



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estrategia De Modificación Metabólica De Una Cepa Nativa De *Clostridium* Para La Producción De 1,3-Propanodiol A Partir De Glicerol

Ximena Carolina Pérez Mancilla, M.Sc.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología
Bogotá, Colombia
2019

Estrategia De Modificación Metabólica De Una Cepa Nativa De *Clostridium* Para La Producción De 1,3-Propanodiol A Partir De Glicerol

Ximena Carolina Pérez Mancilla, M.Sc.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias- Biotecnología

Directora:

Dr. rer. nat. Dolly Montoya Castaño

Codirector:

Dr. rer. nat Diego Mauricio Riaño Pachón

Línea de Investigación:

Microorganismos Solventogénicos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología

Bogotá, Colombia

2019

*A mi mamá, eres mi apoyo, mi razón de ser,
mi ejemplo. Todo en la vida te lo debo a ti.*

*A mi familia, lo más grande y verdadero que
Dios me dio, cómplices y consejeros en este
largo camino.*

Agradecimientos

A mi profesora Dolly Montoya, gracias por acompañar mi camino desde hace tantos años, por ser ejemplo, tutora y amiga; hoy soy una persona mejor por usted.

A mi codirector, Diego Riaño. Gracias por sus enseñanzas, consejos, disposición, paciencia y apoyo, sin lo que no habría podido alcanzar este objetivo de vida.

Al grupo de investigación de Bioprocesos y Bioprospección donde he estado por 12 años de mi vida formándome y particularmente al Ingeniero Gustavo Buitrago y a Mauricio Bernal por sus contribuciones y apoyo.

Al programa de Doctorado en Biotecnología y quienes lo apoyan.

A BIOS por abrirme un espacio para iniciar mi curva de conocimiento en bioinformática.

A Jason Papin y su grupo de investigación en la Universidad de Virginia, que fue mi hogar por 6 meses y donde me sentí acogida y apreciada, intelectualmente y como persona.

Al IBUN en general por todo lo que me ha brindado.

A la Universidad Nacional de Colombia que me ha hecho quien soy como profesional y que me ha dado todas las herramientas y oportunidades.

A mis amigos, especialmente a Pats, Diego, Yamile, Diana B., Laura M. y Natalia Taboada. Su lealtad, compañía, cariño y apoyo son invaluable para mí.

Resumen

El incremento de la producción de fuentes energéticas alternativas como biodiesel ha conllevado a estudiar la posibilidad de establecer biorrefinerías donde se haga uso del subproducto glicerol sin purificar como sustrato para la producción de 1,3-Propanodiol (1,3-PD) por parte de microorganismos del género *Clostridium*. Con el propósito de establecer una estrategia de modificación genética a partir del análisis del transcriptoma de *Clostridium* sp. IBUN13A para la producción de 1,3-PD se obtuvo inicialmente su genoma, lo que otorgó un panorama global del potencial metabólico de la cepa, así como la base de la construcción de un modelo metabólico. Así mismo se realizó un estudio de genómica comparativa entre 32 cepas del género, mostrando que este tiene una amplia plasticidad génica. Tomando en cuenta la tendencia actual de comprender globalmente la información que se puede obtener a partir de técnicas moleculares de punta y generar modelos predictivos de los organismos vivos a partir de la biología de sistemas, se utilizó la red metabólica obtenida previamente dentro del grupo de investigación para implementar estrategias de manipulación *in silico* de triples mutantes, que nos permitieron evaluar la viabilidad de modificar de forma racional al microorganismo y para lo que no se encontraron incrementos en el rendimiento molar del diol de más de 2%. De igual forma se establecieron las diferencias en el perfil transcriptómico global de la cepa en cultivo con glicerol respecto a glucosa, lo cual es fuente de información sobre la fisiología de esta bacteria y sobre posibles blancos de manipulación genética.

Palabras clave: *Clostridium*, transcriptoma, genoma, genómica comparativa, red metabólica, 1,3-Propanodiol.

Abstract

The increase in the production of alternative energy sources such as biodiesel, has encouraged the study about the possibility of establishing biorefineries where glycerol (byproduct of this process) can be used without purifying as a substrate to produce 1,3-propanediol (1,3-PD) by microorganisms of the genus *Clostridium*. In order to establish a genetic modification strategy based on the analysis of the transcriptome of *Clostridium* sp. IBUN13A for producing 1,3-PD, at first its genome was obtained, which gave an overview of the metabolic potential of the strain, as well as the basis of the construction of a metabolic model. Likewise, a study of comparative genomics was carried out among 32 strains of the genus, showing that it has a broad genetic plasticity. Taking into account the current trend of globally understanding the information that can be obtained from cutting-edge molecular techniques and generating predictive models of living organisms from Systems Biology, we used the metabolic network previously obtained within the research group to implement strategies of *in silico* manipulation of triple mutants, which allowed us to evaluate the feasibility of modifying the microorganism rationally and for which no were found increases in the molar yield of the alcohol of more than 2%. Also, the differences in the global transcriptomic profile of the strain cultured with glycerol were established with respect to glucose, which is a source of information about the physiology of this strain and possible targets of genetic manipulation.

Keywords: *Clostridium*, transcriptome, genome, comparative genomics, metabolic network, 1,3-Propanediol

Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVI
Introducción	1
Capítulo 1. Estado del Arte	5
1.1. Metabolismo del glicerol para la obtención de productos de valor agregado vía biotecnológica.....	5
1.2. 1,3-Propanodiol y su importancia a nivel industrial	7
1.3. <i>Clostridium</i> sp. y metabolismo del glicerol.....	8
1.4 Estrategias de modificación genética para la producción de 1,3-Propanodiol a partir de glicerol	10
1.5 Transcriptoma y su aplicación en el conocimiento del metabolismo de <i>Clostridium</i>	12
1.5.1 Avances en el análisis del metabolismo de <i>Clostridium</i> por medio de transcriptómica.....	13
1.6 Reconstrucción metabólica: herramienta para análisis <i>in silico</i> de la información ómica de clostridios.....	16
1.7 Avances en el estudio de cepas de <i>Clostridium</i> por parte del Grupo de Bioprocesos y Bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia.....	17
1.8 Referencias.....	19
Capítulo 2. Potencial metabólico de <i>clostridium</i> sp para producir 1,3-propanodiol 27	
2.1 Introducción.....	29
2.2 Métodos.....	31
2.2.1 Anotación del genoma:.....	31
2.2.1.1 Cepas bacterianas:.....	31
2.2.1.2 Ensamblaje y anotación:.....	31
2.2.2 Análisis del genoma in silico - Genómica comparativa	32
2.2.2.1 Secuencias:	32
2.2.2.2 Análisis de genómica comparativa:.....	32
2.3 Resultados.....	33
2.3.1 Potencial metabólico global de la cepa <i>Clostridium</i> IBUN13A:.....	33
2.3.2 Genómica comparativa de cepas de <i>Clostridium</i> IBUN13A con capacidad de obtener 1,3-Propanodiol:.....	40
2.4 Discusión	48

2.5	Conclusiones	51
2.6	Referencias.....	52
Capítulo 3. Predicción de fenotipos metabólicos de <i>clostridium</i> sp. ibun13a que incrementen la producción de 1,3-propanodiol.....57		
3.1	Introducción	58
3.2	Métodos.....	60
3.2.1	Análisis del genoma accesorio de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A	60
3.2.2	<i>Predicción de triples mutantes knockout</i> :.....	61
3.2.3	Topología de la red metabólica:	61
3.3	Resultados y discusión	61
3.3.1	<i>Análisis del genoma accesorio de Clostridium sp. IBUN13A respecto a la red iCbu641</i>	62
3.3.2	Predicción de fenotipos metabólicos de la cepa <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A para producir 1,3-Propanodiol	64
3.3.3	Análisis de la topología de la red metabólica iCbu641:.....	69
3.3.4	Propuesta de refinamiento de la red iCbu641 para la simulación del metabolismo de la cepa <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A.....	70
3.4	Conclusiones.....	71
3.5	Referencias	72
Capítulo 4. Estrategia de modificación genética para incrementar la producción de 1.3-propanodiol en <i>Clostridium</i> sp		
4.1.	Introducción	77
4.2	Métodos.....	79
4.2.1	Microorganismo:.....	79
4.2.2	Obtención de ARN:	79
4.2.3	Secuenciación y preprocesamiento:	80
4.2.4	Análisis de los datos de secuenciación:	80
4.3	Resultados y Discusión.....	81
4.3.1	Obtención de ARN de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A en cultivo de glucosa y glicerol:81	
4.3.2	Secuenciación y preprocesamiento:.....	84
4.3.3	Análisis de los datos de secuenciación:	85
4.3.4	Análisis de enriquecimiento de ontología de genes:	89
4.4	Propuesta de blancos de Modificación genética para <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A96	
4.5	Conclusiones.....	99
4.6	Referencias	100
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones.....107		
5.1	Conclusiones.....	107
5.2	Recomendaciones.....	108
Anexo 1:.....109		
A.	LISTADO DE ESPECIES UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE GENÓMICA COMPARATIVA	109
B.	LISTA DE SECUENCIAS CODIFICANTES CONSIDERADAS PARTE DEL GENOMA ACCESORIO DE <i>Clostridium</i> IBUN13A, QUE PODRÍAN CONSIDERARSE PARTE DEL GENOMA NÚCLEO.....	114
C.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE GENÓMICA COMPARATIVA DE 101 CEPAS DE <i>Clostridium</i> LISTADAS EN LPSN Y 47 CEPAS DE <i>Clostridium Sensu Stricto</i> EN CONJUNTO CON 4 CEPAS DERIVADAS DE ESTE ESTUDIO.....	118

Anexo 2	125
A. CONTRIBUCIÓN AL CÁLCULO DE COMPONENTES DE BIOMASA BASADO EN LA INFORMACIÓN PUBLICADA PARA OTROS CLOSTRIDIOS Y PARA <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A	125
B. PROPUESTA DE REACCIONES DENTRO DEL SUBSISTEMA DE METABOLISMO DE LÍPIDOS PARA ADICIONAR A LA RED iCbu641	126
Anexo 3	131
A. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ARN.....	131
B. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR DESeq2	138
C. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO POR MEDIO DE LA HERRAMIENTA BiNGO	140
143	143
Estrategia De Modificación Metabólica De Una Cepa Nativa De <i>Clostridium</i> Para La Producción De 1,3-Propanodiol A Partir De Glicerol	143
D. RENDIMIENTOS RELATIVOS DE 1,3-PROPANODIOL ENCONTRADOS PARA ENZIMAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS POR <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A EN GLICEROL RESPECTO A GLUCOSA.....	143

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1 Diferentes productos de la degradación microbiana del glicerol.	6
Figura 1.2 Ruta metabólica de la fermentación del glicerol por parte de <i>Clostridium</i>	9
Figura 2.1 Mapa génico de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A.....	34
Figura 2.2 Distribución de los números EC asignados en la anotación funcional de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A	35
Figura 2.3 Jerarquía de los términos GO de segundo nivel asignados a las secuencias anotadas de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A.	36
Figura 2.4 Comparación entre las redes metabólicas preliminares de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A obtenidas con RAST y Blast2GO/KEGG.	36
Figura 2.5 Análisis de agrupamiento de acuerdo con el promedio de identidad de nucleótidos ANI para 33 especies dentro del género <i>Clostridium</i>	42
Figura 2.6 Distribución del perfil del pangenoma y core genoma para 33 cepas de <i>Clostridium</i> de acuerdo con el agrupamiento de la herramienta USEARCH.....	43
Figura 2.7 Análisis de agrupamiento para 32 especies de <i>Clostridium</i> basado en el método de Neighbor Joining (vecino más cercano).....	46
Figura 2.8 Distribución de COGs para genes core, accesorios y únicos determinados para 32 especies de <i>Clostridium</i>	47
Figura 2.9 Distribución de términos KEGG para genes core, accesorios y únicos determinados para 32 especies de <i>Clostridium</i>	47
Figura 3.1 Rutas asociadas a las enzimas del genoma accesorio de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A presentes en la red iCbu641.....	62
Figura 3.2 Distribución de las enzimas de las triples mutaciones simuladas de acuerdo con los subsistemas a los que pertenecen.....	64
Figura 3.3 Comparación de los rendimientos de 1,3-PD ($Y_{1,3-pd}$) (barras azules) y biomasa (barras verdes) a partir de glicerol respecto a la cepa sin modificar.....	66

Figura 3.4 Ubicación de las enzimas de las triples mutantes con mayores rendimientos dentro de fragmento del mapa metabólico de <i>Clostridium butyricum</i>	67
Figura 3.5 Distribución de los grados de la red no dirigida iCbu641.....	69
Figura 4.1 Cinéticas de formación de productos y crecimiento en cultivo por lotes para la cepa <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A	83
Figura 4.2 Porcentaje de secuencias reconocidas y contadas por medio de las herramientas de mapeo y pseudo-alineamiento contra el genoma de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A	86
Figura 4.3 Relación entre la media de los niveles de expresión de los genes (eje X) y la varianza génica de los recuentos de los experimentos de RNA seq de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A	87
Figura 4.4 Comparación del número de genes diferencialmente expresados en los experimentos de RNA-seq de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A por medio de dos herramientas.....	88
Figura 4.5 Representación circular del transcriptoma de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A en glucosa y glicerol.....	90
Figura 4.6 Categorías de ontología de genes con mayor número de genes diferencialmente expresados.....	91
Figura 4.7 Mapas de calor de términos GO representativos en la categoría Proceso biológico para los genes diferencialmente expresados en <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A bajo cultivos de glucosa y glicerol	93
Figura 4.8 Mapa de calor de término GO representativo en la categoría Función Molecular para los genes diferencialmente expresados en <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A bajo cultivos de glucosa y glicerol.	94
Figura 4.9 Mapa de calor de término GO representativo en la categoría Componente Celular para los genes diferencialmente expresados en <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A bajo cultivos de glucosa y glicerol	95
Figura 4.10 Mapa de calor de la expresión de los genes de las rutas oxidativa y reductiva de consumo de glicerol en <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A bajo cultivos de glucosa y glicerol.	96

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1 Estudios de transcriptoma basados en RNA-Seq para especies de <i>Clostridium</i> .	
Tabla 2.1 Características básicas de las anotaciones del genoma de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A.....	
Tabla 2.2 Subsistemas metabólicos de KEGG con mayor representación de secuencias dentro del genoma de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A.....	
Tabla 2.3 Secuencias únicas del genoma de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A identificadas, de acuerdo con la comparación con 16 genomas del mismo género. P: proceso biológico, F: función molecular, C: componente celular.....	
Tabla 3.1 Proteínas del genoma accesorio de C. IBUN13A con rendimientos relativos mayores a la cepa tipo al simular mutantes sencillas. El rendimiento relativo de producción de 1,3-PD bajo limitación de sustrato ($Y_{1,3-pd}$ relativo) se obtuvo de Serrano-Bermúdez et al., 2017.....	
Tabla 3.2 Enzimas asociadas a reacciones adicionadas por gap-fill en la red iCbu641 y las proteínas correspondientes encontradas en la anotación del genoma de <i>Clostridium</i> IBUN13A.....	
Tabla 4.1 Rendimientos molares de los principales productos de fermentación de <i>Clostridium</i> sp. IBUN13A bajo cultivo de glucosa o glicerol.....	
Tabla 4.2 Resultados de concentración de las muestras de ARN obtenidas en este estudio.....	
Tabla 4.3 Resultados del preprocesamiento de las secuencias obtenidas en este estudio.	

Introducción

Recientemente ha crecido considerablemente el interés por la disminución de las fuentes de combustibles fósiles, así como por sus efectos dañinos al medio ambiente, como el calentamiento global. Esto ha llevado a la búsqueda y desarrollo de fuentes energéticas alternativas, tales como los biocombustibles (Shankar & Shikha, 2017). La adopción de los biocombustibles en Colombia empezó desde la Ley 693/2001, que dicta las normas para el uso de alcoholes carburantes y la ley 939/2004 que estimula la producción y comercialización de biocombustibles de origen vegetal para motores diésel, entre otras. Al ser el quinto productor mundial de aceite de palma, Colombia ha dedicado gran parte de sus esfuerzos a la producción de biodiesel a partir de esta materia prima, que alcanzó en 2016 aproximadamente 448.000 toneladas (Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia, 2017) . En el proceso de obtención de este compuesto, por cada 10 toneladas del éster que se producen, se obtiene 1 tonelada de glicerol crudo en concentraciones entre 70 y 98%, ocasionando que incremente su oferta, y que, por ende, se busquen nuevas estrategias para su aprovechamiento (Vivek *et al.*, 2017). El grupo de Bioprocesos y Bioprospección en conjunto con Corpodib realizó un análisis de valoración tecnológica de productos para aprovechar este glicerol no purificado donde se destacó, dentro de las 5 mejores aplicaciones, su uso como sustrato de fermentación para la producción de 1,3-Propanodiol, también conocido como 1,3-PD o PDO. (Corpodib & Grupo Bioprocesos y Bioprospección, 2015 ; González-Pajuelo, Andrade, & Vasconcelos, 2004; Papanikolaou *et al.*, 2000; Zeng & Biebl, 2002). Desde hace más de una década el interés en este compuesto químico se ha incrementado considerablemente en la medida en que presenta aplicaciones tales como su uso como monómero en un proceso de polimerización para producir politrimetilentereftalato (PTT), lo cual ha aumentado su demanda ya que este puede reemplazar los glicoles clásicos para la producción de poliuretanos, poliésteres y poliéteres, además de ser materia prima para industrias como la cosmética y la farmacéutica (Saxena *et al.*, 2009). De esta manera, el incremento en la demanda de 1,3-PD ha favorecido los esfuerzos encaminados a su producción por vía biotecnológica. Este proceso se realiza a escala

industrial por medio de una cepa recombinante de *Escherichia coli*, usando glucosa derivada de maíz como fuente de carbono (Nakamura & Whited, 2003). También se ha investigado sobre el escalamiento de este proceso a planta piloto con productores del diol a partir de glicerina cruda, como *Klebsiella pneumoniae* (patógeno oportunista) y *Clostridium butyricum* (Cheng *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Szymanowska-Powałowska & Białas, 2014; T. Tan, Shang, & Zhang, 2010; Zhang *et al.*, 2018).

Actualmente, los investigadores han centrado su atención tanto en mejorar el proceso de fermentación como en modificar genéticamente cepas productoras o utilizar los genes involucrados para expresarlos en otros hospederos. En esta medida, con la tendencia actual de comprender globalmente la información que se puede obtener a partir de técnicas moleculares modernas y generar modelos predictivos de los organismos vivos a partir de la biología de sistemas, se considera fundamental entender las redes regulatorias y metabólicas, para poder implementar metodologías de manipulación exitosas en microorganismos como *Clostridium*, que nos permitan incrementar su potencial biotecnológico. Dentro de las herramientas más utilizadas para dicho propósito se encuentran la genómica y la transcriptómica, que permiten analizar el potencial metabólico de un microorganismo o los niveles de expresión de genes bajo una condición determinada, permitiendo identificar posibles blancos genéticos para e.g., terapia génica u obtención de cepas hiperproductoras con fines industriales. Actualmente, el uso extendido de técnicas de secuenciación de nueva generación para obtener las secuencias de los genomas y de los transcritos ha llevado a obtener resultados confiables, reproducibles y precisos en análisis tanto de procariontes como de eucariotes (Wang *et al.*, 2009; van Vliet, 2010; Wang *et al.*, 2012).

Por ende, con el fin de establecer un bioproceso exitoso de producción de 1,3-Propanodiol a partir de glicerol es necesario el entendimiento de la fisiología y del metabolismo del microorganismo bajo condiciones de producción del diol, con el fin de plantear estrategias que lleven a obtener altos rendimientos y productividades. Por tal razón, este proyecto propone analizar el genoma y transcriptoma de la cepa nativa *Clostridium* IBUN13A y así mismo hacer uso del modelo metabólico de nuestro microorganismo para poder plantear una estrategia de modificación genética racional para la obtención de una cepa hiperproductora de propanodiol, o que otorgue beneficios al momento de implementar el proceso a nivel industrial.

Se planteó como objetivo general de esta investigación establecer una estrategia de modificación metabólica a partir del análisis del transcriptoma de *Clostridium* IBUN158B para la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol, para lo cual será necesario (1) Identificar el potencial metabólico para la producción de 1,3-Propanodiol de una cepa nativa de *Clostridium* sp., (2) Predecir fenotipos metabólicos que incrementen la producción de 1,3-Propanodiol en *Clostridium* sp., y (3) Diseñar una estrategia de modificación genética para mejorar la producción de 1,3-Propanodiol en una cepa nativa de *Clostridium* sp. El flujo de trabajo para cumplir estos objetivos se encuentra en la figura A.1. A lo largo de este documento se presentará información sobre el trabajo realizado, dividido en capítulos que dan cuenta de los resultados obtenidos en el marco de cada objetivo específico, y donde se muestra el aporte al conocimiento básico de un microorganismo aislado de suelos colombianos con potencial industrial para producir solventes. En una primera aproximación, la secuenciación y análisis del genoma otorgó un panorama global del potencial metabólico de *Clostridium* sp, así como la base de la construcción de un modelo metabólico. Además, el análisis del transcriptoma en condiciones de producción de 1,3-PD respecto a condiciones de no producción, constituyó una fuente de información importante sobre la fisiología de esta bacteria y sobre posibles blancos de manipulación genética. Igualmente, se exploró el uso de la red metabólica obtenida por el grupo de investigación para implementar estrategias de manipulación *in silico*. El conjunto de resultados referenciados en este escrito nos permitió evaluar la viabilidad de modificar de forma racional al microorganismo.

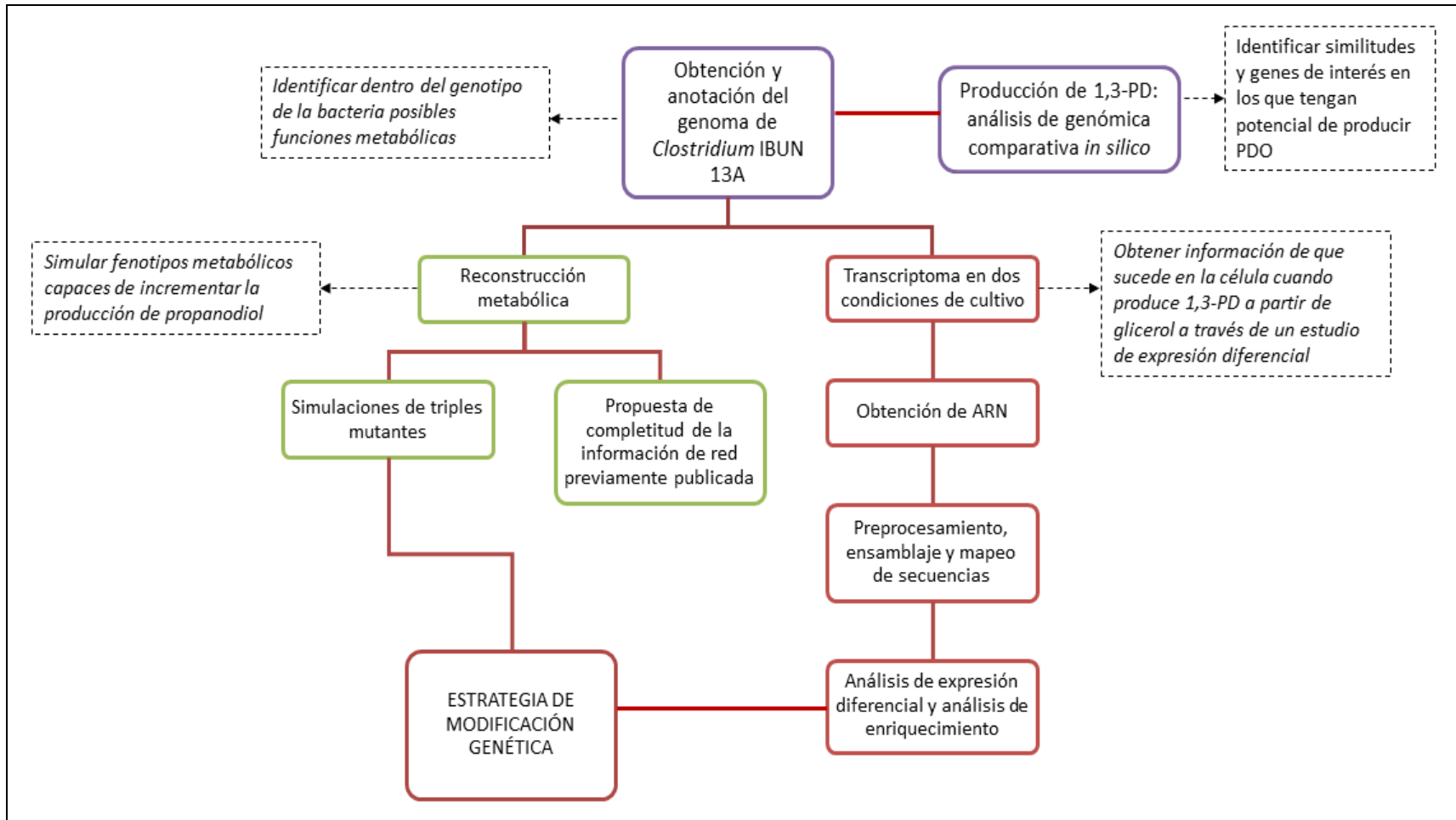


Figura A-1. Flujo de trabajo general para el trabajo de grado. En morado se señalan las actividades del primer objetivo; en verde las del segundo y en rojo el tercero. Las líneas punteadas indican el propósito de cada objetivo.

Capítulo 1. Estado del Arte

1.1. Metabolismo del glicerol para la obtención de productos de valor agregado vía biotecnológica

A través de la transformación biotecnológica, el glicerol crudo puede ser usado sin previa purificación, de modo que este tipo de proceso ofrece la oportunidad de sintetizar un amplio rango de productos, ejerciendo un menor impacto sobre el medio ambiente ya que se generan muy pocos gases de efecto invernadero (Yazdani & Gonzalez, 2007). Dentro de los productos que se pueden obtener por vía biológica a partir de glicerol se tienen (**Figura 1-1**): etanol, ácidos grasos, ácido succínico (intermediario químico industrial), ácido propiónico, butanol, 1,3-propanodiol (amplio uso en adhesivos, polímeros, solvente, etc.) entre otros productos (P. G. da Silva, Mack, & Contiero, 2009).

Para la producción de etanol por medio de glicerina, investigadores de la Universidad de Rice en Texas demostraron la capacidad de *Escherichia coli* de fermentar este sustrato, convirtiendo 84% en etanol. Esta fermentación debe ser suplementada con flujo constante de CO₂ y pH de 6 para poder evitar la inhibición del crecimiento celular (Dharmadi, Murarka, & Gonzalez, 2006). Otro compuesto de alto valor agregado que podría producirse a partir de glicerol es el ácido succínico, obtenido a partir de glicerina por intermedio del microorganismo *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, que es capaz de obtener una relación de ácido succínico y ácido acético 26:1, la cual es 6.5 veces mayor que lo que se obtiene con glucosa (Lee *et al.*, 2001). Por otra parte, es factible obtener ácido propiónico utilizando glicerina por medio de diferentes microorganismos, especialmente *Propionibacterium acidipropioni*, que muestra un rendimiento de 0.84 mol/ mol en fermentación por lotes (F Barbirato, Chedaille, & Bories, 1997). La fermentación de glicerol para obtener butanol se ha realizado con *Clostridium pasteurianum* y en mezcla con glucosa en cepas de *C. acetobutylicum* (da Silva *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008).

Por más de un siglo se ha conocido que el 1,3-Propanodiol (1,3-PD) es producto de la

fermentación bacteriana de glicerol en especies anaerobias y aerobias facultativas que incluyen a *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *Clostridium butyricum* y *C. pasteurianum* (Barbirato, et al., 1998; Papanikolaou et al., 2000; Zeng & Biebl, 2002). En resultados observados en fermentaciones por lotes para cepas de referencia sin modificaciones genéticas, se puede observar que *K. pneumoniae* presenta rendimientos entre 0,53 y 0,61 mol 1,3-propanodiol / mol glicerol (Da Silva, De Lima, & Contiero, 2015; Homann et al., 1990) mientras que *C. butyricum* muestra rendimientos en valores cercanos a 0,65 - 0,69 mol 1,3-propanodiol / mol glicerol crudo (Barbirato et al., 1998; Tan et al., 2018). También se ha descrito la posibilidad de usar otros biocatalizadores como *Shimwellia blattae* que mostró un rendimiento molar de 0,56 mol/mol en el mismo tipo de cultivo (Rodriguez et al., 2017; Rodriguez et al., 2016). Por otra parte, en fermentaciones de lote alimentado a partir de glicerol, *C. butyricum* ha producido alrededor de 65 g/l de 1,3 PD (Saint-Amans et al., 1994), *K. pneumoniae* muestra valores de hasta 70 g/l (Ji et al., 2009) y en el caso de *Escherichia coli*, cepa modificada genéticamente para producir 1,3-PD a partir de glucosa, se han obtenido títulos de hasta 135 g/l (Nakamura & Whited, 2003).

