphoglycolate}(\text{cax}) \rightarrow 2\text{-Phosphoglycolate}(\text{cyt})$
R724	$1 H_2O(\text{cyt}) \leftrightarrow 1 H_2O(\text{tll})$
R725	$1 O_2(\text{tll}) \leftrightarrow O_2(\text{cyt})$

R726 1 Plastoquinone-9(cyt) → Plastoquinone-9(tlm)

R727 1 H₂O(pps) ↔ 1 H₂O(cyt)

R728 1 O₂(pps) ↔ 1 O₂(cyt)

R729 1 Plastoquinone-9(cyt) → Plastoquinone-9(cym)

Vitamina B6

R730 D-Erythrose 4-phosphate(cyt) + NAD⁺(cyt) + H₂O(cyt) → 4-Phospho-D-erythronate(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt)

R731 4-Phospho-D-erythronate(cyt) + NAD⁺(cyt) → 2-Oxo-3-hydroxy-4-phosphobutanoate(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt)

R732 O-Phospho-4-hydroxy-L-threonine(cyt) + 2-Oxoglutarate(cyt) ↔ 2-Oxo-3-hydroxy-4-phosphobutanoate(cyt) + L-Glutamate(cyt)

R733 O-Phospho-4-hydroxy-L-threonine(cyt) + NAD⁺(cyt) → 2-Amino-3-oxo-4-phosphonooxybutyrate(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt)

R734 2-Amino-3-oxo-4-phosphonooxybutyrate(cyt) → 3-Amino-2-oxopropyl phosphate(cyt) + CO₂(cyt)

R735 3-Amino-2-oxopropyl phosphate(cyt) + 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate(cyt) → Pyridoxine phosphate(cyt) + Pi(cyt) + 2 H₂O(cyt)

R736 Pyridoxine phosphate(cyt) + O₂(cyt) ↔ Hydrogen peroxide(cyt) + Pyridoxal phosphate(cyt)

Vitamina B12

R737 2 S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + Uroporphyrinogen III(cyt) → 2 S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + Precorrin 2(cyt)

R738 S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + Precorrin 2(cyt) → S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + Precorrin 3A(cyt)

R739 Precorrin 3A(cyt) + O₂(cyt) + NADH(cyt) + H⁺(cyt) → Precorrin 3B(cyt) + NAD⁺(cyt) + H₂O(cyt)

R740 S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + Precorrin 3B(cyt) → S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + Precorrin 4(cyt)

R741 S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + Precorrin 4(cyt) → S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + Precorrin 5(cyt)

R742 Precorrin 6X(cyt) + Acetate(cyt) + S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) ← Precorrin 5(cyt) + S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + H₂O(cyt)

R743 Precorrin 6Y(cyt) + NADP⁺(cyt) ↔ Precorrin 6X(cyt) + NADPH(cyt) + H⁺(cyt)

R744 2 S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + Precorrin 6Y(cyt) → 2 S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + Precorrin 8X(cyt) + CO₂(cyt)

R745 2 S-Adenosyl-L-methionine(cyt) + Precorrin 6Y(cyt) → 2 S-Adenosyl-L-homocysteine(cyt) + Precorrin 8X(cyt) + CO₂(cyt)

R746 Precorrin 8X(cyt) ↔ Hydrogenobyrrinate(cyt)

R747 Precorrin 8X(cyt) ↔ Hydrogenobyrrinate(cyt)

R748 Precorrin 8X(cyt) ↔ Hydrogenobyrrinate(cyt)

R749 Hydrogenobyrrinate(cyt) + 2 L-Glutamine(cyt) + 2 ATP(cyt) + 2 H₂O(cyt) → Hydrogenobyrrinate a,c diamide(cyt) + 2 Pi(cyt) + 2 L-Glutamate(cyt) + 2 ADP(cyt)

R750 Hydrogenobyrrinate a,c diamide(cyt) + Cobalt ion(cyt) + ATP(cyt) + H₂O(cyt) → Cob(II)yrinate a,c diamide(cyt) + Pi(cyt) + ADP(cyt) + H⁺(cyt)

R751 Hydrogenobyrrinate a,c diamide(cyt) + Cobalt ion(cyt) + ATP(cyt) + H₂O(cyt) → Cob(II)yrinate a,c diamide(cyt) + Pi(cyt) + ADP(cyt) + H⁺(cyt)

R752 2 Cob(II)yrinate a,c diamide(cyt) + Reduced FMN(cyt) ↔ 2 Cob(I)yrinate a,c diamide(cyt) + FMN(cyt) + 2 H⁺(cyt)

R753 Cob(I)yrinate a,c diamide(cyt) + ATP(cyt) + H⁺(cyt) → Adenosyl cobyrrinate a,c diamide(cyt) + Triphosphate(cyt)

- R754** Adenosyl cobyrinate a,c diamide(cyt) + 4 L-Glutamine(cyt) + 4 ATP(cyt) + 4 H₂O(cyt) → Adenosyl cobyrinate hexaamide(cyt) + 4 L-Glutamate(cyt) + 4 Pi(cyt) + 4 ADP(cyt)
- R755** Adenosyl cobyrinate hexaamide(cyt) + D-1-Aminopropan-2-ol O-phosphate(cyt) + ATP(cyt) → Adenosyl cobinamide phosphate(cyt) + ADP(cyt) + Pi(cyt)
- R756** Adenosyl cobinamide phosphate(cyt) + GTP(cyt) → Adenosine-GDP-cobinamide(cyt) + PPI(cyt)
- R757** Nicotinate D-ribonucleotide(cyt) + Dimethylbenzimidazole(cyt) → Nicotinate(cyt) + N1-(5-Phospho-alpha-D-ribosyl)-5,6-dimethylbenzimidazole(cyt) + H⁺(cyt)
- R758** N1-(5-Phospho-alpha-D-ribosyl)-5,6-dimethylbenzimidazole(cyt) + H₂O(cyt) → alpha-Ribazole(cyt) + Pi(cyt)
- R759** Cobamide coenzyme(cyt) + GMP(cyt) + H⁺(cyt) ← Adenosine-GDP-cobinamide(cyt) + alpha-Ribazole(cyt)

Intercambio y Transporte

- R800** Ethanol(cyt) → Ethanol(ext)
- R801** CDP-glucose(cyt) → CDP-glucose(ext)
- R802** Deoxyadenosine(cyt) → Deoxyadenosine(ext)
- R803** dTDP-6-deoxy-L-mannose(cyt) → dTDP-6-deoxy-L-mannose(ext)
- R804** GDP-mannose(cyt) → GDP-mannose(ext)
- R805** 3-Hydroxyechinenone(cyt) → 3-Hydroxyechinenone(ext)
- R806** Nickel(cyt) → Nickel(ext)
- R807** Cadaverine(cyt) → Cadaverine(ext)
- R808** dTDP-galactose (cyt) → dTDP-galactose (ext)
- R809** O₂(pps) → O₂(ext)
- R810** D-Fructose(cyt) → D-Fructose(ext)
- R811** 2-(beta-D-Glucosyl)-sn-glycerol(cyt) → 2-(beta-D-Glucosyl)-sn-glycerol(ext)
- R812** Poly-beta-hydroxybutyrate(cyt) → Poly-beta-hydroxybutyrate(ext)
- R813** UDP-D-galactose(cyt) → UDP-D-galactose(ext)
- R814** Iron chelate(cyt) → Iron chelate(ext)
- R815** myo-Inositol(cyt) → myo-Inositol(ext)
- R816** H₂O(pps) → H₂O(ext)
- R817** Spremine(cyt) → Spermine(ext)
- R818** Sucrose(cyt) → Sucrose(ext)
- R819** Pyruvate(cyt) → Acetaldehyde(cyt) + CO₂(cyt)
- R820** Acetate(cyt) → Acetate(ext)
- R821** Pyruvate(cyt) → Pyruvate(ext)
- R822** 2-Oxoglutarate(cyt) → 2-Oxoglutarate(ext)

R823 Fumarate(cyt) → Fumarate(ext)

R824 Succinate(cyt) → Succinate(ext)

R825 Citrate(cyt) → Citrate(ext)

R826 (S)-Malate(cyt) → (S)-Malate(ext)

R827 CO2(ext) → CO2(tll)

R828 CO2(cyt) + H2O(cyt) → HCO3-(cyt) + H+(cyt)

APÉNDICE B

GEM de *Synechocystis*: asociaciones GPR

En este Apéndice se presentan las asociaciones Gen-Proteína-Reacción (GPR) incluidas en el modelo. En la Tabla B.1 se presentan las reacciones con la misma numeración que en el Apéndice A, los números E.C. y los genes asociados a cada una de ellas. Algunos números de reacción no se encuentran en la Tabla B.1 debido a que no contienen ni número E.C ni gen asociado. Estas reacciones son las que se agregaron con fines de modelado o bien reacciones observadas de forma experimental pero aun sin identificar (por ejemplo, excreción de metabolitos al medio).

Tabla B.1. Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R1	2.6.1.1	<i>sll0402</i>
R2	2.6.1.9	<i>sll1958</i>
R3	2.6.1.1	<i>sll0402</i>
R4	2.5.1.54	<i>sll0934</i>
R5	4.2.3.4	<i>slr2130</i>
R6	4.2.1.10	<i>sll1112</i>
R7	1.1.1.25	<i>slr1559</i>
R8	2.7.1.71	<i>sll1669</i>
R9	2.5.1.19	<i>slr0444</i>
R10	4.2.3.5	<i>sll1747</i>
R11	4.1.3.27	<i>slr0055, slr0738</i>
R12	4.1.3.27	<i>slr0055, slr0738</i>
R13	2.4.2.18	<i>slr1867</i>
R14	5.3.1.24	<i>sll0356</i>
R15	4.1.1.48	<i>slr0546</i>
R16	4.2.1.20	<i>slr0543, slr0966</i>
R17	4.2.1.20	<i>slr0543, slr0966</i>
R18	4.2.1.20	<i>slr0543, slr0966</i>
R19	5.4.99.5	<i>sll0109</i>
R20	4.2.1.51	<i>sll1662</i>
R21	1.3.1.12	<i>slr2081</i>
R22	2.6.1.11	<i>sll0938</i>
R23	2.6.1.11	<i>slr1022</i>
R24	1.4.1.14	<i>sll1027, sll1502</i>
R25	6.3.1.2	<i>slr0288</i>
R26	6.3.1.2	<i>slr1756</i>
R27	3.5.1.2	<i>slr2079</i>
R28	1.4.1.4	<i>slr0710</i>
R29	2.7.2.11	<i>slr2035</i>
R30	1.2.1.41	<i>sll0373</i>
R31	1.2.1.41	<i>sll0461</i>
R32	1.5.1.12	<i>sll1561</i>
R33	1.5.1.12	<i>sll1561</i>
R34	1.5.99.8	<i>sll1561</i>
R35	1.5.99.8	<i>sll1561</i>
R36	1.5.1.2	<i>slr0661</i>
R37	2.3.1.1	<i>sll1883</i>
R38	2.3.1.35	<i>sll1883</i>
R39	3.5.1.14	<i>sll0100</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R40	3.5.1.14	<i>slr1653</i>
R42	2.7.2.8	<i>slr1898</i>
R43	1.2.1.38	<i>sll0080</i>
R44	2.1.3.3	<i>sll0902</i>
Rxn	Número E.C.	Genes
R45	4.3.2.1	<i>slr1133</i>
R46	6.3.4.5	<i>slr0585</i>
R47	6.3.5.5	<i>sll0370, sll1498, slr1616</i>
R48	2.7.2.2	<i>sll0573</i>
R49	1.7.7.2	<i>sll1454</i>
R50	1.7.7.1	<i>slr0898</i>
R51	1.4.7.1	<i>sll1499</i>
R52	3.5.3.6	<i>sll1336</i>
R53	2.6.1.13	<i>slr1022</i>
R54	1.4.3.4	<i>slr0782</i>
R55	1.4.3.4	<i>slr0782</i>
R57	3.5.3.7	<i>sll1077 or sll0228</i>
R58	3.5.1.5	<i>sll0420, sll1750, slr1256</i>
R59	1.14.11.2	<i>sll0428 or sll0191</i>
R60	1.5.1.2	<i>slr0661</i>
R61	1.5.1.12	<i>sll1561</i>
R62	2.6.1.1	<i>sll0402</i>
R63	4.1.3.16	<i>sll0107</i>
R64	4.1.1.19	<i>slr0662, slr1312</i>
R65	4.3.1.19	<i>slr2072</i>
R66	4.2.3.1	<i>sll1172</i>
R67	4.2.3.1	<i>sll1688</i>
R68	2.7.1.39	<i>sll1760</i>
R69	1.1.1.3	<i>sll0455</i>
R70	1.2.1.11	<i>slr0549</i>
R71	2.7.2.4	<i>slr0657</i>
R72	4.2.1.52	<i>slr0550</i>
R73	1.3.1.26	<i>sll1058</i>
R74	2.6.1.83	<i>sll0480</i>
R75	5.1.1.7	<i>slr1665</i>
R76	4.1.1.20	<i>sll0504</i>
R77	6.3.5.4	-

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R78	3.5.1.1	<i>sll0422</i>
R79	3.5.1.1	<i>sll0585</i>
R80	2.7.1.-	<i>sll0776</i>
R81	4.1.1.81	<i>sll1713</i>
R91	2.5.1.32	<i>slr1255</i>
R92	2.5.1.32	<i>slr1255</i>
R93	1.14.99.-	<i>slr1254</i>
R94	1.14.99.-	<i>slr1254</i>
R95	-	<i>sll0033, slr0940</i>
R96	-	<i>sll0033, slr0940</i>
Rxn	Número E.C.	Genes
R97	-	<i>sll0147</i>
R98	-	<i>sll0147</i>
R99	1.14.13.-	<i>sll1468</i>
R100	1.14.13.-	<i>sll1468</i>
R101	1.14.13.-	<i>sll1468</i>
R102	-	<i>slr0088</i>
R103	6.1.1.17	<i>sll0179</i>
R104	1.2.1.70	<i>slr1808</i>
R105	5.4.3.8	<i>sll0017</i>
R106	4.2.1.24	<i>sll1994</i>
R107	2.5.1.61	<i>slr1887</i>
R108	4.2.1.75	<i>sll0166</i>
R109	4.1.1.37	<i>slr0536</i>
R110	1.3.3.3	<i>sll1185</i>
R111	1.3.99.22	<i>sll1876</i>
R112	1.3.99.22	<i>sll1917</i>
R113	1.3.3.4	<i>sll1237</i>
R114	1.3.3.4	<i>slr1790</i>
R115	6.6.1.1	<i>slr1030, slr1055, slr1777</i>
R116	2.1.1.11	<i>slr0525</i>
R117	1.14.13.81	<i>sll1874</i>
R118	-	<i>slr0905</i>
R119	1.14.13.81	<i>sll1214</i>
R120	1.14.13.81	<i>sll1874</i>
R121	-	<i>slr0905</i>
R122	1.14.13.81	<i>sll1214</i>
R123	1.14.13.81	<i>sll1874</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R124	-	<i>slr0905</i>
R125	1.14.13.81	<i>sll1214</i>
R126	1.3.1.75	<i>slr1923</i>
R127	1.3.1.33	<i>slr0506</i>
R128	1.3.7.7	<i>slr0749, slr0750, slr0772</i>
R129	2.5.1.62	<i>slr0056</i>
R130	1.5.1.20	<i>slr2141</i>
R131	3.5.4.16	<i>slr0426</i>
R132	3.6.1.-	<i>sll1076 or slr0787 or slr0920</i>
R133	3.6.1.-	<i>sll1076 or slr0787 or slr0920</i>
R134	4.1.2.25	<i>slr1626</i>
R135	1.2.1.3	<i>slr0091</i>
R136	2.7.6.3	<i>slr1093</i>
R137	2.5.1.15	<i>slr2026</i>
Rxn	Número E.C.	Genes
R138	2.5.1.15	<i>slr2026</i>
R139	4.1.3.38	<i>slr0887</i>
R140	2.6.1.85	<i>slr1979</i>
R141	6.3.2.17	<i>sll1612</i>
R142	6.3.2.12	<i>sll1612</i>
R143	1.5.1.3	<i>slr2026</i>
R144	3.5.1.10	<i>sll0070</i>
R145	3.5.4.9	<i>sll0753</i>
R146	1.5.1.5	<i>sll0753</i>
R149	1.8.1.9	<i>slr0600</i>
R150	4.2.1.1	<i>slr0051</i>
R151	4.2.1.1	<i>slr1347</i>
R152	3.6.1.1	<i>slr1622</i>
R153	2.7.4.1	<i>sll0290</i>
R154	2.7.4.1	<i>sll0290</i>
R155	1.6.1.2	<i>slr1239, slr1434</i>
R156	1.15.1.1	<i>slr1516</i>
R157	1.11.1.6	<i>sll1987</i>
R158	1.11.1.9	<i>slr1171</i>
R159	1.11.1.9	<i>slr1992</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R160	-	<i>slr0600, slr1562, ssr2061</i>
R162	-	<i>sll1973, slr1510, sll1848</i>
R163	-	<i>sll1973, slr1510, sll1848</i>
R164	-	<i>sll1973, slr1510, sll1848</i>
R165	-	<i>sll1973, slr1510, sll1848</i>
R166	3.1.3.4	<i>sll0545</i>
R167	3.1.3.4	<i>sll0545</i>
R168	3.1.3.4	<i>sll0545</i>
R169	2.7.1.107	<i>slr0054</i>
R170	2.7.1.107	<i>slr0054</i>
R171	2.7.1.107	<i>slr0054</i>
R172	2.7.7.41	<i>slr1369</i>
R173	2.7.8.5	<i>sll1522</i>
R174	3.1.3.27	-
R175	3.13.1.1	<i>slr1020</i>
R176	2.4.1.-	<i>slr0384</i>
R177	2.4.1.157	<i>sll1377</i>
R178	2.4.1.157	<i>sll1377</i>
R181	2.4.1.184	<i>slr1508</i>
R182	2.3.1.30	<i>slr1348</i>
R183	2.5.1.47	<i>sll0712</i>
R184	2.5.1.47	<i>slr1842</i>
R185	2.7.7.4	<i>slr1165</i>
R186	2.7.1.25	<i>slr0676</i>
R187	1.8.4.8	<i>slr1791</i>
R188	3.1.3.7	<i>sll0895</i>
R189	1.8.7.1	<i>slr0963</i>
R190	4.3.1.19	<i>slr2072</i>
R191	2.1.2.1	<i>sll1931</i>
R192	2.1.2.10	<i>sll0171, slr0293, slr0879</i>
R193	2.1.1.13	<i>slr0212</i>
R194	3.3.1.1	<i>sll1234</i>
R195	2.1.1.37	<i>slr0214</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R196	2.5.1.6	<i>sll0927</i>
R197	1.1.1.81	<i>sll1908</i>
R198	2.6.1.45	<i>sll1559</i>
R199	2.7.1.165	<i>slr1840</i>
R200	1.1.1.60	<i>slr0229</i>
R201	4.1.1.47	<i>sll1981</i>
R202	1.2.3.5	<i>sll1556</i>
R203	2.8.1.7	<i>sll0704</i>
R204	2.8.1.7	<i>slr0077</i>
R205	2.8.1.7	<i>slr0387</i>
R206	2.6.1.4	<i>sll0006</i>
R207	2.3.1.31	-
R208	2.5.1.49	-
R209	1.4.3.19	<i>slr0633</i>
R210	3.1.3.7	<i>sll0895</i>
R211	1.4.1.1	<i>sll1682</i>
R212	4.1.1.50	-
R213	6.3.2.2	<i>slr0990</i>
R214	6.3.2.3	<i>slr1238</i>
R215	2.3.2.2	<i>slr1269</i>
R216	3.4.11.2	<i>sll1343</i>
R217	3.4.11.1	<i>sll2001</i>
R218	1.1.1.95	<i>sll1908</i>
R219	2.6.1.52	-
R220	3.1.3.3	<i>slr1124</i>
R221	2.7.1.2	<i>sll0593</i>
R222	2.7.1.2	<i>slr0329</i>
R223	5.3.1.9	<i>slr1349</i>
R224	3.1.3.11	<i>slr0952</i>
R225	3.1.3.11	<i>slr2094</i>
R226	2.7.1.11	<i>sll0745</i>
R227	2.7.1.11	<i>sll1196</i>
R228	4.1.2.13	<i>sll0018</i>
R229	4.1.2.13	<i>slr0943</i>
R230	5.3.1.1	<i>slr0783</i>
R231	1.2.1.59	<i>sll1342</i>
R232	1.2.1.12	<i>slr0884</i>
R233	2.7.2.3	<i>slr0394</i>
R234	5.4.2.1	<i>slr1748</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R235	5.4.2.1	<i>slr1124</i>
R236	5.4.2.1	<i>slr1945</i>
R237	5.4.2.1	<i>sll0395</i>
R238	4.2.1.11	<i>slr0752</i>
R239	5.4.2.2	<i>sll0726</i>
R240	2.7.1.4	<i>slr1448</i>
R241	5.3.1.8	<i>slr0493</i>
R242	5.4.2.8	<i>sll1496</i>
R243	5.4.2.8	<i>slr1334</i>
R244	2.7.7.13	<i>sll1496</i>
R245	2.7.7.13	<i>sll1558</i>
R246	2.7.7.22	<i>sll1370</i>
R247	2.7.7.22	<i>slr2074</i>
R248	2.7.7.24	<i>sll0207</i>
R249	2.7.7.33	<i>slr0983</i>
R250	5.1.3.2	<i>sll0244</i>
R251	5.1.3.2	<i>slr1067</i>
R252	5.1.3.2	<i>slr1078</i>
R253	4.2.1.46	<i>slr0809</i>
R254	4.2.1.46	<i>slr0836</i>
R255	5.1.3.13	<i>slr0985</i>
R256	5.1.3.13	<i>slr1933</i>
R257	1.1.1.133	<i>sll1395</i>
R258	2.7.7.9	-
R259	5.1.3.2	<i>sll0244</i>
R260	1.2.1.3	<i>slr0091</i>
R261	1.1.1.2	<i>slr0942</i>
R262	2.7.1.30	<i>slr1672</i>
R263	1.1.1.94	<i>slr1755</i>
R264	1.1.5.3	<i>sll1085</i>
R265	1.1.5.3	<i>sll1085</i>
R266	2.4.1.14	<i>sll0045</i>
R267	3.1.3.24	<i>slr0953</i>
R268	4.99.1.1	<i>slr0839</i>
R269	2.5.1.-	<i>sll1899</i>
R270	-	<i>sll1898</i>
R271	2.4.2.17	<i>sll0900, slr1560</i>
R272	3.6.1.31	<i>slr0608</i>
R273	3.5.4.19	<i>slr0608</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R274	5.3.1.16	<i>slr0652</i>
R275	4.1.3.-	<i>sll1893</i>
R276	2.4.2.-	<i>slr0084</i>
R277	4.2.1.19	<i>slr0500</i>
R278	2.6.1.9	<i>sll1958</i>
R279	3.1.3.15	<i>sll0084</i>
R280	1.1.1.23	<i>slr0682</i>
R281	1.1.1.23	<i>slr1848</i>
R282	1.1.1.23	<i>slr0682</i>
R283	1.1.1.23	<i>slr1848</i>
R284	2.2.1.6	<i>sll0065, sll1981, slr2088</i>
R285	2.2.1.6	<i>sll0065, sll1981, slr2088</i>
R286	2.2.1.6	<i>sll0065, sll1981, slr2088</i>
R287	1.1.1.86	<i>sll1363</i>
R288	1.1.1.86	<i>sll1363</i>
R289	1.1.1.86	<i>sll1363</i>
R290	4.2.1.9	<i>slr0452</i>
R291	4.2.1.9	<i>slr0452</i>
R292	2.6.1.42	<i>slr0032</i>
R293	2.6.1.42	<i>slr0032</i>
R294	2.6.1.42	<i>slr0032</i>
R295	2.3.3.13	<i>sll1564</i>
R296	2.3.3.13	<i>slr0186</i>
R297	4.2.1.33	<i>sll1444, sll1470</i>
R298	4.2.1.33	<i>sll1444, sll1470</i>
R299	1.1.1.85	<i>slr1517</i>
R301	2.3.1.182	<i>sll1564 or slr0186</i>
R302	4.2.1.35	<i>sll1444, sll1470</i>
R303	-	<i>sll1444, sll1470</i>
R304	1.1.1.85	<i>slr1517</i>
R305	5.5.1.4	<i>sll1722</i>
R306	5.5.1.4	<i>sll1981</i>
R307	3.1.3.25	<i>sll1329</i>
R308	3.1.3.25	<i>sll1383</i>
R309	3.1.3.25	<i>sll1959</i>
R310	2.3.1.180	<i>slr1511</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R311	2.3.1.179	<i>slr1332</i>
R312	2.3.1.180	<i>slr1511</i>
R313	2.3.1.179	<i>sll1069</i>
R314	6.4.1.2	<i>sll0053, sll0336, sll0728, slr0435</i>
R315	2.3.1.39	<i>slr2023</i>
R316	2.3.1.179	<i>sll1069</i>
R317	2.3.1.179	<i>slr1332</i>
R318	2.3.1.179	<i>sll1069</i>
R319	2.3.1.179	<i>slr1332</i>
R320	2.3.1.179	<i>sll1069</i>
R321	2.3.1.179	<i>slr1332</i>
R322	2.3.1.179	<i>sll1069</i>
R323	2.3.1.179	<i>slr1332</i>
R324	2.3.1.179	<i>sll1069</i>
R325	2.3.1.179	<i>slr1332</i>
R326	2.3.1.179	<i>sll1069</i>
R327	2.3.1.179	<i>slr1332</i>
R328	2.3.1.179	<i>sll1069</i>
R329	2.3.1.179	<i>slr1332</i>
R330	1.1.1.100	<i>slr0886</i>
R331	1.1.1.100	<i>sll0330</i>
R332	1.1.1.100	<i>sll5079</i>
R333	1.1.1.100	<i>slr0886</i>
R334	1.1.1.100	<i>sll0330</i>
R335	1.1.1.100	<i>sll5079</i>
R336	1.1.1.100	<i>slr0886</i>
R337	1.1.1.100	<i>sll0330</i>
R338	1.1.1.100	<i>sll5079</i>
R339	1.1.1.100	<i>slr0886</i>
R340	1.1.1.100	<i>sll0330</i>
R341	1.1.1.100	<i>sll5079</i>
R342	1.1.1.100	<i>slr0886</i>
R343	1.1.1.100	<i>sll0330</i>
R344	1.1.1.100	<i>sll5079</i>
R345	1.1.1.100	<i>slr0886</i>
R346	1.1.1.100	<i>sll0330</i>
R347	1.1.1.100	<i>sll5079</i>
R348	1.1.1.100	<i>slr0886</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R349	1.1.1.100	<i>sll0330</i>
R350	1.1.1.100	<i>sll5079</i>
R351	1.1.1.100	<i>slr0886</i>
R352	1.1.1.100	<i>sll0330</i>
R353	1.1.1.100	<i>sll5079</i>
R354	4.2.1.-	<i>sll1605</i>
R355	4.2.1.-	<i>sll1605</i>
R356	4.2.1.-	<i>sll1605</i>
R357	4.2.1.-	<i>sll1605</i>
R358	4.2.1.-	<i>sll1605</i>
R359	4.2.1.-	<i>sll1605</i>
R360	4.2.1.-	<i>sll1605</i>
R361	4.2.1.-	<i>sll1605</i>
R362	1.3.1.10	<i>slr1051</i>
R363	1.3.1.10	<i>slr1051</i>
R364	1.3.1.10	<i>slr1051</i>
R365	1.3.1.10	<i>slr1051</i>
R366	1.3.1.10	<i>slr1051</i>
R367	1.3.1.10	<i>slr1051</i>
R368	1.3.1.10	<i>slr1051</i>
R369	1.3.1.10	<i>slr1051</i>
R370	1.14.19.1	<i>sll0541</i>
R371	1.14.19.1	<i>sll0541</i>
R372	1.14.19.-	<i>slr1350</i>
R373	1.14.19.3	<i>sll0262</i>
R374	1.14.19.-	<i>sll1441</i>
R375	1.14.19.3	<i>sll0262</i>
R376	2.3.1.129	<i>sll0379</i>
R377	3.5.1.108	<i>sll1508</i>
R378	2.3.1.191	<i>slr0776</i>
R379	2.4.1.182	<i>slr0015, slr1677</i>
R380	3.6.1.54	-
R381	1.4.3.16	<i>sll0631</i>
R382	2.5.1.72	<i>sll0622</i>
R383	2.4.2.19	<i>slr0936</i>
R384	2.7.7.18	<i>sll1916</i>
R385	2.7.7.1	<i>slr0787</i>
R386	6.3.5.1	<i>slr1691</i>
R387	2.7.1.23	<i>sll1415</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R388	2.7.1.23	<i>slr0400</i>
R389	2.4.2.11	<i>slr0788</i>
R390	4.1.1.11	<i>sll0892</i>
R391	4.1.1.15	<i>sll1641</i>
R392	2.1.2.11	<i>slr0526</i>
R393	1.1.1.86	<i>sll1363</i>
R394	6.3.2.1	<i>sll1249</i>
R395	2.7.1.33	<i>slr0812</i>
R396	4.1.1.36	<i>sll0250</i>
R397	6.3.2.5	<i>sll0250</i>
R398	6.3.2.5	<i>sll0250</i>
R399	2.7.7.3	<i>slr0847</i>
R400	2.7.1.24	<i>slr0553</i>
R401	2.6.1.16	<i>sll0220</i>
R402	5.4.2.10	<i>sll1758</i>
R403	2.3.1.157	<i>sll0899</i>
R404	2.7.7.23	<i>sll0899</i>
R405	2.5.1.7	<i>slr0017</i>
R406	1.1.1.158	<i>slr1424</i>
R407	6.3.2.8	<i>slr1423</i>
R408	6.3.2.9	<i>sll2010</i>
R409	6.3.2.13	<i>slr0528</i>
R410	5.1.1.3	<i>slr1746</i>
R411	5.1.1.1	<i>slr0827</i>
R412	6.3.2.4	<i>slr1874</i>
R413	6.3.2.10	<i>slr1351</i>
R414	2.7.8.13	<i>sll0657</i>
R415	2.4.1.227	<i>slr1656</i>
R416	2.4.1.129	<i>sll1833</i>
R417	2.4.1.129	<i>slr1710</i>
R418	3.6.1.27	<i>sll0210</i>
R419	4.1.2.13	<i>sll0018</i>
R420	4.1.2.13	<i>slr0943</i>
R421	3.1.3.37	<i>slr2094</i>
R422	1.1.1.49	<i>slr1843</i>
R423	3.1.1.31	<i>sll1479</i>
R424	1.1.1.44	<i>sll0329</i>
R425	5.3.1.6	<i>slr0194</i>
R426	5.3.1.6	<i>ssl2153</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R427	2.2.1.1	<i>sll1070</i>
R428	2.2.1.1	<i>sll1070</i>
R429	5.1.3.1	<i>sll0807</i>
R430	2.2.1.2	<i>slr1793</i>
R431a	4.1.1.39	<i>slr0009, slr0012</i>
R431b	4.1.1.39	<i>slr0009, slr0012</i>
R432	2.7.1.19	<i>sll1525</i>
R433	2.7.6.1	<i>sll0469</i>
R434	4.2.3.3	<i>sll0036</i>
R435	4.4.1.5	<i>slr0381</i>
R436	3.1.2.6	<i>sll1019 or slr1259</i>
R437	4.1.2.22	<i>sll0529</i>
R438	4.1.2.22	<i>slr0453</i>
R439	4.1.2.22	<i>sll0529</i>
R440	4.1.2.22	<i>slr0453</i>
R441	2.7.1.11	<i>sll0745</i>
R442	2.7.1.11	<i>sll1196</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