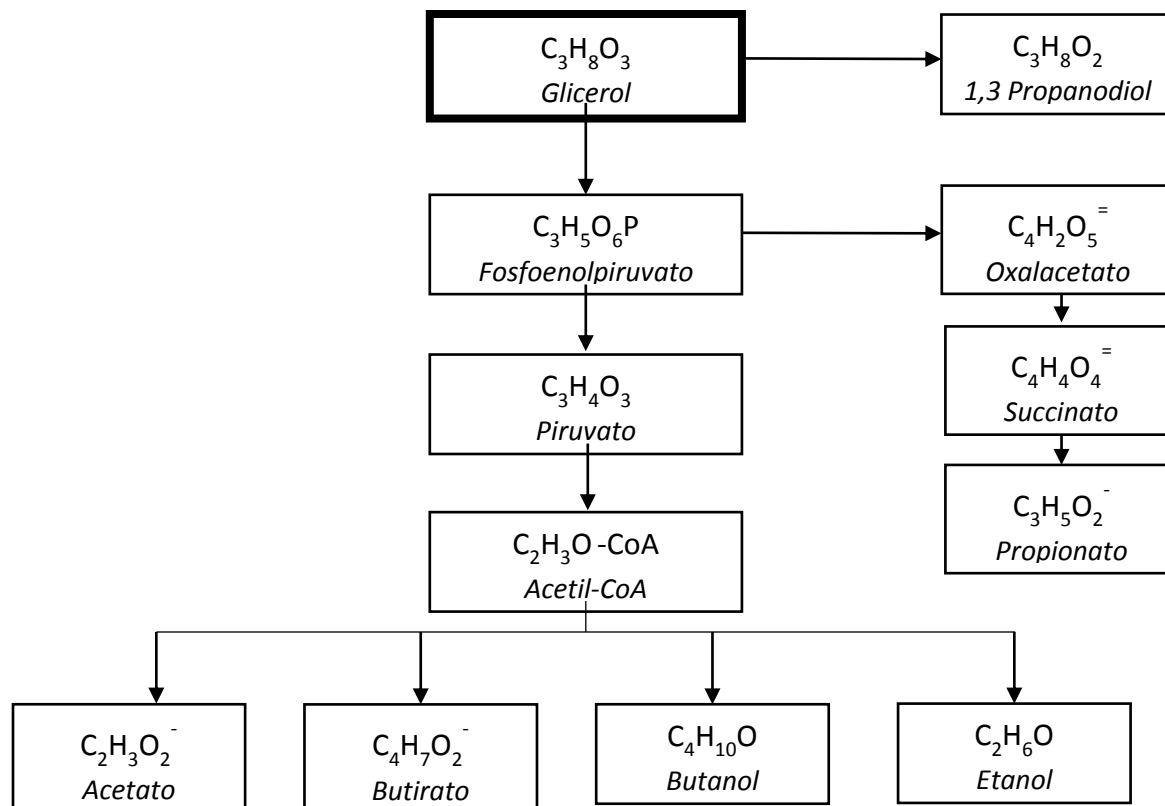


Figura 1-1 Diferentes productos de la degradación microbiana del glicerol.
Modificado de da Silva et al., 2009.

1.2. 1,3-Propanodiol y su importancia a nivel industrial

El 1,3-PD es un compuesto incoloro e inodoro, con densidad relativa 1.05 y peso molecular de 76 g/mol (Kurian, 2005). Se caracteriza además por tener baja toxicidad, ser no inflamable y miscible en agua, alcoholes y éteres (Kaur, Srivastava, & Chand, 2012). En los últimos años se ha incrementado el interés por el 1,3-PD, inclusive como un químico a granel, ya que sirve como monómero para producir plásticos con propiedades especiales como poliésteres, poliéteres, poliuretanos y compuestos cíclicos (Saxena *et al.*, 2009; Zeng & Biebl, 2002). Los polímeros basados en 1,3-PD exhiben muchas propiedades especiales tales como buena estabilidad a la luz, elasticidad mejorada y capacidad de ser degradados por enzimas y microorganismos (Kurian, 2005; Umare *et al.*, 2007).

En la actualidad existe un gran número de aplicaciones del 1,3-PD, por ejemplo como intermediario químico en la síntesis de compuestos para las industrias química, farmacéutica y de alimentos; como excipiente humectante, estabilizante, anticongelante o vehículo solvente en diferentes formulaciones; como materia prima para fibras textiles y especialmente para el desarrollo de un nuevo e importante copolímero (politrimetilen-tereftalato, PTT) utilizado para la fabricación de prendas de vestir, alfombras, cubiertas, entre otros (Kaur *et al.*, 2012; Saxena *et al.*, 2009; Zeng & Biebl, 2002).

Actualmente existen procesos químicos y biotecnológicos para producir este monómero, siendo DuPont la compañía que maneja la mayor parte del mercado del 1,3-PD al producirlo a partir de los 2 procesos (Kaur *et al.*, 2012). Para producir el diol por medio de vía química, se usa la hidrólisis de la acroleína o la hidroformilación e hidrogenación usando como sustrato óxido de etileno, las cuales son materias primas derivadas del petróleo (An-ping Zeng & Biebl, 2002). Por su parte, la obtención de este compuesto por medio de fermentación ha sido ampliamente investigada en los últimos años, y se da de forma natural a partir de glicerol, compuesto cuya oferta ha aumentado debido a la industria del biodiesel (M González-Pajuelo, Andrade, & Vasconcelos, 2004; Kaur *et al.*, 2012).

1.3. *Clostridium* sp. y metabolismo del glicerol

El glicerol que entra por difusión a la célula de los clostridios puede convertirse en dihidroxiacetona por oxidación o puede deshidratarse para producir 3-hidroxiacetaldehído, que a su vez se reduce para producir 1,3-PD (**Figura 1.2**) (Zeng, 1996). El proceso de acetogénesis genera una molécula de ATP por medio de la fosforilación a nivel de sustrato a partir del acetil-CoA. En esta vía, el piruvato es descarboxilado oxidativamente para obtener acetil-CoA, que se convierte en acetil-fosfato por la acción de una fosfotransacetilasa. Finalmente, la acetato quinasa interviene en la producción de acetato y ATP. Por su parte, en la fermentación de butirato, el acetil-CoA obtenido a partir de la descarboxilación del piruvato acoplado con la reducción de la ferredoxina, se condensa para producir acetoacetil-CoA, que es reducido a butiril-CoA. Por medio de una fosfotransacetilasa este se convierte en butiril-fosfato, y finalmente una quinasa produce butirato y ATP (Zeng, 1996). Para producir butanol, *C. pasteurianum* hace uso de la enzima butiraldehído/ butanol deshidrogenasa E (AdhE o Aad), que transforma el butiril-CoA en butiraldehído, el cual posteriormente se transforma en butanol por medio de la butanol deshidrogenasa (BdhB o BdhII) (Dabrock, Bahl, & Gottschalk, 1992).

Ya que el glicerol es una sustancia más reducida que la glucosa, este produce más NADH por la misma cantidad de carbono durante las reacciones catabólicas, lo que estimula la producción de 1,3-Propanodiol en condiciones anaeróbicas (Biebl *et al.*, 1999). Se ha estudiado la importancia de la ruta metabólica de producción de este diol en microorganismos como *Clostridium* VPI 3266, donde se demostró que cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono, inclusive cuando existe glucosa también en el medio, las enzimas glicerol deshidrogenasa (GDH) y dihidroxiacetona quinasa (DHAK), necesarias para obtener dihidroxiacetona fosfato, están activas y presentes. Se pudo observar igualmente que, en presencia de glicerol, hay una disminución en la concentración de la enzima hidrogenasa respecto al metabolismo de la glucosa, que es completamente acidogénico en condiciones de pH controlado. Este hecho resulta en el incremento en la concentración de ferredoxina reducida, que debe ser reoxidada por medio de la enzima NADH-Ferredoxina oxidoreductasa, formando en conjunto con el metabolismo del glicerol, NADH, que debe ser regenerado a NAD por medio de las rutas de 1,3-PD y butirato (Saint-Amans *et al.*, 2001)

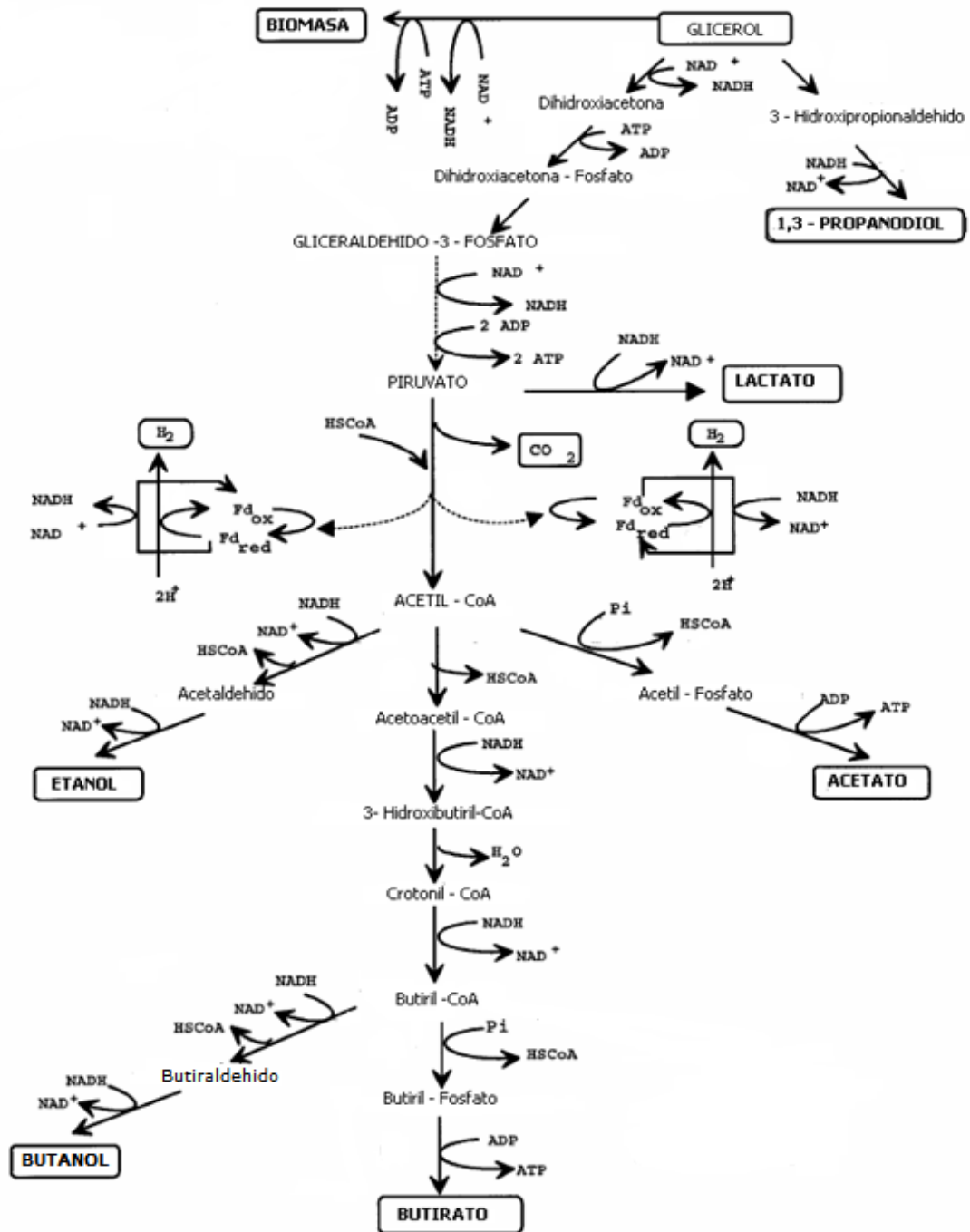


Figura 1-2. Ruta metabólica de la fermentación del glicerol por parte de *Clostridium*. Modificada a partir de Saint Amans *et al.*, 2001 y Dabrock *et al.* 1992.

1.4 Estrategias de modificación genética para la producción de 1,3-Propanodiol a partir de glicerol

La obtención de microorganismos genéticamente modificados capaces de fermentar glicerol u otros sustratos para producir 1,3-PD se ha abordado desde diferentes perspectivas, con el fin de dar solución a los principales cuellos de botella de este proceso biotecnológico (Celińska, 2010; Yang et al., 2018). El ejemplo más importante y exitoso en el cual se aplicó ingeniería metabólica para la producción de este solvente ha sido el desarrollo de una cepa de *E. coli* implementado por las empresas DuPont y Genencor International, quienes modificaron los procesos para convertir un material de bajo costo como la D-glucosa (hidrolizado de maíz) en 1,3-PD. Esto se logró gracias a una combinación de varios mecanismos entre ellos, la expresión de genes heterólogos, procesos de delección de genes, además del control en cuanto a la distribución de flujo, el balance redox y la energía, además de modificar el mecanismo de toma de sustrato para la síntesis de 1,3-PD. Con este mecanismo se logró una producción de 1,3-PD de 135 g/L y una productividad de 3.5 g/L/h (Nakamura & Whited, 2003). Otro caso se refiere a la modificación de una cepa de *E. coli* que consistió en insertar los genes de la vía del 1,3-PD (*dhaB1* y *dhaB2*) de *C. butyricum* junto con el gen *yghD* de *E. coli*, los cuales fueron puestos bajo el control del promotor sensible a la temperatura con el fin de construir un nuevo operón de expresión en esta bacteria. Posteriormente, esta cepa fue usada en un nuevo proceso fermentativo de 2 etapas y se obtuvo una productividad de 2.6 g/L/h (Tang et al., 2009).

Por su parte, *Clostridium butyricum*, reconocido como un microorganismo con amplio potencial para producir 1,3-PD, ha sido poco estudiado respecto a la aplicación de ingeniería metabólica (Celińska, 2010). En un estudio realizado en la Universidad de Ulm, se obtuvo una cepa de *Clostridium* sp. que incluía la inactivación del gen de la enzima lactato deshidrogenasa (*ldhA*) que mostró un valor de productividad 9,4% mayor a la cepa sin modificar, que corresponde a una bacteria perteneciente al Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, denominada *Clostridium* sp. IBUN158B (Montoya, 2012). Así mismo se obtuvo una cepa que sobre expresaba el operón de 1,3-PD (*dha*) de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A por medio de la inserción de una copia del mismo a través del plásmido ClosTron, la cual mostró productividades 5,3% mayores a la cepa tipo en fermentación por lotes (Montoya,

2012). Otro microorganismo del género para el que se realizó modificación genética es *C. beijerinckii* DSM 791, a la que se le insertaron los genes heterólogos de *E. coli* que codifican para las enzimas glicerol deshidrogenasa y dihidroxiacetona quinasa, las cuales participan en la ruta oxidativa de fermentación del glicerol y pueden aumentar la disponibilidad de NADH y la biomasa. Los resultados de este estudio mostraron un incremento en la productividad de 1,3-PD en 26,8% pero se mantuvo los rendimientos tanto de este producto como de otros como ácido acético y butírico respecto a la cepa tipo (Wischrál *et al.*, 2016).

Otro ejemplo implica el uso de *C. acetobutylicum*, microorganismo comúnmente empleado para la producción de solventes (acetona, butanol, etanol); sin embargo, esta cepa no puede crecer en glicerol debido a su incapacidad para regenerar suficiente NADH necesario para su crecimiento y metabolismo. La modificación genética de este microorganismo fue realizada por González-Pajuelo y colaboradores (2005) quienes realizaron la introducción de los genes de la vía del 1,3-PD de *C. butyricum* para crear la mutante *C. acetobutylicum* DG1 (pSPD5), microorganismo recombinante capaz de crecer en glicerol y producir 84 g/L de 1,3-PD con un rendimiento de 0.65 mol/mol de glicerol en cultivos en fed-batch, lo cual es un logro importante en la medida en que estos valores resultan ser superiores a los obtenidos con algunas cepas de *C. butyricum* (González-Pajuelo *et al.*, 2005). Recientemente se han desarrollado herramientas como el ClosTron, enfocado a estrategias knock out de genes en procedimientos de mutagénesis en especies de *Clostridium* sp. Con esta herramienta es posible obtener mutantes que se comporten de manera estable en el cultivo y de esta forma enfocar su uso al mejoramiento de la producción de 1,3-PD (Kubiak *et al.*, 2012).

Pese a lo mencionado anteriormente, existen muy pocos datos publicados acerca de resultados de investigaciones que involucren especies de *Clostridium* sp. para la degradación de glicerol y la obtención de productos de alto valor agregado. Por otra parte, la fermentación microbiana de producción de butanol a partir de glucosa ha sido ampliamente estudiada, y se constituye en un modelo de estudio para cepas solventogénicas. Dentro de los factores que han constituido problemas para la aplicación industrial de la fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) se cuenta el relativo alto costo de las materias primas de la fermentación y la competencia con fuentes

nutricionales, los bajos rendimientos de solventes y la formación de numerosos subproductos, la degeneración del cultivo, la toxicidad del butanol y el bajo conocimiento de los mecanismos de regulación de la ruta metabólica (P Dürre, 2011). Diversas soluciones enfocadas en la resistencia a concentraciones altas del solvente, al uso de sustratos novedosos y a la expresión de genes en bacterias heterólogas, entre otras, han sido desarrolladas.

1.5 Transcriptoma y su aplicación en el conocimiento del metabolismo de *Clostridium*

Con el fin de entender la complejidad de la fisiología y la regulación de diferentes rutas metabólicas desde la perspectiva de la biología de sistemas, se han aplicado tecnologías novedosas asociadas a las ómicas. El transcriptoma, entendido como el conjunto total de transcritos en una célula bajo un estado fisiológico o de desarrollo específico, es estudiado por medio de la transcriptómica. Esta disciplina permite, entre otros, obtener información sobre la estructura transcripcional de los genes y cuantificar los diferentes niveles de expresión de cada transcrito en diferentes condiciones. Para poder conseguir estos objetivos, existen tecnologías fundamentadas en hibridación y enfoques basados en secuenciación (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009).

Una de estas tecnologías son los microarreglos, que se basan en la hibridación de sondas cortas de oligonucleótidos inmovilizadas en una matriz sólida con los transcritos analizados marcados con fluorógenos. En este caso, la intensidad de la luz emitida puede usarse como una medida del nivel de expresión de los genes (Malone & Oliver, 2011). Los microarreglos se pueden construir a partir de secuencias de genomas anotados y se han consolidado como una tecnología ampliamente distribuida y relativamente económica, cuyo desarrollo ha permitido entender los posibles sesgos en los datos obtenidos por medio de esta técnica, y por lo tanto diseñar experimentos que permitan manejarlos o minimizarlos. (Malone & Oliver, 2011; van Vliet, 2010). Sin embargo, se considera que tiene desventajas como, por ejemplo, la necesidad de tener información genómica previa del organismo en estudio, un rango dinámico limitado para la detección de los niveles de transcritos debido al ruido de fondo, la eficiencia puede ser pobre debido a hibridaciones no específicas y la necesidad de métodos complejos de normalización (Jaksik *et al.*, 2015; van Vliet, 2010). Otra dificultad importante es la falta

de reproducibilidad entre laboratorios y entre plataformas (Shendure, 2008).

Por otra parte, en un inicio los procedimientos basados en la secuencia hacían uso de la técnica de Sanger, que es considerada costosa, de bajo rendimiento y no tiene la capacidad de arrojar datos cuantitativos (Z. Wang *et al.*, 2009). Otro método, conocido como RNA-Seq, que se fundamenta en el uso de las nuevas tecnologías de secuenciación (de alto rendimiento), puede usarse sin limitación alguna para el estudio de bacterias que presentan marcadas diferencias aún entre cepas de un mismo género bacteriano (Croucher & Thomson, 2010; Pinto *et al.*, 2011). Del mismo modo, estas herramientas también facilitan el descubrimiento de nuevos rasgos genéticos; y en cuanto a los resultados, se ha establecido que permiten el mapeo preciso de las secuencias al genoma, comparado por ejemplo, con los resultados obtenidos utilizando metodologías como la hibridación de oligonucleótidos (Pinto *et al.*, 2011). Adicionalmente mediante RNA-seq es posible determinar los niveles de expresión de genes, para lo cual esta tecnología se basa en la cantidad de lecturas de secuenciación derivadas de un transcrito particular con respecto al número total de lecturas generadas en el experimento/condición, lo que finalmente permite discriminar entre altos y bajos niveles de expresión. (Croucher & Thomson, 2010; Martin & Wang, 2011; Pinto *et al.*, 2011; Z. Wang *et al.*, 2009). Todos estos datos son de gran relevancia cuando se trata de estudiar los transcriptomas bacterianos evaluando diferentes condiciones.

1.5.1 Avances en el análisis del metabolismo de *Clostridium* por medio de transcriptómica

Para el caso de *Clostridium*, el interés se ha enfocado en el estudio de la ruta de producción de solventes a partir de glucosa y su interacción con redes de expresión de genes como la de esporulación (Dürre, 2009). Una de las herramientas que se ha utilizado con mayor frecuencia para este tipo de investigaciones es un microarreglo diseñado y optimizado en 2005 (Alsaker, Paredes, & Papoutsakis, 2005), valiéndose de la publicación del genoma del microorganismo modelo *C. acetobutylicum* en 2001 (Nölling *et al.*, 2001). La comparación de las fases de crecimiento exponencial tardía y estacionaria en una cepa tipo de *C. acetobutylicum* y en una mutante que no tiene la capacidad de formar endosporas, reveló la expresión diferencial de genes contenidos

dentro del plásmido pSOL1, dentro de los que se cuentan aquellos que codifican para la solventogénesis, en el periodo de transición entre las 2 fases, así como el incremento en la expresión de genes codificantes para proteínas propias del inicio de la esporulación (Alsaker & Papoutsakis, 2005). Por otra parte, Jones y colaboradores evaluaron en 2008 un total de 25 muestras a lo largo del crecimiento de *C. acetobutylicum* para evaluar el proceso de esporulación, y observaron un patrón de expresión de los factores sigma de transcripción propios del proceso similar al observado para *Bacillus subtilis* (Jones et al., 2008). Otro ejemplo es el análisis realizado para comparar la cepa hiperproductora de butanol EA2018 respecto a la cepa ATCC824, que mostró la expresión diferencial de genes relacionados con la solventogénesis como e.g., *spo0A* que codifica para el regulador maestro de la esporulación y de la formación de solventes (Hu et al., 2011).

Wang y colaboradores publicaron una investigación basada en la metodología RNA-seq para entender la dinámica transcripcional de la fermentación de glucosa de *Clostridium beijerinckii* NCMIB 8052 en un sistema por lotes sin control de pH. Dentro de los hallazgos de los autores se encuentra la regulación negativa de genes de acidogénesis al inicio de la solventogénesis y la expresión coordinada de los genes pertenecientes al operón sol. Adicionalmente se reportó un patrón de expresión dependiente del tiempo de los genes de esporulación similar a la encontrada en organismos modelo como *C. acetobutylicum* y *B. subtilis*. (Wang et al., 2011, 2012). Respecto a esta misma especie, se realizó igualmente un análisis de RNA-Seq en conjunto con la secuenciación del genoma de la cepa DSM6423, en diferentes tiempos durante la fermentación de glucosa para producir isopropanol. La cepa DSM6423 es reconocida por producir este solvente, concluyendo los autores que los patrones de expresión son similares a los resultados de la cepa NCMIB 8052, y que los genes propios de la producción de butanol, acetona e isopropanol se encuentran sobre-regulados inclusive en estadios tempranos de la curva de crecimiento, mostrando que su regulación es diferente a la que presenta la cepa tipo *C. acetobutylicum* ATCC824 (de Gérando et al., 2018).

En el caso de *C. butyricum*, se investigó sobre la producción de hidrógeno molecular por medio de RNA-Seq en fermentación por lotes sin control de pH, debido a que bajo esta condición se producen mayores cantidades de H₂. Se pudo observar al comparar las fases de crecimiento exponencial (pH 7,3) y estacionaria (pH 6,3), que aquellos

implicados en la ruta glucolítica se expresaron de forma constante durante los dos estados, sin embargo, los genes correspondientes a las Hidrogenasas Fe-Fe, implicados en la producción de H₂, fueron sub-expresados a lo largo de la fermentación, lo que contrasta con la alta producción de la molécula. A este respecto, se concluyó que los genes de la nitrogenasa se expresaban mayoritariamente en la fase estacionaria, concluyendo que este proceso fisiológico está mediado por este tipo de enzimas cuando el pH no está regulado. Igualmente las enzimas que median la obtención de los productos clásicos de la fermentación como el ácido acético y butírico, se expresan diferencialmente a un pH de 6,3 (Calusinska *et al.*, 2015). Otros estudios de RNA-Seq con clostridios se encuentran relacionados en la Tabla 1-1

Tabla 1-1. Estudios de transcriptoma basados en RNA-Seq para especies de *Clostridium*.

ESPECIE DE <i>Clostridium</i>	SUSTRATO	OBJETIVO	REFERENCIA
<i>difficile</i>	Sacarosa	Evaluación de cambios en el sustrato (0,5% sacarosa) y en la presión osmótica (1,5% NaCl) entre diferentes cepas patógenas	(Scaria <i>et al.</i> , 2013)
<i>ljungdahlii</i> DSM13528	Fructosa	Evaluación de las diferencias en el uso de fuente orgánica e inorgánica de carbono	(Tan <i>et al.</i> , 2013)
<i>stercorarium</i> DSM8532	Celobiosa, xilosa	Complementar la información genómica, especialmente a lo referente al metabolismo central y uso de xilosa	(Schellenberg <i>et al.</i> , 2014)
<i>termitidis</i> CT1112	Celobiosa, xilosa, celulosa, xilano	Identificación de genes involucrados en el metabolismo de las fuentes de carbono complejas.	(Munir <i>et al.</i> , 2016)

Estos estudios, que reportan análisis del perfil transcriptómico de *Clostridium* empleando secuenciación de alto rendimiento relacionado con las actividades fisiológicas del microorganismo a través de la fermentación, permite la implementación de estrategias de manipulación genética basadas en la biología de sistemas.

1.6 Reconstrucción metabólica: herramienta para análisis *in silico* de la información ómica de clostridios

La reconstrucción metabólica se ocupa de la relación entre la fisiología y la información genética de un organismo bajo condiciones específicas definidas, con el objetivo básico de dar contexto a los datos ómicos que se generan, guiar estrategias de ingeniería metabólica e identificar posibles nuevas redes y circuitos, entre otros (Chen *et al.*, 2012). Con el desarrollo de tecnología que permite obtener una gran cantidad de información genética y metabólica de los organismos, sumado a la amplia capacidad de análisis por medio de herramientas computacionales, se ha hecho posible obtener modelos metabólicos a escala de genoma *in silico* que relacionan el fenotipo y el genotipo de los organismos. Estos modelos se han constituido como una forma confiable de evaluar posibles manipulaciones genéticas acelerando los procesos de diseño al minimizar la experimentación (Palsson, 2009). Sin embargo, todavía existen algunas limitaciones cuando se desea obtener la reconstrucción metabólica de un organismo, siendo la principal el consumo de tiempo y las posibles imprecisiones de la depuración manual de las redes metabólicas construidas, pero de cualquier forma se considera como un paso crítico de especial cuidado para la obtención de los resultados deseados (Thiele & Palsson, 2010).

La conversión de la información genómica en una red metabólica depurada y compleja y posteriormente en una matriz matemática, facilita la generación de estudios biológicos computacionales, el análisis de características fenotípicas y las estrategias de ingeniería metabólica (Thiele & Palsson, 2010). En el caso de los clostridios, desde 2008 se publicaron simultáneamente dos reconstrucciones a escala genómica de la cepa tipo *C. acetobutylicum* ATCC824 (Lee *et al.*, 2008; Senger & Papoutsakis, 2008a, 2008b). A partir de allí se han publicado al menos 4 estudios más para este microorganismo (Dash *et al.*, 2014; McAnulty *et al.*, 2012; Salimi, Zhuang, & Mahadevan, 2010; Yoo *et al.*, 2015). Por otra parte, también se han publicado modelos de este tipo para otras 7 especies: *C. autoethanogenum*, *C. beijerinckii*, *C. ljungdahlii*, *C. thermocellum*, *C. cellulolyticum*, *C. kluyveri*, y la publicada por nuestro grupo de investigación de *C. butyricum* (Chen *et al.*, 2018; Milne *et al.*, 2011; Nagarajan *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 2010; Salimi *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2018; Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017). Estos análisis han permitido a los

investigadores tener una mirada comprensiva del metabolismo de las bacterias mencionadas, además de proporcionar información importante para proponer modificaciones racionales con miras a obtener productos de interés a partir de un amplio rango de fuentes de carbono.

1.7 Avances en el estudio de cepas de *Clostridium* por parte del Grupo de Bioprocesos y Bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia

La línea de solventes inició sus actividades estandarizando las condiciones de aislamiento y cultivo de microorganismos anaerobios con la cepa de referencia *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Luego hacia mediados de la década de los ochenta se aislaron 178 cepas de *Clostridium* sp. a partir de 155 muestras provenientes de diferentes cultivos agrícolas, de las cuales 13 cepas presentaron una mayor producción de solventes como acetona, butanol, etanol y 1,3-propanodiol con respecto a las cepas de referencia (*C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum* DSM 792, *C. beijerinckii* NCIMB 8052 y *C. butyricum* DSM 2478). Posteriormente, se evaluó la capacidad de estas cepas para utilizar diferentes tipos de polisacáridos, con resultados positivos para varios de los sustratos evaluados (Montoya *et al.*, 2001; Montoya *et al.*, 2000). También se realizaron estudios relacionados con la taxonomía de las cepas nativas utilizando ensayos moleculares tales como la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S rARN, caracterización por perfiles plasmídicos, PFGE (Electroforesis en Gel por Campo Pulsado), hibridación ADN-ADN, perfiles de macrorestricción y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Arévalo *et al.*, 2002; Jaimes *et al.*, 2006; Montoya *et al.*, 1999; Quilaguy *et al.*, 2006). Posteriormente se diseñó un análisis multivariado de las técnicas de caracterización genotípicas y fenotípicas y se demostró que varias de estas cepas estaban en un nodo taxonómico diferente al de las cepas de referencia *C. butyricum* DSM 2478 y DSM 523 y por consiguiente se propusieron como posible nueva especie dentro del género *Clostridium*. Así mismo el grupo se enfocó en evaluar la capacidad de estas cepas para producir 1,3-PD a partir de glicerol sin necesidad de adicionar coenzima B12, aunque para todas se encontró producción de 1,3-PD, dos de éstas (IBUN158B y 13A) presentaron altos rendimientos en comparación con la cepa de referencia (Cárdenas *et al.*, 2006). De esta manera, con el fin de optimizar los procesos de fermentación se evaluaron diferentes condiciones en el medio de cultivo

y además se utilizó glicerina coproducto de la industria de producción de biodiesel (Perez, 2009).