<i>Rxn</i>	Número E.C.	Genes
R446	1.6.5.3	<i>slr1281, sll1732, sll0520, sll0027, sssr1386, slr0844, sll0223, sll1733, sll0522, sll0519, slr1291, slr0331, sll0521, sll0026, slr1279, slr0261, slr1280, slr1623, sll1262, slr2007, slr2009, ssl0352</i>
R447	1.6.5.3	<i>slr1281, sll0520, sssr1386, slr0844, sll0223, sll0522, sll0519, slr1291, slr0331, sll0521, slr1279, slr0261, slr1280, slr1623, sll1262, slr2007, slr2009, ssl0352</i>
R448	1.6.5.3	<i>slr1281, sll1732, sll0520, sll0027, sssr1386, slr0844, sll0223, sll1733, sll1734, sll0522, sll0519, slr1291, slr0331, sll0521, sll0026, slr1279, slr0261, slr1280, slr1623, sll1262, slr2007, slr2009, ssl0352, slr1302</i>
R449	1.6.5.3	<i>slr1281, sll1732, sll0520, sll0027, sssr1386, slr0844, sll0223, sll1733, sll1734, sll0522, sll0519, slr1291, slr0331, sll0521, sll0026, slr1279, slr0261, slr1280, slr1623, sll1262, slr2007, slr2009, ssl0352, slr1302</i>
R450	1.6.99.3	<i>sll1484</i>
R451	1.6.99.3	<i>slr0851</i>
R452	1.6.99.3	<i>slr1743</i>
R453	1.6.99.3	<i>sll1484</i>
R454	1.6.99.3	<i>slr0851</i>
R455	1.6.99.3	<i>slr1743</i>
R456	1.9.3.1	<i>sll0813, slr2082, slr2083</i>
R457	1.9.3.1	<i>slr1136, slr1137, slr1138</i>
R458	1.9.3.1	<i>sll0813, slr2082, slr2083</i>
R459	1.9.3.1	<i>slr1136, slr1137, slr1138</i>
R460	1.10.3.-	<i>slr1379, slr1380</i>
R461	1.10.3.-	<i>slr1379, slr1380</i>
R462	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R463	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R464	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R465	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R466	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R467	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R468	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R469	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

<i>Rxn</i>	Número E.C.	Genes
R470	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R471	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R472	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R473	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R474	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R475	1.10.99.1	<i>sll1182, sll1316, sll1317, slr0342, slr0343, slr1185, sml0004, smr0003, smr0010, sll1796</i>
R476	-	<i>sll0226, sll0629, sll0634, sll0819, slr0171, slr0737, slr0823, slr0823, slr1655, slr1834, slr1835, sml0008, smr0004, smr0005, ssl0563, sss0390, sss2831, sss2016</i>
R477	-	<i>sll0226, sll0629, sll0634, sll0819, slr0171, slr0737, slr0823, slr0823, slr1655, slr1834, slr1835, sml0008, smr0004, smr0005, ssl0563, sss0390, sss2831, sss2016</i>
R478	1.18.1.2	<i>slr1643</i>
R479	1.8.7.2	<i>sll0554, sss0330</i>
R480	-	<i>sll0226, sll0629, sll0634, sll0819, slr0171, slr0737, slr0823, slr0823, slr1655, slr1834, slr1835, sml0008, smr0004, smr0005, ssl0563, sss0390, sss2831</i>
R481	-	<i>sll0550, sll1521</i>
R482	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll</i>
R483	1.6.5.3	<i>slr1281, sll1732, sll0520, sss1386, slr0844, sll0223, sll1733, sll0522, sll0519, slr1291, slr0331, sll0521, slr1279, slr0261, slr1280, slr1623, sll1262, slr2007, slr2009, ssl0352</i>
R484	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll0219</i>
R485	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll0219</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

<i>Rxn</i>	Número E.C.	Genes
R486	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll0219</i>
R487	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll0219</i>
R488	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll0219</i>
R489	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll0219</i>
R490	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll0219</i>
R491	-	<i>sll0258, sll0427, sll0849, sll0851, sll1194, sll1398, sll1418, sll1867, slr0906, slr0927, slr1181, slr1311, slr1645, slr1739, slr2034, sml0001, sml0002, sml0003, sml0005, sml0007, smr0001, smr0006, smr0007, smr0008, smr0009, ssl2598, sss3451, sll0217, sll0219</i>
R492	3.6.3.14	<i>sll1327, sll1323, sll1322, ssl2615, sll1324, sll1325, sll1326, slr1329, slr1330</i>
R493	3.6.3.14	<i>sll1327, sll1323, sll1322, ssl2615, sll1324, sll1325, sll1326, slr1329, slr1330</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R494	2.7.1.40	<i>sll0587</i>
R495	2.7.1.40	<i>sll1275</i>
R496	1.8.1.4	<i>slr1096</i>
R497	1.2.4.1	<i>sll1721, slr1934</i>
R498	2.3.1.12	<i>sll1841</i>
R499	6.2.1.1	<i>sll0542</i>
R500	1.2.1.3	<i>slr0091</i>
R501	1.1.1.1	<i>sll0990</i>
R502	1.1.1.2	<i>slr0942</i>
R503	4.1.1.31	<i>sll0920</i>
R504	1.1.1.37	<i>sll0891</i>
R505	2.6.1.1	<i>sll0402</i>
R506	2.7.9.2	<i>slr0301</i>
R507	1.4.1.1	<i>sll1682</i>
R508	4.2.1.3	<i>slr0665</i>
R509	4.2.1.3	<i>slr0665</i>
R510	1.1.1.42	<i>slr1289</i>
R511	6.2.1.5	<i>sll1023, sll1557</i>
R512	4.2.1.2	<i>slr0018</i>
R513	1.3.99.1	<i>sll0823, sll1625, slr1233</i>
R514	1.3.99.1	<i>sll0823, sll1625, slr1233</i>
R515	2.3.3.1	<i>sll0401</i>
R516	1.1.1.28	<i>slr1556</i>
R517	1.1.1.38	<i>slr0721</i>
R518	2.3.1.8	<i>slr2132</i>
R519	2.7.2.1	<i>sll1299</i>
R520	3.1.3.18	<i>sll1349</i>
R521	3.1.3.18	<i>slr0458</i>
R522	3.1.3.18	<i>slr1762</i>
R523	1.2.7.1	<i>sll0741</i>
R524	4.1.1.2	<i>sll1358</i>
R525	1.2.2.1	<i>sll1359</i>
R526	1.4.3.16	<i>sll0631</i>
R527	4.1.1.15	<i>sll1641</i>
R528	4.1.1.71	<i>sll1981</i>
R529	1.2.1.16	<i>slr0370</i>
R530	2.6.1.19	<i>slr1022</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R531	1.1.99.14	<i>sll0404</i>
R532	1.1.99.14	<i>slr0806</i>
R533	2.4.2.14	<i>sll0757</i>
R534	6.3.4.13	<i>slr1159</i>
R535	2.1.2.2	<i>slr0477</i>
R536	2.1.2.2	<i>slr0477</i>
R537	6.3.5.3	<i>sll1056, slr0519, slr0520</i>
R538	6.3.3.1	<i>slr0838</i>
R539	6.3.4.18	<i>sll0578</i>
R540	5.4.99.18	<i>sll0901</i>
R541	6.3.2.6	<i>slr1226</i>
R542	4.3.2.2	<i>sll0421</i>
R543	2.1.2.3	<i>slr0597</i>
R544	2.1.2.3	<i>slr0597</i>
R545	6.3.4.4	<i>sll1823</i>
R546	4.3.2.2	<i>sll0421</i>
R547	1.17.4.1	<i>slr0591, slr1164</i>
R548	3.1.3.5	<i>sll1108</i>
R549	3.1.3.5	<i>sll1459</i>
R550	1.17.4.1	<i>slr0591, slr1164</i>
R551	2.4.2.7	<i>sll1430</i>
R552	3.6.1.19	<i>sll1005</i>
R553	2.7.4.6	<i>sll1852</i>
R554	2.7.4.6	<i>sll1852</i>
R555	2.7.4.6	<i>sll1852</i>
R557	3.1.3.5	<i>sll1108</i>
R558	3.1.3.5	<i>sll1459</i>
R559	1.1.1.205	<i>slr1722</i>
R560	6.3.5.2	<i>slr0213</i>
R561	2.7.4.8	<i>slr1123</i>
R562	2.1.2.2	<i>slr0861</i>
R563	2.7.4.3	<i>sll1059</i>
R564	2.7.4.3	<i>sll1815</i>
R565	2.7.4.3	<i>sll1059</i>
R566	2.7.4.3	<i>sll1815</i>
R567	3.6.1.19	<i>sll1005</i>
R568	2.7.4.6	<i>sll1852</i>
R569	2.7.4.6	<i>sll1852</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R570	2.1.3.2	<i>slr1476</i>
R571	3.5.2.3	<i>sll1018</i>
R572	3.5.2.3	<i>slr0406</i>
R573	1.3.98.1	<i>sll0744</i>
R574	1.3.98.1	<i>slr1418</i>
R575	2.4.2.10	<i>slr0185</i>
R576	4.1.1.23	<i>sll0838</i>
R577	2.7.4.14	<i>sll1249</i>
R578	2.7.4.22	<i>sll0144</i>
R579	2.7.4.14	<i>sll1249</i>
R580	2.7.4.6	<i>sll1852</i>
R581	2.7.4.6	<i>sll1852</i>
R582	6.3.4.2	<i>sll1443</i>
R583	6.3.4.2	<i>sll1443</i>
R584	3.5.4.13	<i>sll1258</i>
R585	3.5.4.13	<i>sll1258</i>
R586	2.7.4.9	<i>slr0379</i>
R587	2.7.4.9	<i>slr0379</i>
R588	2.1.1.148	<i>sll1635</i>
R589	3.6.1.19	<i>sll1005</i>
R590	1.17.4.1	<i>slr0591, slr1164</i>
R591	1.17.4.1	<i>slr0591, slr1164</i>
R592	2.7.4.6	<i>sll1852</i>
R593	2.5.1.-	<i>slr1736</i>
R594	-	<i>slr1737</i>
R595	-	<i>slr1737</i>
R596	2.1.1.95	<i>slr0089</i>
R597	2.1.1.95	<i>slr0089</i>
R598	4.1.3.40	<i>sll1797</i>
R599	2.5.1.39	<i>slr0926</i>
R600	-	<i>sll0936 or slr1099 or slr1300</i>
R601	-	<i>sll0418</i>
R602	-	<i>sll0418</i>
R603	5.4.4.2	<i>sll0603</i>
R604	5.4.4.2	<i>slr0817</i>
R605	2.2.1.9	<i>sll0603</i>
R606	4.2.99.20	<i>slr1916</i>
R607	4.2.1.113	<i>sll0409</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R608	6.2.1.26	<i>slr0492</i>
R609	4.1.3.36	<i>sll1127</i>
R610	3.1.2.28	<i>slr0204</i>
R611	2.5.1.-	<i>slr1518</i>
R612	2.1.1.-	<i>sll1653</i>
R613	1.13.11.27	<i>slr0090</i>
R614	3.5.4.25	<i>sll1894</i>
R615	3.5.4.26	<i>slr0066</i>
R616	3.1.3.-	<i>sll0400</i>
R617	1.1.1.193	<i>slr0066</i>
R618	4.1.99.12	<i>sll1894</i>
R619	2.5.1.78	<i>sll1282</i>
R620	2.5.1.9	<i>sll0300</i>
R621	2.7.1.26	<i>slr1882</i>
R622	2.7.7.2	<i>slr1882</i>
R623	1.5.1.38	<i>slr0945</i>
R624	1.14.99.40	<i>slr1719 or slr0001</i>
R625	2.4.1.213	<i>sll1566</i>
R626	3.1.3.69	<i>slr0746</i>
R627	4.1.1.18	<i>sll1683</i>
R628	3.5.3.11	<i>sll0228</i>
R629	2.5.1.16	-
R630	2.5.1.16	-
R631	2.4.2.28	<i>sll0135</i>
R632	5.3.1.23	<i>slr1938</i>
R633	2.7.7.27	<i>slr1176</i>
R634	2.4.1.21??	<i>glgA?</i>
R635	2.4.1.21??	<i>glgA?</i>
R636	2.4.1.18	<i>sll0158</i>
R637	3.2.1.68	<i>glgX?</i>
R638	3.2.1.68	<i>glgX?</i>
R639	2.4.1.1	<i>slr1367</i>
R640	2.4.1.1	<i>sll1356</i>
R641	3.2.1.-	<i>slr0237</i>
R642	3.2.1.-	<i>slr1857</i>
R643	2.3.1.9	<i>slr1993</i>
R644	1.1.1.36	<i>slr1994</i>
R645	2.3.1.-	<i>slr1829, slr1830</i>
R646	6.3.2.29	<i>slr2002</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

Rxn	Número E.C.	Genes
R647	3.4.15.6	<i>slr2001</i>
R648	2.2.1.7	<i>sll1945</i>
R649	1.1.1.267	<i>sll0019</i>
R650	2.7.7.60	<i>slr0951</i>
R651	2.7.1.148	<i>sll0711</i>
R652	4.6.1.12	<i>slr1542</i>
R653	1.17.7.1	<i>slr2136</i>
R654	1.17.1.2	<i>slr0348</i>
R655	1.17.1.2	<i>slr0348</i>
R656	5.3.3.2	<i>sll1556</i>
R657	2.5.1.1	<i>slr0739</i>
R658	2.5.1.10	<i>slr0739</i>
R659	2.5.1.29	<i>slr0739</i>
R660	2.5.1.31	<i>sll0506</i>
R661	1.3.1.83	<i>sll1091</i>
R662	2.5.1.84	<i>slr0611</i>
R663	2.5.1.85	<i>slr0611</i>
R664	-	<i>slr0118</i>
R666	-	<i>ssr0102, slr0633</i>
R667	2.5.1.3	<i>sll0635</i>
R668	2.7.4.16	<i>slr1787</i>
R672	-	<i>slr2057</i>
R673	-	<i>slr0040, slr0041, slr0043, slr0044</i>
R674	-	<i>slr1512</i>
R675	-	<i>sll0834</i>
R676	-	<i>sll0771</i>
R677	3.6.3.-	<i>sll1270, slr1735</i>
R678	3.6.3.-	<i>sll1270, slr1735</i>
R679	-	<i>sll1102, sll1103, sll1104</i>
R680	-	<i>slr1145</i>
R681	-	<i>slr0467, slr0559, sll0146, slr0949, slr1881</i>
R682	-	<i>slr0447, slr1200, slr1201, sll0764, sll0374</i>