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios de caracterización molecular de las cepas promisorias, con el fin de obtener la secuencia de los genes involucrados en la producción de 1,3-PD. Actualmente, se tienen avances acerca de la organización del operón *dha* encargado de la regulación genética de la producción del solvente en la cepa nativa IBUN13A y se cuenta con la secuencia de una región del genoma de la cepa IBUN158B de 4556 pb que contiene tres genes potenciales identificados como *dhaB1*, *dhaB2* y *dhaT* que codifican para las enzimas glicerol deshidratasa, activadora de la glicerol deshidratasa y 1,3-PD deshidrogenasa, respectivamente (Montoya, 2009). Del mismo modo se conoce la secuencia de los genes que codifican para la regulación del operón *dha*, los cuales corresponden a un sistema de dos componentes (Barragan, Gutierrez-Escobar, & Montoya, 2015). Los resultados obtenidos hasta el momento por el grupo de investigación, los cuales son producto de estudios enfocados al desarrollo de la tecnología para la producción por vía biotecnológica de 1,3-propanodiol, indican que este tiene una ventaja competitiva respecto a productos comparables a nivel mundial. Lo anterior debido a que las cepas nativas productoras de este solvente presentan una eficiencia de conversión superior en un 10%, con respecto a cepas patrón reconocidas a nivel mundial como buenas productoras del diol a partir de glicerina cruda (Aragon, 2007); así mismo estas cepas tienen el potencial para ser alteradas metabólicamente y obtener de esta manera microorganismos nativos hiperproductores de 1,3-PD.

Igualmente se llevó a cabo un estudio proteómico en el cual se evaluó la expresión diferencial de proteínas bajo condiciones de producción de 1,3- PD mediante electroforesis bidimensional, selección de *spots* y espectrometría de masas. En este estudio, se estandarizaron tanto las condiciones para la extracción de la fracción de proteínas intracelulares, como para la electroforesis bidimensional. De las proteínas diferencialmente expresadas treinta y dos fueron escogidas para ser identificadas por espectrometría de masas en tándem (MALDI TOF/TOF), utilizando el método de mapeo peptídico. Se registró la presencia de cuatro enzimas implicadas en la ruta metabólica del 1,3- propanodiol, una de la ruta reductiva (1,3-propanodiol deshidrogenasa) y tres de la ruta oxidativa (3-hidroxi butiril CoA deshidrogenasa, butanol deshidrogenasa dependiente de NADPH y fosfatobutiril transferasa). También se identificaron las enzimas

fosfoglicerato quinasa, glucosa 6-fosfato isomerasa, desoxirribosa fosfato aldolasa, transcetolasa, cisteína sintetasa, O-acetilhomoserina sulfhidrilasa, glicil tRNA ligasa, glutamina sintetasa, aspartato β - semialdehído deshidrogenasa, inosin 5-monofosfato deshidrogenasa, aconitato hidratasa y la proteína PRSA, no reportadas para *Clostridium* sp., lo cual es un aporte novedoso al conocimiento de la cepa nativa con el fin de optimizar la producción de 1,3-PD (Comba *et al.*, 2013). Por otra parte, como parte de este trabajo se secuenciaron y anotaron 4 genomas de las cepas objeto de estudio del grupo de investigación, y con base en la información derivada se generó el modelo metabólico a escala genómica iCbu641 (Pérez-Mancilla *et al.*, 2017; Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017).

1.8 Referencias

- Alsaker, K., Paredes, C., & Papoutsakis, E. (2005). Design, optimization and validation of genomic DNA microarrays for examining the *Clostridium acetobutylicum* transcriptome. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10, 432–443.
- Alsaker, K. V., & Papoutsakis, E. T. (2005). Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 7103–7118.
- Aragon, O. (2007). *Estudio de la viabilidad técnica de la producción de 1,3 – propandiol (1,3-PD) a partir de glicerol con nuevas cepas colombianas de Clostridium sp. a nivel laboratorio*. National University of Colombia.
- Arévalo, C., Arrieta, A., Aguilera, G., Aristizabal, F., & Montoya, D. (2002). Caracterización de cepas nativas colombianas de clostridios solventogénicos por perfiles plásmidos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 31(2), 51–60.
- Barbirato, F., Chedaille, D., & Bories, A. (1997). Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 441–446.
- Barbirato, F., Himmi, E. H., Conte, T., & Bories, A. (1998). 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops and Products*, 7(2–3), 281–289.
- Barragan, C. E., Gutierrez-Escobar, A. J., & Montoya Castaño, D. (2015). Computational analysis of 1,3-propanediol operon transcriptional regulators: Insights into *Clostridium* sp. Glycerol metabolism regulation. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 129–140.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. P., & Deckwer, W. D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(3), 289–97.

- Calusinska, M., Hamilton, C., Monsieurs, P., Mathy, G., Leys, N., Franck, F., ... Wilmotte, A. (2015). Genome-wide transcriptional analysis suggests hydrogenase- and nitrogenase-mediated hydrogen production in *Clostridium butyricum* CWBI 1009. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1–16.
- Cárdenas, D. P., Pulido, C., Aragón, Ó. L., Aristizabal, F. A., Suarez, Z., & Montoya Castaño, D. (2006). Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp . mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas*, 35(1), 120–137.
- Celińska, E. (2010). Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. *Biotechnology Advances*, 28(4), 519–530.
- Chen, J., Daniell, J., Griffin, D., Li, X., & Henson, M. A. (2018). Experimental testing of a spatiotemporal metabolic model for carbon monoxide fermentation with *Clostridium autoethanogenum*. *Biochemical Engineering Journal*, 129, 64–73.
- Chen, N., Jimenez, I., Kyriakopoulos, S., Polizzi, K. M., & Kontoravdi, C. (2012). Metabolic network reconstruction : advances in in silico interpretation of analytical information. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 77–82.
- Comba González, N., Vallejo, A. F., Sánchez-Gómez, M., & Montoya, D. (2013). Protein identification in two phases of 1,3-propanediol production by proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, 89, 255–264.
- Croucher, N. J., & Thomson, N. R. (2010). Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 619–624.
- da Silva, G. P., De Lima, C. J. B., & Contiero, J. (2015). Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. *Catalysis Today*, 257(P2), 259–266.
- da Silva, P. G., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol : A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30–39.
- Dabrock, B., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1992). Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1233–1239.
- Dash, S., Mueller, T. J., Venkataramanan, K. P., Papoutsakis, E. T., & Maranas, C. D. (2014). Capturing the response of *Clostridium acetobutylicum* to chemical stressors using a regulated genome-scale metabolic model. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–16.
- de Gérando, H. M., Wasels, F., Bisson, A., Clement, B., Bidard, F., Jourdier, E., ... Ferreira, N. L. (2018). Genome and transcriptome of the natural isopropanol producer *Clostridium beijerinckii*. *BMC Genomics*, 19, 242–254.
- Dharmadi, Y., Murarka, A., & Gonzalez, R. (2006). Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli* : A New Platform for Metabolic Engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(5), 821–829.

- Dürre, P. (2009). Metabolic Networks in *Clostridium acetobutylicum*: Interaction of Sporulation, Solventogenesis and Toxin Formation. In H. Brüggemann & G. Gottschalk (Eds.), *Clostridia: Molecular Biology in the Post-Genomic Era* (pp. 215–227). Hethersett: Horizon Scientific Press.
- Dürre, P. (2011). Fermentative production of butanol—the academic perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 331–6.
- González-Pajuelo, M., Andrade, J. C., & Vasconcelos, I. (2004). Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31(9), 442–6.
- González-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Andrade, J. C., Vasconcelos, I., & Soucaille, P. (2005). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering*, 7(5–6), 329–36.
- Homann, T., Tag, C., Biebl, H., Deckwer, W., & Schink, B. (1990). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied Microbiology Biotechnology*, 33, 121–126.
- Hu, S., Zheng, H., Gu, Y., Zhao, J., Zhang, W., Yang, Y., Jiang, W. (2011). Comparative genomic and transcriptomic analysis revealed genetic characteristics related to solvent formation and xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* EA 2018. *BMC Genomics*, 12, 93.
- Jaimes, C. P., Fabio, A. A. G., Bernal M., M., Suárez, Z. R., & Montoya, D. (2006). AFLP fingerprinting of Colombian *Clostridium* spp strains, multivariate data analysis and its taxonomical implications. *Journal of Microbiological Methods*, 67(1), 64–69.
- Jaksik, R., Iwanaszko, M., Rzeszowska-Wolny, J., & Kimmel, M. (2015). Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biology Direct*, 10(46), 1–14.
- Ji, X. J., Huang, H., Zhu, J. G., Hu, N., & Li, S. (2009). Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of *Klebsiella pneumoniae*: The role of pH fluctuation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159(3), 605–613.
- Jones, S. W., Paredes, C. J., Tracy, B., Cheng, N., Sillers, R., Senger, R. S., & Papoutsakis, E. T. (2008). The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biology*, 9(7), R114.
- Kaur, G., Srivastava, a. K., & Chand, S. (2012). Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 106–118.
- Kurian, J. V. (2005). A New Polymer Platform for the Future — Sorona® from Corn Derived 1,3-Propanediol. *Journal of Polymers and the Environment*, 13(2), 159–167.
- Lee, J., Yun, H., Feist, A., Palsson, B., & Lee, S. (2008). Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 849–862.
- Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (2001). Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum*

- succiniciproducens using glycerol as a carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 41–8.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209–28.
- Malone, J. H., & Oliver, B. (2011). Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology*, 9, 34.
- Martin, J. A., & Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), 671–682.
- McAnulty, M. J., Yen, J. Y., Freedman, B. G., & Senger, R. S. (2012). Genome-scale modeling using flux ratio constraints to enable metabolic engineering of clostridial metabolism in silico. *BMC Systems Biology*, 6, 42.
- Milne, C. B., Eddy, J. a, Raju, R., Ardekani, S., Kim, P.-J., Senger, R. S., ... Price, N. D. (2011). Metabolic network reconstruction and genome-scale model of butanol-producing strain *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *BMC Systems Biology*, 5, 130.
- Montoya, D., Arévalo, C., Gonzales, S., Aristizabal, F., & Schwarz, W. H. (2001). New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27(5), 329–35.
- Montoya, D., Perdomo, L., Arévalo, C., Aristizábal, F., & Schwarz, W. (1999). Caracterización de cepas nativas de *Clostridium* spp por secuenciación parcial del gen ribosomal 16s rARN. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 2, 35–39.
- Montoya, D., Spitia, S., Silva, E., & Schwarz, W. H. (2000). Isolation of mesophilic solvent-producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 79(2), 117–26.
- Montoya, J. D. (2009). *Determinación de la secuencia de genes putativamente involucrados en la producción de 1,3-propanodiol en la cepa nativa colombiana Clostridium sp. IBUN 158B*. Universidad Nacional de Colombia.
- Montoya, J. D. (2012). *Metabolic engineering of the Colombian strain Clostridium sp . IBUN 158B in order to improve the bioconversion of glycerol into 1 , 3-propanediol*. Ulm University.
- Munir, R. I., Spicer, V., Krokhin, O. V., Shamshurin, D., Zhang, X., Taillefer, M., ... Levin, D. B. (2016). Transcriptomic and proteomic analyses of core metabolism in *Clostridium termitidis* CT1112 during growth on α -cellulose, xylan, cellobiose and xylose. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–21.
- Nagarajan, H., Sahin, M., Nogales, J., Latif, H., Lovley, D. R., Ebrahim, A., & Zengler, K. (2013). Characterizing acetogenic metabolism using a genome-scale metabolic reconstruction of *Clostridium ljungdahlii*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 1–13.
- Nakamura, C. E., & Whited, G. M. (2003). Metabolic engineering for the microbial

- production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), 454–459.
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M., Makarova, K., Gibson, R., Qiandong, Z., ... Smith, D. (2001). Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 183(16), 4823–4838.
- Palsson, B. (2009). Metabolic systems biology. *FEBS Letters*, 583(24), 3900–3904.
- Papanikolaou, S., Ruiz-Sanchez, P., Pariset, B., Blanchard, F., & Fick, M. (2000). High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*, 77(2–3), 191–208.
- Pérez-Mancilla, X., Rosas, J. P., & Montoya Castaño, Dolly Riaño-Pachón, D. (2017). Genomic Analyses of *Clostridium* strains with Biotechnological Potential in Production of Solvents. In *Simposio de Investigación de Posgrados en Biotecnología UN - Libro de resúmenes* (p. 49). Bogotá: Editorial UN.
- Perez Mancilla, X. (2009). *Estandarización de la Concentración de Glicerol Industrial y de la Fuente de Nitrógeno en el Medio de Cultivo para la Producción de 1,3-Propanodiol utilizando una Cepa Nativa de Clostridium sp.* Universidad Nacional de Colombia.
- Pinto, A. C., Melo-Barbosa, H. P., Miyoshi, A., Silva, A., & Azevedo, V. (2011). Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1707–1718.
- Quilaguy Ayure, D. M., Suárez Moreno, Z. R., Aristizábal Gutierrez, F. A., Bernal Morales, J. M., & Montoya Castaño, D. (2006). Genome analysis of thirteen Colombian clostridial strains by pulsed field gel electrophoresis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(5).
- Roberts, S. B., Gowen, C. M., Brooks, J. P., & Fong, S. S. (2010). Genome-scale metabolic analysis of *Clostridium thermocellum* for bioethanol production. *BMC Systems Biology*, 4, 31.
- Rodriguez, A., Wojtusik, M., Masca, F., Santos, V. E., & Garcia-Ochoa, F. (2017). Kinetic modeling of 1,3-propanediol production from raw glycerol by *Shimwellia blattae*: Influence of the initial substrate concentration. *Biochemical Engineering Journal*, 117, 57–65.
- Rodriguez, A., Wojtusik, M., Ripoll, V., Santos, V. E., & Garcia-Ochoa, F. (2016). 1,3-Propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: Operational conditions and kinetics in batch cultivations. *Bioresource Technology*, 200, 830–837.
- Saint-amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K., & Soucaille, P. (2001). Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures, 183(5), 1748–1754.
- Saint-Amans, S., Perlot, P., Goma, G., & Soucaille, P. (1994). High Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by *Clostridium butyricum* VPI3266 in a Simply COntrolled Fed-Batch System. *Biotechnology Letters*, 16(8), 831–836.

- Salimi, F., Zhuang, K., & Mahadevan, R. (2010). Genome-scale metabolic modeling of a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. *Biotechnology Journal*, *5*(7), 726–738.
- Saxena, R. K., Anand, P., Saran, S., & Isar, J. (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, *27*(6), 895–913.
- Scaria, J., Mao, C., Chen, J. W., McDonough, S. P., Sobral, B., & Chang, Y. F. (2013). Differential stress transcriptome landscape of historic and recently emerged hypervirulent strains of *Clostridium difficile* strains determined using RNA-seq. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–12.
- Schellenberg, J. J., Verbeke, T. J., McQueen, P., Krokhin, O. V., Zhang, X., Alvare, G., ... Sparling, R. (2014). Enhanced whole genome sequence and annotation of *Clostridium stercorarium* DSM8532T using RNA-seq transcriptomics and high-throughput proteomics. *BMC Genomics*, *15*(1), 1–16.
- Senger, R. S., & Papoutsakis, E. T. (2008a). Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, *101*(5), 1036–52.
- Senger, R. S., & Papoutsakis, E. T. (2008b). Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part II. Development of specific proton flux states and numerically determined sub-systems. *Biotechnology and Bioengineering*, *101*(5), 1053–71.
- Serrano-Bermúdez, L. M., González Barrios, A. F., Maranas, C. D., & Montoya, D. (2017). *Clostridium butyricum* maximizes growth while minimizing enzyme usage and ATP production: Metabolic flux distribution of a strain cultured in glycerol. *BMC Systems Biology*, *11*(1), 1–13.
- Shendure, J. (2008). the beginning of the end for microarrays ? *Nature Methods*, *5*(7), 585–587.
- Tan, J. P., Tee, Z. K., Roslam Wan Isahak, W. N., Kim, B. H., Asis, A. J., & Jahim, J. M. (2018). Improved Fermentability of Pretreated Glycerol Enhanced Bioconversion of 1,3-Propanediol. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *57*(37), 12565–12573.
- Tan, Y., Liu, J., Chen, X., Zheng, H., & Li, F. (2013). RNA-seq-based comparative transcriptome analysis of the syngas-utilizing bacterium *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 grown autotrophically and heterotrophically. *Molecular BioSystems*, *9*(11), 2775.
- Tang, X., Tan, Y., Zhu, H., Zhao, K., & Shen, W. (2009). Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(6), 1628–1634.
- Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*, *5*(1), 93–121.
- Umare, S. S., Chandure, A. S., & Pandey, R. A. (2007). Synthesis, characterization and biodegradable studies of 1,3-propanediol based polyesters. *Polymer Degradation*

- and Stability*, 92(3), 464–479.
- van Vliet, A. (2010). Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiology Letters*, 302, 1–7.
- Wang, Y., Li, X., Mao, Y., & Blaschek, H. P. (2011). Single-nucleotide resolution analysis of the transcriptome structure of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 using RNA-Seq. *BMC Genomics*, 12(1), 479.
- Wang, Y., Li, X., Mao, Y., & Blaschek, H. P. (2012). Genome-wide dynamic transcriptional profiling in *clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 using single- nucleotide resolution RNA-Seq. *BMC Genomics*, 13(1), 102.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63.
- Wischrall, D., Zhang, J., Cheng, C., Lin, M., De Souza, L. M. G., Pessoa, F. L. P., ... Yang, S. T. (2016). Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. *Bioresource Technology*, 212, 100–110.
- Yang, M., Yun, J., Zhang, H., Magocha, T. A., Zayed, H., Xue, Y., ... Qi, X. (2018). Genetically engineered strains: Application and advances for 1,3-Propanediol production from glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 3–15.
- Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 213–9.
- Yoo, M., Bestel-Corre, G., Croux, C., Riviere, A., Meynal-Salles, I., & Soucaille, P. (2015). A Quantitative System-Scale Characterization of the Metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *MBio*, 6(6), e01808-15.
- Zeng, A. (1996). Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Engineering*, 14, 169–175.
- Zeng, A., & Biebl, H. (2002). Bulk Chemicals from Biotechnology : The Case of 1,3-Propanediol Production. *Advances in Biochemical Engineering*, 74, 239–259.
- Zou, W., Ye, G., Zhang, J., Zhao, C., Zhao, X., & Zhang, K. (2018). Genome-scale metabolic reconstruction and analysis for *Clostridium kluyveri*. *Genome*, 61(8), 615–613. .

Capítulo 2. Potencial metabólico de *Clostridium* sp para producir 1,3-propanodiol¹

Perez-Mancilla Ximena C.¹, Rosas- Morales Juan P.¹, Montoya Castaño Dolly¹, Riaño-Pachón Diego M².

¹. Instituto de Biotecnología (IBUN), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

². Laboratório de Biologia Computacional, Evolutiva e de Sistemas, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Resumen

Trece aislamientos del género *Clostridium*, obtenidos a partir de muestras de suelos cultivables colombianos, depositados en la colección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), han mostrado altos rendimientos de producción de solventes a partir de glucosa y glicerol, incluso iguales o superiores a cepas tipo. Con el propósito de identificar las principales rutas metabólicas dentro del genoma de una de estas cepas, denominada *Clostridium* sp. IBUN13A, se secuenció su genoma en conjunto con el de otras tres (IBUN22A, IBUN125C e IBUN62F). La mayoría de las secuencias codificantes asignadas al microorganismo de interés se asocian con términos de ontología de genes relacionados con procesos metabólicos y actividad catalítica. Se identificaron todos los genes implicados en las rutas oxidativa y reductiva de fermentación de glicerol para producir 1,3-Propanodiol, además de ácidos orgánicos como el acético y el butírico. Por otra parte, al realizar un estudio de genómica comparativa se puede observar que estos clostridios se clasifican dentro de la especie *C. butyricum*. Igualmente, se encontró que el pangenoma resultante de la comparación de 105, 51 o 32 cepas del género es abierto, mostrando una amplia plasticidad génica. Al

¹ En este capítulo se trata el primer objetivo específico de este trabajo, que buscaba identificar dentro del genotipo de la bacteria posibles funciones metabólicas, identificar similitudes en microorganismos del género *Clostridium* con potencial de producir PDO así como posibles genes de interés en el pangenoma de la cepa en estudio.

analizar el genoma núcleo de 32 cepas que mostraron la presencia del gen *dhaT*, se concluyó que la mayoría de familias génicas que pertenecen a este están asociadas a procesos de traducción, estructura ribosomal, biogénesis y transcripción. La anotación funcional del genoma permitió encontrar fenotipos metabólicos del microorganismo en estudio, con miras a construir una red metabólica a escala genómica, que pueda contribuir al establecimiento de una estrategia de ingeniería genética para incrementar los rendimientos del diol de interés.

Palabras clave: *Clostridium*, genoma, secuenciación, 1,3-Propanodiol, Genómica comparativa

LISTADO DE ABREVIATURAS

1,3-PD	1,3-propanodiol
3-HPA	3-hidroxiopropionaldehído
ABE	acetona, butanol y etanol
ABySS	Assembly By Short Sequences - assembler
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANI	<i>Average nucleotide identity</i> (identidad promedio de nucleótidos)
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	BLAST de nucleótidos
BLASTp	BLAST de proteínas
BLASTx	Búsqueda en bases de datos de proteínas utilizando como criterio de consulta nucleótidos traducidos
BPGA	<i>Bacterial Pan-Genome Analysis tool</i>
CDS	Secuencia(s) codificante(s)
CoA	Coenzima A
E.C	<i>Enzyme Commission</i>
COG	<i>Cluster of Orthologous Groups</i>
D.O.	Densidad óptica
<i>dhaT</i>	1,3-Propanodiol deshidrogenasa
GC	Guanina-Citosina
GO	<i>Gene ontology</i> (ontología de genes)
IBUN	Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
iCORN	<i>Iterative Correction of Reference Nucleotides</i>
IMAGE	<i>Iterative Mapping and Assembly for Gap Elimination</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<i>k-mers</i>	Sub-secuencias con k nucleótidos a partir de reads obtenidos por secuenciación masiva
LPSN	<i>List of prokaryotic names with standing in nomenclature</i>
MEGA X	Molecular Evolutionary Genetics Analysis X software
MUSCLE	<i>Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation</i>

NAD⁺/NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado/reducido
NADP⁺/NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado/reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nr	Base de datos de proteínas no redundantes
nt	Base de datos de nucleótidos
OAU	<i>Orthologous Average Nucleotide Identity Tool using USEARCH (OrthoANlu)</i>
ORF	Marcos abiertos de lectura
P	Fosfato
PAGIT	<i>Post-Assembly Genome Improvement Toolkit</i>
PTS	Sistemas de fosfotransferasas
PTT	Politrimetilentereftalato
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
RefSeq	Secuencias de referencia de NCBI
SOAPdenovo2	<i>Short Oligonucleotide Alignment Program for de novo assembly version 2</i>
SPAdes	<i>St. Petersburg genome assembler</i>
tBLASTn	Búsqueda en bases de datos de nucleótidos traducidas utilizando como criterio de consulta proteínas

2.1 Introducción

El género *Clostridium*, descrito inicialmente en 1880 por A. Prazmowski, es un grupo heterogéneo que pertenece al Phylum *Firmicutes* y la familia *Clostridiaceae*. Se ha descrito como bacilos Gram-positivos en su mayoría, formadores de endosporas, con metabolismo anaeróbico, no reductores de sulfato, catalasa negativos con metabolismo quimiorganotrofo o quimiolitotrofo (De Vos *et al.*, 2009). Hasta octubre de 2018 se encontraban documentadas en el listado de nombres procariotas con posición en nomenclatura (LPSN) 225 especies dentro del género, las cuales tienen una amplia diversidad de características fenotípicas y genotípicas (Parte, 2018).

Los clostridios comprenden varias especies de gran importancia en la industria de las biorrefinerías por su capacidad de producir los solventes acetona, butanol y etanol (ABE), así como isopropanol y/o 1,3-propanodiol (1,3-PD) a partir de fuentes celulósicas, carbohidratos simples o glicerol (Dürre, 2011a; Karimi *et al.*, 2015; Patakova, Linhova, & Rychtera, 2013; Zeng & Biebl, 2002). Dichos productos, particularmente los procedentes de la fermentación ABE son conocidos desde 1861 cuando Pasteur describió por primera vez la obtención de butanol por medio de microorganismos, y se tornó de gran importancia durante la Primera y Segunda Guerra Mundial, debido al aumento en la demanda de acetona (Jones & Woods, 1986). Por su parte, el 1,3-PD se reconoce como

producto del metabolismo microbiano de la glicerina desde 1881 y el interés en este se ha incrementado con el establecimiento de la industria de biodiesel (la cual genera glicerol como subproducto) y la comercialización del Polítrimetilentereftalato (PTT) por parte de DuPont (Biebl *et al.*, 1999).

En cuanto a los *Clostridium* fermentadores de glicerol específicamente, se ha evidenciado que sus características bioquímicas y genéticas no son homogéneas, tal cual sucede dentro del género. Estos microorganismos pueden clasificarse por características como el uso de diversos azúcares o su capacidad de crecer en medio con peptona y extracto de levadura sin una fuente de carbono fermentable (Biebl & Spröer, 2002). La asimilación del glicerol por *Clostridium* comprende una vía reductiva y otra oxidativa por medio de las que se obtienen subproductos como acetato, butirato, etanol, butanol y 1,3-PD (Figura 1.2- Cap 1).

La importancia de *Clostridium* no se da solo por su potencial nivel industrial sino también a nivel epidemiológico, por lo que el interés en el conocimiento de sus secuencias genómicas ha incrementado. Hasta octubre de 2018 se encuentran disponibles 1018 ensamblajes de genomas de este género, dentro de los cuales se cuentan 129 genomas completos (NCBI, 2018) . El rápido crecimiento en la generación de este tipo de información, así como la necesidad de comprender la diversidad de este grupo de microorganismos y de implementar metodologías de ingeniería metabólica, han conducido a realizar estudios de genómica comparativa que conlleven a comprender atributos fisiológicos y relaciones filogenéticas dentro de este grupo (Brüggermann & Gottschalk, 2008; Calusinska, Happe, & Joris, 2010; Dehoux *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2014; Manzoor, Schnürer, & Bongcam-Rudloff, 2018; Poehlein *et al.*, 2017; Stabler *et al.*, 2009; Williamson *et al.*, 2016).

El grupo de Bioprocesos y Bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia ha aislado 13 cepas de *Clostridium* con capacidad promisoría de producir solventes a partir de glucosa o glicerol respecto a cepas tipo (Montoya *et al.*, 2001; Montoya *et al.*, 2000). Dentro de estas cepas se encuentra la denominada IBUN13A, cuyo genoma fue secuenciado y es objeto de este estudio, el cual busca analizar el genoma de dicho microorganismo para identificar posibles funciones metabólicas, principalmente las asociadas a la producción de 1,3-PD, y por medio de genómica comparativa, determinar

similitudes entre miembros del género y posibles genes de interés entre aquellos que tengan el potencial génico de producir el diol.

2.2 Métodos

2.2.1 Anotación del genoma:

2.2.1.1 Cepas bacterianas:

El ADN de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A así como de otras 3 cepas con características fenotípicas similares (IBUN22A, IBUN125C e IBUN62F) fue obtenido de la colección Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología UN (Colección 90 del Registro Nacional de Colecciones Biológicas). Estas cepas fueron aisladas previamente de suelos agrícolas colombianos y escogidas por su capacidad de producir solventes totales o 1,3-Propanodiol (Cárdenas *et al.*, 2006; Montoya, *et al.* 2001; Montoya, *et al.* 2000)

2.2.1.2 Ensamblaje y anotación:

Los genomas fueron secuenciados en un instrumento Illumina HiSeq2000 utilizando el kit de preparación de librerías Nextera. El preprocesamiento de los reads se realizó con Clean_reads y Fastx-toolkit v0.0.14. El ensamblaje del genoma se realizó con Velvet v1.2.10 , SPAdes, ABySS y SOAPdenovo2 para longitudes impares de *k-mers* de 27 a 65. Se escogió el obtenido con el primer programa con 65 k-mer debido a los valores obtenidos en parámetros como N50, N75, número de contigs con longitud menor a 100pb y, fundamentalmente, la coherencia entre la longitud del ensamblaje con lo evaluado previamente por medio de la técnica de electroforesis en campo pulsado (Quilaguy Ayure *et al.*, 2006; Rosas-Morales, 2015).

Para mejorar este ensamblaje se usaron las herramientas IMAGE y iCORN pertenecientes a la herramienta PAGIT. Para la anotación estructural se combinó el resultado obtenido por Glimmer, GeneMarkS y Prodigal por medio de MAKER2. Respecto a la anotación funcional y análisis del genoma se utilizaron las herramientas BLAST y Blast2GO. (Rosas-Morales, *et al.* 2015). Adicionalmente el ensamblaje fue

anotado automáticamente por medio de RAST y las secuencias predichas y la asignación de función de las mismas por ambos métodos fueron comparadas.

2.2.2 Análisis del genoma in silico - Genómica comparativa

2.2.2.1 Secuencias:

Adicionalmente a los genomas generados en este trabajo, las secuencias de los genomas de 101 especies del género *Clostridium* descritos en LPSN (Parte, 2018) fueron incluidas. Estas fueron escogidas de acuerdo con su disponibilidad y al formato descargable en la base de datos de ensamblajes de NCBI (NCBI, 2018). Dentro de estas, 47 pertenecen a clostridios del cluster I (según lo listado en el manual de Bergey de sistemática bacteriana), reconocido como el grupo de verdaderos miembros del género *Clostridium* (*Clostridium sensu stricto*) (Collins et al., 1994; De Vos et al., 2009). Las especies analizadas se encuentran listadas en el anexo 1.A.

Se tomaron las secuencias que dentro de las 101 que mostraran la presencia del gen de la enzima 1,3-Propanodiol deshidrogenasa (*dhaT*), fueran o no productoras reconocidas del alcohol. De estas, 29 especies y 3 de las obtenidas en este trabajo cumplieron dicha condición, por lo tanto sus secuencias previamente obtenidas de la base de datos *Assembly* del NCBI, fueron utilizadas para este estudio (NCBI, 2018). La información de las accesiones se encuentra en el Anexo 1.A.

2.2.2.2 Análisis de genómica comparativa:

Los 29 genomas que presentan el gen *dhaT*, en conjunto con las secuencias de las cepas IBUN13A, IBUN22A e IBUN125C (que también cuentan con dicho gen), fueron incluidas en el análisis de genómica comparativa. Se obtuvo la identidad promedio de nucleótidos, ANI por sus siglas en inglés, por medio de la herramienta OrthoANIu (OAU) (Yoon, et al., 2017; Edgar, 2010). Para el análisis de core y pan-genoma se utilizó la herramienta *Bacterial Pan-Genome Analysis tool* (BPGA; Chaudhari, Gupta, & Dutta, 2016). La agrupación de genes ortólogos de las secuencias obtenidas se obtuvo por medio de la herramienta USEARCH utilizando como punto límite mínimo 50 % de identidad de las proteínas (Rost, 1999). La matriz binaria para análisis del pan-genoma y análisis filogenético se creó utilizando igual número de iteraciones que de genomas analizados. Se obtuvo un árbol de agrupamiento por medio de la herramienta MEGA X (Kumar et al.,

2018). basado en la agrupación de genes ortólogos del pangenoma. El análisis se realizó con el método *Neighbor-Joining*, y se obtuvo un árbol consenso a partir de 1000 réplicas y las distancias fueron calculadas con el modelo Kimura 2-parámetros. Este mismo análisis se realizó tanto para las 101 secuencias de bacterias del género *Clostridium* descritas en el apartado anterior como para las 47 pertenecientes al *cluster* I, las cuales fueron analizadas en conjunto con los 4 genomas obtenidos en este estudio, dentro de los cuales se encuentra el del microorganismo en estudio, *Clostridium* sp. IBUN13A.

2.3 Resultados

Con el fin de determinar el potencial metabólico de la cepa objeto de este estudio, se realizó un análisis completo de la anotación de su genoma, seguido por una comparación con genomas de cepas representativas que tuvieran codificado dentro de su genoma la enzima 1,3-PD deshidrogenasa, necesaria para obtener el diol de interés, con el fin de identificar genes conservados y genes únicos entre dichas especies.

2.3.1 Potencial metabólico global de la cepa *Clostridium* IBUN13A:

La información general relacionada con el preprocesamiento, ensamblaje y anotación de la cepa de estudio así como de las otras tres analizadas se encuentra publicada previamente (Rosas-Morales, 2015; Rosas-Morales *et al.*, 2015). Al realizar un análisis inicial donde se compararon las secuencias codificantes predichas contra la base de datos de proteínas no redundantes nr usando BLASTx con el fin de asignar funciones, se observó que los microorganismos en estudio podrían pertenecer a la especie *C. butyricum*, lo cual es concordante con estudios previos sobre el gen 16S de las cepas aisladas de suelos colombianos (Montoya *et al.*, 2001; Montoya *et al.*, 1999).

Respecto a la anotación funcional, debido a que esta se realizó inicialmente por medio de dos estrategias, se pudo observar que al utilizar la herramienta automática RAST se asignaba a un mayor número de secuencias un código enzimático (**Tabla 2-1**). Igualmente, una vez asignadas las posibles funciones de las proteínas tanto por medio de BLASTx y Blast2GO así como RAST, estas fueron comparadas e incluidas a la base de datos de ensamblajes de NCBI, depositando lo correspondiente a 4086 secuencias de genes y 4022 de proteínas, dentro de un genoma parcial con una longitud de 4'643.590 pb. Las

características básicas del genoma se encuentran esquematizadas en la Figura 2-1 Vale la pena anotar que, con base en esta anotación, se obtuvo en otro trabajo doctoral del grupo una red metabólica a escala genómica (Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017).

Tabla 2-1. Características básicas de las anotaciones del genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A

		Blast2GO	RAST
Genes anotados		4282	4275
Códigos asignados	E.C.	1066	1720
Proteínas hipotéticas		824	804

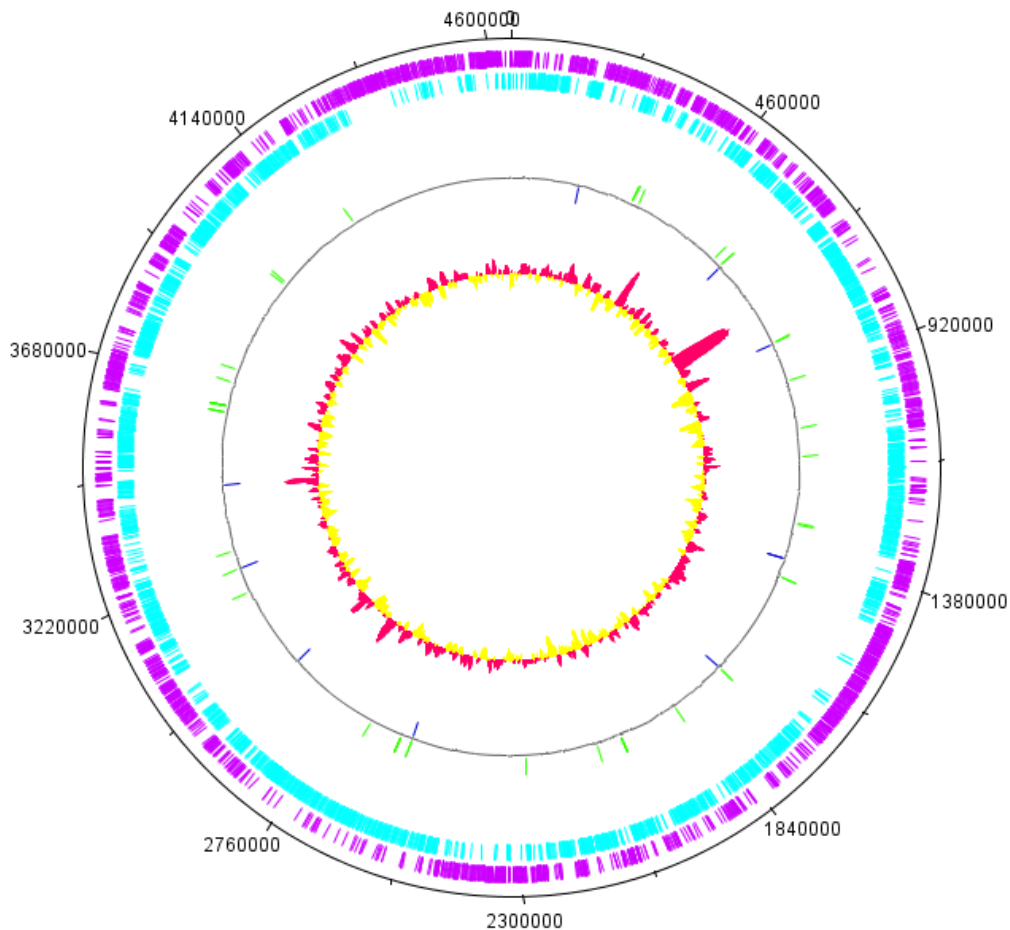


Figura 2-1. Mapa génico de *Clostridium* sp. IBUN13A. En color lila se muestran las secuencias codificantes en la hebra directa, en color azul claro las secuencias codificantes en la hebra reversa. En color verde están identificadas las secuencias de

tARN y en azul oscuro las de rARN. En el círculo del centro se muestra el %GC. Este mapa se obtuvo a través de la herramienta DNAPlotter.

Respecto a la asignación de códigos EC y de anotaciones de ontología de genes, se pudo observar que la mayoría de las enzimas fueron identificadas dentro del grupo de las transferasas e hidrolasas (**Figura 2-2**) lo que es coherente con la asignación de términos GO de función molecular (**Figura 2-3**), que en su mayoría correspondieron a actividad catalítica referente a estos dos tipos de enzimas.

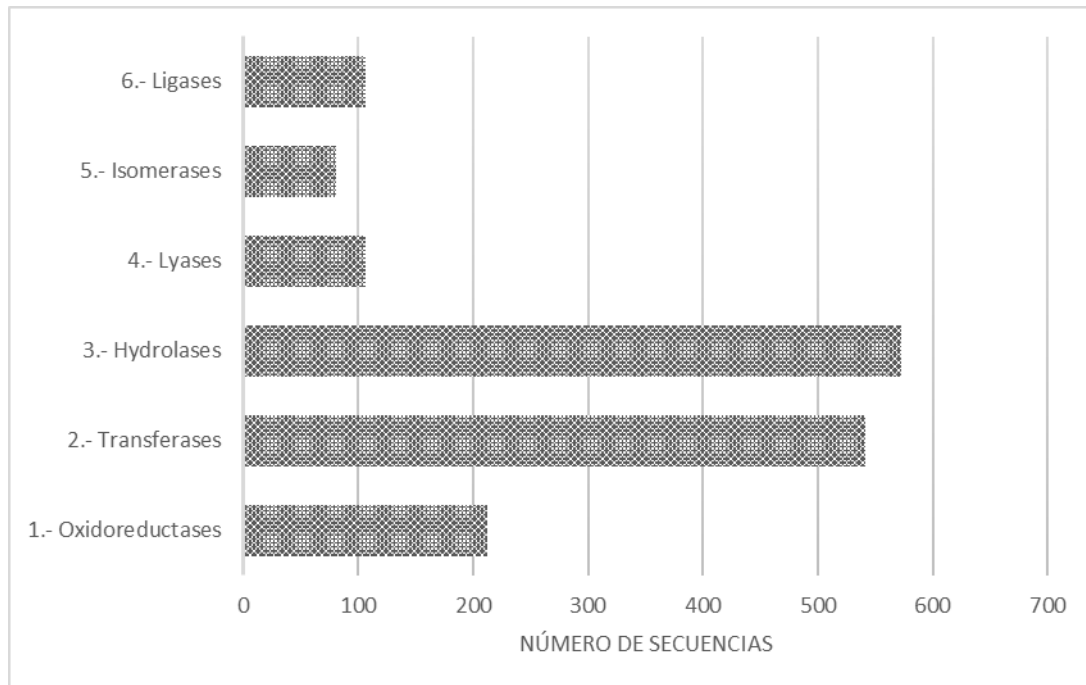


Figura 2-2. Distribución de los números EC asignados en la anotación funcional de *Clostridium* sp. IBUN13A

Con el fin de obtener la mayor cantidad de información posible del potencial metabólico del microorganismo codificado en el genoma, se tomaron las redes metabólicas preliminares obtenidas a partir de la anotación por RAST (1130 posibles reacciones predichas) así como por Blast2GO/KEGG (817 reacciones predichas), con el fin de detectar posibles reacciones y/o enzimas que a las que no se les hubiese asignado función pero que se encuentren dentro del genoma ensamblado. Inicialmente se compararon manualmente los códigos E.C (*Enzyme Commission numbers*) asignados a las secuencias, los cuales podían estar asociados a una o más reacciones metabólicas. Se encontraron 594 reacciones en común entre las dos redes. Por otra parte, se

establecieron los identificadores de reacciones de KEGG a las reacciones encontradas con RAST, dentro de las que 524 no tenían un identificador de esta base de datos (no eran comparables). De esta forma se pudo observar que 448 reacciones fueron detectadas en ambas anotaciones (Figura 2.4).

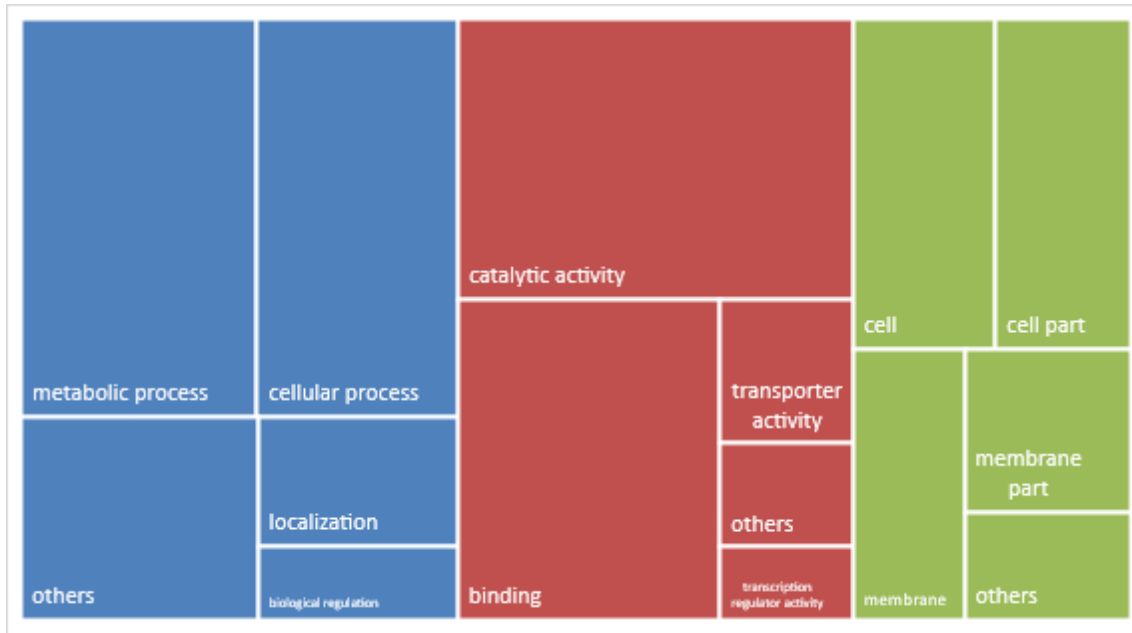


Figura 2-3. Jerarquía de los términos GO de segundo nivel asignados a las secuencias anotadas de *Clostridium* sp. IBUN13A. Azul: Proceso Biológico; Rojo: Función molecular; Verde: Componente celular.

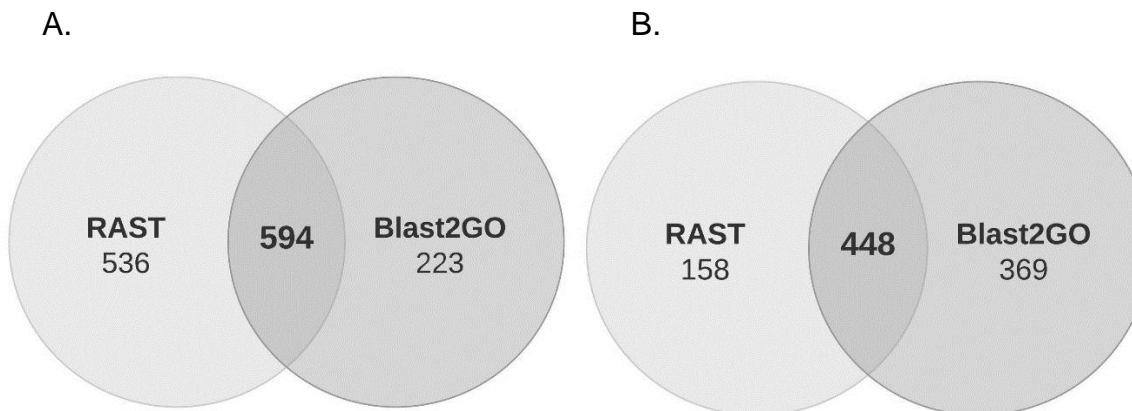


Figura 2-4. Comparación entre las redes metabólicas preliminares de *Clostridium* sp. IBUN13A obtenidas con RAST y Blast2GO/KEGG. A. números E.C. y B. Identificadores

de KEGG (524 reacciones de la base de datos SEED del sistema automático de anotación RAST no tenían identificador en la base de datos KEGG).

En la tabla a continuación (Tabla 2-2; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se muestran algunos de los subsistemas metabólicos según KEGG, con más secuencias del genoma de *Clostridium* IBUN13A asociadas. Esto respecto a un análisis de las secuencias finales publicadas en el NCBI. Así mismo se puede observar, como es previsible, que los procesos con mayor representación son aquellos destinados a la producción de biomasa y energía.

Tabla 2-2. Subsistemas metabólicos de KEGG con mayor representación de secuencias dentro del genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A

RUTA METABÓLICA	SECUENCIAS ASOCIADAS
<i>Purine metabolism</i>	394
<i>Thiamine metabolism</i>	286
<i>Pyrimidine metabolism</i>	104
<i>Alanine, aspartate and glutamate metabolism</i>	70
<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	68
<i>Starch and sucrose metabolism</i>	63
<i>Glycine, serine and threonine metabolism</i>	57
<i>Pyruvate metabolism</i>	50
<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	49

Con el fin de confirmar la anotación de genes y obtener un mayor nivel de completitud para la generación de un modelo metabólico, se revisaron las predicciones de genes fundamentales para las rutas reductiva y oxidativa del consumo de glicerol, sustrato de interés para la producción de 1,3-Propanodiol, así como otros procesos metabólicos importantes.

Según Rosas-Morales (2015), en el genoma de la cepa en estudio se encontraron 31 genes correspondientes a sistemas de fosfotransferasas (PTS) para el transporte activo de azúcares, método ampliamente descrito en bacterias. Así mismo se reconoce que *Clostridium* sp. IBUN13A cuenta con todas las enzimas de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas. Respecto a la ruta de las pentosas fosfato, según la anotación es posible la isomerización de glucosa 6-P a fructosa 6-P y la consecuente producción de ribosa y

desoxirribosa para la síntesis de ácidos nucleicos. Sin embargo, la enzima 1.1.1.49 (glucosa 6-P deshidrogenasa) no fue encontrada en la anotación, lo que significa que la producción de dichos monosacáridos se da sin seguir la rama oxidativa de esta ruta, es decir, sin la producción de NADPH + H⁺ tal y como ha sido identificado en *Clostridium butyricum* y *acetobutylicum* (Bizukojc et al., 2010; Rosas-Morales, 2015).

Respecto a la ruta oxidativa de producción de 1,3-PD, el microorganismo requiere la transformación de glicerol a piruvato y a partir de allí la obtención de productos ácidos derivados de la fermentación, con el fin de obtener energía por fosforilación a nivel de sustrato. Es igualmente importante en bacterias anaeróbicas controlar el flujo de electrones en el interior de la célula. Los mayores productos de este proceso metabólico son el butirato, acetato y etanol los cuales nuestra bacteria produce según información experimental (Cárdenas et al., 2006; D. Montoya et al., 2000; Rosas-Morales et al., 2015). Otros productos pueden ser ácido láctico, fórmico y/o succínico. Algunos puntos por resaltar son:

- Conversión de glicerol en intermediarios de la ruta glicolítica: Las enzimas necesarias para la producción de glicerona fosfato a partir de glicerol y su isomerización a gliceraldehído 3-P se identificaron completamente (glicerol deshidrogenasa WP_002581227.1; Dihidroxiacetona quinasa WP_046057916.1, WP_043853326.1, WP_003408953.1; Triosa fosfato isomerasa WP_002582110.1). Las enzimas para la transformación a piruvato de estos intermediarios también fueron completamente identificadas dentro de las secuencias predichas.
- Reacción fosforoclástica: La enzima piruvato ferredoxin oxidoreductasa juega un papel fundamental en el metabolismo central de los clostridios debido a que lleva a la producción de acetyl-CoA y por ende a la obtención de ácidos, solventes, ATP y flujo de electrones. Se encontraron dentro de la anotación funcional tres productos génicos relacionados (WP_046057453.1, WP_043853313.1, WP_046058067.1), para los que se realizó una verificación de la predicción de la función por medio de BLASTp usando la base de datos nr, y los resultados mostraron 100% de identidad con piruvato:ferredoxin oxidoreductasas de *C. butyricum*.

- Conversión de piruvato a acetato y acetona: la enzima fosfotransacetilasa no fue predicha inicialmente en la anotación funcional realizada, sin embargo, la función pudo ser asignada al corroborar por medio de alineamiento por medio de BLASTn con enzimas iguales de cepas de *Clostridium* (WP_002579598.1). La producción de ATP y acetato también se da en la cepa de estudio por medio de la enzima acetato quinasa WP_002579599.1. Respecto a la producción de acetona, los genes necesarios para producir este compuesto se encuentran en un megaplásmido de bajo número de copia previamente descrito para la cepa en estudio, que muestra similitud con el plásmido pSol1 de *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Quilaguy Ayure et al., 2006). Al realizar un BLASTn entre la secuencia ensamblada del genoma y el plásmido pSol1 se encontró que los mayores porcentajes de identidad correspondían a secuencias de genes que codifican componentes del PTS, de los cuales hay copia en el plásmido y en el cromosoma. Sin embargo, no se encontraron hits con los genes *ctfA*, *ctfB* (que codifican para la enzima CoA- transferasa) y *adc* (acetoacetato descarboxilasa). Igualmente, cuando se hace el ejercicio de extraer los contigs que mostraron hits con esta secuencia y hacer un blastn contra la colección de nucleótidos (nt) del NCBI, sucede exactamente el mismo fenómeno, y se encuentran altos porcentajes de identidad con genes de PTS y con reguladores de respuesta de dos componentes contenidos en genomas de clostridios y otras bacterias gram-positivas. Dentro de las posibles explicaciones está que la muestra enviada fue tomada en un punto temprano en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria (D.O. 0,3-0,5), y debido a que este plásmido es de bajo número de copia debido a su gran tamaño, puede ser que el ADN correspondiente a este elemento no estuviera representado en la muestra y lo que se observa en el análisis bioinformático corresponde únicamente a ADN cromosomal.
- Conversión de piruvato a butirato y butanol: Los productos génicos necesarios para la producción de ácido butírico a partir de piruvato fueron identificados en su mayoría en las dos anotaciones. Una de las reacciones más importantes, ya que se encuentra relacionada con la reducción de acetoacetyl-CoA a 3-hidroxi-butiril-CoA con la consecuente producción de NAD⁺ o NADP⁺, puede ser mediada por la enzima 1.1.1.35 o 1.1.1.157, para las que se asignó un gen predicho (producto: WP_002582766.1). Respecto a la producción de butanol, se encontró la secuencia de una enzima aldehído/alcohol dehidrogenasa que podría catalizar la formación de

butiraldehído a partir de butiril-CoA (WP_002582956.1) y la secuencia incompleta de la enzima butanol deshidrogenasa (ClosIBUN13A_CONTIG65g00726).

Respecto a la ruta reductiva de producción de 1,3-PD, el glicerol que entra a la célula por difusión es deshidratado a 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA) y este a su vez se reduce al alcohol (Zeng, 1996). Los productos de los genes *dhaB1* (WP_046058642.1) y *dhaB2* (WP_003413271.1) que codifican para la enzima glicerol deshidratasa y su proteína activadora, que poseen amplia similitud estructural con la enzima piruvato formato liasa, así como el gen *dhaT* (WP_046058643.1) que codifica para la enzima 1,3-Propanodiol deshidrogenasa fueron anotados. De igual forma el sistema regulador de dos componentes *dhaA/dhaS* fue encontrado secuencia arriba de *dhaB1*, tal y como se esperaba, debido a que ya se ha determinado la estructura del operon *dha* para esta cepa en trabajos previos del grupo (Barragan, Gutierrez-Escobar, & Montoya Castaño, 2015).

Así mismo, las enzimas que hacen parte del ciclo de Krebs que se encontraron dentro del genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A son la aconitato hidratasa (WP_046057772.1), piruvato carboxilasa (WP_002580842.1), Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (WP_046058240.1) e Isocitrato deshidrogenasa (WP_002579378.1). Respecto a la posibilidad de obtener citrato a partir de oxalacetato y acetil-CoA y la posterior formación de α -cetoglutarato, se ha encontrado en algunos clostridios como *C. acetobutylicum*, *C. kluyveri* y *C. ljungdahlii* la presencia de la enzima re-citrato sintasa (Amador-Noguez et al., 2010; F. Li et al., 2007; Tan et al., 2013). Al realizar un BLASTp a la proteína WP_002583007.1, adyacente a la aconitasa, esta mostró 100% de identidad con otras homocitrato sintasas descritas en genomas de *C. butyricum*, así como un 88% con la misma proteína de *C. beijerinckii*. De igual forma se encontraron identidades de 30 y 31% con las proteínas descritas para *C. acetobutylicum* y *C. kluyveri*.

2.3.2 Genómica comparativa de cepas de *Clostridium* IBUN13A con capacidad de obtener 1,3-Propanodiol:

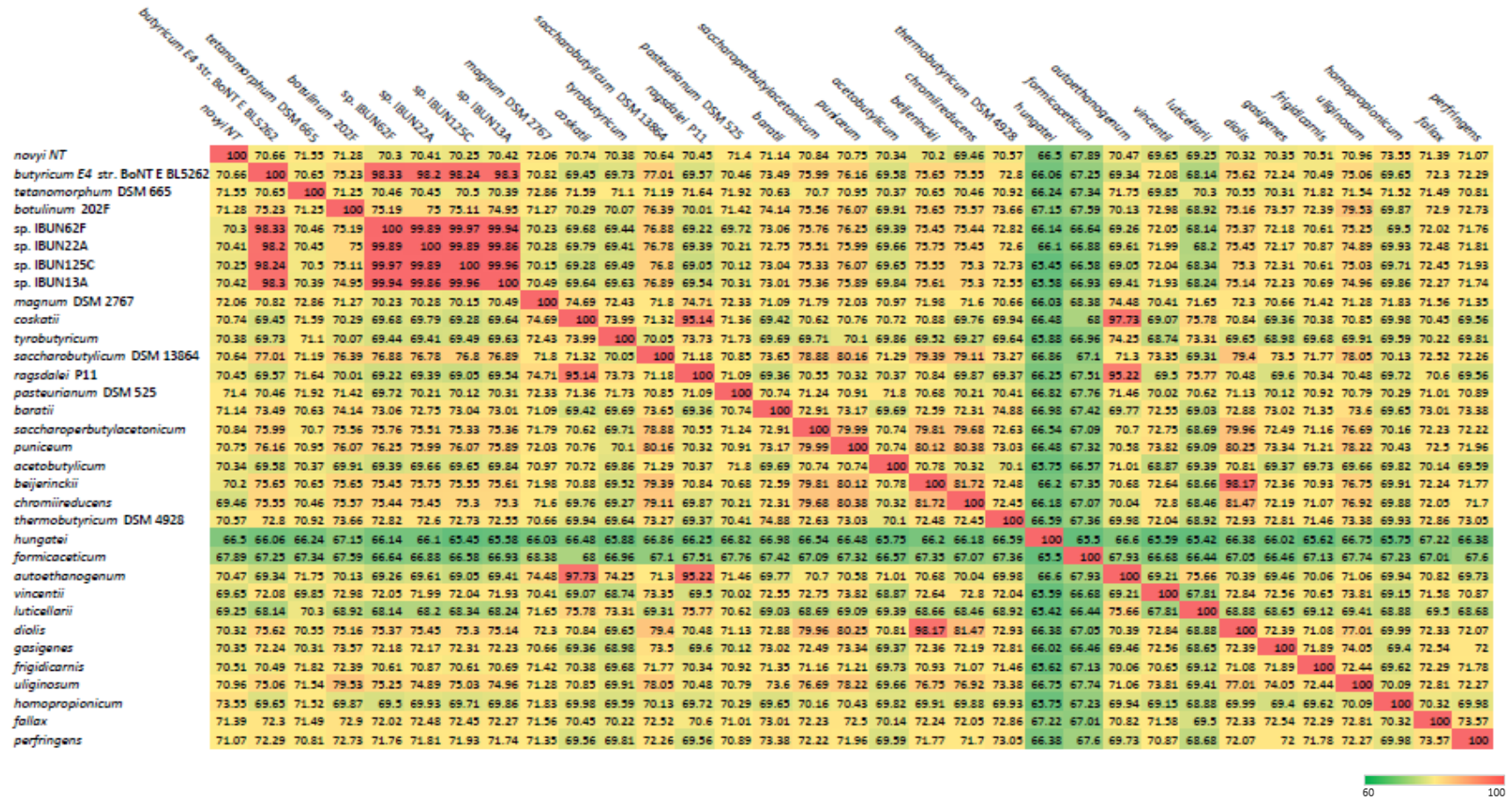
Las 29 cepas que contienen el gen *dhaT* y las 4 cepas que se secuenciaron en este estudio mostraron un %GC entre 27 y 42,5. Al realizar el análisis de identidad nucleotídica ANI, se pudo observar que las cepas pertenecen a la especie *C. butyricum*

(ANI 98,2 – 98,3%). Con otras especies se muestra un porcentaje menor a 80% (Figura 2-5)

El análisis de genómica comparativa por medio de BPGA mostró que el pangenoma es abierto de acuerdo a la regresión potencial calculada por el programa ($f(x) = 2827,68 \cdot x^{0.79}$), lo que es congruente con un estudio previo donde se analizan 16 especies del mismo género (Udaondo, Duque, & Ramos, 2017). La distribución de los genes del pangenoma y el core genoma se pueden observar en la **Figura 2.6**. Dentro del análisis se consideraron para las 32 cepas un total de 114311 secuencias codificantes. De acuerdo con esto, 166 genes de cada cepa mostraron hacer parte del genoma *core*. Se hallaron 84860 genes accesorios y 29213 genes únicos o *singletons*, 41 de los cuales corresponden a la cepa *C. sp.* IBUN13A. Estas secuencias, según los identificadores de las proteínas del GenBank anotadas, corresponden en su totalidad a proteínas hipotéticas. Sin embargo, se realizó un búsqueda por similitud de secuencias usando tBLASTn contra el archivo de secuencias codificantes de la cepa en la base de datos RefSeq y se pudo encontrar función a 9 de estas secuencias, las cuales se pueden observar en la Tabla 2-3.