Rxn	Número E.C.	Genes
R683	-	<i>sll0473, sll1080, sll1081, sll1082</i>
R684	-	<i>sll1450, sll1451, sll1452, sll1453</i>
R685	-	<i>sll0108</i>
R686	-	<i>sll0537</i>
R687	-	<i>sll1017</i>
R688	3.6.3.25	<i>slr1452, slr1453, slr1454, slr1455</i>
R689	-	<i>slr0096</i>
R690	3.6.3.27	<i>sll0540, sll0679, sll0680, sll0681, sll0682, sll0683, sll0684</i>
R691	3.6.3.27	<i>slr1247, slr1248, slr1249, slr1250</i>
R692	3.6.3.34	<i>slr1316, slr1317, slr1318, slr1319, sll1202, slr1491, slr1492</i>
R693	-	<i>sll1598, sll1599, sll1600</i>
R694	3.6.3.12	<i>slr1728, slr1729, slr1730, slr1731</i>
R695	-	<i>sll0493, slr1508, slr1509</i>
R696	3.6.3.-	<i>slr0798</i>
R697	3.6.3.-	<i>slr2043, slr2044, slr2045</i>
R698	-	<i>sll0383, sll0384, sll0385, slr1978, sll1623, slr0354</i>
R699	-	<i>sll0383, sll0384, sll0385, slr1978, sll1623, slr0354</i>
R700	-	<i>slr0797</i>
R701	-	<i>slr1392</i>
R702	-	<i>sll0507</i>
R703	-	<i>sll0671</i>

Tabla B.1 (cont.). Asociaciones GPR

<i>Rxn</i>	Número E.C.	Genes
R704	-	<i>slr0014, slr1216</i>
R705	3.6.3.8	<i>sll0672</i>
R706	-	<i>slr1336</i>
R707	-	<i>sll0273</i>
R708	3.6.3.4	<i>sll1920</i>
R709	3.6.3.29	<i>sll0738, sll0739</i>
R710	3.6.3.30	<i>sll0237, sll0238, sll0240</i>
R711	3.6.3.30	<i>slr1295, slr0513, slr0327, sll1878</i>
R712	-	<i>slr0401</i>
R713	-	<i>slr0401</i>
R724	-	<i>slr2057</i>
R726	-	-
R727	-	<i>slr2057</i>
R730	1.2.1.72	-
R731	1.1.1.290	-
R732	2.6.1.52	-
R733	1.1.1.262	<i>sll0660</i>
R734	-	-
R735	2.6.99.2	<i>slr1779</i>
R736	1.4.3.5	<i>sll1440</i>

<i>Rxn</i>	Número E.C.	Genes
R737	2.1.1.107	<i>sll0378</i>
R738	2.1.1.130	<i>slr1879</i>
R739	1.14.13.83	-
R740	2.1.1.131	<i>slr0969</i>
R741	2.1.1.133	<i>slr0239</i>
R742	2.1.1.152	<i>slr1538</i>
R743	1.3.1.54	<i>slr0252</i>
R744	2.1.1.132	<i>sll0099</i>
R745	2.1.1.132	<i>slr1368</i>
R746	5.4.1.2	<i>sll0794</i>
R747	5.4.1.2	<i>sll0916</i>
R748	5.4.1.2	<i>slr1467</i>
R749	6.3.5.9	<i>sll1501</i>
R750	6.6.1.2	<i>sll1890</i>
R751	6.6.1.2	<i>slr1211</i>
R752	1.16.8.1	<i>slr0001</i>
R753	2.5.1.17	<i>slr0260</i>
R754	6.3.5.10	<i>slr0618</i>
R755	6.3.1.10	<i>slr1925</i>
R756	2.7.7.62	<i>slr0216</i>
R757	2.4.2.21	<i>sll1500</i>
R758	3.1.3.73	<i>slr1124</i>
R759	2.7.8.26	<i>slr0636</i>

APÉNDICE C

Reacción de producción de biomasa

En este Apéndice se presenta la descripción detallada de la reacción de producción de biomasa incluida en el GEM (reacciones R82 a R90), cuya composición se describió en el Capítulo 2, Figura 2.12.

C.1. Reacción de producción de biomasa.

La reacción de biomasa se encuentra dividida en varias reacciones, que dan como producto un componente de la reacción final de biomasa en la que luego reaccionan todos juntos para formar la biomasa. Se presentan todas estas reacciones en la tabla a continuación:

Tabla C.1. Reacciones de formación de biomasa del GEM curado

Composición de proteínas
$0.608 L - Valina + 0.566 L - Isoleucina + 0.496 L - Treonina + 0.366 L$ $- Asparagina + 1029 L - Leucina + 0.766 L - Alanina + 0.455 L$ $- Arginina + 0.14 L - Triptofano + 0.09 L - Cisteina + 0.177 L$ $- Metionina + 0.168 L - Histidina + 0.666 Glicina + 0.502 L$ $- Glutamina + 0.463 L - Prolina + 0.454 L - Aspartato + 0.524 L$ $- Serina + 0.546 L - Glutamato + 0.362 L - fenilalanina + 0.378 L$ $- Lisina + 0.263 L - Tirosina \rightarrow 9.0197 H_2O + B1$
Composición de ADN
$0.7749 dCTP + 0.8517 dTTP + 0.7772 dGTP + 0.8487 dATP \rightarrow 3.2525 PP_i + B2$
Composición de ARN
$0.808 GTP + 0.8012 UTP + 0.73 ATP + 0.7799 CTP \rightarrow B3 + 3.1191 PP_i$
Composición de pared celular
$0.4276 Peptidoglicano + 0.4276 Lipopolisacarido \rightarrow B4$
Composición de lípidos
$0.265 DGDG + 0.255 SQDG + 0.1 fosfatidilglicerol + 0.38 MGDG \rightarrow B5$
Composición soluble de la biomasa

0.008 *Corismato* + 0.003 *SuccCoA* + 0.008 *Piridoxal fosfate*
 + 0.002 *Undecaprenil difosfato* + 0.062 NAD^+ + 0.008 10 – *Formil*
 – *THF* + 1.147 *Putrescina* + 0.008 *Tiamine difosfato* + 0.008 *Hemo O*
 + 0.008 *Cobamamida* + 0.008 *THF* + 0.008 *Hemo A* + 0.008 *Glutación*
 + 0.008 5 – *Metil – THF* + 0.008 *Riboflavina* + 0.008 *Hemo*
 + 0.002 *NADH* + 0.006 *CoA* + 0.01 *AcCoA* + 0.008 *FAD* + 0.008 5,10
 – *Metenil – THF* + 0.008 *S – Adenosil – metionina* + 0.004 $NADP^+$
 + 0.012 *NADPH* + 0.233 *Espermidina* + 0.001 *Malonil – CoA* → *B6*

Composición de iones inorgánicos

0.303 Zn^{+2} + 0.303 *Molibdato* + 0.379 P_i + 0.303 *Cu* + 1.136 NH_4^+ + 0.682 Fe^{3+}
 + 0.379 SO_4^{-2} + 0.682 Fe^{2+} + 0.379 Na^+ + 0.303 *Mn* + 17.04 K^+
 + 0.757 Mg^{+2} + 0.303 *Co* + 0.454 Ca^{+2} → *B7*

Composición de pigmentos

0.001 γ – *Tocoferol* + 0.01 α – *Tocoferol* + 0.113 *Zeaxantina* + 0.001 β – *Tocoferol*
 + 0.134 β – *Caroteno* + 0.098 *Equinenona* + 0.009 δ – *Tocoferol*
 + 0.827 *Clorofila a* + 0.063 γ – *Caroteno* + 0.067 *filoquinona* → *B8*

Reacción final de formación de biomasa

53.35 H_2O + 0.17 *B3* + 0.059 *B4* + 0.0244 *B8* + 53.35 *ATP* + 0.01 *B7* + 0.12 *B5*
 + 0.21031 *Glyc* + 0.51 *B1* + 0.029 *B6* + 0.031 *B2*
 → 53.35 *Pi* + 53.35 *ADP*

APÉNDICE D

Parámetros fotosintéticos

En el presente Apéndice se presenta en primer un lugar un detalle de las reacciones del GEM utilizadas para el cálculo de los parámetros fotosintéticos que se presentaron en los Capítulos 3, 4 y 5. A continuación se muestran las ecuaciones utilizadas para el cálculo de dichos parámetros.

D.1. Reacciones involucradas en el cálculo de parámetros fotosintéticos.

Se presenta un listado de las reacciones del GEM consideradas para el cálculo de los parámetros fotosintéticos, cada una junto con el número de reacción que le corresponde en el GEM presentando en el Apéndice A. Las abreviaturas utilizadas pueden consultarse en al principio de la tesis.

Tabla D.1. Reacciones involucradas en el cálculo de los parámetros fotosintéticos

Producción de ATP	
R492	$14 H^+ (tll) + 3 ADP (cyt) + 3 P_i (cyt) \rightarrow 3 ATP (cyt) + 3 H_2O (cyt) + 14 H^+ (cyt)$
Producción de NADPH	
R478	$2 Fd (cyt) + NADP^+ (cyt) + H^+ (cyt) \leftrightarrow 2 Fd^+ (cyt) + NADPH (cyt)$
Consumo de NADPH por CEF	
R483	$NADPH (cyt) + 5 H^+ (cyt) + PQ (tlm) \rightarrow NADP^+ (cyt) + PQH_2 (tlm) + 4 H^+ (tll)$
R448	$NADPH (cyt) + 4 H^+ (cyt) + PQ (tlm) + H_2O (cyt) + CO_2 (tll) \rightarrow NADP^+ (cyt) + PQH_2 (tlm) + 4 H^+ (tll) + HCO_3^- (cyt)$
R452	$NADH (cyt) + H^+ (cyt) + PQ (tlm) \rightarrow NAD^+ (cyt) + PQH_2 (tlm)$
Vías auxiliares consumo NADPH	
R481	$2 NADPH (cyt) + 2 H^+ (cyt) + O_2 (cyt) \rightarrow 2 NADP^+ (cyt) + 2 H_2O (cyt)$
PSI	
R476	$1 Photon_{p700} (tlm) + 1 P700 (tlm) + 1 Fd^+ (cyt) \rightarrow 1 P700_p (tlm) + 1 Fd (cyt)$
R477	$1 P700_p (tlm) + 1 Pc (tll) \rightarrow 1 Pc^+ (tll) + 1 P700 (tlm)$
PSII	
R484	$1 Photon_{680} (tlm) + 1 P680 (tlm) + 1 QA_{P680} (tlm) \rightarrow 1 P680_p (tlm) + 1 QAn_{P680} (tlm)$

R485	$1 PQ(tlm) + 1 QAn_{P680}(tlm) + H^+(cyt) \rightarrow 1 PQn_{P680}(tlm) + 1 QA_{P680}(tlm)$
R486	$1 PQn_{P680}(tlm) + 1 QAn_{P680}(tlm) + H^+(cyt) \rightarrow 1 PQH_2(tlm) + 1 QA_{P680}(tlm)$
R487	$1 P680_p(tlm) + 1 S0_{P680}(tlm) \rightarrow 1 P680(tlm) + 1 S1_{P680}(tlm)$
R488	$1 P680_p(tlm) + 1 S1_{P680}(tlm) \rightarrow 1 P680(tlm) + 1 S2_{P680}(tlm)$
R489	$1 P680_p(tlm) + 1 S2_{P680}(tlm) \rightarrow 1 P680(tlm) + 1 S3_{P680}(tlm)$
R490	$1 P680p(tlm) + 1 S3_{P680}(tlm) \rightarrow 1 P680(tlm) + 1 S4_{P680}(tlm)$
R491	$1 S4_{P680}(tlm) + 2 H_2O(tll) \rightarrow 1 S0_{P680}(tll) + O_2(tll) + 4 H^+(tll)$
CEF	
R462	$PQH_2(tlm) + 2 Pc(tll) \rightarrow PQ(tlm) + 2 Pc^+(tll) + 2 H^+(tll)$
PCEF	
R460	$2 PQH_2(tlm) + O_2(cyt) + 4 H^+(cyt) \rightarrow 2 PQ(tlm) + 4 H^+(tll) + 2 H_2O(cyt)$
R457	$4 Pc(tll) + O_2(cyt) + 8 H^+(cyt) \rightarrow 4 Pc^+(tll) + 4 H^+(tll) + 2 H_2O(cyt)$
NADPH disipado por NO₃	
R50	$Nitrite(cyt) + 6 Fd(cyt) + 7 H^+(cyt) \rightarrow NH_3(cyt) + 2 H_2O(cyt) + 6 Fd^+(cyt)$
Consumo de ATP por NO₃	
R646	$L - Aspartate(cyt) + L - Arginine(cyt) + 2 ATP(cyt) + Cyanophycin polymer(cyt) \rightarrow Cyanophycin(cyt) + 2 Pi(cyt) + 2 ADP(cyt)$
Flujo de fotones	
R443	$1 Photon(ext) \rightarrow 1 Photon(tlm)$
Captación de Carbono	
R673	$HCO_3^-(ext) + ATP(cyt) + H_2O(cyt) \rightarrow 1 HCO_3^-(cyt) + 1 ADP(cyt) + PPI(cyt)$
R827	$CO_2(ext) \rightarrow CO_2(tll)$
Fijación de carbono (RuBisCO)	
R431a	$RuBP(cax) + CO_2(cax) + H_2O(cax) \rightarrow 2 3PG(cax)$
R431b	$RuBP(cax) + O_2(cax) \rightarrow 3PG(cax) + 2PGlyc(cax)$
O₂ liberado	
R809	$O_2(pps) \rightarrow O_2(ext)$

D.2. Cálculo de parámetros fotosintéticos

A continuación, se presentan las ecuaciones utilizadas para el cálculo de los parámetros fotosintéticos. Los flujos se representan con la letra v , y como subíndice el número de reacción correspondiente a la Tabla D.1.

$$\frac{ATP}{NADP}(LEF) = \frac{3 * v_{R492}}{v_{R478}} \quad (0.1)$$

$$\frac{ATP}{NADP}(AEF) = \frac{3 * v_{R492}}{v_{R478} - v_{R483} - v_{R448} - v_{R452} - 2 * v_{R481} - 3 * v_{R50}} \quad (0.2)$$

$$\frac{PSI}{PSII} = \frac{v_{R477}}{v_{R487} + v_{R488} + v_{R489} + v_{R490}} \quad (0.3)$$

$$\phi_{CO_2} = \frac{v_{R673} + v_{R827}}{v_{R443}} \quad (0.4)$$

$$hv_i/O_2 = \frac{v_{R443}}{v_{R809}} \quad (0.5)$$

$$hv_i/hv_0 = \frac{2 * (v_{R483} + v_{R448} + v_{R452} + 2 * v_{R481} + 3 * v_{R50})}{v_{R443}} \quad (0.6)$$

APÉNDICE E

Resultados de FBA del GEM

En este Apéndice se presentan los resultados de los FBA que se discutieron a lo largo de la tesis. La columna v_{min} corresponde a las cotas inferiores y la columna v_{max} a las cotas superiores, ambas obtenidas por FVA. La columna FBA corresponde a los flujos obtenidos por dicha optimización. Por último, la columna MOMA corresponde a los resultados de dicha técnica obtenidos para los mutantes acoplados. Se presentan todos los flujos de los siguientes casos:

- Cepa silvestre sin fotorrespiración y con un flujo de 20% de la evolución de O_2 en el PSII asignado a la reacción de Mehler (Capítulo 3)
- Mutante acoplado M2 para producción fotosintética de etanol (Capítulo 4)
- Mutante acoplado M4 para producción fotosintética de etanol (Capítulo 5)

Tabla E.1. Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R2	-0.016474	-0.016474	0	-0.007083	-0.007083	0	-0.003185	-0.011538	-0.011538	0	-0.009678
R3	-0.011989	-0.011989	0	-0.005155	-0.005155	0	-0.002318	-0.008397	-0.008397	0	-0.007043
R4	0	0.03513	0.03513	0	0.015105	0.015105	0.006792	0	0.024604	0.024604	0.020639
R5	0	0.03513	0.03513	0	0.015105	0.015105	0.006792	0	0.024604	0.024604	0.020639
R6	0	0.03513	0.03513	0	0.015105	0.015105	0.006792	0	0.024604	0.024604	0.020639
R7	-0.03513	-0.03513	0	-0.015105	-0.015105	0	-0.006792	-0.024604	-0.024604	0	-0.020639
R8	0	0.03513	0.03513	0	0.015105	0.015105	0.006792	0	0.024604	0.024604	0.020639
R9	0	0.03513	0.03513	0	0.015105	0.015105	0.006792	0	0.024604	0.024604	0.020639
R10	0	0.03513	0.03513	0	0.015105	0.015105	0.006792	0	0.024604	0.024604	0.020639
R11	0	0	0.006371	0	0	0.002739	0	0	0	0.004462	0
R12	0	0.006371	0.006371	0	0.002739	0.002739	0.001231	0	0.004462	0.004462	0.003743
R13	0	0.006371	0.006371	0	0.002739	0.002739	0.001231	0	0.004462	0.004462	0.003743
R14	0	0.006371	0.006371	0	0.002739	0.002739	0.001231	0	0.004462	0.004462	0.003743
R15	0	0.006371	0.006371	0	0.002739	0.002739	0.001231	0	0.004462	0.004462	0.003743
R16	0	0	0.006371	0	0	0.002739	0	0	0	0.004462	0
R17	0	0.006371	0.006371	0	0.002739	0.002739	0.001231	0	0.004462	0.004462	0.003743
R18	0	0	0.006371	0	0	0.002739	0	0	0	0.004462	0
R19	0	0.028509	0.028509	0	0.012258	0.012258	0.005512	0	0.019967	0.019967	0.016749
R20	0	0.016474	0.016474	0	0.007083	0.007083	0.003185	0	0.011538	0.011538	0.009678
R21	0	0.012035	0.012035	0	0.005175	0.005175	0.002327	0	0.008429	0.008429	0.00707
R23	-54.289769	-16.223665	0	-1.85	0	0	-0.008768	-0.105714	0	0	-0.026642
R24	0	0	54.226869	0	0	0	0	0	0	1.85	0
R26	0	0.127748	54.226869	0	22.64354	85.58429	5.503496	0	0.08947	54.29562	15.242271
R27	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0	0	0	54.29562	0
R28	-1000	998.97406	1000	-25	17.98658	85.58429	-2.874724	-19.66918	-4.141916	51.21228	10.638042
R29	0	0	54.289769	0	0.019499	1.85	0	0	0.03176	0.105714	0
R31	0	0	54.289769	0	0.019499	1.85	0	0	0.03176	0.105714	0
R32	0	16.178317	54.226869	0	0	1.85	0	0	0	0	0
R33	0	0	54.226869	0	0	1.85	0	0	0	0	0
R34	0	0	34.013736	0	0	50	0.072826	0	0	0	0

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R35	0	0	14.35936	0	0	25	0.07348	0	0	0	0
R36	0	0.02107	34.076636	0	0.00906	50	0.150381	0	0.014757	0.014757	0.012379
R37	0	0	27.144884	0	0	1.85	0.008768	0	0	0.105714	0.026642
R38	0	16.223665	54.289769	0	0	1.85	0	0	0	0.105714	0
R40	0	0	27.144884	0	0	1.85	0.008768	0	0	0.105714	0.026642
R41	-54.289769	-0.02107	0	-1.85	-0.00906	0	-0.004074	-0.014757	-0.014757	0	-0.012379
R42	0	16.223665	54.289769	0	0	1.85	0.008768	0	0	0.105714	0.026642
R43	-54.289769	-16.223665	0	-1.85	0	0	-0.008768	-0.105714	0	0	-0.026642
R44	0	0.024277	0.1258	0	0.010439	0.616666	0.004694	0	0.017003	0.105714	0.014263
R45	0	0.145241	0.4988	0	0.010439	1.85	0.004694	0	0.017003	0.119354	0.014263
R46	0	0.145241	0.4988	0	0.010439	1.85	0.004694	0	0.017003	0.119354	0.014263
R47	0	0	27.113434	0	0	42.79214	0	0	0	27.14781	0.066133
R48	-27.042434	0.052762	0.248	-42.79214	0.022687	0.616666	0.010202	-27.14781	0.068802	0.211428	-0.008417
R49	0.141999	0.800854	1.137749	0	0.344358	0.672727	0.457789	0	0.624591	1.057142	0.695071
R50	0.142	0.800854	1.137749	0	0.344358	0.672727	0.457789	0	0.624591	1.057142	0.695071
R51	0	0	54.226869	0	21.61408	85.58429	0.685195	0	0	54.29562	14.976331
R52	0	0.120963	0.4988	0	0	1.85	0	0	0	0.119354	0
R53	-0.1258	16.199388	54.289769	-0.616666	-0.010439	1.85	0.004074	-0.105714	-0.017003	0.014757	0.012379
R54	0	0	0.1258	0	0	0.616666	0	0	0	0.105714	0
R55	0	0	0.1258	0	0	0.616666	0	0	0	0.105714	0
R56	0	0	0.1258	0	0	0.616666	0	0	0	0.105714	0
R57	0	0	0.1258	0	0	0.616666	0	0	0	0.105714	0
R58	0	0.003571	0.1258	0	0.001535	0.616666	0.00069	0	0.002501	0.105714	0.002098
R59	0	0	0.0629	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R60	0	0	0.0629	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R61	0	0	0.0629	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R62	0	0	0.0629	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R63	0	0	0.0629	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R64	0	0.003571	0.061099	0	0.001535	0.059677	0.00069	0	0.002501	0.05873	0.002098
R65	0	0.025483	0.025758	0	0.011075	0.011075	0.00498	0	0	0.017527	0.015133

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R67	0	0.048077	0.048351	0	0.02079	0.02079	0.009349	0	0.015823	0.032901	0.028406
R68	0	0.048077	0.048351	0	0.02079	0.02079	0.009349	0	0.015823	0.032901	0.028406
R69	0	0.056755	0.1222	0	0.024522	0.119354	0.011027	0	0.021901	0.11746	0.033505
R70	0	0.076209	0.43198	0	0.032887	0.336363	0.166256	0	0.035526	0.528571	0.117141
R71	0	0.076209	0.431979	0	0.032887	0.336363	0.166256	0	0.035526	0.528571	0.117141
R72	0	0.019453	0.388099	0	0.008364	0.336363	0.155228	0	0.013624	0.528571	0.083635
R73	0	0.019453	0.3881	0	0.008364	0.336363	0.155228	0	0.013624	0.528571	0.083635
R74	0	0.019453	0.3881	0	0.008364	0.336363	0.155228	0	0.013624	0.528571	0.083635
R75	0	0.019453	0.3881	0	0.008364	0.336363	0.155228	0	0.013624	0.528571	0.083635
R76	0	0.017202	0.3881	0	0.007396	0.336363	0.154793	0	0.012048	0.528571	0.082313
R77	0	0.016656	27.113434	0	0.975691	42.79214	4.689302	0	0.011665	27.14781	0.068102
R79	0	0	27.113434	0	0.968529	42.79214	4.686081	0	0	27.14781	0.058316
R80	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R81	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R82	0	0.045509	0.045509	0	0.019568	0.019568	0.008799	0	0.031873	0.031873	0.026736
R83	0	0.002766	0.002766	0	0.001189	0.001189	0.000534	0	0.001937	0.001937	0.001625
R84	0	0.015169	0.015169	0	0.006522	0.006522	0.002933	0	0.010624	0.010624	0.008912
R85	0	0.005264	0.005264	0	0.002263	0.002263	0.001018	0	0.003687	0.003687	0.003093
R86	0	0.010708	0.010708	0	0.004604	0.004604	0.00207	0	0.007499	0.007499	0.006291
R87	0	0.002587	0.002587	0	0.001112	0.001112	0.0005	0	0.001812	0.001812	0.00152
R88	0	0.000892	0.000892	0	0.000383	0.000383	0.000172	0	0.000624	0.000624	0.000524
R89	0	0.002177	0.002177	0	0.000936	0.000936	0.000421	0	0.001524	0.001524	0.001279
R90	0	0.089233	0.089233	0	0.038369	0.038369	0.017254	0	0.062496	0.061579	0.052425
R91	0	0.000888	0.03502	0	0.000381	0.043023	0.000171	0	0.000622	0.05	0.000521
R92	0	0.000888	0.03502	0	0.000381	0.043023	0.000171	0	0.000622	0.05	0.000521
R93	0	0.000888	0.03502	0	0.000381	0.043023	0.000171	0	0.000622	0.049999	0.000521
R94	0	0.000888	0.03502	0	0.000381	0.043023	0.000171	0	0.000622	0.05	0.000521
R95	0	0.000888	0.03502	0	0.000381	0.043023	0.000171	0	0.000622	0.05	0.000521
R96	0	0.000888	0.03502	0	0.000381	0.043023	0.000171	0	0.000622	0.05	0.000521

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R97	0	0.000888	0.03502	0	0.000381	0.043023	0.000171	0	0.000622	0.05	0.000521
R98	0	0.000751	0.03502	0	0.000322	0.043023	0.000145	0	0.000526	0.05	0.000441
R99	0	0.000246	0.000246	0	0.000105	0.000105	0.000047	0	0.000172	0.000172	0.000144
R100	0	0.000246	0.000246	0	0.000105	0.000105	0.000047	0	0.000172	0.000172	0.000144
R101	0	0	0.03502	0	0	0.043023	0	0	0	0.05	0
R102	0	0.000213	0.03502	0	0.000091	0.043023	0.000041	0	0.000149	0.05	0.000125
R103	0	0.015067	0.015067	0	0.006478	0.006478	0.002913	0	0.010552	0.010552	0.008852
R104	0	0.015067	0.015067	0	0.006478	0.006478	0.002913	0	0.010552	0.010552	0.008852
R105	-0.015067	-0.015067	0	-0.006478	-0.006478	0	-0.002913	-0.010552	-0.010552	0	-0.008852
R106	0	0.007533	0.007533	0	0.003239	0.003239	0.001456	0	0.005276	0.005276	0.004426
R107	0	0.001883	0.001883	0	0.000809	0.000809	0.000364	0	0.001319	0.001319	0.001106
R108	0	0.001883	0.001883	0	0.000809	0.000809	0.000364	0	0.001319	0.001319	0.001106
R109	0	0.001862	0.001862	0	0.0008	0.0008	0.00036	0	0.001304	0.001304	0.001094
R110	0	0.001862	0.001862	0	0.0008	0.0008	0.00036	0	0.001304	0.001304	0.001094
R112	0	0	0.001853	0	0	0.000796	0	0	0	0.001296	0
R114	0	0.000931	0.000931	0	0.0004	0.0004	0.00018	0	0.000652	0.000652	0.000547
R115	0	0.0018	0.0018	0	0.000774	0.000774	0.000348	0	0.001261	0.001261	0.001057
R116	0	0.0018	0.0018	0	0.000774	0.000774	0.000348	0	0.001261	0.001261	0.001057
R119	0	0.0018	0.0018	0	0.000774	0.000774	0.000348	0	0.001261	0.001261	0.001057
R122	0	0.0018	0.0018	0	0.000774	0.000774	0.000348	0	0.001261	0.001261	0.001057
R125	0	0.0018	0.0018	0	0.000774	0.000774	0.000348	0	0.001261	0.001261	0.001057
R126	0	0.0018	0.0018	0	0.000774	0.000774	0.000348	0	0.001261	0.001261	0.001057
R127	0	0	0.0018	0	0	0.000774	0.000348	0	0	0.001261	0.001057
R128	0	0.0018	0.0018	0	0.000774	0.000774	0	0	0.001261	0.001261	0
R129	0	0.0018	0.0018	0	0.000774	0.000774	0.000348	0	0.001261	0.001261	0.001057
R130	0	0.010859	0.87155	0	0.004669	0.739999	0.002099	0	0.007605	0.11746	0.00638
R131	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048
R132	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048
R133	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048
R134	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R135	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048
R136	0	0	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0	0.000057	0.000048
R137	0	0	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0	0.000057	0.000048
R138	0	0.000082	0.000082	0	0	0.000035	0	0	0.000057	0.000057	0
R139	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048
R140	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048
R142	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048
R143	0	0.000082	0.000082	0	0.000035	0.000035	0.000016	0	0.000057	0.000057	0.000048
R144	0	0	0.800549	0	0	0.924999	0.005419	0	0	0.071153	0.010968
R145	0	0.063985	0.8183	0	0.027513	0.925	0.012372	0	0.038261	0.142307	0.032095
R146	0	0.064006	0.818299	0	0.027522	0.925	0.012376	0	0.038275	0.142307	0.032107
R147	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0	0.13	0.13
R148	4.5662	4.750076	4.884	0	4.973918	8.325	4.50874	3.7	4.239693	17.77664	4.310394
R149	0	0	1000	0	0	85.58429	985.9441	0	0	1000	999.935808
R151	4.5662	4.750076	4.884	0	4.973918	8.325	4.50874	3.699999	4.239693	17.77664	4.310394
R152	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.319872	0	0	54.29562	0.1572
R153	-0.00002	-0.00002	0	-0.000008	-0.000008	0	-0.000004	-0.000014	-0.000014	0	-0.000012
R154	-1000	-0.435767	54.233769	-85.58429	-0.049407	85.58429	-999.8806	-1000	-1000	54.29562	-0.334721
R155	-1000	1000	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
R156	0.09072	0.25	0.25	0	0	50	0.097292	0.090361	0.140653	0.25	0.02559
R157	0	0.125113	7.30468	0	0.000048	25	0.0353	0	0.073682	5.942118	0.010028
R159	0	0	7.30468	0	0	16.66667	0.137791	0	0	5.942118	0.048873
R160	-7.30468	0	0	-16.66667	0	0	-0.137791	-5.942118	0	0	-0.048873
R161	-0.001013	-0.001013	0	-0.000435	-0.000435	0	-0.000196	-0.000709	-0.000709	0	-0.000595
R162	0	0.004069	0.004069	0	0.001749	0.001749	0.000786	0	0.002849	0.002849	0.00239
R163	0	0.002837	0.002837	0	0.00122	0.00122	0.000548	0	0.001987	0.001987	0.001667
R164	0	0.00273	0.00273	0	0.001174	0.001174	0.000527	0	0.001912	0.001912	0.001604
R165	0	0.00107	0.00107	0	0.00046	0.00046	0.000207	0	0.000749	0.000749	0.000629
R166	0	0.004069	54.226869	0	0.001749	85.58429	0.222077	0	0.002849	54.29562	0.085666
R167	0	0.002837	54.226869	0	0.00122	85.58429	0.221342	0	0.001987	54.29562	0.084689