La mayoría de estos *singletons* se encuentran asociados a procesos biológicos de transporte y funciones relacionadas con unión a ADN y factores transcripcionales.

Así mismo se encontraron, dentro de este grupo de secuencias únicas, dos anotadas como pseudogenes. Dentro de estas se encuentra la secuencia contenida en el contig NZ_JZWG01000257.1 asociado a la enzima 6.3.5.5, carbamoil fosfato sintasa, que cataliza el paso de Glutamina a Carbamoil-P, que dará origen al Uridina monofosfato. El otro gen se encuentra en el contig NZ_JZWG01000247.1 y está asociado a la enzima 1.2.1.41, glutamato-5-semialdehido deshidrogenasa.



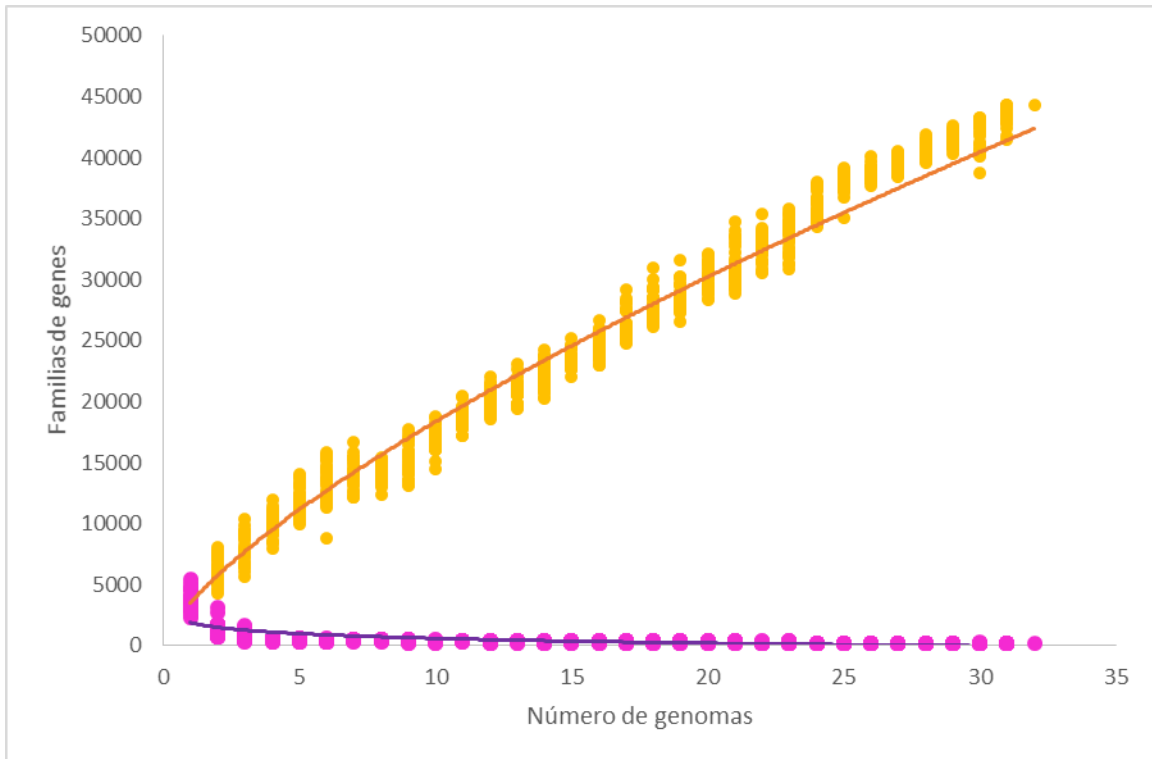


Figura 2-6. Distribución del perfil del pangenoma y core genoma para 33 cepas de *Clostridium* de acuerdo con el agrupamiento de la herramienta USEARCH. La línea naranja muestra la distribución de ley potencial para el pangenoma y los puntos amarillos las familias de genes de este, mientras que la línea morada muestra la distribución exponencial del core genoma y los puntos rosados las familias de genes core.

Tabla 2-3. Secuencias únicas del genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A identificadas, de acuerdo con la comparación con 16 genomas del mismo género. P: proceso biológico, F: función molecular, C: componente celular.

Código GenBank Proteína	Código RefSeq secuencia genómica	Función	Identificador GO Asociado	Nombre GO
KJZ91060.1	NZ_JZWG01000155.1 cds: WP_002582915.1	Transportador melibiosasodio MelB	P:GO:0006810; F:GO:0003674	P: transporte
KJZ91070.1	NZ_JZWG01000155.1 cds: WP_002582903.1	ATPasa familia AAA	F:GO:0043167	F: Unión a iones
KJZ97800.1	NZ_JZWG01000010.1_ cds: WP_046058709.1	Metionina--tARN ligasa	F:GO:0003723; C:GO:0005737; F:GO:0043167; P:GO:0006399; P:GO:0006520; F:GO:0016874;	F: Unión a ARN; C: citoplasma; F: Unión a iones; P: Proceso metabólico de tARN ; P: Proceso metabólico de aminoácidos;

Código GenBank Proteína	Código RefSeq secuencia genómica	Función	Identificador GO Asociado	Nombre GO
			P:GO:0006412	F: Actividad ligasa; P: traducción
KJZ91090.1	NZ_JZWG01000155.1 cds: WP_002582898.1	Regulador transcripcional familia XRE	F:GO:0003677	F: Unión a ADN
KJZ91073.1	NZ_JZWG01000155.1 cds: WP_024040745.1	Regulador transcripcional	F:GO:0003677; F:GO:0003700; F:GO:000988; P:GO:0034641; P:GO:0009058	F: Unión a ADN; F: Actividad de Factor transcripcional; Unión a ADN; F: Actividad de Factor transcripcional; Unión a proteína; P: Proceso metabólico de compuesto nitrogenado celular P: Proceso biosintético
KJZ91085.1	NZ_JZWG01000155.1 cds: WP_046058858.1	Subunidad translocasa secB	P:GO:0006461; F:GO:0051082; P:GO:0006810	P: Ensamblaje de complejo proteico; F: Unión de proteína no plegada; P: Transporte
KJZ91079.1	NZ_JZWG01000155.1 cds: WP_002582899.1	Regulador transcripcional familia XRE	F:GO:0003677	F: Unión a ADN
KJZ91080.1	NZ_JZWG01000155.1 cds: WP_046058847.1	Proteína de unión a ADN	F:GO:0003677	F: Unión a ADN
KJZ97539.1	NZ_JZWG01000018.1 cds: WP_046058718.1	Transportador de Magnesio	C:GO:0005575	C: Componente celular

Por otra parte, se obtuvo el árbol de agrupamiento basado en la información del pangenoma por medio del método *Neighbor-Joining* (**Figura 2-7**), el cual mostró una estructura similar (tomando en cuenta únicamente las especies analizadas en este apartado) a lo publicado previamente respecto a una filogenia obtenida con el método de máxima verosimilitud en la que se analizaron 31 marcadores moleculares de 59 cepas de *Clostridium* por medio de la herramienta de inferencia filogenómica automática AMPHORA2 (Pérez-Mancilla *et al.*, 2017). Nuevamente se puede observar que los microorganismos pertenecientes al Banco de Cepas y Genes del IBUN se encuentran cercanamente relacionados entre ellos y con *C. butyricum*, y separados de otros clostridios de interés industrial como *C. pasteurianum* y *C. acetobutylicum*. Para la obtención de este árbol no se consideró la cepa llamada IBUN62F debido a que esta no muestra la presencia del gen *dhaT*, sin embargo, se realizó un análisis incluyendo a esta

cepa, la cual se agrupa con las otras 3 obtenidas en este estudio. Al obtener un árbol basado en el alineamiento de las proteínas del genoma *core* por medio de la herramienta MUSCLE, se observa el mismo comportamiento aquí descrito.

Igualmente, al observar la distribución de términos COG (Cluster of Orthologous Groups – FIGURA 2-8) se puede observar que más genes pertenecientes al genoma *core* están envueltos en los procesos de traducción, estructura ribosomal y biogénesis además de transcripción, ambos pertenecientes a la categoría de almacenamiento y procesamiento de información; lo que es congruente con el estudio de Udaondo y colaboradores en 2017, donde se pudo observar el mismo fenómeno. Por otra parte, los genes accesorios y únicos están más representados dentro de la función de transcripción, mecanismos de transducción de señales y metabolismo de carbohidratos. La distribución de los términos de KEGG para genomas núcleo, accesorio y singletons, muestra que la gran mayoría se agrupan, como era de esperarse en la categoría de metabolismo. También se observa un porcentaje menor de genes asociados con enfermedades humanas, sin embargo, estos genes podrían pertenecer a procesos metabólicos normales que se asocian dentro de las rutas metabólicas contempladas en esta categoría.

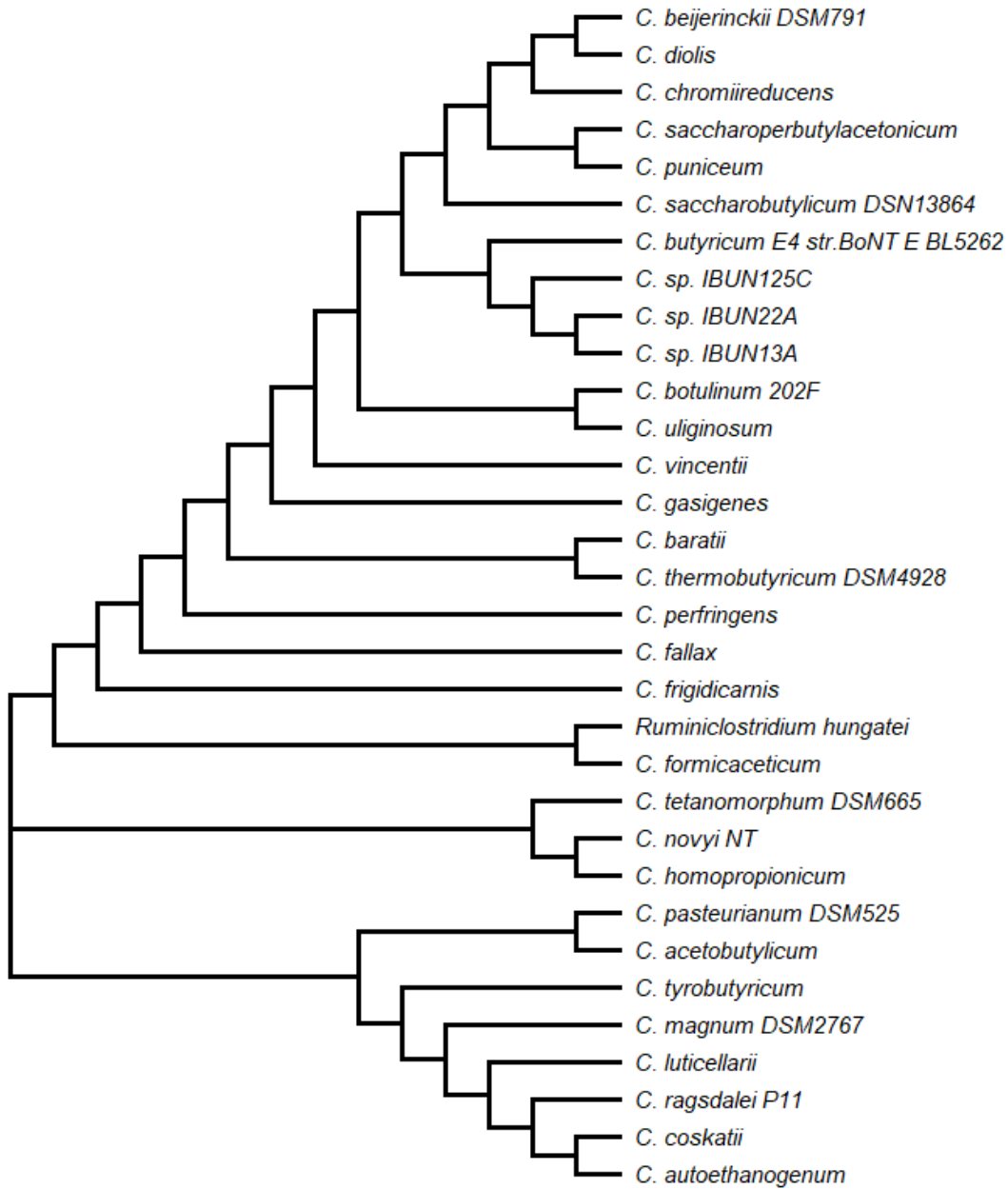


Figura 2-7. Análisis de agrupamiento para 32 especies de *Clostridium* basado en el método de Neighbor Joining (vecino más cercano). En el cuadro rojo se encuentran las cepas cuyos genomas fueron obtenidos dentro de este estudio.

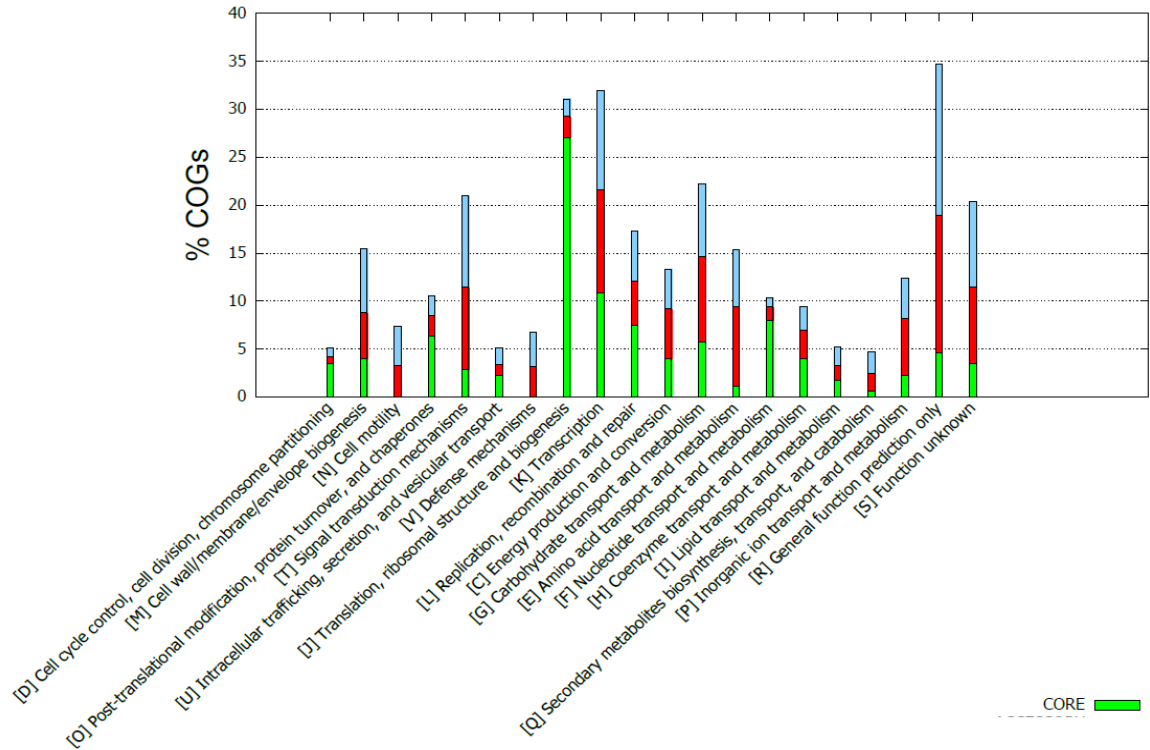


Figura 2-8. Distribucion de COGs para genes core, accesorios y únicos del para 32 especies de *Clostridium*. En verde se muestra el porcentaje para genoma núcleo, en rojo para genoma accesorio y en azul para genes únicos.

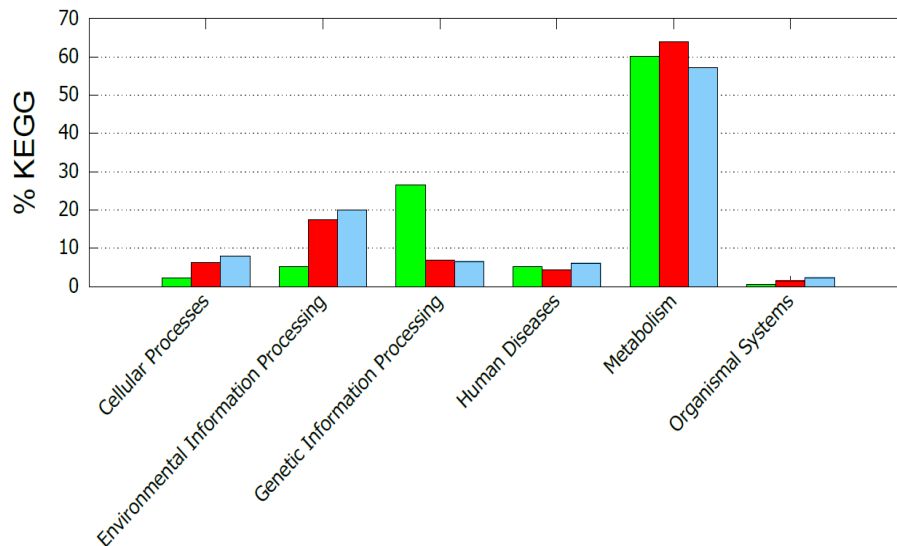


Figura 2-9. Distribución de términos KEGG para genes core, accesorios y únicos determinados para 32 especies de *Clostridium*. En verde se muestra el porcentaje para genoma núcleo, en rojo para genoma accesorio y en azul para genes únicos.

Con el fin de corroborar los resultados del genoma accesorio de la cepa IBUN13A, se tomaron las 3574 secuencias de esta y se alinearon por medio de un BLASTp local, tomando como base de datos un archivo con todas las proteínas accesorias de los 32 genomas analizados. 3544 proteínas mostraron alineamientos, y de estas 152 estaban presentes en al menos 30 de las 32 cepas. Esto podría indicar que estas secuencias podrían pertenecer al genoma *core*, tomando en cuenta que dentro de este grupo se encuentran proteínas con funciones propias del mantenimiento y reproducción, tales como ADN y ARN polimerasas, así como proteínas de esporulación, proteínas necesarias para el metabolismo energético y flujo de electrones (ferredoxina y ruberitina), componentes de ribosoma, entre otras (Anexo 1.B).

Adicionalmente se realizó el mismo análisis para las 101 cepas del género listadas en LPSN (incluidas las anteriormente analizadas), en conjunto con las 4 cepas derivadas de este estudio, donde se encontró que el microorganismo con mayor número de secuencias codificantes para ser analizadas fue *Clostridium asparagiforme* DSM 15981 y el que contenía menor número de genes fue *C. paradoxum* DSM 7308. De acuerdo con las estadísticas no se encontraron genes exclusivamente ausentes en ninguna de las 105 cepas, pero si se encontró un mayor número de *singletons*, a excepción de la cepa *Clostridium* sp. IBUN62 F que no mostró ninguno. De igual forma para los 47 genomas del cluster I y las 4 cepas de esta investigación, se encontró que *C. magnum* DSM 2767 tuvo el mayor número de CDS a ser analizadas y el menor *C. novyi* NT. Para ambos casos se determinó que el pangenoma es abierto, lo que es congruente con otros estudios (Udaondo et al., 2017; Zhou, Ma, Mao, & Liu, 2014). Los resultados de estos análisis se encuentran en el Anexo 1.C.

2.4 Discusión

Diversas especies dentro del género *Clostridium* han mostrado un amplio impacto en la industria debido a su capacidad de producir solventes como el butanol, acetona y etanol (en la fermentación acetobutílica o ABE – propia de Gram-positivos anaerobios) a partir de carbohidratos, biomasa ligninocelulósica o glicerol. Esto ha ocasionado que el metabolismo quimioorganoheterotrófico de estos microorganismos se convierta en un interesante objeto de investigación entre la comunidad científica (Dürre, 2011b; Jones & Woods, 1986; Lee et al., 2008; Lehmann et al., 2012;

Patakova et al., 2013). Tal es el caso de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A, ya que ha demostrado previamente que tiene potencial mayor o similar a cepas tipo para hidrolizar polisacáridos así como producir acetona y 1,3-Propanodiol (Cárdenas et al., 2006; D. Montoya et al., 2000). Antes de la concepción de este trabajo y aquellos que se derivaron del mismo, se habían realizado investigaciones sobre el proceso fermentativo, la estructura y sobre-expresión del operón *dha*, mutaciones sitio-dirigidas y proteoma en cepas cercanamente relacionadas a IBUN13A aisladas de suelos colombianos (Barragan et al., 2015; Cárdenas et al., 2006; Comba González et al., 2013; J. D. Montoya, 2012; Perez Mancilla, 2009). Sin embargo, no se contaba con una caracterización del genoma completo de ninguna de las bacterias pertenecientes al banco de cepas y genes del IBUN que permitiera facilitar la implementación de herramientas de biología de sistemas e ingeniería genética, así como contribuir a analizar los niveles de expresión de genes, todo con miras a incrementar el rendimiento y/o productividad de 1,3-PD a partir de glicerina.

De acuerdo con los resultados aquí presentados, las cepas IBUN13A, IBUN22A, IBUN 125C e IBUN62F pertenecen a la especie *C. butyricum* debido a sus características a nivel genómico, lo que es coherente con lo observado previamente en otros trabajos del grupo (Arévalo et al., 2002; D. Montoya et al., 2001). Esta especie en particular, se reconoce como uno de los mayores productores naturales de 1,3-PD conocidos hasta el momento (Saxena et al., 2009). Hasta noviembre de 2018 se encontraban documentados 5 genomas completos de cepas de esta especie y 17 más a nivel parcial, sin contar con las 4 secuenciadas en este estudio (NCBI, 2018; Calusinska et al., 2015; Kwok et al., 2014; C. Li et al., 2016; Mo et al., 2015; Xin et al., 2013). El promedio del porcentaje GC de este grupo, según lo reportado en la base de datos *Genome* de NCBI, es de 28,62%, el tamaño de genoma es de 4,57 Mb y el número de genes predichos es de 4127, similar a lo encontrado para la cepa IBUN13A, así como para las otras 3 aquí secuenciadas.

Tal y como se esperaba para un microorganismo que basa su obtención de energía necesaria para los procesos de construcción de biomasa en fosforilación a nivel de sustrato, en *C. sp.* IBUN13A se lograron identificar todos los genes de las enzimas de la ruta glicolítica, así como los que conducen a la formación de ácido láctico, fórmico y Acetil-CoA y su posterior transformación en ácidos acético y butírico que en conjunto con

la producción de hidrógeno molecular, contribuyen al flujo de electrones al interior de la célula. Debido a que el glicerol es una molécula más reducida que la glucosa, se requiere la disposición de dos átomos de hidrógeno más, lo que se logra por medio de la producción de 1,3-PD (Abbad-Andaloussi et al., 1996). Los genes del operon *dha*, que permiten la conversión de glicerol a hidroxipropionaldehído y la reducción de este a 1,3-PD, fueron plenamente identificados en la cepa en estudio. Por otra parte, respecto al ciclo de ácidos tricarbónicos, cuya importancia para este género bacteriano radica en la formación de intermediarios metabólicos en lo que se conocen como reacciones anapleróticas, el microorganismo mostró características similares a las reportadas en los genomas de otros clostridios como *C. acetobutylicum* y *Clostridium ljungdahlii* (Nölling et al., 2001; Tan et al., 2013).

Por otra parte, al realizar un estudio básico de genómica comparativa en el que se analizaron 32 cepas de *Clostridium* en cuyo genoma se encontró el gen de la enzima *dhaT*, así como 51 clostridios pertenecientes al Cluster I y 105 dentro de las que se cuentan 101 listadas en LPSN, se determinó que a medida que se incrementa el número de cepas disminuye el número de genes *core*, lo que muestra la plasticidad genómica del género, tal y como se ha observado previamente en estudios de cepas patógenas (Hielm et al., 1998; Scaria et al., 2010). Esto resulta importante por cuanto dicha flexibilidad génica confiere a las bacterias ventajas adaptativas tales como la habilidad de colonizar diferentes nichos, utilizar diversos nutrientes y sobrevivir ante cambios ambientales repentinos (Udaondo et al., 2017; Udaondo et al., 2016).

El pangenoma abierto exhibido al analizar estos grupos de clostridios era lo esperado, ya que esta característica es típica de especies que se encuentran en ambientes variados tienen la capacidad y oportunidad de intercambiar material genético (Medini et al., 2005). Dentro del pangenoma, especialmente cuando se estudian aquellos abiertos, se considera que en promedio se puede encontrar alrededor de 10 a 30% de genes sin homólogos detectables dentro de la especie (genes únicos), los cuales generalmente no contribuyen a la aptitud (fitness) del organismo pero que si pueden ser reclutados ocasionalmente para desempeñar funciones biológicas (Wolf et al., 2016). Para el caso de *C. IBUN13A*, dentro de estos genes únicos se encontraron 2 pseudogenes. Este tipo de fenómenos son encontrados en los genomas parciales

generados por tecnologías de segunda generación como las utilizadas en este trabajo, los cuales pueden generar marcos abiertos de lectura (ORF) fragmentados debido a la existencia de múltiples contigs, lo que ocasiona por ejemplo que diferentes fragmentos se anoten por separado a pesar de ser parte de un mismo ORF (Klassen & Currie, 2012).

En general, vale la pena resaltar que se obtuvo la anotación funcional del genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A, parte del grupo taxonómico de *C. butyricum*, lo que permitió encontrar sus fenotipos metabólicos y por ende se constituye en un insumo para construir una red metabólica a escala genómica, así como la base para realizar análisis del transcriptoma teniendo una secuencia de referencia. Este desarrollo contribuye al establecimiento de una estrategia de ingeniería genética para incrementar los rendimientos de 1,3-PD.

2.5 Conclusiones

El genoma de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A evidenció su carácter quimiorganoheterotrófico, al mostrar el potencial de usar, además de carbohidratos simples, glicerol para producir 1,3-Propanodiol y para obtener energía y carbono, lo que pudo observarse al analizar la anotación funcional de las secuencias obtenidas. Dicha anotación se convirtió a su vez en un insumo importante para la construcción de una red metabólica a escala genómica. Así mismo, el análisis de la información de las secuencias analizadas y su comparación con otras de microorganismos del mismo género, ubican a *Clostridium* sp. IBUN13A dentro de la especie *Clostridium butyricum*, e igualmente demuestra que esta está estrechamente relacionada con las otras cepas de *Clostridium* secuenciadas en este trabajo. Al encontrarse un pan-genoma abierto al analizar desde 32 hasta 105 secuencias de clostridios, incluidas aquellas obtenidas en este estudio, permiten inferir que estas bacterias tienen la capacidad de adaptarse a cambios en el hábitat, debido a la plasticidad génica de este taxa. La información aquí obtenida proporciona una visión global de la fisiología de esta bacteria y se convierte en el punto de inicio para estudiar la expresión de genes de *Clostridium* sp. IBUN13A en diferentes condiciones y plantear nuevas estrategias de modificación genética basadas en biología de sistemas para el desarrollo de un bioproceso exitoso de producción de 1,3-PD.

2.6 Referencias

- Abbad-Andaloussi, S., Dürr, C., Raval, G., & Petitdemange, H. (1996). Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology*, *142*, 1149–1158.
- Amador-Noguez, D., Feng, X. J., Fan, J., Roquet, N., Rabitz, H., & Rabinowitz, J. D. (2010). Systems-level metabolic flux profiling elucidates a complete, bifurcated tricarboxylic acid cycle in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, *192*(17), 4452–4461.
- Arévalo, C., Arrieta, A., Aguilera, G., Aristizabal, F., & Montoya, D. (2002). Caracterización de cepas nativas colombianas de clostridios solventogénicos por perfiles plásmidos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, *31*(2), 51–60.
- Barragan, C. E., Gutierrez-Escobar, A. J., & Montoya Castaño, D. (2015). Computational analysis of 1,3-propanediol operon transcriptional regulators: Insights into *Clostridium* sp. Glycerol metabolism regulation. *Universitas Scientiarum*, *20*(1), 129–140.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. P., & Deckwer, W. D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *52*(3), 289–97.
- Biebl, H., & Spröer, C. (2002). Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *25*(4), 491–7.
- Bizukojc, M., Dietz, D., Sun, J., & Zeng, A.-P. (2010). Metabolic modelling of syntrophic-like growth of a 1,3-propanediol producer, *Clostridium butyricum*, and a methanogenic archeon, *Methanosarcina mazei*, under anaerobic conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *33*(4), 507–23.
- Brüggermann, H., & Gottschalk, G. (2008). Comparative Genomics of Clostridia: Link between the Ecological Niche and Cell. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1125*, 73–81.
- Calusinska, M., Hamilton, C., Monsieurs, P., Mathy, G., Leys, N., Franck, F., ... Wilmotte, A. (2015). Genome-wide transcriptional analysis suggests hydrogenase- and nitrogenase-mediated hydrogen production in *Clostridium butyricum* CWBI 1009. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 1–16.
- Calusinska, M., Happe, T., & Joris, B. (2010). The surprising diversity of clostridial hydrogenases : a comparative genomic perspective. *Microbiology*, *156*, 1575–1588.
- Cárdenas, D. P., Pulido, C., Aragón, Ó. L., Aristizabal, F. A., Suarez, Z., & Montoya Castaño, D. (2006). Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp . mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas*, *35*(1), 120–137.