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R168	0	0.00273	54.226869	0	0.001174	85.58429	0.221278	0	0.001912	54.29562	0.084604
R169	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.22129	0	0	54.29562	0.083276
R170	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.220793	0	0	54.29562	0.083022
R171	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.22075	0	0	54.29562	0.083
R172	0	0.00107	0.00107	0	0.00046	0.00046	0.000207	0	0.000749	0.000749	0.000629
R173	0	0.00107	0.00107	0	0.00046	0.00046	0.000207	0	0.000749	0.000749	0.000629
R174	0	0.00107	0.00107	0	0.00046	0.00046	0.000207	0	0.000749	0.000749	0.000629
R175	0	0.00273	0.00273	0	0.001174	0.001174	0.000527	0	0.001912	0.001912	0.001604
R176	0	0.00273	0.00273	0	0.001174	0.001174	0.000527	0	0.001912	0.001912	0.001604
R177	0	0.004069	0.004069	0	0.001749	0.001749	0.000786	0	0.002849	0.002849	0.00239
R178	0	0.005675	0.005675	0	0.00244	0.00244	0.001097	0	0.003974	0.003974	0.003334
R179	0	0.004069	0.004069	0	0.001749	0.001749	0.000786	0	0.002849	0.002849	0.00239
R180	0	0.005675	0.005675	0	0.00244	0.00244	0.001097	0	0.003974	0.003974	0.003334
R181	0	0.002837	0.002837	0	0.00122	0.00122	0.000548	0	0.001987	0.001987	0.001667
R182	0	0.004188	0.04353	0	0.001801	0.018217	0.000809	0	0.030487	0.030487	0.025574
R184	0	0.004188	0.04353	0	0.001801	0.018217	0.000809	0	0.030487	0.030487	0.025574
R185	0	0.015598	0.1222	0	0.006707	0.119354	0.003016	0	0.038478	0.11746	0.032277
R186	0	0.015598	54.226869	0	0.006707	85.58429	0.228956	0	0.038478	54.29562	0.106374
R187	0	0.015598	0.1222	0	0.006707	0.119354	0.003016	0	0.038478	0.11746	0.032277
R188	0	0.015598	0.122199	0	0.006707	0.119354	0.003016	0	0.038478	0.11746	0.032277
R189	0	0.012867	0.1222	0	0.005532	0.119354	0.002488	0	0.036565	0.11746	0.030673
R190	0	0.169381	0.400275	0	0	0.924999	0	0	0.713548	1.85	0.758108
R191	-0.4317	-0.077273	0.04625	-0.924999	-0.029204	0.925	-0.013132	-0.213461	-0.047567	1.794009	-0.039902
R192	0	0	0.458349	0	0.004022	0.925	0.001809	0	0	1.794009	0
R193	0	0.010838	0.871549	0	0.00466	0.74	0.002095	0	0.007591	0.11746	0.006367
R194	0	0.00216	0.800549	0	0.000928	0.74	0.000417	0	0.001512	0.001512	0.001269
R195	0	0	0.800549	0	0	0.74	0	0	0	0	0
R196	0	0.002825	0.871549	0	0.001214	0.74	0.000546	0	0.001978	0.11746	0.001659
R406	-0.002251	-0.002251	0	-0.000968	-0.000968	0	-0.000435	-0.001576	-0.001576	0	-0.001322
R198	-0.0185	0.117097	0.622775	0	3.365459	5.55	3.028092	2.466666	2.960192	16.54331	2.990194

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R199	0	0	0.0185	0	0	0.925	0	0	0	0	0
R200	0	0.009355	0.0185	0	0	0.925	0	0	0	1.794009	0
R201	0	0.009355	0.0185	0	0	0.925	0	0	0	1.794009	0
R202	0	0	0.458349	0	0	0.616666	0	0	0.006552	0.071153	0.005496
R205	0	0	0.039341	0	0	0.016464	0	0	0.027553	0.027553	0.023113
R206	-1000	1000	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
R207	0	0.008678	0.1222	0	0.003731	0.119354	0.001678	0	0.006078	0.11746	0.005098
R208	0	0.008678	0.1222	0	0.003731	0.119354	0.001678	0	0.006078	0.11746	0.005098
R209	0	0	14.35936	0	0	0	0	0	0	0	1.85
R210	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.22594	0	0	54.29562	0.074097
R211	-1000	-999.86427	1000	0	3.365423	5.55	3.028076	1.85	2.966687	16.54331	2.995642
R212	0	0.000602	0.1222	0	0.000259	0.119354	0.000116	0	0.000422	0.11746	0.000354
R213	0	0.00002	27.113434	0	0.000008	42.79214	0.219661	0	0.000014	27.14781	0.082453
R214	0	0.00002	27.113434	0	0.000008	42.79214	0.219661	0	0.000014	27.14781	0.082453
R215	0	0	27.113434	0	0	42.79214	0.219657	0	0	27.14781	0.082441
R217	0	0	27.113434	0	0	42.79214	0.219657	0	0	27.14781	0.082441
R218	0	0.398159	0.6357	0	3.409457	5.55	3.047878	3.083333	3.77296	17.33714	3.831533
R219	-0.6357	-0.398159	0	-5.55	-3.409457	0	-3.047878	-17.33714	-3.77296	-3.083333	-3.831533
R220	0	0.398159	0.6357	0	3.409457	5.55	3.047878	3.083333	3.77296	17.33714	3.831533
R222	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R223	-0.888	-0.555	-0.555	-1.85	-0.013433	0	-0.00604	-14.07664	-0.05373	0	-0.058329
R225	1.961	2.242135	2.442	0	3.358872	85.58429	0.202216	0	0	56.76228	3.048481
R227	0	0	0.481	0	0	85.58429	0.237082	0	0	54.29562	0.076646
R229	-2.442	-2.242135	-1.961	-5.55	-3.358872	85.58429	0.034865	-16.54331	0	54.29562	-2.971835
R230	3.33	3.33	3.663	0	0	0	0	0	0	0	0
R231	8.148	8.236192	8.769	0	5.041047	8.325	4.538927	0	0	0	0
R232	0	0	0.620999	0	0	0	0	-17.77664	-4.412731	-3.7	-4.455547
R233	8.148	8.236192	8.769	0	5.041047	8.325	4.538927	3.699999	4.412731	17.77664	4.455547
R237	-0.8732	-0.8658	-0.8473	-3.083333	-1.497332	0	-1.430674	-1.85	-0.293695	0	-0.333706

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R238	0.8658	0.8658	0.8806	0	1.497332	3.083333	1.430674	0	0.293695	1.85	0.333706
R239	-0.171883	-0.031241	0	-0.148	-0.013433	0	-0.00604	-0.284615	-0.05373	0	-0.045071
R240	-0.200137	0	0	-0.23125	0	0	0	-0.37	0	0	0
R241	-0.108663	0	0	-0.077083	0	0	0	-0.071153	0	0	0
R243	0	0	0.108663	0	0	0.077083	0	0	0	0.071153	0
R245	0	0	0.108663	0	0	0.077083	0	0	0	0.071153	0
R393	-0.000051	-0.000051	0	-0.000022	-0.000022	0	-0.00001	-0.000036	-0.000036	0	-0.00003
R248	0	0	0.1222	0	0	0.088095	0	0	0	0.148	0
R249	0	0	0.1222	0	0	0.1	0	0	0	0.147999	0.026717
R252	0	0	0.1222	0	0	0.088095	0	0	0	0.148	0
R254	0	0	0.1222	0	0	0.088095	0	0	0	0.148	0
R256	0	0	0.1222	0	0	0.088095	0	0	0	0.147999	0
R257	0	0	0.1222	0	0	0.088095	0	0	0	0.148	0
R258	0	0.012474	0.149412	0	0.005364	0.115625	0.002412	0	0.040586	0.185	0.007329
R259	0	0	0.1222	0	0	0.099999	0	0	0.031849	0.148	0
R260	-0.604274	-0.126453	0	-5.55	-3.365459	0	-3.028092	-16.54331	-2.960192	-2.466666	-2.990194
R261	-0.604275	-0.126453	0	-5.55	-3.365459	0	-3.028092	-16.54331	-2.960192	-2.466666	-2.990194
R262	0	0.126453	0.604275	0	3.365459	5.55	3.028092	2.466666	2.960192	16.54331	2.990194
R263	-34.013736	-17.130879	0.604275	0	0	0	0	0	0	0	0
R264	0	17.242221	34.013736	0	3.358961	5.55	3.02517	0	2.949609	16.54331	2.963973
R265	0	0	14.35936	0	0	5.55	0	0	0	12.54541	0.017343
R266	0	0	0.100068	0	0	0.115625	0	0	0	0.185	0
R267	0	0	0.100068	0	0	0.115625	0	0	0	0.185	0
R268	0	0.000062	0.000062	0	0.000026	0.000026	0.000012	0	0.000043	0.000043	0.000036
R269	0	0.000041	0.000041	0	0.000017	0.000017	0.000008	0	0.000028	0.000028	0.000024
R270	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R271	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491
R272	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491
R273	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491
R274	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R276	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491
R277	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491
R278	-0.007645	-0.007645	0	-0.003287	-0.003287	0	-0.001478	-0.005354	-0.005354	0	-0.004491
R279	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491
R281	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491
R283	0	0.007645	0.007645	0	0.003287	0.003287	0.001478	0	0.005354	0.005354	0.004491
R284	0	0.100308	0.100308	0	0.043131	0.043131	0.019395	0	0.070252	0.070252	0.058931
R285	0	0.07455	0.07455	0	0.032055	0.032055	0.014415	0	0.052212	0.052212	0.043798
R286	0	0.025758	0.025758	0	0.011075	0.011075	0.00498	0	0.01804	0.01804	0.015133
R287	0	0.07455	0.07455	0	0.032055	0.032055	0.014415	0	0.052212	0.052212	0.043798
R288	0	0.025758	0.025758	0	0.011075	0.011075	0.00498	0	0.01804	0.01804	0.015133
R289	0	0.025758	0.025758	0	0.011075	0.011075	0.00498	0	0.01804	0.01804	0.015133
R290	0	0.07455	0.07455	0	0.032055	0.032055	0.014415	0	0.052212	0.052212	0.043798
R291	0	0.025758	0.025758	0	0.011075	0.011075	0.00498	0	0.01804	0.01804	0.015133
R292	-0.046828	-0.046828	0	-0.020135	-0.020135	0	-0.009054	-0.032797	-0.032797	0	-0.027512
R293	-0.027669	-0.027669	0	-0.011897	-0.011897	0	-0.00535	-0.019378	-0.019378	0	-0.016255
R294	-0.025758	-0.025758	0	-0.011075	-0.011075	0	-0.00498	-0.01804	-0.01804	0	-0.015133
R296	0	0.046828	0.046828	0	0.020135	0.020135	0.009054	0	0.032797	0.032797	0.027512
R297	0	0.046828	0.046828	0	0.020135	0.020135	0.009054	0	0.032797	0.032797	0.027512
R298	0	0.046828	0.046828	0	0.020135	0.020135	0.009054	0	0.032797	0.032797	0.027512
R299	0	0.046828	0.046828	0	0.020135	0.020135	0.009054	0	0.032797	0.032797	0.027512
R300	0	0.046828	0.046828	0	0.020135	0.020135	0.009054	0	0.032797	0.032797	0.027512
R301	0	0.000274	0.024574	0	0	0.011009	0	0	0.01804	0.01804	0
R302	0	0.000274	0.024574	0	0	0.011009	0	0	0.01804	0.01804	0
R303	0	0.000274	0.024574	0	0	0.011009	0	0	0.01804	0.01804	0
R304	0	0.000274	0.024574	0	0	0.011009	0	0	0.01804	0.01804	0
R306	0	0	0.200137	0	0	0.23125	0	0	0	0.37	0
R309	0	0	0.200137	0	0	0.23125	0	0	0	0.37	0
R310	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R313	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R314	0	0.262764	0.262764	0	0.112985	0.112985	0.050808	0	0.184031	0.184031	0.154375
R315	0	0.262761	0.262761	0	0.112984	0.112984	0.050808	0	0.184029	0.184029	0.154373
R317	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R319	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R321	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R323	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R325	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R327	0	0.02808	0.02808	0	0.012074	0.012074	0.005429	0	0.019666	0.019666	0.016497
R329	0	0.012166	0.012166	0	0.005231	0.005231	0.002352	0	0.00852	0.00852	0.007147
R332	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R335	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R338	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R341	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R344	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R347	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R350	-0.02808	-0.02808	0	-0.012074	-0.012074	0	-0.005429	-0.019666	-0.019666	0	-0.016497
R353	0	0.012166	0.012166	0	0.005231	0.005231	0.002352	0	0.00852	0.00852	0.007147
R354	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R355	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R356	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R357	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R358	0	0.037085	0.037085	0	0.015946	0.015946	0.007171	0	0.025973	0.025973	0.021788
R359	0	0.02808	0.02808	0	0.012074	0.012074	0.005429	0	0.019666	0.019666	0.016497
R360	0	0.02808	0.02808	0	0.012074	0.012074	0.005429	0	0.019666	0.019666	0.016497
R361	0	0.012166	0.012166	0	0.005231	0.005231	0.002352	0	0.00852	0.00852	0.007147
R362	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R363	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R364	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R365	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788
R366	-0.037085	-0.037085	0	-0.015946	-0.015946	0	-0.007171	-0.025973	-0.025973	0	-0.021788

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R367	-0.02808	-0.02808	0	-0.012074	-0.012074	0	-0.005429	-0.019666	-0.019666	0	-0.016497
R368	-0.02808	-0.02808	0	-0.012074	-0.012074	0	-0.005429	-0.019666	-0.019666	0	-0.016497
R369	0	0.012166	0.012166	0	0.005231	0.005231	0.002352	0	0.00852	0.00852	0.007147
R370	0	0.001105	0.001105	0	0.000475	0.000475	0.000213	0	0.000774	0.000774	0.000649
R371	0	0.011946	0.011946	0	0.005136	0.005136	0.00231	0	0.008367	0.008367	0.007018
R372	0	0.010245	0.010245	0	0.004405	0.004405	0.001981	0	0.007175	0.007175	0.006019
R373	0	0.004921	0.004921	0	0.002116	0.002116	0.000951	0	0.003446	0.003446	0.002891
R374	0	0.000273	0.000273	0	0.000117	0.000117	0.000052	0	0.000191	0.000191	0.00016
R375	0	0.000188	0.000188	0	0.000081	0.000081	0.000036	0	0.000132	0.000132	0.00011
R376	0	0.004502	0.004502	0	0.001936	0.001936	0.00087	0	0.003153	0.003153	0.002645
R377	0	0.004502	0.004502	0	0.001936	0.001936	0.00087	0	0.003153	0.003153	0.002645
R378	0	0.004502	0.004502	0	0.001936	0.001936	0.00087	0	0.003153	0.003153	0.002645
R379	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R380	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R381	0	0.000207	0.000207	0	0.000089	0.000089	0.00004	0	0.000144	0.000144	0.000121
R382	0	0.000207	0.000207	0	0.000089	0.000089	0.00004	0	0.000144	0.000144	0.000121
R383	0	0.000207	0.000207	0	0.000089	0.000089	0.00004	0	0.000144	0.000144	0.000121
R385	0	0.000207	0.000207	0	0.000089	0.000089	0.00004	0	0.000144	0.000144	0.000121
R386	0	0.000207	0.000207	0	0.000089	0.000089	0.00004	0	0.000144	0.000144	0.000121
R388	0	0.000041	0.000041	0	0.000017	0.000017	0.000008	0	0.000028	0.000028	0.000024
R389	-0.00002	-0.00002	0	-0.000008	-0.000008	0	-0.000004	-0.000014	-0.000014	0	-0.000012
R391	0	0.000051	0.000051	0	0.000022	0.000022	0.00001	0	0.000036	0.000036	0.00003
R392	0	0.000051	0.000051	0	0.000022	0.000022	0.00001	0	0.000036	0.000036	0.00003
R247	0	0	0.108663	0	0	0.077083	0	0	0	0.071153	0
R394	0	0.000051	0.000051	0	0.000022	0.000022	0.00001	0	0.000036	0.000036	0.00003
R395	0	0.000051	0.000051	0	0.000022	0.000022	0.00001	0	0.000036	0.000036	0.00003
R396	0	0.000051	0.000051	0	0.000022	0.000022	0.00001	0	0.000036	0.000036	0.00003
R397	0	0	0.000051	0	0.000022	0.000022	0.00001	0	0	0.000036	0
R398	0	0.000051	0.000051	0	0	0.000022	0	0	0.000036	0.000036	0.00003
R399	0	0.000051	0.000051	0	0.000022	0.000022	0.00001	0	0.000036	0.000036	0.00003