- Chaudhari, N. M., Gupta, V. K., & Dutta, C. (2016). BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Scientific Reports*, 6, 24373.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., ... Farrow, J. A. E. (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 812–826.
- Comba González, N., Vallejo, A. F., Sánchez-Gómez, M., & Montoya, D. (2013). Protein identification in two phases of 1,3-propanediol production by proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, 89, 255–264.
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., & Rainey, F. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology - Vol 3: The Firmicutes*. Springer-Verlag New York Inc. (2nd ed.). New York: Springer.
- Dehoux, P., Marvaud, J. C., Abouelleil, A., Earl, A. M., Lambert, T., & Dauga, C. (2016). Comparative genomics of *Clostridium bolteae* and *Clostridium clostridioforme* reveals species-specific genomic properties and numerous putative antibiotic resistance determinants. *BMC Genomics*, 17, 819.
- Dürre, P. (2011a). Ancestral sporulation initiation. *Molecular Microbiology*, 80(3), 584–7.
- Dürre, P. (2011b). Fermentative production of butanol--the academic perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 331–6.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461.
- Hielm, S., Björkroth, J., Hyytiä, E., & Korkeala, H. (1998). Genomic analysis of *Clostridium botulinum* group II by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 703–708.
- Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50(4), 484–524.
- Karimi, K., Tabatabaei, M., Sárvári Horváth, I., & Kumar, R. (2015). Recent trends in acetone, butanol, and ethanol (ABE) production. *Biofuel Research Journal*, 2(4), 301–308.
- Klassen, J. L., & Currie, C. R. (2012). Gene fragmentation in bacterial draft genomes: Extent, consequences and mitigation. *BMC Genomics*, 13, 14.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Kwok, J. S. L., Ip, M., Chan, T.-F., Lam, W.-Y., & Tsui, S. K. W. (2014). Draft genome sequence of *Clostridium butyricum* strain NOR 33234, isolated from an elderly patient with diarrhea. *Genome Announcements*, 2(6), 7–8.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnology and Bioengineering*,

101(2), 209–28.

- Lehmann, D., Hönicke, D., Ehrenreich, A., Schmidt, M., Weuster-Botz, D., Bahl, H., & Lütke-Eversloh, T. (2012). Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(3), 743–54.
- Li, C., Wang, Y., Xie, G., Peng, B., Zhang, B., Chen, W., ... Zhang, B. (2016). Complete genome sequence of *Clostridium butyricum* JKY6D1 isolated from the pit mud of a Chinese flavor liquor-making factory. *Journal of Biotechnology*, 220, 23–24.
- Li, F., Hagemeyer, C. H., Seedorf, H., Gottschalk, G., & Thauer, R. K. (2007). Re-citrate synthase from *Clostridium kluyveri* is phylogenetically related to homocitrate synthase and isopropylmalate synthase rather than to Si-citrate synthase. *Journal of Bacteriology*, 189(11), 4299–4304.
- Ma, C., Kojima, K., Xu, N., Mobley, J., Zhou, L., Yang, S.-T., & Liu, X. (Margaret). (2014). Comparative proteomics analysis of high n-butanol producing metabolically engineered *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology*.
- Manzoor, S., Schnürer, A., & Bongcam-rudloff, E. (2018). Genome-Guided Analysis of *Clostridium ultunense* and Comparative Genomics Reveal Different Strategies for Acetate Oxidation and Energy Conservation in Syntrophic Acetate-Oxidising Bacteria. *Genes*, 9(4), 225.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(6), 589–594.
- Mo, S., Kim, B. S., Yun, S. J., Lee, J. J., Yoon, S. H., & Oh, C. H. (2015). Genome sequencing of *Clostridium butyricum* DKU-01, isolated from infant feces. *Gut Pathogens*, 7, 8.
- Montoya, D., Arévalo, C., Gonzales, S., Aristizabal, F., & Schwarz, W. H. (2001). New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27(5), 329–35.
- Montoya, D., Perdomo, L., Arévalo, C., Aristizabal, F., & Schwarz, W. (1999). Caracterización de cepas nativas de *Clostridium* spp por secuenciación parcial del gen ribosomal 16s rARN. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 35–39.
- Montoya, D., Spitia, S., Silva, E., & Schwarz, W. H. (2000). Isolation of mesophilic solvent-producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 79(2), 117–26.
- Montoya, J. D. (2012). *Metabolic engineering of the Colombian strain Clostridium sp . IBUN 158B in order to improve the bioconversion of glycerol into 1 , 3-propanediol*. Ulm University.
- NCBI. (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D8–D13.

- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M., Makarova, K., Gibson, R., Qiandong, Z., ... Smith, D. (2001). Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 183(16), 4823–4838.
- Parte, A. C. (2018). LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature (Bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(6), 1825–1829.
- Patakova, P., Linhova, M., & Rychtera, M. (2013). Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia: *Clostridium* metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnology Advances*, 31(1), 58–67.
- Pérez-Mancilla, X., Rosas, J. P., & Montoya Castaño, Dolly Riaño-Pachón, D. (2017). Genomic Analyses of *Clostridium* strains with Biotechnological Potential in Production of Solvents. In *Simposio de Investigación de Posgrados en Biotecnología UN - Libro de resúmenes* (p. 49). Bogotá: Editorial UN. E-ISSN : 2619-4503
- Perez Mancilla, X. (2009). *Estandarización de la Concentración de Glicerol Industrial y de la Fuente de Nitrógeno en el Medio de Cultivo para la Producción de 1,3-Propanodiol utilizando una Cepa Nativa de Clostridium sp*. Universidad Nacional de Colombia.
- Poehlein, A., Solano, J. D. M., Flitsch, S. K., Krabben, P., Winzer, K., Reid, S. J., ... Dürre, P. (2017). Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–15.
- Quilaguy Ayure, D. M., Suárez Moreno, Z. R., Aristizábal Gutierrez, F. A., Bernal Morales, J. M., & Montoya Castaño, D. (2006). Genome analysis of thirteen Colombian clostridial strains by pulsed field gel electrophoresis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(5). Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582006000500009&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Rosas-Morales, J. P. (2015). *Anotación del genoma de Clostridium sp. IBUN 13A a partir de su secuencia parcial*. Universidad Nacional de Colombia.
- Rosas-Morales, J. P., Perez-Mancilla, X., López-Kleine, L., Montoya Castaño, D., & Riaño-Pachón, D. M. (2015). Draft genome sequences of clostridium strains native to Colombia with the potential to produce solvents. *Genome Announcements*, 3(3), e00486-15.
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering Design and Selection*, 12(2), 85–94.
- Saxena, R. K., Anand, P., Saran, S., & Isar, J. (2009). Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, 27(6), 895–913.
- Scaria, J., Ponnala, L., Janvilisri, T., Yan, W., Mueller, L. A., & Chang, Y. F. (2010). Analysis of ultra low genome conservation in *Clostridium difficile*. *PLoS ONE*, 5(12), e15147.

- Serrano-Bermúdez, L. M., González Barrios, A. F., Maranas, C. D., & Montoya, D. (2017). *Clostridium butyricum* maximizes growth while minimizing enzyme usage and ATP production: Metabolic flux distribution of a strain cultured in glycerol. *BMC Systems Biology*, 11, 58.
- Stabler, R. a, He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., ... Wren, B. W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biology*, 10(9), R102.
- Tan, Y., Liu, J., Chen, X., Zheng, H., & Li, F. (2013). RNA-seq-based comparative transcriptome analysis of the syngas-utilizing bacterium *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 grown autotrophically and heterotrophically. *Molecular BioSystems*, 9(11), 2775.
- Udaondo, Z., Duque, E., & Ramos, J. L. (2017). The pangenome of the genus *Clostridium*. *Environmental Microbiology*, 19(7), 2588–2603.
- Udaondo, Z., Molina, L., Segura, A., Duque, E., & Ramos, J. L. (2016). Analysis of the core genome and pangenome of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3268–3283.
- Williamson, C. H. D., Sahl, J. W., Smith, T. J., Xie, G., Foley, B. T., Smith, L. A., ... Hill, K. (2016). Comparative genomic analyses reveal broad diversity in botulinum-toxin-producing *Clostridia*. *BMC Genomics*, 17, 180.
- Wolf, Y. I., Makarova, K. S., Lobkovsky, A. E., & Koonin, E. V. (2016). Two fundamentally different classes of microbial genes. *Nature Microbiology*, 2(3), 1–6.
- Xin, B., Tao, F., Wang, Y., Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2013). Genome Sequence of *Clostridium butyricum* Strain DSM1072, a Promising producer of Biofuels and Biochemicals. *Genome Announcements*, 1(4), e00563-13.
- Yoon, S. H., Ha, S. min, Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(10), 1281–1286.
- Zeng, A. (1996). Pathway and kinetic analysis of 1, 3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Engineering*, 14, 169–175.
- Zeng, A., & Biebl, H. (2002). Bulk Chemicals from Biotechnology : The Case of 1, 3-Propanediol Production. *Advances in Biochemical Engineering*, 74, 239–259.
- Zhou, C., Ma, Q., Mao, X., & Liu, B. (2014). New Insights into *Clostridia* Through Comparative Analyses of Their 40 Genomes. *BioEnergy Research*, 7(4), 1481–1492.

Capítulo 3. Predicción de fenotipos metabólicos de *clostridium* sp. ibun13a que incrementen la producción de 1,3-propanodiol²

Perez-Mancilla Ximena C.¹, Riaño-Pachón Diego M², Serrano-Bermúdez Luis M.¹, Montoya Castaño Dolly¹.

¹. Instituto de Biotecnología (IBUN), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

². Laboratório de Biologia Computacional, Evolutiva e de Sistemas, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Resumen

La secuenciación del genoma parcial del microorganismo aislado de suelos colombianos *Clostridium* sp. IBUN13A dio lugar a la obtención de una red metabólica a escala genómica en la que se evaluó el efecto de diferentes perturbaciones sobre el rendimiento de 1,3-Propanodiol a partir de glicerol. Dicha red, denominada por sus autores como iCbu641 fue utilizada en el presente estudio con el fin de predecir fenotipos metabólicos de triples mutantes que permitan incrementar los rendimientos de este diol. Esta reconstrucción mostró una distribución libre de escala, tal y como se esperaba para este tipo de red, y además, al reconciliar la información de la con la anotación funcional del genoma se encontraron nuevas posibles asociaciones de genes de esta bacteria a 31 reacciones. Se predijeron 5242 posibles mutantes triples, para las que 2 mostraron aumento en el rendimiento en 2,26%, pero los flujos de las reacciones metabólicas no cambiaron significativamente sino en dos reacciones de intercambio, por lo que se

²En este capítulo se trata el segundo objetivo específico de este trabajo, que consistía fundamentalmente en simular fenotipos metabólicos capaces de incrementar la producción de 1,3-Propanodiol

considera la necesidad de considerar otra estrategia para incrementar los rendimientos con miras a la producción industrial del compuesto de interés. Sin embargo, ya que estas reacciones muestran que una menor liberación de los coproductos hidrógeno y formato podría influir sobre los rendimientos, se recomienda prestar atención a las reacciones conducentes a su producción por cuanto inciden en el flujo de electrones, fundamental en la producción de energía y biomasa en microorganismos anaeróbicos.

Palabras clave: *Clostridium*, genoma, reconstrucción metabólica, modelo metabólico a escala genómica

LISTADO DE ABREVIATURAS

1,3-PD	1,3-Propanodiol
ABE	acetona, butanol y etanol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
COBRA	COntstraint-Based Reconstruction and Analysis
DhaB1	Glicerol deshidratasa
DhaB2	Proteína activadora de la glicerol deshidratasa
DhaT	1,3-Propanodiol deshidrogenasa
E.C	<i>Enzyme Commission</i>
FVA	Análisis de Variabilidad de Flujo
GAMS	General Algebraic Modeling System
GEMs	Modelos metabólicos a escala genómica
IBUN	Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
mARN	ARN mensajero
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
ROOM	Estrategia de minimización de regulación on/off
Ton	Tonelada
US Dollars.	Dólares americanos
$Y_{1,3-pd}$	Rendimiento de producción de 1,3-PD respecto al consumo de glicerol como fuente de carbono

3.1 Introducción

Debido a la disminución de reservas de combustibles fósiles, se ha incrementado el interés por obtener, a partir de fuentes renovables, compuestos como el biodiesel, del que se estima una producción mundial hacia 2020 de $110 \cdot 10^9$ L (Rodrigues, Bordado, & Dos Santos, 2017). En el proceso de transesterificación para obtener este compuesto por medio de aceites de origen animal o vegetal, se obtienen el éster y glicerol crudo en una relación 10:1, aumentando la oferta de este último. El uso de este subproducto,

importante no solo para rentabilizar la industria del biodiesel sino para aliviar su manejo como desecho, se torna no viable económicamente si es purificado, por lo que la investigación se ha basado en el uso como sustrato para la producción de compuestos con mayor valor agregado (Vivek *et al.*, 2017).

El uso de microorganismos como fábricas para obtener compuestos químicos a partir de sustratos renovables, e.g. glicerol, se considera una alternativa atractiva, aunque debe ser mejorada para que pueda ser económicamente viable. Por lo general, se utilizan microorganismos modelo de los cuales existe un vasto conocimiento acerca de su genoma y metabolismo, para poder aplicar estrategias de biología de sistemas que permitan entender y predecir comportamientos y así incrementar los títulos, rendimientos y/o productividades de estas células-fábricas (Campbell, Xia, & Nielsen, 2017). Dentro de estas herramientas se encuentran los modelos metabólicos a escala genómica (GEMs), los cuales aprovechan la información generada por la secuenciación de genomas además de ser enriquecidas con datos provenientes de otras -ómicas, y han permitido obtener estimaciones sobre el desempeño de mutantes antes de implementar estrategias de modificación genética en el organismo foco de estudio (Xu, Ye, & Liu, 2018).

El género *Clostridium* se puede considerar una alternativa viable para implementar el concepto de célula como fábrica de síntesis química, ya que cumple con diversos requisitos importantes tales como: (1) hay disponibilidad de genomas completos, concretamente 129 a octubre de 2018 (NCBI, 2018); (2) es capaz de degradar una amplia diversidad de sustratos y de tolerar contaminantes de los mismos (Tracy *et al.*, 2012); (3) hay desarrollos importantes en la aplicación de herramientas de modificación e ingeniería genética en este género que van desde la mutagénesis al azar hasta la edición genómica (Joseph, Kim, & Sandoval, 2018); y, (4) a partir de esta ya hay una tecnología de fermentación implementada (fermentación ABE) desde la que se ha acumulado un vasto conocimiento fisiológico (Jones & Woods, 1986); entre otros (Charubin *et al.*, 2018).

Dentro de toda la diversidad metabólica de *Clostridium*, el uso de glicerol como fuente de carbono por medio de cepas como *Clostridium butyricum* es de importancia debido a la posibilidad de instaurar una biorrefinería en la que se aproveche este sustrato, subproducto de la producción de biodiesel, para la producción de 1,3-PD (1,3-Propanodiol). Esta fermentación es ampliamente conocida, ya que se descubrió desde

1881 y hacia los años 1960s se estudiaron las enzimas involucradas (Biebl *et al.*, 1999). Se ha descrito que el microorganismo sigue dos rutas, una oxidativa en la que se convierte en el intermediario de la ruta glicolítica dihidroxiacetona, y una reductiva en la que puede, por medio de la enzima glicerol deshidratasa y su proteína activadora (DhaB1 y DhaB2), deshidratarse para producir 3-hidroxi propionaldehído, que a su vez se reduce para producir 1,3-PD por medio de la enzima 1,3-propanodiol deshidrogenasa (DhaT) (Raynaud *et al.*, 2003; Zeng, 1996). Respecto a los estudios del metabolismo de esta bacteria, vale la pena destacar que en el año 1996 Zeng publicó un análisis teórico de la estequiometría del consumo de glicerol y la cinética de formación de productos, así como de forma más reciente Bizukoje y colaboradores en 2010 desarrollaron un modelo metabólico para la producción de 1,3-PD y metano en un cultivo sintrófico de *C. butyricum* y *Methanosarcina mazei*, en el que construyeron una red para el primer microorganismo que contemplaba 77 reacciones y 69 metabolitos dentro de las que se contaban aquellas del metabolismo central incluida la ruta reductiva de 1,3-PD y las del metabolismo anabólico de aminoácidos.

El grupo de investigación de Bioprocesos y Bioprospección obtuvo la secuencia del genoma de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A (Rosas-Morales *et al.*, 2015; Capítulo 2), de la cual se conoce su capacidad de producir 1,3-PD, y a partir de allí se obtuvo una red metabólica a escala genómica llamada iCbu641 (Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017). En este trabajo se propuso predecir fenotipos metabólicos de triples mutantes de *Clostridium* sp. IBUN13A que permitan incrementar los rendimientos de 1,3-PD, así como hacer uso de la información genómica generada previamente en conjunto con iCbu641 para establecer posibles candidatos de modificación genética que permitan mejorar este proceso biotecnológico.

3.2 Métodos

3.2.1 Análisis del genoma accesorio de *Clostridium* sp. IBUN13A

Respecto a la red iCbu641: Tomando los resultados expuestos en el apartado 2.3.2 del capítulo anterior, se relacionó cada secuencia perteneciente al genoma accesorio de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A al ser comparada con otras 31 con el respectivo código E.C. asignado en la anotación. A partir de allí, por medio de Microsoft Excel® 2016, se realizaron comparaciones con el modelo previamente obtenido dentro del grupo de

investigación iCbu641 (Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017), el cual hizo uso de la información genómica obtenida previamente en el marco de este trabajo.

3.2.2 Predicción de triples mutantes knockout :

Se utilizó la red creada por el grupo de investigación basada en el genoma, para la cual ya se habían generado knockouts sencillos y dobles (Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017). A partir de esto se escogieron las combinaciones entre mutantes sencillas y dobles previamente predichas que mostraran rendimientos de 1,3-PD iguales o superiores a la cepa nativas y se generaron simulaciones de triples mutantes por medio de la estrategia de minimización de regulación on/off ROOM (función objetivo: maximización de biomasa vs minimización de uso enzimático) utilizando una modificación del código previamente escrito por Serrano-Bermúdez, en el software GAMS (General Algebraic Modeling System, GAMS Development Corp., Washington, DC) V.24.2., y resuelto por medio del solver CPLEX 12.6.0.0. Los datos se analizaron con Microsoft Excel® 2016.

3.2.3 Topología de la red metabólica:

Se obtuvo la red en el formato necesario por medio de la función `outputNetworkCytoscape` incluida en la suite COBRA dentro del software MatLab® 2013b (Hyduke *et al.*, 2011; Schellenberger *et al.*, 2011). Posteriormente la red fue analizada utilizando Cytoscape versión 3.5.1 (Shannon *et al.*, 2003) y se observó la distribución de los grados de los nodos por medio del paquete `powerLaw` de R, según lo recomendado por el autor (Gillespie, 2015).

3.3 Resultados y discusión

Dentro del marco de este proyecto se propuso predecir fenotipos metabólicos de *Clostridium* IBUN13A para la producción de 1,3-Propanodiol a partir de glicerol. Previamente se trabajó en el ensamblaje y anotación de la cepa en estudio, además de otras tres, lo cual se expone en el capítulo 2, e igualmente se publicó en el artículo: Rosas-Morales J., Perez-Mancilla X., López-Kleine L., Montoya Castaño D., & Riaño-Pachón D. Draft Genome Sequences Of *Clostridium* Strains Native To Colombia With The Potential To Produce Solvents, 2015. *Genome Announcements* 3(3):e00486-15.

3.3.1 Análisis del genoma accesorio de *Clostridium* sp. IBUN13A respecto a la red iCbu641

Inicialmente y tal y como se menciona en el apartado 2.3.2 del anterior capítulo, se identificó el genoma accesorio de la cepa IBUN13A respecto a las otras 31 con las que fue comparada. Para estas secuencias codificantes se encontraron 1181 que contenían códigos enzimáticos asignados por la anotación funcional, que corresponden a un total de 614 enzimas. Dentro de estas, 308 fueron incluidas dentro de la red publicada previamente en el grupo de investigación, denominada iCbu641 (Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017). La mayoría de dichas enzimas se encuentran asociadas a rutas de metabolismo de aminoácidos y carbohidratos (Figura 3-1).

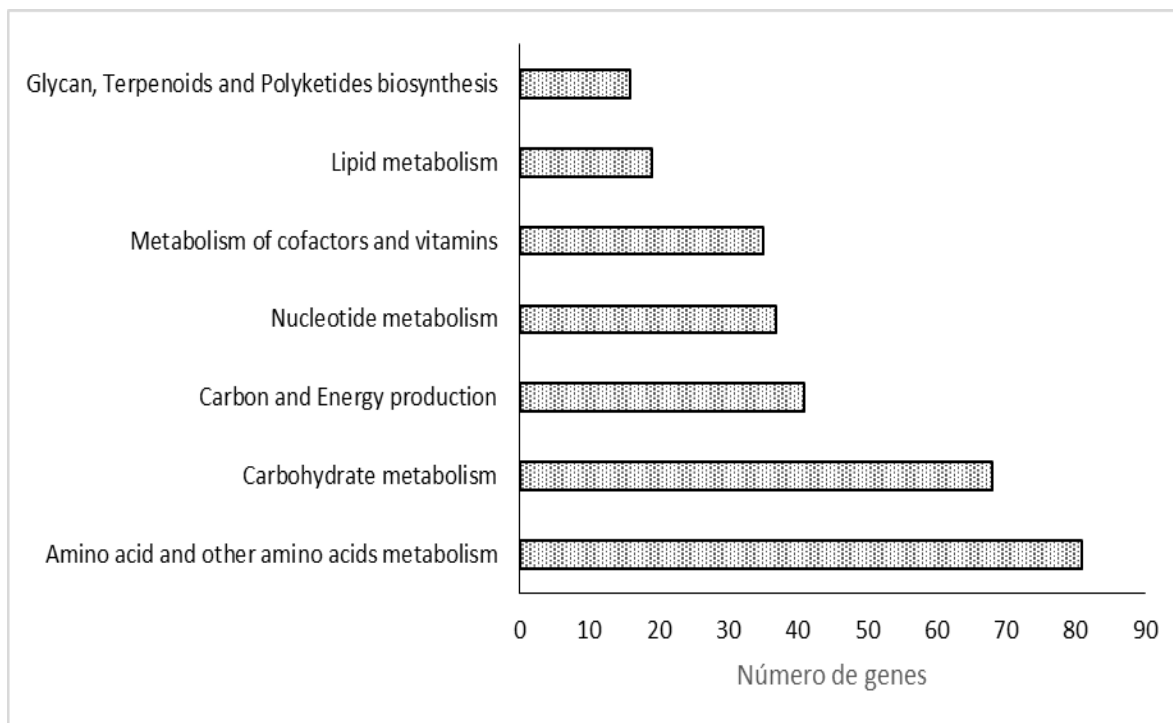


Figura 3-1. Rutas asociadas a las enzimas del genoma accesorio de *Clostridium* sp. IBUN13A presentes en la red iCbu641.

En este mismo estudio de Serrano y colaboradores en 2017 se realizaron simulaciones para determinar el efecto en el rendimiento de 1,3-PD de mutaciones sencillas bajo

limitación de glicerol, para lo que se consideraron 145 enzimas. Al comparar con la información relacionada con las enzimas presentes en el genoma accesorio de IBUN13A, se observó que 127 de ellas fueron simuladas como deleciones sencillas y 7 arrojaron resultados mayores de rendimientos respecto a la cepa tipo (entre 0.5 y 0.71 % - Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Proteínas del genoma accesorio de *C. IBUN13A* con rendimientos relativos mayores a la cepa tipo al simular mutantes sencillas. El rendimiento relativo de producción de 1,3-PD bajo limitación de sustrato ($Y_{1,3-pd}$ relativo) se obtuvo de Serrano-Bermúdez et al., 2017.

Código E.C	ID proteína	Función	$Y_{1,3-pd}$ relativo
1.1.1.42	KJZ90084.1, KJZ90136.1	isocitrato deshidrogenasa	100.53
5.1.1.1	KJZ91965.1	alanina racemasa	100.69
2.7.1.56	KJZ95164.1	1-fosfofructoquinasa	100.71
4.1.2.4	KJZ93315.1, KJZ92183.1	Desoxirribosa-fosfato aldolasa	100.69
1.1.1.205	KJZ97272.1	inosina-5 -monofosfato deshidrogenasa	100.61
1.2.1.8	KJZ84506.1	betaína- aldehído deshidrogenasa	100.71
3.1.3.5	KJZ90315.1	5 -nucleotidasa	100.69

La predicción de mutantes por medio de modelos metabólicos a escala genómica se constituye en una herramienta de interés para encontrar nuevos blancos de modificación genética, y ha sido utilizada en especies como *C. thermocellum* en la producción de etanol (Dash & Maranas, 2016; Roberts et al., 2010). En este estudio, se encontraron las 7 enzimas previamente mencionadas (Tabla 3-1) que al ser eliminadas *in silico* (Serrano-Bermúdez et al., 2017) lograron incrementar de manera incipiente el rendimiento del producto respecto a la cepa sin modificar. En su mayoría estas enzimas están vinculadas al metabolismo de purinas, pirimidinas, aminoácidos y aminoazúcares (por ende, a la formación de peptidoglicano), pero no son fundamentalmente necesarias para el crecimiento por cuanto su deleción no implicó letalidad, lo que significa que probablemente se desvía parte del carbono que no es estrictamente necesario para la formación de biomasa a la formación de 1,3-PD causando dicho aumento. Estas enzimas fueron contempladas en las simulaciones descritas en el siguiente apartado (3.3.2).

3.3.2 Predicción de fenotipos metabólicos de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A para producir 1,3-Propanodiol

Para llevar a cabo este análisis se utilizó la red iCbu641, que se basó en la anotación de genes para *Clostridium* sp. IBUN13A así como otras redes de clostridios solventogénicos e incluye 891 reacciones, 701 metabolitos y 641 genes (Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017). Para realizar las simulaciones se consideraron rendimientos de 1,3-PD de 0,588 g/g y de biomasa de 0,006 g/g. Después de escoger las enzimas a ser evaluadas en la simulación de acuerdo con lo expuesto en el apartado 3.2.2, en total se produjeron 5242 mutantes a partir de 73 enzimas, cuya distribución de acuerdo con el subsistema al que pertenecen se muestra en la **Figura 3-2**. Se puede observar que la mayoría de las enzimas que contribuyeron a mantener o incrementar el rendimiento de propanodiol en las simulaciones previas de mutantes sencillas y dobles, y por ende en las predicciones de mutantes triples, corresponden al metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos.

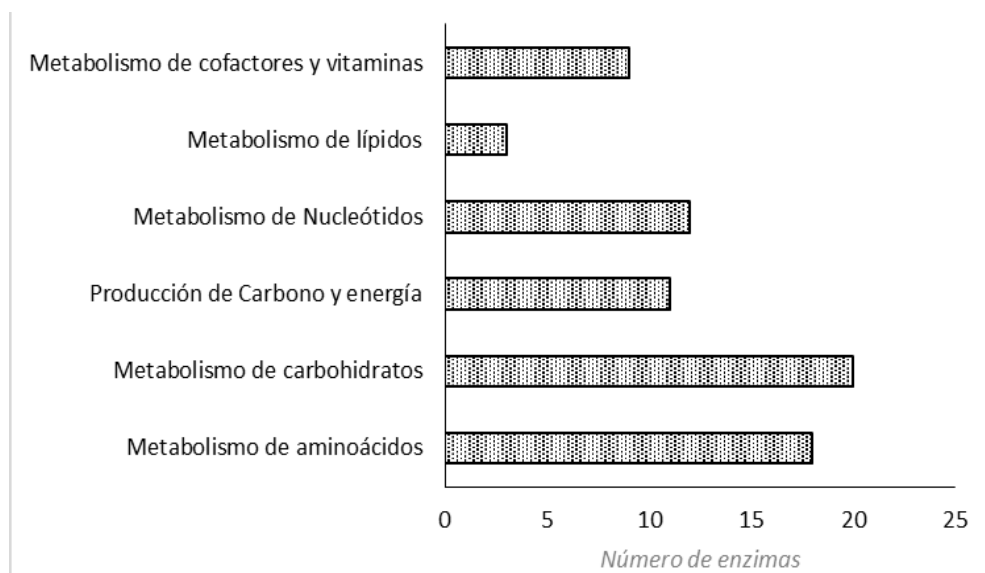


Figura 3-2. Distribución de las enzimas de las triples mutaciones simuladas de acuerdo con los subsistemas a los que pertenecen.

Aunque se encontró un importante número de mutantes triples que superaban el valor de rendimiento de propanodiol (Figura 3-3), este incremento no fue superior al 2,26%. De acuerdo con un análisis financiero de la producción biotecnológica de 1,3-Propanodiol realizado en 2015 (Corpodib & Grupo Bioprocesos y Bioprospección, 2015), donde se

planteó un escenario en el cual a partir de 15000 Ton /año de glicerol suministradas por una planta productora de Biodiesel se produjeran alrededor de 6900 Ton/ año de 1,3-Propanodiol, se determinó un punto de equilibrio económico en dólares de \$23417380 US Dollars. Allí mismo se reporta que para 2016 el precio de venta del diol en China alcanzó valores entre \$1500 y 1600 US Dollars, lo que significaría que el punto de equilibrio económico se alcanzaría después de 2 años de iniciada la producción. Bajo las condiciones obtenidas con la cepa nativa *Clostridium* sp. IBUN13A, a partir de la misma cantidad de glicerina se obtendrían 8820 toneladas de 1,3-PD, y con las triples mutantes aquí escogidas serían 9030 Ton, asumiendo que se pudiera recuperar el 100% de lo producido por el método de separación escogido, lo que significaría una venta total de \$13230000 o \$13545000 US Dollars respectivamente en el primer año, alcanzando en ambos casos el equilibrio a los 21 meses aproximadamente. Vale la pena aclarar que para poder determinar los costos de producción y la rentabilidad de este proceso es necesario tener en cuenta parámetros tales como la estrategia de fermentación y de separación que se usarían a escala industrial, así como el valor de la materia prima, que en procesos biotecnológicos tiende a ser significativo dentro de los costos totales.

Al comparar los flujos de la cepa nativa respecto a las triples mutantes se pudo observar que tal y como se esperaba, la producción de metabolitos que compiten con la ruta del propanodiol como el ácido butírico y el etanol disminuye, pero otros metabolitos como el hidrógeno molecular, ácido láctico y ácido acético aumentan. Las dos mutantes con mayores rendimientos corresponden a aquellas donde se eliminaron las enzimas 1.1.1.205 (inosina-5-mono fosfato deshidrogenasa- Metabolismo de purinas) y 4.1.2.4 (Desoxirribosa fosfato aldolasa – Pentosas Fosfato) ya sea con la enzima 1.1.1.95 (fosfoglicerato deshidrogenasa – Metabolismo de Glicina, Serina y Treonina) o con la enzima 2.6.1.52 (fosfoserina transaminasa - Metabolismo de Glicina, Serina y Treonina). (Figura 3-4). Al observar de forma global los flujos de cada una de las reacciones simuladas para estas dos mutantes respecto a los flujos de la cepa nativa, para 462 de las 891 reacciones de la red se observó un cambio en el flujo. Sin embargo, al analizar los datos de análisis de variabilidad de flujo (FVA) publicados previamente (Serrano-Bermúdez et al., 2017), se puede observar que tan solo las reacciones de intercambio de ácido fórmico e hidrógeno tuvieron cambios que se encontraban por fuera de los límites mínimo y máximo de los flujos simulados para la cepa nativa. Esto nos indica que

debemos buscar otra metodología de mejoramiento clásico o racional para incrementar rendimiento y productividad. Sin embargo, ya que la producción de ácido fórmico e hidrógeno son importantes en el flujo de electrones en anaerobios estrictos como los microorganismos de este género, se deberían considerar como blanco de manipulación las enzimas que contribuyen a su formación.

A lo largo de los últimos años el grupo de investigación ha realizado esfuerzos para incrementar los rendimientos y/o productividades de las cepas aisladas de suelos colombianos con potencial para consumir glicerol y producir 1,3-PD. Se ha investigado sobre el proceso fermentativo al evaluar sistemas de cultivo por lote y lote alimentado, estandarizar el medio de cultivo y diseñar estrategias de escalamiento del proceso (Aragon, 2007; Cárdenas et al., 2006; Perez Mancilla, 2009). Así mismo, se han desarrollado aproximaciones de mutagénesis sitio dirigida para inactivar genes propios de la ruta oxidativa de consumo de glicerol, cuyos resultados no han mostrado incrementos sustanciales en la producción del diol (Bernal, n.d.; Montoya, 2012), lo que es concordante con simulaciones previas de mutantes sencillas realizadas previamente (Serrano-Bermúdez et al., 2017). Es importante destacar entonces que el uso de un modelo metabólico para probar hipótesis *in silico* sobre el diseño de cepas triples mutantes knockout que contribuyan con el fin biotecnológico de obtener mayores rendimientos de 1,3-PD, permiten disminuir costos y tiempo invertido en experimentación en el laboratorio.

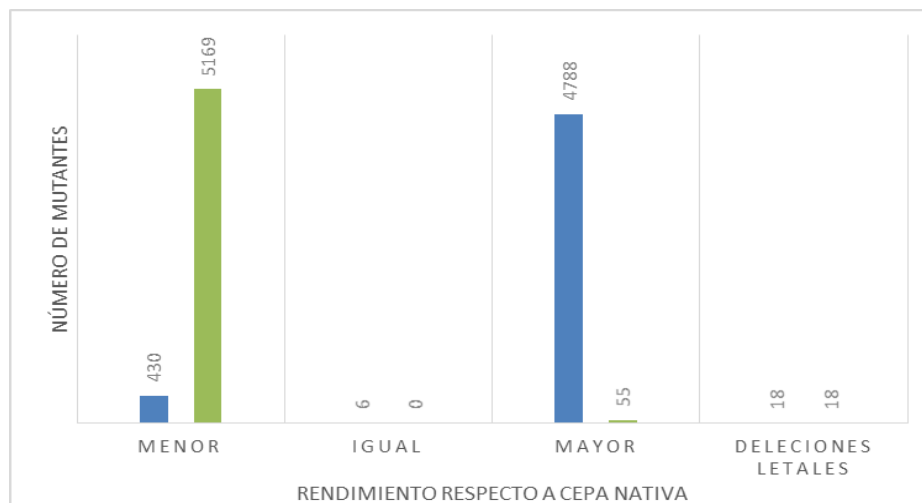


Figura 3-3 Comparación de los rendimientos de 1,3-PD ($Y_{1,3-pd}$) (barras azules) y biomasa ($Y_{1,3-pd}$) (barras verdes) a partir de glicerol respecto a la cepa sin modificar. Menor: Valores más bajos que la cepa nativa, Igual: valores idénticos que la cepa nativa, Mayor: valores más altos que la cepa nativa y, deleciones letales: que causarían la muerte celular.

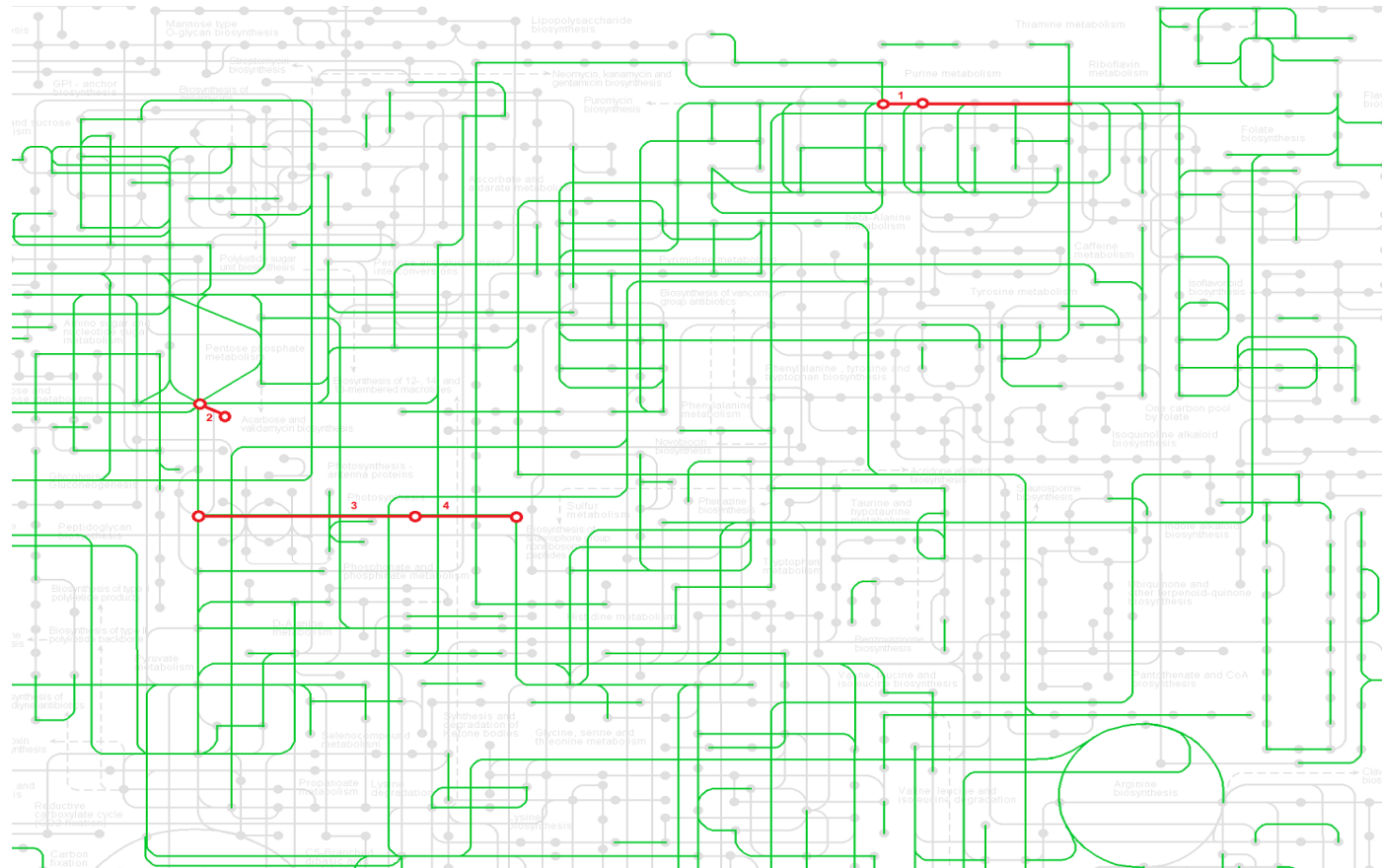


Figura 3-4. Ubicación de las enzimas de las triples mutantes con mayores rendimientos dentro de fragmento del mapa metabólico de *Clostridium butyricum*. (1) 1.1.1.205, (2) 4.1.2.4, (3) 1.1.1.95 y (4) 2.6.1.52

3.3.3 Análisis de la topología de la red metabólica iCbu641:

A partir de la red metabólica iCbu641 se obtuvo un grafo bipartito con 1021 nodos entre compuestos y reacciones, después de eliminar el metabolito agua de esta, que se consideró como no dirigido para poder establecer los parámetros topológicos básicos. Por medio de Cytoscape se obtuvo el grado de los nodos, para los cuales se evaluó la distribución que seguían (**Figura 3-5**). La prueba de hipótesis evaluada por medio del paquete *powerLaw* no permite descartar la hipótesis de que la distribución del grado de conectividad en la red sigue una ley de potencia, (valor $p= 0,68$); lo cual es concordante al ajustar los datos con las distribuciones exponencial (valor $p= 0,007$) y Poisson (valor $p= 0,0005$). Sin embargo, al comparar esta distribución con la Log-normal se pudo observar que ninguna de las dos distribuciones se favorece sobre la otra (valor $p = 0.649$). Esta última, así como la ley de potencia, es una distribución de cola larga (*long tailed distribution*). Esta red mostró que el mayor número de pasos a seguir al conectar dos nodos de esta es de 11 (diámetro). El porcentaje centralización de la red (*Network Centralization*), que muestra la posibilidad de ver la red como centralizada por un único nodo que se conecta con los demás es de 13%. Así mismo, la longitud característica de ruta (*Characteristic Path Length*) es de 4,41.

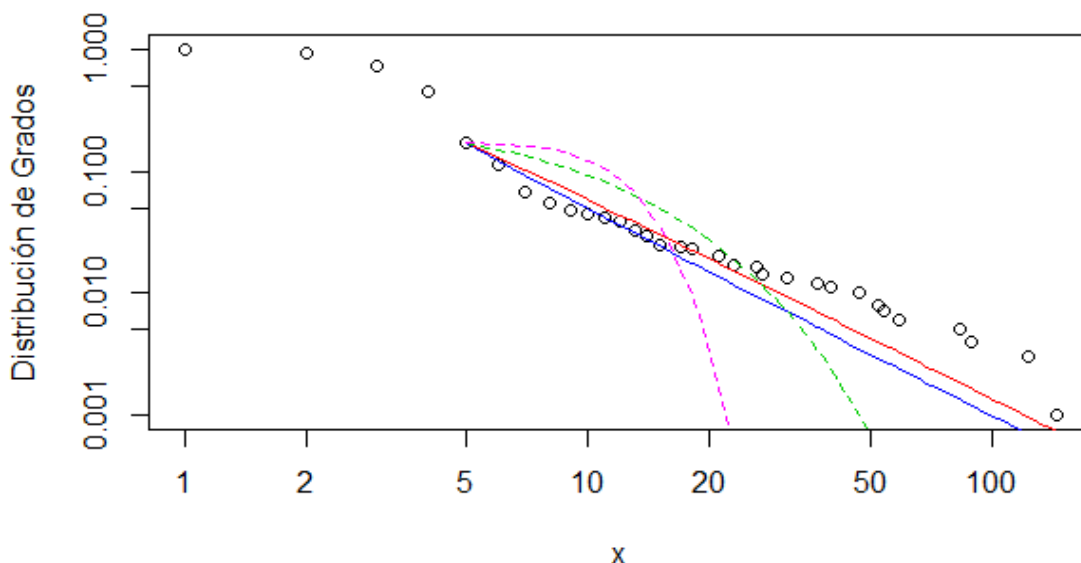


Figura 3-5. Distribución de los grados de la red no dirigida iCbu641. Obtenido por medio del análisis con el paquete *powerLaw* de R. Las posibles distribuciones se identifican como Azul: Power law, rojo: Log normal, verde punteado: exponencial y fucsia punteado: Poisson.

3.3.4 Propuesta de refinamiento de la red iCbu641 para la simulación del metabolismo de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A

Con base en la anotación automática con RAST de la cepa IBUN13A (capítulo 2), se obtuvieron las reacciones que podrían ser llevadas a cabo por el microorganismo con las enzimas encontradas dentro del genoma, y se comparó dicha información con la red iCbu641. Se encontraron 514 reacciones comunes y 137 reacciones nuevas dentro de la anotación. Así mismo se determinó que en iCbu641 se contemplaban 189 reacciones que no estaban en las establecidas con RAST. Un punto de importancia radica en que para 31 de las 59 reacciones incluidas por medio de *gap-filling* en iCbu641 se encontraron posibles genes asociados dentro de la anotación funcional realizada por el grupo, correspondientes a 23 proteínas como se puede observar en la **Tabla 3-2**. Esto podría contribuir en la completitud de la red y en la posterior inclusión de las asociaciones gen-reacción a iCbu641.

Tabla 3-2. Enzimas asociadas a reacciones adicionadas por gap-fill en la red iCbu641 y las proteínas correspondientes encontradas en la anotación del genoma de *Clostridium* IBUN13A.

Código enzima	REACCIONES iCbu641	Códigos RefSeq proteínas asociadas
1.2.1.2	R00519	WP_043853792.1
1.2.7.1	R01196	WP_046058067.1 WP_043853313.1 WP_046057453.1
1.3.1.44	R01171	WP_002579902.1 WP_046057974.1
2.3.1.16	R03778 R03991 R04742 R04747 R03858	WP_002582294.1
2.3.1.30	R00586	WP_002582125.1
2.3.1.8	R00230	WP_002579598.1
2.7.1.15	R01051	WP_043853828.1
2.7.1.21	R01567 R02099	WP_002582303.1
3.5.4.3	R01676	WP_003432670.1
4.1.1.21	R04209	WP_002579500.1
5.3.1.16	R04640	WP_002580921.1
1.A.1	T016	WP_045144726.1
1.A.35	T048	WP_002582575.1 WP_003411831.1
2.A.19	T036	WP_003409595.1
2.A.20	T028	WP_046058954.1
2.A.3.1	T035 T044 T056	WP_046057929.1 WP_080646779.1
2.A.53	T053	WP_003433175.1

Código enzima	REACCIONES iCbu641	Códigos RefSeq proteínas asociadas
3.6.1.3 3.6.3.19 3.6.1.15 3.6.3.18	T013	WP_003432676.1 WP_002581922.1 WP_002579819.1 WP_003406357.1 WP_046057939.1 WP_002579818.1 WP_046057940.1 WP_046058506.1 WP_002579820.1 WP_045143772.1
3.6.1.15	T004	WP_046057831.1 WP_003429548.1 WP_002582248.1 WP_003408971.1
3.6.1.3 3.6.3.19 3.6.1.15 3.6.3.18	T061 T014	WP_003432676.1 WP_002581922.1 WP_046058087.1 WP_081044150.1 WP_046058127.1 WP_002580342.1 WP_003432678.1 WP_002581697.1 WP_002581696.1 WP_003412019.1
3.A.1.3	T007	WP_003433351.1 WP_046057608.1 WP_003409525.1
3.A.1.7	T002	WP_002579563.1 WP_002579561.1 WP_002579562.1 WP_002579560.1
3.6.1.3 3.6.3.3 3.6.1.15 3.6.3.4	T037	WP_046057559.1 WP_046057586.1 WP_082076421.1

Así mismo, con el fin de refinar la red de acuerdo con los requerimientos de *Clostridium butyricum* para la formación de biomasa, se indagó sobre la ecuación de componentes de biomasa (Anexo 2A) y sobre la posibilidad de expandir las reacciones de producción de lípidos de membrana, basados en la información de la composición de estos para dicha bacteria establecida en literatura previamente (Goldfine & Johnston, 2005). Esta contribución es propuesta con el fin de contribuir al mejoramiento de la capacidad predictiva del modelo. Dentro de la red iCbu641 se encuentran documentadas 7 reacciones generales dentro del subsistema de metabolismo de lípidos que darían lugar a los precursores de los componentes de membrana, para las que se encontraron 45 posibles reacciones para reemplazarlas. Estas se encuentran listadas en el Anexo 2B.

3.4 Conclusiones

Al integrar la información obtenida por medio del estudio de genómica comparativa de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A, se logró determinar que dentro del genoma accesorio de esta se encontraron 308 enzimas contempladas en la red metabólica a escala genómica iCbu641, de las cuales 7 mostraron rendimientos de producción de 1,3-Propanodiol mayores a la cepa tipo cuando se simuló su mutación por *knock-out* en un estudio previo. Así mismo, los respectivos bloqueos a las reacciones metabólicas por medio de

simulación de triples mutantes no aumentaron en más de 2,26% el rendimiento de 1,3-PD, y únicamente la reacción de intercambio de hidrógeno y formato mostraron un cambio con valor de flujo menor a los intervalos del FVA, productos que se encuentran directamente vinculados con el flujo de electrones en esta bacteria. Estos resultados indican la necesidad de encontrar una metodología diferente de mejoramiento clásico o racional para incrementar rendimiento y productividad, pero se constituyen en un insumo importante en la toma de decisiones sobre el diseño de experimentos en el laboratorio. Es significativo destacar también que la red iCbu641 tiene potencial para ser completada con nueva información procedente de la anotación del genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A.

3.5 Referencias

- Aragon, O. (2007). *Estudio de la viabilidad técnica de la producción de 1,3-propanodiol (1,3-PD) a partir de glicerol con nuevas cepas colombianas de Clostridium sp. a nivel laboratorio*. National University of Colombia.
- Bernal, J. M. (n.d.). *Evaluación de la expresión de genes involucrados en la producción de 1,3-Propanodiol para una cepa nativa de Clostridium sp.* Universidad Nacional de Colombia.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. P., & Deckwer, W. D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(3), 289–97.
- Bizukojc, M., Dietz, D., Sun, J., & Zeng, A.-P. (2010). Metabolic modelling of syntrophic-like growth of a 1,3-propanediol producer, *Clostridium butyricum*, and a methanogenic archeon, *Methanosarcina mazei*, under anaerobic conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(4), 507–23.
- Campbell, K., Xia, J., & Nielsen, J. (2017). The Impact of Systems Biology on Bioprocessing. *Trends in Biotechnology*, 35(12), 1156–1168.
- Cárdenas, D. P., Pulido, C., Aragón, Ó. L., Aristizabal, F. A., Suarez, Z., & Montoya Castaño, D. (2006). Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp. mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmaceuticas*, 35(1), 120–137.
- Charubin, K., Bennett, R. K., Fast, A. G., & Papoutsakis, E. T. (2018). Engineering *Clostridium* organisms as microbial cell-factories: challenges & opportunities. *Metabolic Engineering*, 50, 173–191.
- Corpodib, & Grupo Bioprocesos y Bioprospección, I. (2015). *Definición de los mejores escenarios para el desarrollo de una Biorefinería en Ecodiesel Colombia S.A. a través de un estudio prospectivo a corto y mediano plazo*. Informe Final Contrato 577/2013 Colciencias.

- Dash, S., Ng, C. Y., & Maranas, C. D. (2016). Metabolic modeling of clostridia: Current developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 363(4), fnw004.
- Gillespie, C. (2015). Fitting Heavy Tailed Distributions: The powerLaw Package. *Journal of Statistical Software*, 64(2), 1–16.
- Goldfine, H., & Johnston, N. (2005). Membrane lipids of Clostridia. In P. Dürre (Ed.), *Handbook on Clostridia* (pp. 297–327).
- Hyduke, D., Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R., Thiele, I., Orth, J., ... Palsson, B. (2011). COBRA Toolbox 2.0. *Protocol Exchange*. Retrieved from <https://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2097#/related-articles>
- Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50(4), 484–524.
- Joseph, R. C., Kim, N. M., & Sandoval, N. R. (2018). Recent developments of the synthetic biology toolkit for Clostridium. *Frontiers in Microbiology*, 9, 154.
- Montoya, J. D. (2012). *Metabolic engineering of the Colombian strain Clostridium sp. IBUN 158B in order to improve the bioconversion of glycerol into 1, 3-propanediol*. Ulm University.
- NCBI. (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D8–D13.
- Perez Mancilla, X. (2009). *Estandarización de la Concentración de Glicerol Industrial y de la Fuente de Nitrógeno en el Medio de Cultivo para la Producción de 1,3-Propanodiol utilizando una Cepa Nativa de Clostridium sp.* Universidad Nacional de Colombia.
- Raynaud, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C., & Soucaille, P. (2003). Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of Clostridium butyricum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5010–5.
- Roberts, S. B., Gowen, C. M., Brooks, J. P., & Fong, S. S. (2010). Genome-scale metabolic analysis of Clostridium thermocellum for bioethanol production. *BMC Systems Biology*, 4, 31.
- Rodrigues, A., Bordado, J. C., & Dos Santos, R. G. (2017). Upgrading the glycerol from biodiesel production as a source of energy carriers and chemicals - A technological review for three chemical pathways. *Energies*, 10(11), 1817.
- Rosas-Morales, J. P., Perez-Mancilla, X., López-Kleine, L., Montoya Castaño, D., & Riaño-Pachón, D. M. (2015). Draft genome sequences of Clostridium strains native to Colombia with the potential to produce solvents. *Genome Announcements*, 3(3), e00486-15.
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R. M. T., Thiele, I., Orth, J. D., Feist, A. M., ... Palsson, B. Ø. (2011). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature Protocols*, 6(9), 1290–1307.

- Serrano-Bermúdez, L. M., González Barrios, A. F., Maranas, C. D., & Montoya, D. (2017). *Clostridium butyricum* maximizes growth while minimizing enzyme usage and ATP production: Metabolic flux distribution of a strain cultured in glycerol. *BMC Systems Biology*, 11, 58.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–504.
- Tracy, B. P., Jones, S. W., Fast, A. G., Indurthi, D. C., & Papoutsakis, E. T. (2012). Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 364–81.
- Vivek, N., Sindhu, R., Madhavan, A., Anju, A. J., Castro, E., Faraco, V., ... Binod, P. (2017). Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate – Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview. *Bioresource Technology*, 239, 507–517.
- Xu, N., Ye, C., & Liu, L. (2018). Genome-scale biological models for industrial microbial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3439–3451.
- Zeng, A. (1996). Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Engineering*, 14, 169–175.

Capítulo 4. Estrategia de modificación genética para incrementar la producción de 1,3-propanodiol en *Clostridium* sp³

Pérez-Mancilla Ximena C.¹, Montoya Castaño Dolly¹, Riaño-Pachón Diego M².

¹. Instituto de Biotecnología (IBUN), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

². Laboratório de Biologia Computacional, Evolutiva e de Sistemas, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Resumen

La posibilidad de establecer una biorefinería basada en *Clostridium* es una alternativa atractiva y viable debido a la amplia versatilidad metabólica de estos microorganismos. El grupo de Bioprocesos y Bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia ha obtenido el genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A, que ha mostrado capacidad de producir solventes a partir de diversos sustratos. Con el fin último de poder plantear esquemas racionales de manipulación genética de esta cepa para producir 1,3-Propanodiol a partir de glicerol, que incrementen los títulos, rendimientos o productividades ya obtenidos y establecer la producción biotecnológica de este diol en el país, se planteó la necesidad de ampliar el conocimiento de la fisiología de la bacteria, por lo que este estudio establece las diferencias en el perfil transcriptómico de la cepa cuando es cultivada en glicerol respecto a la glucosa a las 24 horas de fermentación. Para ello se realizó un estudio RNA-seq, por medio del que se detectaron 392 genes diferencialmente expresados, de los cuales 221 disminuyeron su expresión en glicerol respecto a glucosa

³ En el contenido de este capítulo, correspondiente al tercer objetivo específico de este trabajo se buscaba obtener información de que sucede en la célula cuando produce 1,3-PD a partir de glicerol a través de un estudio de expresión diferencial y a partir de todos los resultados de la tesis establecer blancos de manipulación genética

y 171 la aumentaron. Dentro de estos últimos se encontraron algunos relacionados con la ruta oxidativa de consumo de glicerol. El análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes demostró que los fenómenos biológicos con mayor representación dentro de los genes diferencialmente expresados corresponden a procesos de oxidoreducción. Este primer acercamiento al estudio transcriptómico global de la fermentación de glicerol, en conjunto con el análisis del genoma y la simulación de mutantes *knock-out* permite la comprensión del metabolismo del microorganismo con miras a escoger blancos de modificación genética.

Palabras clave: Transcriptoma, RNA-Seq, *Clostridium*, glicerol, 1,3-Propanodiol

LISTADO DE ABREVIATURAS

1,3-PD	1,3-Propanodiol
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BINGO	Biological Networks Gene Ontology tool
EC	<i>Enzyme Commission</i>
DEPC	Dietil-piro carbonato
DESeq2	<i>Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution</i>
<i>dhaB1</i>	Glicerol deshidratasa
<i>dhaB2</i>	Proteína activadora de la glicerol deshidratasa
<i>dhaT</i>	1,3-Propanodiol deshidrogenasa
EdgeR	<i>Empirical analysis of Digital Gene Expression data in R</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FVA	Análisis de Variabilidad de Flujos
GFF	<i>General Feature Format</i>
GO	<i>Ontología de genes</i>
IBUN	Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
MIP	Major Intrinsic Proteins
NAD⁺/NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado/reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng/μL	Nanogramos por microlitro
RCM	Reinforced Clostridial Medium
RIN	RNA Integrity Number
TGY	<i>Tryptone Glucose Yeast Extract broth</i>
TPM	<i>Transcripts Per Kilobase Million</i>
Ymol	Rendimiento molar

4.1. Introducción

El uso de glicerol como fuente de carbono en procesos biotecnológicos se ha considerado de interés debido al incremento en la oferta, causado principalmente por la producción de biodiesel que lo genera como subproducto (da Silva, Mack, & Contiero, 2009). Se estima que hacia 2020 se producirán alrededor de 40 billones de galones de este biocombustible, lo que significa que indirectamente se obtendrán aproximadamente 4 billones de galones de glicerina cruda, cuyo aprovechamiento puede incrementar la viabilidad económica de esta industria (Chozhavendhan *et al.*, 2018). Existe un amplio rango de productos que pueden obtenerse en el contexto de una biorrefinería en la que se incluya el consumo de glicerol sin purificar, siendo uno de los más estudiados y conocidos el 1,3-Propanodiol (1,3-PD) por medio de la fermentación anaeróbica con enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*, o Firmicutes como algunas especies de *Clostridium*, entre otros (Barbirato, *et al.*, 1998; Papanikolaou *et al.*, 2000; Zeng & Biebl, 2002).

La producción de 1,3-PD como parte del metabolismo de la glicerina por parte de *Clostridium* se conoce desde 1881 y ha sido ampliamente estudiada (Biebl *et al.*, 1999). Dentro de las especies más reconocidas está *C. butyricum*, para la que se encuentran 20 genomas ensamblados disponibles en la base de datos del NCBI hasta diciembre de 2018, con tamaños desde 4 hasta 4,9 Mb (NCBI, 2018). Para incrementar la producción del solvente en microorganismos de este género o para solucionar problemas relacionados con la fermentación tales como la tolerancia al sustrato, se han llevado a cabo estrategias de modificación ya sea al azar o racionales, aunque específicamente para la especie *C. butyricum* los estudios son escasos (Kubiak *et al.*, 2012). En el primer caso, se realizó mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina a la cepa DSM 5431, obteniendo a partir de tres mutantes representativas un incremento del consumo de glicerol hasta de 40% y de producción del diol hasta de 55% (Abbad-Andaloussi *et al.*, 1995). En cuanto a la aplicación de estrategias racionales de modificación, hasta el momento se ha optado por el uso de los genes de esta especie para ser transferidos a otros microorganismos. En una de las investigaciones se obtuvo una mutante de *C. acetobutylicum* capaz de crecer en glicerol con la inserción del operón *dha* (genes *dhaB1*, *dhaB2* y *dhaT*), la cual arrojó un rendimiento de 0.65 mol_{1,3-PD} /mol de glicerol en cultivos en lote alimentado (González-Pajuelo *et al.*, 2005). Otro ejemplo es el

realizado por Tang y colaboradores en 2009, donde se insertaron en *Escherichia coli* los genes *dhaB1* y *dhaB2* de *C. butyricum* y se obtuvo una concentración de 104,4 g de 1,3-PD/L y una productividad de 2.6 g de 1,3PD/L/h (Tang *et al.*, 2009).