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R400	0	0.000051	0.000051	0	0.000022	0.000022	0.00001	0	0.000036	0.000036	0.00003
R401	0	0.009004	0.009004	0	0.003872	0.003872	0.001741	0	0.006306	0.006306	0.00529
R402	-0.009004	-0.009004	0	-0.003872	-0.003872	0	-0.001741	-0.006306	-0.006306	0	-0.00529
R403	0	0.009004	0.009004	0	0.003872	0.003872	0.001741	0	0.006306	0.006306	0.00529
R404	0	0.009004	0.009004	0	0.003872	0.003872	0.001741	0	0.006306	0.006306	0.00529
R405	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R197	-0.622774	-0.117097	0.0185	-5.55	-3.365459	0	-3.028092	-16.54331	-2.960192	-2.466666	-2.990194
R407	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R408	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R409	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R410	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R411	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R412	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R413	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R414	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R415	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R417	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R418	0	0.002251	0.002251	0	0.000968	0.000968	0.000435	0	0.001576	0.001576	0.001322
R420	1.199	1.199	1.613	0	0	85.58429	3.059996	0	2.949464	56.76228	0.00936
R421	1.199	1.199	55.662869	0	0	85.58429	3.289478	0	2.949464	56.76228	0.087116
R422	0.444	0.523758	0.7322	0	0	1.85	0	0	0	14.07664	0.013257
R423	0.444	0.523758	0.7322	0	0	1.85	0	0	0	14.07664	0.013257
R424	0.444	0.523758	0.7322	0	0	1.85	0	0	0	14.07664	0.013257
R426	1.3098	1.349311	1.35	0	1.632405	2.775	1.491415	1.233333	1.350353	3.636728	1.379633
R427	1.421	1.421	1.432	0	1.66323	2.775	1.505277	1.233333	1.432411	3.636728	1.448468
R428	1.421	1.45613	1.457544	0	1.678336	2.775	1.51207	1.233333	1.457015	3.636728	1.469107
R429	-2.88	-2.87713	-2.842	-5.549999	-3.341566	0	-3.017348	-7.273456	-2.889426	-2.466666	-2.917575
R430	-0.222	-0.222	0.181	-2.775	-1.66323	85.58429	1.554718	-3.636728	1.517052	55.52895	-1.439108
R431	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R431a	4.5662	4.750076	4.884	0	4.973918	8.325	4.50874	3.699999	4.239693	17.77664	4.310394

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R431b	0	0	0.0296	0	0	1.85	0	0	0	3.588018	0
R432	4.5958	4.750076	4.884	0	4.973918	8.325	4.50874	3.7	4.239693	17.77664	4.310394
R433	0.071	0.071688	0.1222	0	0.030825	0.119354	0.013861	0	0.082058	0.17619	0.068834
R434	0	0	0.400275	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R435	-0.400274	0	0	-0.616666	0	0	0	0	0	0	0
R436	0	0	0.400275	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R438	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R442	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.229481	0	0	54.29562	0.077756
R443	36.288341	100	100	0.151666	100	100	99.92673	36.144589	56.26132	100	99.979555
R444	16.175302	32.923043	78.699045	0	22.34543	100	68.5932	16.115318	26.38261	69.28363	64.014228
R445	15.861897	67.076956	83.4265	0	77.65457	100	31.33353	20.02927	29.8787	83.42857	35.965327
R447	0	0	14.35936	0	0	25	0	0	0	11.63424	0
R448	0	0.336363	0.336363	0	0.37	0.37	0	0	0	0.336363	0.000498
R449	0	0	0.336363	0	0	0.37	0	0	0	0.336363	0.369501
R452	0	0	34.013736	0	0	0	0	0	0	1.85	0
R455	0	0	14.35936	0	0	0	0	0	0	1.85	0
R457	0.404382	0.823076	1.967476	0	0	25	0	0.402882	0.659565	1.73209	8.493319
R459	0	0.00198	7.247941	0	0	12.5	0	0	0	6.334828	0
R460	0	0	12.425109	0	0	25	10.86667	0	0	9.224635	0
R461	0	0	7.247941	0	0	12.5	0.03674	0	0	6.334828	0.193422
R462	0	0	42.541925	0	38.82729	50	15.66677	0	0	42.54286	34.969303
R463	0	0	14.495883	0	0	25	0	0	0	12.66966	0
R464	0	70.36926	85.08385	0	0	100	0	0	32.51696	85.08571	0
R465	0	70.36926	85.08385	0	0	100	0	0	32.51696	85.08571	0
R466	0	70.36926	85.08385	0	0	100	0	0	32.51696	85.08571	0
R467	0	35.18463	42.541925	0	0	50	0	0	16.25848	42.54286	0
R468	0	35.18463	42.541924	0	0	50	0	0	16.25848	42.54286	0
R469	0	35.18463	42.541924	0	0	50	0	0	16.25848	42.54286	0
R470	0	0.007921	28.991766	0	0	50	0	0	0	25.33931	0

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R471	0	0.007921	28.991766	0	0	50	0	0	0	25.33931	0
R472	0	0.007921	28.991766	0	0	50	0	0	0	25.33931	0
R473	0	0.00396	14.495883	0	0	25	0	0	0	12.66966	0
R474	0	0.00396	14.495883	0	0	25	0	0	0	12.66966	0
R475	0	0.00396	14.495883	0	0	25	0	0	0	12.66966	0
R476	15.782588	66.741571	83.009367	0	77.65457	100	31.13895	19.929124	29.72931	83.01143	35.918712
R477	15.861897	67.076956	83.4265	0	77.65457	100	31.33353	20.02927	29.8787	83.42857	35.965327
R478	-27.383552	30.131466	1000	-85.58429	17.05552	50	1000	-23.11955	12.20175	1000	1000
R479	-1000	0.024595	0.1222	-85.58429	0.010575	0.119354	-985.9394	-1000	0.044779	0.17619	-999.898244
R480	0.079309	0.335384	0.417132	0	0	50	0.194584	0.100146	0.149393	0.417142	0.046615
R481	0.404382	1.646152	1.967476	0	0	12.5	0.530076	0.805765	0.659565	3.464181	1.780381
R482	0.080876	0.164615	0.393495	0	0	100	0	0.080576	0.131913	0.346418	0.004566
R483	0	1.19723	34.013736	0	23.91337	50	0	0	0.183521	31.49554	0
R484	16.175302	32.923043	78.699045	0	22.34543	100	68.5932	16.115318	26.38261	69.28363	64.014228
R485	8.047212	16.379214	39.152775	0	11.17271	50	34.2966	8.01737	13.12535	34.46861	32.004831
R486	8.047212	16.379214	39.152775	0	11.17271	50	34.2966	8.01737	13.12535	34.46861	32.004831
R487	4.043825	8.23076	19.674761	0	5.586356	25	17.1483	4.028829	6.595653	17.32091	16.003557
R488	4.043825	8.23076	19.674761	0	5.586356	25	17.1483	4.028829	6.595653	17.32091	16.003557
R489	4.043825	8.23076	19.674761	0	5.586356	25	17.1483	4.028829	6.595653	17.32091	16.003557
R490	4.043825	8.23076	19.674761	0	5.586356	25	17.1483	4.028829	6.595653	17.32091	16.003557
R491	4.043825	8.23076	19.674761	0	5.586356	25	17.1483	4.028829	6.595653	17.32091	16.003557
R492	3.372988	13.077731	23.247613	0.01238	14.08096	28.57143	10.24239	3.401495	6.770634	22.55197	11.994864
R493	0	0.001697	10.345745	0	0	17.85714	0.010497	0	0	8.398919	0.160835
R495	0.316382	0.4107	0.4107	0	0	1.85	0	0	0	1.85	0
R498	0.4255	0.4255	0.444	0	0	1.85	0	0	0.553326	1.85	0.566632
R499	-0.819349	0.01739	999.90163	-1.85	-1.047042	85.58429	994.8983	-1.85	999.7004	1000	0.059973
R500	0	0	0.863724	0	1.05452	1.85	0.928611	0	0	1.85	0
R501	0	0	0.863724	0	1.05452	1.85	0.928611	0	0	0.925	0
R502	0	0	0.863724	0	0	1.85	0	0	0	1.85	0
R503	0.382588	0.382588	0.4884	0	1.466153	3.083333	1.416653	0	0.24291	0.925	0.291105

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R504	0.0703	0.0703	0.1924	-1.85	-1.325497	0	-1.201934	-0.925	0	0	0
R505	-14.75896	-0.337193	-0.327395	-25	-0.093094	0	-0.304386	-11.63424	-0.165442	0	-0.26383
R506	0	0	0.094317	0	0	0	0	0	0	0	0
R507	0	0.039341	0.039341	0	0.016916	0.016916	0.007607	0	0	0.027149	0
R508	0.111	0.115694	0.1258	0	0.047561	1.233333	0.021387	0	0.077467	0.925	0.064983
R509	-0.1258	-0.115694	-0.111	-1.233333	-0.047561	0	-0.021387	-0.925	-0.077467	0	-0.064983
R510	0.111	0.115694	0.1258	0	0.047561	1.233333	0.021387	0	0.077467	0.925	0.064983
R511	0	0.000007	0.000007	0	0.000003	0	0.000001	0	0.000005	0.000005	0.000004
R512	-0.2	-0.2	-0.0703	-1.85	-0.031798	0.616666	-0.014299	0	0	0	0
R513	0	0.0296	0.0296	0	0.012244	0.925	0.005506	0	0	0.148	0
R514	0	0.00396	0.0296	0	0	0.925	0	0	0	0.148	0
R515	0.111	0.115694	0.1258	0	0.047561	1.233333	0.021387	0	0.077467	0.925	0.064983
R516	0	0	0.400275	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R517	0	0.1297	0.1297	0	1.357296	2.775	1.216234	0	0	0.925	0
R518	0	0	1000	0	0	85.58429	995.8148	0	999.6607	1000	0
R519	0	0	1000	0	0	85.58429	995.8148	0	999.6607	1000	0
R522	0	0	0.0296	0	0	1.85	0	0	0	3.588018	0
R523	0	0.041655	0.560324	0	1.253087	3.083333	1.017905	0	0	1.85	0
R524	0	0	0.458349	0	0	0.616666	0	0	0.006552	0.071153	0.005496
R525	0	0	0.80055	0	0	0.925	0	0	0	0	0
R526	0	0	14.35936	0	0	25	0.111055	0	0	11.63424	0.037709
R527	0	0.005084	0.125799	0	0	0.925	0	0	0	0.925	0
R528	0	0	0.1258	0	0	0.925	0	0	0	0.925	0
R529	0	0.005084	0.1258	0	0	0.925	0	0	0	0.925	0
R530	0	0.005084	0.125799	0	0	0.925	0	0	0	0.925	0
R532	0	0.000082	0.0296	0	0.000035	1.85	0.000016	0	0.000057	3.588018	0.000048
R533	0	0.028315	0.1222	0	0.012175	0.115625	0.005475	0	0.01983	0.071153	0.016635
R534	0	0.028315	0.1222	0	0.012175	0.115625	0.005475	0	0.01983	0.071153	0.016635
R535	0	0.028025	0.1222	0	0.01205	0.115625	0	0	0.013075	0.071153	0
R536	0	0	0.1222	0	0	0.115625	0	0	0	0.071153	0

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R537	0	0.028315	0.1222	0	0.012175	0.115625	0.005475	0	0.01983	0.071153	0.016635
R538	0	0.028315	0.1222	0	0.012175	0.115625	0.005475	0	0.01983	0.071153	0.016635
R539	0	0.028294	0.1222	0	0.012166	0.115625	0.005471	0	0.019816	0.071153	0.016623
R540	0	0.028294	0.1222	0	0.012166	0.115625	0.005471	0	0.019816	0.071153	0.016623
R541	0	0.028294	0.1222	0	0.012166	0.115625	0.005471	0	0.019816	0.071153	0.016623
R542	0	0.028294	0.1222	0	0.012166	0.115625	0.005471	0	0.019816	0.071153	0.016623
R543	0	0.035939	0.122199	0	0.015453	0.115624	0.006949	0	0.025171	0.071153	0.021114
R544	-0.122199	-0.035939	0	-0.115624	-0.015453	0	-0.006949	-0.071153	-0.025171	0	-0.021114
R545	0	0.021388	0.1222	0	0.009196	0.115625	0.004135	0	0.014979	0.049333	0.012565
R546	0	0.021388	0.1222	0	0.009196	0.115625	0.004135	0	0.014979	0.049333	0.012565
R547	0	0.002347	0.122199	0	0.001009	0.115625	0.000453	0	0.001644	0.049333	0.001379
R549	0	0	0.122199	0	0	0.115625	0	0	0	0.049333	0
R550	0	0.002149	0.002149	0	0.000924	0.000924	0.000415	0	0.001505	0.001505	0.001263
R551	-0.1222	-0.000644	0	-0.119354	-0.000277	0	-0.000124	-0.11746	-0.000451	0	-0.000378
R553	0	0.034481	54.226869	0	0.014826	85.58429	0.307504	0	0.024149	54.29562	0.084518
R554	0	0.002347	0.002347	0	0.001009	0.001009	0.000453	0	0.001644	0.001644	0.001379
R555	0	0.002149	0.002149	0	0.000924	0.000924	0.000415	0	0.001505	0.001505	0.001263
R556	0	0.000041	0.003748	0	0.000017	0.00161	0.000008	0	0.000028	0.002621	0.000024
R558	-0.80055	-0.00216	0	-0.74	-0.000928	0	-0.000417	-0.001512	-0.001512	0	-0.001269
R559	0	0.014551	0.108663	0	0.006257	0.077083	0.002813	0	0.010191	0.071153	0.008549
R560	0	0.014551	0.108663	0	0.006257	0.077083	0.002813	0	0.010191	0.071153	0.008549
R561	0	0.014572	54.226869	0	0.006266	85.58429	0.303655	0	0.010206	54.29562	0.072822
R562	0	0.000289	0.1222	0	0.000124	0.115625	0.005475	0	0.006755	0.071153	0.016635
R564	-0.41605	0.320812	1000	-1.85	0	85.58429	999.6197	-1.85	999.8876	1000	0.275364
R566	-0.1222	0	0	-0.115625	0	0	0	-0.049333	0	0	0
R567	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.207759	0	0	54.29562	0.050324
R568	0	0.002143	0.1222	0	0.000921	0.088095	0.00087	0	0.001501	0.148	0.002643
R569	-0.1222	0	0	-0.088095	0	0	-0.000455	-0.148	0	0	-0.001384
R570	0	0.028484	0.1222	0	0.012247	0.1	0.005507	0	0.051799	0.148	0.043451
R572	-0.1222	-0.028484	0	-0.1	-0.012247	0	-0.005507	-0.148	-0.051799	0	-0.043451

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R574	0	0.028484	0.1222	0	0.012247	0.1	0.005507	0	0.051799	0.148	0.043451
R575	-0.1222	-0.028484	0	-0.1	-0.012247	0	-0.005507	-0.148	-0.051799	0	-0.043451
R576	0	0.028484	0.1222	0	0.012247	0.1	0.005507	0	0.051799	0.148	0.043451
R577	0	0.016379	0.280162	0	0.00702	0.344186	0.003157	0	0.011471	0.4	0.009622
R579	0	0.032986	54.297869	0	0.014183	85.58429	0.214137	0	0.054952	54.29562	0.096421
R580	0	0.047608	54.297869	0	0.02047	85.58429	0.21742	0	0.065192	54.29562	0.106395
R581	-0.1222	0.014235	0.280162	-0.088095	0.006098	0.344186	0.002287	-0.148	0.00997	0.4	0.006979
R582	0	0.013974	54.226869	0	0	85.58429	0.167469	0	0.009787	54.29562	0.067374
R583	0	0	27.113434	0	0.006008	42.79214	0.107517	0	0	27.14781	0.066436
R584	0	0	0.1222	0	0	0.088095	0.000455	0	0	0.148	0.001384
R585	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.271828	0	0	54.29562	0.097499
R586	0	0.002356	0.1222	0	0.001013	0.088095	0.000455	0	0.00165	0.148	0.001384
R587	-0.1222	-0.002356	0	-0.088095	-0.001013	0	-0.000455	-0.148	-0.00165	0	-0.001384
R588	0	0.002356	0.1222	0	0.001013	0.088095	0.000455	0	0.00165	0.148	0.001384
R589	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.300837	0	0	54.29562	0.06426
R590	0	0.002143	0.1222	0	0.000921	0.088095	0.00087	0	0.001501	0.148	0.002643
R591	0	0.002356	0.1222	0	0.001013	0.088095	0	0	0.00165	0.148	0
R592	0	0.002356	0.1222	0	0.001013	0.088095	0.000455	0	0.00165	0.148	0.001384
R593	0	0.000045	0.000045	0	0.000019	0.000019	0.000008	0	0.000032	0.000032	0.000026
R594	0	0.000021	0.000021	0	0.000009	0.000009	0.000004	0	0.000015	0.000015	0.000012
R595	0	0.000023	0.000023	0	0.00001	0.00001	0.000004	0	0.000016	0.000016	0.000014
R596	0	0.000021	0.000021	0	0.000009	0.000009	0.000004	0	0.000015	0.000015	0.000012
R597	0	0.000002	0.000002	0	0	0	0	0	0.000001	0.000001	0.000001
R598	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R601	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R602	0	0.000023	0.000023	0	0.00001	0.00001	0.000004	0	0.000016	0.000016	0.000014
R604	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085
R605	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R606	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085
R607	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085
R608	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085
R609	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085
R610	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085
R611	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085
R612	0	0.000145	0.000145	0	0.000062	0.000062	0.000028	0	0.000102	0.000102	0.000085
R613	0	0.000045	0.000045	0	0.000019	0.000019	0.000008	0	0.000032	0.000032	0.000026
R614	0	0.000062	0.000062	0	0.000026	0.000026	0.000012	0	0.000043	0.000043	0.000036
R615	0	0.000062	0.000062	0	0.000026	0.000026	0.000012	0	0.000043	0.000043	0.000036
R616	0	0.000062	0.000062	0	0.000026	0.000026	0.000012	0	0.000043	0.000043	0.000036
R617	0	0.000062	0.000062	0	0.000026	0.000026	0.000012	0	0.000043	0.000043	0.000036
R618	0	0.000124	0.000124	0	0.000053	0.000053	0.000024	0	0.000086	0.000086	0.000072
R619	0	0.000124	0.000124	0	0.000053	0.000053	0.000024	0	0.000086	0.000086	0.000072
R620	0	0.000062	0.000062	0	0.000026	0.000026	0.000012	0	0.000043	0.000043	0.000036
R621	0	0.000041	0.000041	0	0.000017	0.000017	0.000008	0	0.000028	0.000028	0.000024
R622	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R623	-0.000031	-0.000031	0	-0.000013	-0.000013	0	-0.000006	-0.000021	-0.000021	0	-0.000018
R624	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R625	0	0	0.133425	0	0	0.148	0	0	0	0.284615	0
R626	0	0	0.133425	0	0	0.148	0	0	0	0.284615	0
R627	0	0	0.3881	0	0	0.336363	0.151467	0	0	0.528571	0.072206
R628	0	0.003571	0.061099	0	0.001535	0.059677	0.00069	0	0.002501	0.05873	0.002098
R629	0	0.000602	0.061099	0	0.000259	0.059677	0.000116	0	0.000422	0.05873	0.000354
R630	0	0	0.061099	0	0	0.059677	0	0	0	0.05873	0
R631	0	0.000602	0.1222	0	0.000259	0.119354	0.000116	0	0.000422	0.11746	0.000354
R632	0	0.000602	0.1222	0	0.000259	0.119354	0.000116	0	0.000422	0.11746	0.000354
R633	0	0.018766	1000	0	0.008069	85.58429	0.053529	0	0.013143	1000	0.018744
R635	0	0.018766	1000	0	0.008069	85.58429	0.053529	0	0.013143	1000	0.018744
R638	0	0	1000	0	0	85.58429	0.0499	0	0	1000	0.007718

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R643	0	0	0.431862	0	0	0.462499	0	0	0.105929	0.925	0.147662
R644	-0.431862	0	0	-0.462499	0	0	0	-0.925	-0.105929	0	-0.147662
R645	0	0	0.431862	0	0	0.462499	0	0	0.105929	0.925	0.147662
R646	0	0	27.113434	0	0	42.79214	0.439298	0	0	27.14781	0.164873
R647	0	0	27.113434	0	0	42.79214	0.439298	0	0	27.14781	0.164873
R648	0	0.015298	0.280162	0	0.006578	0.344186	0.002958	0	0.010714	0.4	0.008987
R649	0	0.015256	0.280162	0	0.00656	0.344186	0.00295	0	0.010685	0.4	0.008963
R650	0	0.015256	0.280162	0	0.00656	0.344186	0.00295	0	0.010685	0.4	0.008963
R651	0	0.015256	0.280162	0	0.00656	0.344186	0.00295	0	0.010685	0.4	0.008963
R652	0	0.015256	0.280162	0	0.00656	0.344186	0.00295	0	0.010685	0.4	0.008963
R653	0	0.015256	0.280162	0	0.00656	0.344186	0.00295	0	0.010685	0.4	0.008963
R654	0	0	0.280162	0	0	0.344186	0.00295	0	0.010685	0.4	0.008963
R655	0	0.015256	0.280162	0	0.00656	0.344186	0	0	0	0.4	0
R656	-0.210121	-0.011441	0.07004	-0.258139	-0.004919	0.086046	0.000737	-0.3	0.002672	0.1	0.002241
R657	0	0.003815	0.07004	0	0.00164	0.086046	0.000737	0	0.002672	0.1	0.002241
R658	0	0.003815	0.07004	0	0.00164	0.086046	0.000737	0	0.002672	0.1	0.002241
R659	0	0.003768	0.07004	0	0.00162	0.086046	0.000728	0	0.002639	0.1	0.002214
R660	0	0.000005	0.000005	0	0.000002	0	0.000001	0	0.000003	0.000003	0.000003
R661	0	0.001992	0.001992	0	0.000856	0.000856	0.000385	0	0.001395	0.001395	0.00117
R662	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R663	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R664	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R665	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R666	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R667	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R668	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R669	0.718627	4.178939	4.501386	-0.184999	3.680571	4.002727	3.790235	3.263636	4.334711	4.420779	4.032502
R670	-6.504999	0	996.9028	0	0	0	0	0	0	0	0
R671	0	0	1.464549	0	0	0	0	0	0	0	0
R672	-1.399911	999.04764	1000	-0.554999	0.870383	1000	0.830712	-1.175655	998.6892	1000	-0.716696

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R673	2.032 227	3.363636	3.363636	0	3.33	3.33	3.33	3.363636	3.7	3.363636	3.33
R675	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R676	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R677	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R678	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R680	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R681	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R682	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R684	0.142	0.800854	1.137749	0	0.344358	0.672727	0.457789	0	0.624591	1.057142	0.695071
R687	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R688	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R689	0	0.015936	0.1222	0	0.006852	0.119354	0.003081	0	0.038715	0.11746	0.032476
R691	0	0.064653	0.2444	0	0.0278	0.199999	0.012501	0	0.108981	0.296	0.091418
R692	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.219649	0	0	85.58429	0
R693	0	0.00027	0.00027	0	0.000116	0.000116	0.000052	0	0.000189	0.000189	0.000158
R694	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R695	0	0.015205	0.015205	0	0.006538	0.006538	0.00294	0	0.010649	0.010649	0.008933
R697	0	0.00027	0.00027	0	0.000116	0.000116	0.000052	0	0.000189	0.000189	0.000158
R698	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.219649	0	0	54.29562	0.082436
R700	0	0.000291	0.000291	0	0.000125	0.000125	0.000056	0	0.000203	0.000203	0.000171
R701	0	0.00067	0.00067	0	0.000288	0.000288	0.000129	0	0.000469	0.000469	0.000394
R703	0	0.002476	0.002476	0	0.001064	0.001064	0.000478	0	0.001734	0.001734	0.001454
R704	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R705	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R706	0	0.000405	0.000405	0	0.000174	0.000174	0.000078	0	0.000283	0.000283	0.000238
R707	0	0.015543	0.015543	0	0.006683	0.006683	0.003005	0	0.010886	0.010886	0.009131
R708	0	0.00027	0.00027	0	0.000116	0.000116	0.000052	0	0.000189	0.000189	0.000158
R709	0	0.00027	0.00027	0	0.000116	0.000116	0.000052	0	0.000189	0.000189	0.000158
R711	0	0.000608	0.000608	0	0.000261	0.000261	0.000117	0	0.000426	0.000426	0.000357

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R712	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R713	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R714	0	0.000041	0.003748	0	0.000017	0.00161	0.000008	0	0.000028	0.002621	0.000024
R715	0	0.000602	0.1222	0	0.000259	0.119354	0.000116	0	0.000422	0.11746	0.000354
R716	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R717	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R718	4.5662	4.750076	4.884	0	4.973918	8.325	4.50874	3.7	4.239693	17.77664	4.310394
R719	0	0	0.0296	0	0	1.85	0	0	0	3.588018	0
R720	4.5662	4.750076	4.884	0	4.973918	8.325	4.50874	3.7	4.239693	17.77664	4.310394
R721	4.5958	4.750076	4.884	0	4.973918	8.325	4.50874	3.7	4.239693	17.77664	4.310394
R722	9.162	9.500152	9.768	0	9.947837	16.65	9.01748	7.4	8.479386	35.55328	8.620788
R723	0	0	0.0296	0	0	1.85	0	0	0	3.588018	0
R724	8.087651	16.461521	39.349522	0	11.17271	50	34.2966	8.057659	13.19131	34.64182	32.007114
R725	4.043825	8.23076	19.674761	0	5.586356	25	17.1483	4.028829	6.595653	17.32091	16.003557
R726	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R727	-1000	-1000	0	-1000	0	0	0	-1000	-1000	0	0
R728	-1000	-5.593129	0	-6.727272	-5.568545	0	-5.533735	-7.003571	-5.173908	-2.775	-5.453262
R729	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R730	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R731	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R732	-0.00002	-0.00002	0	-0.000008	-0.000008	0	-0.000004	-0.000014	-0.000014	0	-0.000012
R733	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R734	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R735	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R736	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R737	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R738	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R739	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R740	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R741	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R742	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R743	-0.00002	-0.00002	0	-0.000008	-0.000008	0	-0.000004	-0.000014	-0.000014	0	-0.000012
R745	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R748	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R749	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R751	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R752	0	0.00001	0.00001	0	0.000004	0.000004	0.000002	0	0.000007	0.000007	0.000006
R753	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R754	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R755	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R756	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R757	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R758	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R759	0	0.00002	0.00002	0	0.000008	0.000008	0.000004	0	0.000014	0.000014	0.000012
R800	0	0	0.863724	0	1.05452	1.85	0.928611	0	0	1.85	0
R801	0	0	0.1222	0	0	0.1	0	0	0	0.147999	0.026717
R802	0	0	0.122199	0	0	0.115625	0	0	0	0.049333	0
R803	0	0	0.1222	0	0	0.088095	0	0	0	0.148	0
R804	0	0	0.108663	0	0	0.077083	0	0	0	0.071153	0
R805	0	0	0.03502	0	0	0.043023	0	0	0	0.05	0
R806	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.219649	0	0	54.29562	0.082436
R807	0	0	0.388099	0	0	0.336363	0.151467	0	0	0.528571	0.072206
R808	0	0	0.1222	0	0	0.088095	0	0	0	0.148	0
R809	0	5.593129	1000	0	5.568545	6.727272	5.533735	2.775	5.173908	7.003571	5.453262
R810	0	0	0.200137	0	0	0.23125	0	0	0	0.37	0
R811	0	0	0.133425	0	0	0.148	0	0	0	0.284615	0
R812	0	0	0.431862	0	0	0.462499	0	0	0.105929	0.925	0.147662
R813	0	0	0.1222	0	0	0.099999	0	0	0.031849	0.148	0
R814	0	0	54.226869	0	0	85.58429	0.219649	0	0	85.58429	0
R815	0	0	0.200137	0	0	0.23125	0	0	0	0.37	0

Tabla E.1.(cont.) Resultados de las optimizaciones

	<i>Cepa Silvestre, Mehler 20%</i>			<i>Cepa acoplada M2 (Etanol)</i>				<i>Cepa acoplada M4 (PHB)</i>			
	vmin	FBA	vmax	vmin	FBA	vmax	MOMA	vmin	FBA	vmax	MOMA
R816	0	1000	1000	0	0	1000	0	0	1000	1000	0
R817	0	0	0.061099	0	0	0.059677	0	0	0	0.05873	0
R818	0	0	0.100068	0	0	0.115625	0	0	0	0.185	0
R819	0	0	0.560325	0	0	1.85	0	0	0	1.85	0
R820	0	0	0.863725	0	0	0.925	0	0	0	0	0
R821	0	0	0.541533	0	0	0.739999	0	0	0	1.233333	0
R822	0	0	0.125799	0	0	0.336363	0	0	0	0.74	0
R823	0	0	0.4366	0	0	0.616666	0	0	0	0	0
R824	0	0	0.248	0	0	0.37	0	0	0.051793	0.925	0.043447
R825	0	0	0.0148	0	0	0.308333	0	0	0	0.616666	0
R826	0	0	0.1297	0	0	0.616666	0	0	0	0.4625	0
R827	0.203222	0.336363	0.336363	0	0.37	0.37	0	0.336363	0	0.336363	0.37
R828	1.3213	1.723723	29.775722	0	2.865224	42.79214	2.651673	0	0.986451	27.76447	1.138631