La transcriptómica puede constituir una herramienta básica para desarrollar estrategias de mejoramiento de cepas. Esta disciplina permite, entre otros, cuantificar los niveles de expresión de cada transcrito en diferentes condiciones, por medio de métodos basados en hibridación o en secuenciación de segunda y tercera generación (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009). Tomando en cuenta el desarrollo y la accesibilidad de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, se ha aprovechado su uso en el mapeo y cuantificación de transcritos y se les ha otorgado el término RNA-seq, mostrando ventajas considerables respecto a los microarreglos (van Vliet, 2010; Z. Wang *et al.*, 2009). En clostridios se han utilizado las dos estrategias, principalmente para el estudio de la producción de solventes. Los microarreglos han sido útiles para entender aspectos importantes sobre la solventogénesis y la esporulación en la cepa tipo *C. acetobutylicum* ATCC824, de la que se conoce su genoma desde el año 2001 (Alsaker & Papoutsakis, 2005; Hu *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2008). De igual forma, se han publicado diferentes estudios basados en el uso de la tecnología de RNA-seq sobre este género para la comprensión de su fisiología bajo el uso de variados sustratos (Calusinska *et al.*, 2015; de Gérando *et al.*, 2018; Munir *et al.*, 2016; Schellenberg *et al.*, 2014; Tan, Liu, Chen, Zheng, & Li, 2013; Y. Wang, Li, Mao, & Blaschek, 2012)

El grupo de Bioprocesos y Bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia ha obtenido el genoma de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A, la cual pertenece a la especie *C. butyricum* (capítulo 2) y tiene la capacidad de producir solventes tipo Acetona, Butanol y Etanol, además de 1,3-Propanodiol (Montoya *et al.*, 2001; Rosas-Morales *et al.*, 2015). Con base en esta información se generó el modelo metabólico a escala genómica iCbu641 (Serrano-Bermúdez *et al.*, 2017). Investigadores en Alemania desarrollaron una cepa modificada que sobreexpresaba el operón *dha* de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A. por medio de la inserción de una copia del mismo a través del plásmido ClosTron, la cual mostró productividades 5,3% mayores a la cepa tipo en fermentación por lotes (Montoya, 2012). A partir de estas investigaciones, y con el fin de establecer un bioproceso exitoso de producción de 1,3-Propanodiol a partir de glicerol y obtener altos rendimientos y productividades se propuso analizar el transcriptoma de la cepa nativa *Clostridium* sp.

IBUN13A y así mismo hacer uso del genoma y el modelo metabólico para plantear una estrategia de modificación genética racional para la obtención de una cepa hiperproductora de 1,3-PD, o que otorgue beneficios al momento de implementar el proceso a nivel industrial.

4.2 Métodos

4.2.1 Microorganismo:

La cepa *Clostridium* sp. IBUN13A fue obtenida de la colección Banco de Cepas y Genes del IBUN (Colección 90 del Registro Nacional de Colecciones Biológicas) que fue activada y mantenida como stock de trabajo en viales de 120 ml de medio RCM bajo anaerobiosis estricta, de acuerdo a las condiciones establecidas previamente (Montoya *et al.*, 2000).

4.2.2 Obtención de ARN:

Inicialmente se realizaron fermentaciones en viales de 40 ml utilizando glucosa o glicerol y el medio de cultivo descrito previamente (Perez Mancilla, 2009), con sus respectivas cinéticas de formación de productos y consumo de sustrato, analizando las muestras por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), usando una columna AMINEX HPX-87H. A partir de dichas fermentaciones se extrajo ARN de las 24 horas de cultivo, según las condiciones estandarizadas previamente (ANEXO 3.A), para hacer los estudios transcriptómicos (3 réplicas biológicas). Para la lisis celular, extracción y purificación de ARN, se utilizó la combinación de los kits comerciales TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit y RNeasy Protect Bacteria Mini Kit, de acuerdo a lo reportado para algunos estudios similares (Scaria *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011). La cuantificación del material se realizó por medio de Qubit2 de Invitrogen®. Estas muestras fueron enviadas para su análisis de calidad por medio del equipo Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies® (RIN: RNA Integrity Number) y posterior obtención de librerías y secuencias. Todo el material utilizado se encontraba libre de ARNasas, ya que estaba certificado o fue previamente tratado con agua con DEPC 0,1%. Se procedió a obtener las muestras de volumen de 30 µL para ser enviadas para secuenciación, a las que se les removió el agua por medio del concentrador Vacufuge 5301 de Eppendorf® realizando 2 ciclos de centrifugación al vacío de 10 minutos a 45°C. Todas las muestras presentaron relaciones de absorbancia 260/280 entre 1,95 y 2, indicando que en su mayoría se tiene ARN puro.

4.2.3 Secuenciación y preprocesamiento:

Las muestras de glucosa y glicerol a las 24 horas de fermentación fueron secuenciadas en un instrumento Illumina HiSeq2500 utilizando el kit de preparación de librerías pareadas TruSeq RNA (microbe), según el protocolo establecido por el proveedor del servicio (Macrogen). El preprocesamiento de los reads (lecturas de secuencias de 101 pb) se realizó con Trimmomatic (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014) y BBDuk2 (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools>). Esta segunda herramienta permitió remover adaptadores, secuencias de ARN ribosomales y realizar cortes en los extremos de las secuencias, y mostró resultados viables para continuar el proceso. La evaluación de la calidad se realizó con FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>).

4.2.4 Análisis de los datos de secuenciación:

Para ensamblar y/o alinear las secuencias del transcriptoma al genoma previamente anotado se utilizó Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012); en conjunto con HTSeq-count (Anders, Pyl, & Huber, 2015), así como con Kallisto (Bray, Pimentel, Melsted, & Pachter, 2016), análisis con el que se continuó el proceso de análisis de expresión diferencial por medio de las herramientas EdgeR incluida dentro de la suite Blast2GO Pro-Trial Versión 5.0.13 (Conesa *et al.*, 2005; Robinson, McCarthy, & Smyth, 2010) y DESeq2 de Bioconductor, cuyo código se encuentra en el Anexo 3.B (Love, Huber, & Anders, 2014). Para establecer los genes diferencialmente expresados, se escogieron aquellos con un radio $\log_2 \geq 1,5$ y un valor p ajustado menor o igual a 0,1.

4.2.5 Análisis de enriquecimiento de ontología de genes:

Con el fin de determinar los fenómenos biológicos relacionados con los genes diferencialmente expresados se realizó un análisis de enriquecimiento de términos de ontología de genes(GO). Para ello se tomaron las listas de genes diferencialmente expresados como entrada para la aplicación BiNGO de Cytoscape (Maere, Heymans, & Kuiper, 2005). El método estadístico escogido fue la distribución hipergeométrica y la corrección FDR (False Discovery Rate) de Benjamini & Hochberg, con un valor p corregido menor o igual a 0,05. Se utilizó la asignación de términos GO dada a cada secuencia codificante del genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A por medio de la suite Blast2GO Basic Versión 5.0.13 (Conesa *et al.*, 2005) como archivo de anotación de referencia, y adicionalmente se uso la base de datos de ontología de genes para las 3

categorías en formato OBO obtenida el 4 de diciembre de 2017 (Gene Ontology Consortium, 2017). Posteriormente se tomaron las categorías GO sobrerrepresentadas que tuvieran un mayor número de genes asociados y se generaron mapas de calor por medio del paquete de R *pheatmap* (Kolde, 2018) para los datos de expresión de los genes por categoría GO que se hubieran identificado como diferencialmente expresados.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Obtención de ARN de *Clostridium* sp. IBUN13A en cultivo de glucosa y glicerol:

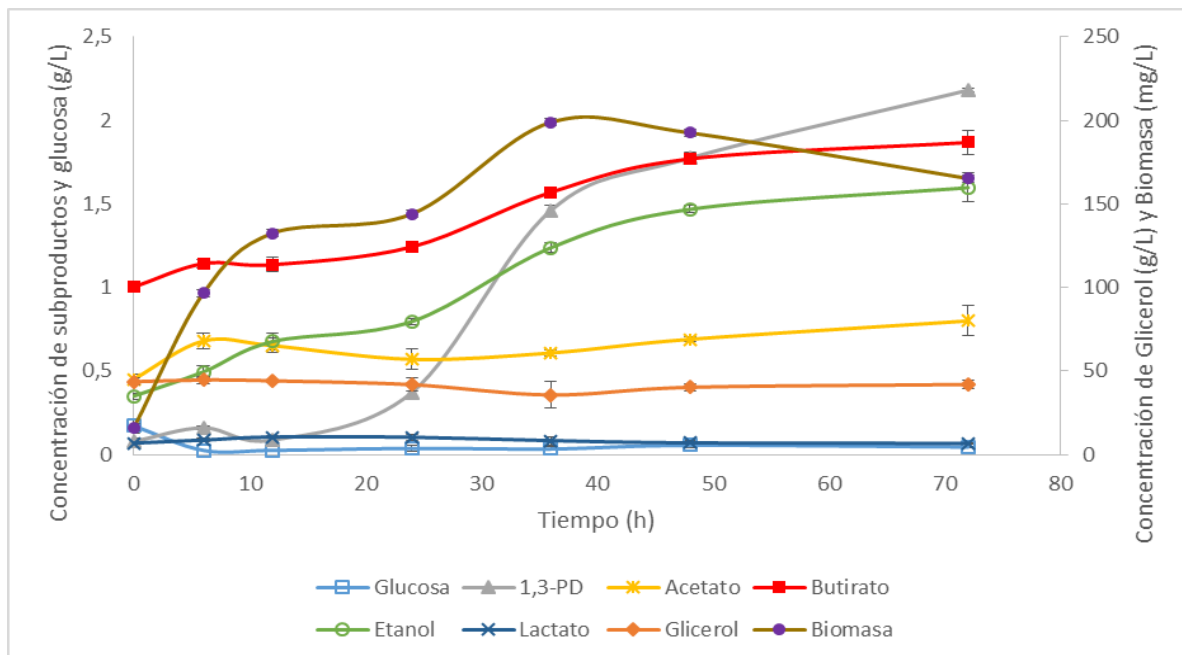
Inicialmente se realizaron cultivos en anaerobiosis, con un volumen efectivo de trabajo de 4 L con control de pH, utilizando un medio de cultivo industrial estandarizado en el grupo de investigación, con glucosa (20 g/l) o con glicerol (40g/l) como fuente de carbono. Los resultados de las cinéticas de formación de productos para tres fermentaciones por duplicado utilizando glucosa como sustrato mostraron la producción de solventes tipo acetona y butanol, sin embargo, el producto principal de las fermentaciones fue el etanol. En el caso del glicerol como sustrato, el mayor producto de la fermentación es el 1,3-Propanodiol, que comienza a detectarse hacia las 24 horas. La producción de ácido láctico fue casi nula para los dos sustratos probados, y como subproducto predominó el etanol. Para el caso del glicerol se observó una producción incipiente de los solventes acetona y butanol. A partir de estos cultivos se obtuvieron las muestras de ARN, dentro de las que solo una muestra mostró calidad aceptable (número RIN ≥ 7) para la continuación del trabajo (Anexo 3.A).

Por tal razón, se decidió repetir los experimentos, sin embargo, con el fin de agilizar la toma de muestras y obtener una concentración importante de células en un menor volumen, se decidió trabajar en viales de 40 ml sin control de pH. Inicialmente se planteó la posibilidad de cambiar el método de lisis celular, por lo que se evaluó la técnica de *Bead Beating*. Se realizaron cultivos de la bacteria en caldo TGY y se procedió con las extracciones cuando el microorganismo alcanzó una densidad óptica entre 0,7 y 0,8. Se revisaron los protocolos y se probó inicialmente *Bead Beating* haciendo 3 ciclos de 20 segundos, pero se obtuvieron concentraciones muy bajas de ARN. Posteriormente se realizaron pruebas con diferentes ciclos de *Bead Beating* y se

comparó con el TRIzol® Max™ *Bacterial RNA Isolation Kit* , sin embargo, se estableció que con este último se obtienen mayores concentraciones de ARN, por lo que se procedió a obtener las muestras por fermentación para ser enviadas a su secuenciación (Anexo 3.A).

Para llevar a cabo las fermentaciones se activaron las esporas provenientes del cultivo madre por choque térmico y se cultivaron 12 horas en 40 ml caldo RCM. Posteriormente se inocularon 8 ml de este cultivo en viales de 100 ml de caldo TGY según el caso durante 14 horas en glicerol y 10 horas en glucosa donde se obtuvo una densidad óptica de 0,8 a 1, de donde se tomaron inóculos que se dispusieron en viales con medio industrial durante 72 horas y se tomaron las muestras correspondientes. Las cinéticas de fermentación se encuentran en la **Figura 4-1**. Se puede observar que bajo condiciones sin control de pH el 1,3-PD se comienza a producir hacia la mitad de la fase exponencial (Figura 4-1 A), y que tanto en cultivo de glucosa (Figura 4-1 4.1 A) como glicerol (Figura 4.1 B) los mayores subproductos son el butirato y el etanol (Tabla 4-1).

A.



B.

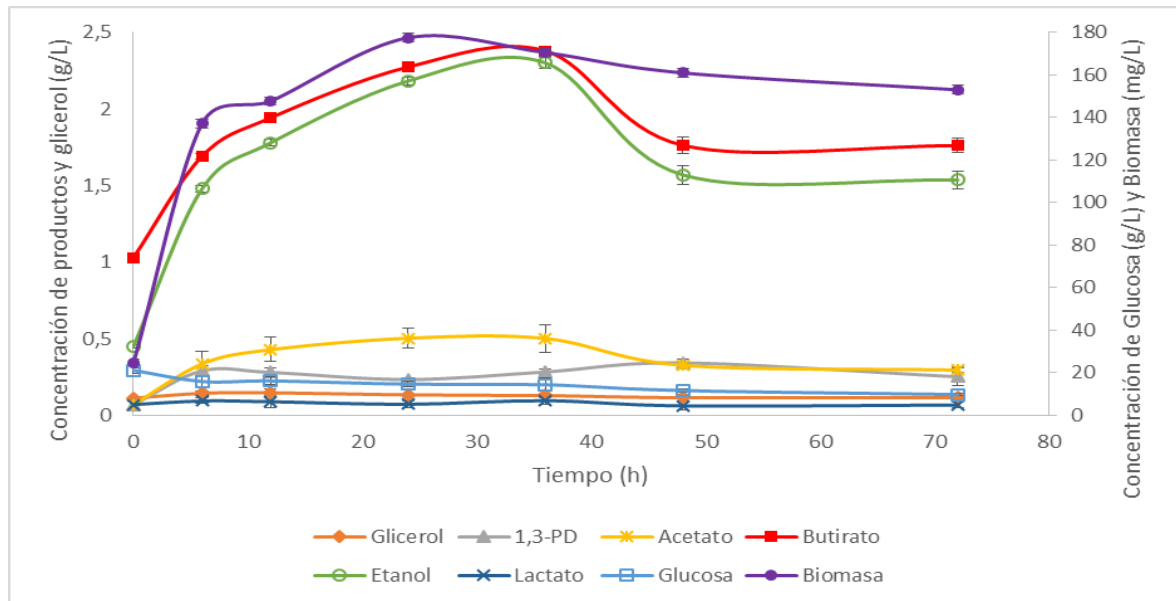


Figura 4-1. Cinéticas de formación de productos y crecimiento en cultivo por lotes para la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A. A) Usando como sustrato glicerol (40g/L), y **B)** Usando como sustrato glucosa (20 g/L). Todos los análisis se realizaron por triplicado y las barras de error representan las desviaciones estándar de los promedios de las réplicas

Tabla 4-1. Rendimientos molares de los principales productos de fermentación de *Clostridium* sp. IBUN13A bajo cultivo de glucosa o glicerol

COMPUESTO	Ymol- Glucosa	Ymol - glicerol
1,3-PD	0.04	0.75
Acetato	0.06	0.16
Butirato	0.13	0.27
Etanol	0.19	0.38
Lactato	0	0
Acetona	0.2	0.41
Butanol	0	0.33

Inicialmente se extrajo ARN de muestras de las 6 y 24 horas en glucosa y a las 6 y 36 horas en glicerol y fueron evaluadas para determinar su calidad en el Bioanalyzer de Agilent, el cuál mostró que ninguna de las muestras tenía calidad suficiente para ser secuenciadas (Anexo 3.A). Se realizaron 3 intentos de conseguir muestras con calidad suficiente para ser secuenciadas, sin embargo no fue posible obtenerlas, por diferentes motivos que pueden influenciar el resultado tales como el medio en el que se cultivaban las células (es un medio estandarizado para la producción industrial de 1,3-PD, bajo en nutrientes), la producción de ácidos a partir del metabolismo fermentativo (pH mínimo durante la fermentación 4,3) y el transporte (el proveedor del servicio no garantiza

cadena de frío). Posteriormente se decidió mandar a secuenciar muestras de las 24 horas de los dos cultivos, tomando en cuenta que el microorganismo tiende a crecer rápidamente en glucosa y por ende disminuye considerablemente el pH del medio de cultivo, además de comenzar la fase estacionaria y de solventogénesis en un tiempo menor a las 36 horas dificultando la obtención de muestras con concentración suficiente, además que a las 24 horas de fermentación en glicerol, esta bacteria se encuentra produciendo biomasa y en consecuencia los metabolitos asociados a crecimiento tales como el 1,3-PD. En la **Tabla 4-2** se relacionan las muestras enviadas y su concentración, de las cuales las 3 primeras corresponden a la fermentación de glucosa y las siguientes 3 pertenecen a la fermentación de glicerol.

Tabla 4-2. Resultados de concentración de las muestras de ARN obtenidas en este estudio.

	Muestra	Concentración ARN Qubit (ng/μL)	Concentración ARN Bioanalyzer (ng/μL) ¹	Número RIN ¹
GLUCO	1_glu	1060	103,8	2,9
	2_glu	1736	276,1	2,4
	3_glu	2200	506,2	3,4
GLICER	4_gly	136	42	2,5
	5_gly	2480	586	3,9
	6_gly	1016	327,4	2,6

¹La concentración de Bioanalyzer y el número RIN corresponden a lo reportado por el proveedor del servicio después de su transporte y reconstitución en agua DEPC.

4.3.2 Secuenciación y preprocesamiento:

Respecto al análisis bioinformático de las secuencias obtenidas inicialmente se utilizó BBDuk2 (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools>), con los siguientes parámetros, establecidos después de revisar los archivos de calidad de las secuencias crudas:

ref : Los archivos fasta utilizados para realizar cortes a la derecha corresponden a los de los adaptadores de librerías TruSeq, disponibles con el software BBDuk2.

- fref: Las referencias utilizadas para filtración en este caso fueron las correspondientes a las secuencias de 5S, 16S y 23S de la base de datos Silva del dominio Bacteria, obtenidas desde el software SortMeRNA (Kopylova, Noé, & Touzet, 2012).
- rcomp=t: Busca los kmers y sus complementos reversos

- maskmiddle= t incrementa la sensibilidad al ignorar la base de la mitad de cada kmer.
- trimq=30: Realiza cortes de calidad a un valor mínimo de Q30 de acuerdo con el algoritmo Phred.
- qtrim=rl: los cortes de calidad en las secuencias se hacen tanto hacia la derecha como hacia la izquierda.
- mlf=0.6: se descartan los reads que conservan menos del 60% de su longitud original después del procesamiento.

La remoción de adaptadores específicos utilizados en la construcción de librerías de Illumina, así como el corte de los *reads* donde la calidad de la asignación de bases desciende generando que estas secuencias no se puedan alinear, son fundamentales para obtener resultados coherentes en los siguientes pasos del análisis (Yang & Kim, 2015). Los resultados del preprocesamiento se muestran en la **Tabla 4-3**

Tabla 4-3. Resultados del preprocesamiento de las secuencias obtenidas en este estudio.

	MUESTRA	Número de secuencias iniciales	Número de secuencias post-tratamiento	% de secuencias removidas	%GC Post-tto	Tasa global de alineamiento VS genoma 13 A
GLUCOS A	1	100700731	60114190	40.3	37	98.67
	2	8065371	5862233	27.32	40	98.32
	3	7251611	4841490	33.24	36	98.15
	4	8208016	4626536	43.64	38	50.81
GLICEROL	5	9286272	2762830	70.25	37	46.45
	6	105097900	25952939	75.31	37	50.59

4.3.3 Análisis de los datos de secuenciación:

Posteriormente se procedió a realizar el conteo de abundancia de transcritos por medio de la herramienta HTSeq-count, la cual hace uso del alineamiento de los *reads* contra el genoma de *Clostridium* sp IBUN13A obtenido previamente con Bowtie2 además del archivo GFF de modelos génicos para contar transcritos (Anders *et al.*, 2015) y Kallisto, que hace uso de grafos de Brujin para realizar pseudo-alineamientos y asignar los *reads*

a transcritos específicos (Bray *et al.*, 2016). La **Figura 4-2** muestra que el uso de pseudo-alineamientos por medio de Kallisto muestra un mayor porcentaje de secuencias reconocidas y contadas, tal y como se ha evidenciado en otros estudios (Bray *et al.*, 2016; Everaert *et al.*, 2017); además de tener la ventaja de tener tiempo de ejecución menor, por tanto los datos generados por medio de esta herramienta se usaron para los siguientes pasos en el análisis.

Una vez obtenidos los conteos se verificó el modelamiento de los datos por medio de una distribución binomial negativa, para aquellos genes que mostraron un valor de expresión consistente en las 6 muestras, tal y como se muestra en la **Figura 4-3**, donde se puede observar que el valor de la varianza génica es mayor que la media del nivel de expresión. El modelamiento de los datos bajo esta distribución es común para los datos derivados de secuenciación de ARN mensajeros (Robinson & Smyth, 2008) y tanto EdgeR como DESeq2 asumen que la distribución de los conteos es binomial negativa (Love, Huber, & Anders, 2014; Robinson *et al.*, 2010).

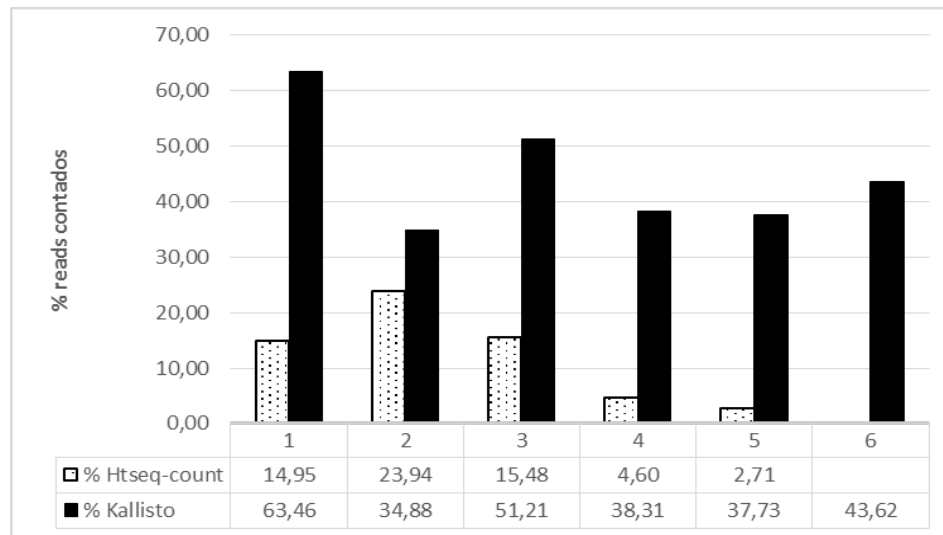


Figura 4-2. Porcentaje de secuencias reconocidas y contadas por medio de las herramientas de mapeo y pseudo-alineamiento contra el genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A. La herramienta de mapeo Bowtie2 + HTSeq-count se identifica en color blanco con puntos y la herramienta de pseudo-alineamiento Kallisto se identifica en negro.

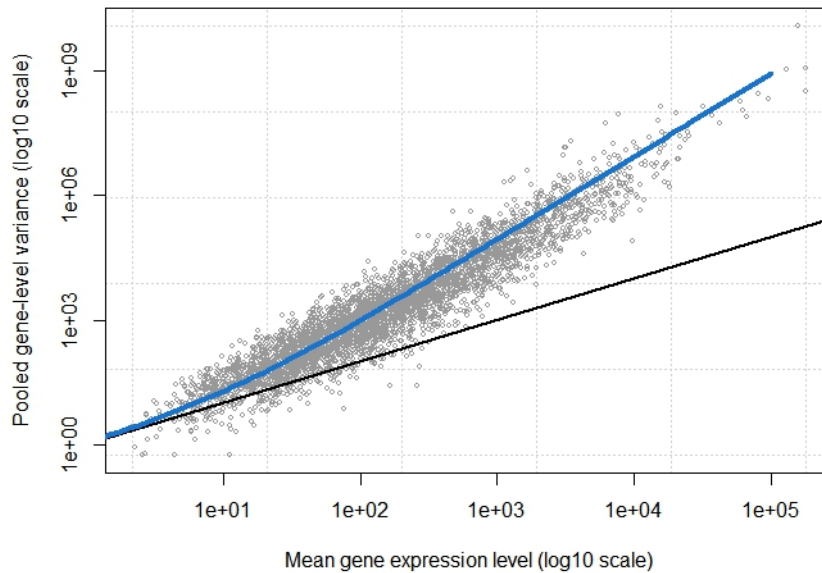


Figura 4-3. Relación entre la media de los niveles de expresión de los genes (eje X) y la varianza génica de los recuentos de los experimentos de RNA seq de *Clostridium* sp. IBUN13A. La distribución de Poisson se muestra en una línea negra y la binomial negativa en una línea azul, que muestra ajuste con los datos observados.

Al realizar los análisis de expresión diferencial (Log2 – fold change) por medio de DESeq2 se detectaron 392 genes que corresponden al 9.4% del genoma, de los cuales 221 disminuyeron su expresión en glicerol respecto a glucosa y 171 la aumentaron. Con EdgeR se encontraron 720 genes expresados diferencialmente (17% del genoma), de los que 367 disminuyeron su expresión y 353 la aumentaron. La comparación en los genes hallados para cada una de estas condiciones se muestra en la **Figura 4-4**.

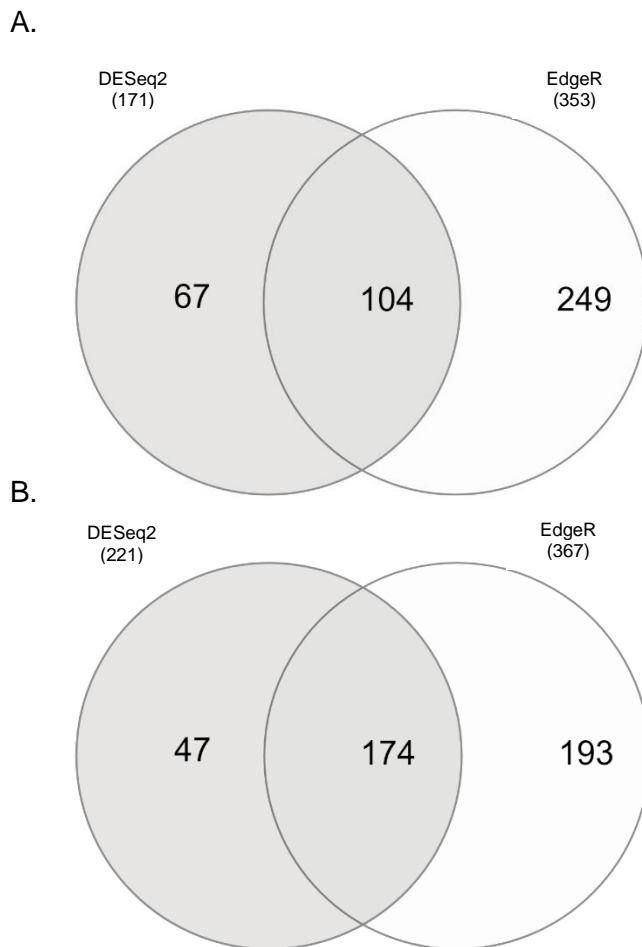


Figura 4-4. Comparación del número de genes diferencialmente expresados en los experimentos de RNA-seq de *Clostridium* sp. IBUN13A por medio de dos herramientas. En gris oscuro se observan los genes hallados con la herramienta Deseq2 y en gris claro con EdgeR. A) genes con expresión aumentada y B) genes que disminuyeron su expresión.

En un estudio donde se compararon los software de expresión diferencial utilizando datos de cerebro humano se determinó que DESeq2 tiene mayor exactitud que EdgeR y permite una mayor confiabilidad en los resultados (Costa-Silva, Domingues, & Lopes, 2017). De igual forma, se estableció en una comparación entre estas dos herramientas utilizando datos de la bacteria *Cupriavidus metallidurans*, que DESeq2 tiende a disminuir el número de falsos positivos respecto a EdgeR (Yabo, Monsieur, & Leys, 2017). La visualización de los cambios de la expresión (\log_2 fold change) y el análisis de componentes principales de las muestras se encuentran en el anexo 3.B.

El comportamiento general de la transcripción del genoma de *Clostridium* sp. IBUN13A en glicerol y en glucosa se puede observar en la **Figura 4-5**. A este respecto, vale la pena mencionar que se encontró dentro de los 171 genes sobreexpresados se encuentran las enzimas glicerol deshidrogenasa, dihidroxiacetona quinasa y fosfoglicerato quinasa, las cuales están involucradas en la conversión oxidativa de glicerol a intermediarios de la ruta glicolítica para conseguir energía por fosforilación de sustrato. Así mismo se encuentran enzimas que participan en la formación de co-productos durante el consumo de glicerol tales como la piruvato formato liasa o formato C-acetiltransferasa, por medio de la que se convierte el piruvato en formato y la NADH deshidrogenasa por medio de la que a partir de este cofactor se puede obtener hidrógeno molecular. También se encontraron 5 genes relacionados con el proceso de esporulación. Por otra parte, dentro de los 221 genes sub-expresados en glicerol, 18 pertenecen a transportadores ABC, 4 de ellas pertenecen a sistemas reguladores de dos componentes, 45 a proteínas relacionadas con componentes celulares. Además, dentro de este grupo de genes también se encontró la fosfotransbutirilasa, fundamental para la obtención de butirato, uno de los co-productos de la fermentación del glicerol.

4.3.4 Análisis de enriquecimiento de ontología de genes:

De acuerdo con el análisis de enriquecimiento de genes sobreexpresados en glicerol vale la pena anotar que, dentro de las categorías de ontología de genes de procesos biológicos y funciones moleculares, algunas que sobresalen corresponden a procesos de oxidoreducción, actividades hidrolíticas sobre enlaces glicosídicos y producción de energía a partir de oxidación de compuestos orgánicos (**Figura 4-6 A**). De acuerdo con el análisis de genes con valores de expresión menores en glicerol que en glucosa se encuentra que se destacan categorías relacionadas con transporte principalmente (**Figura 4-6B**). En el anexo 3.C se pueden observar los resultados arrojados por la herramienta BiNGO.

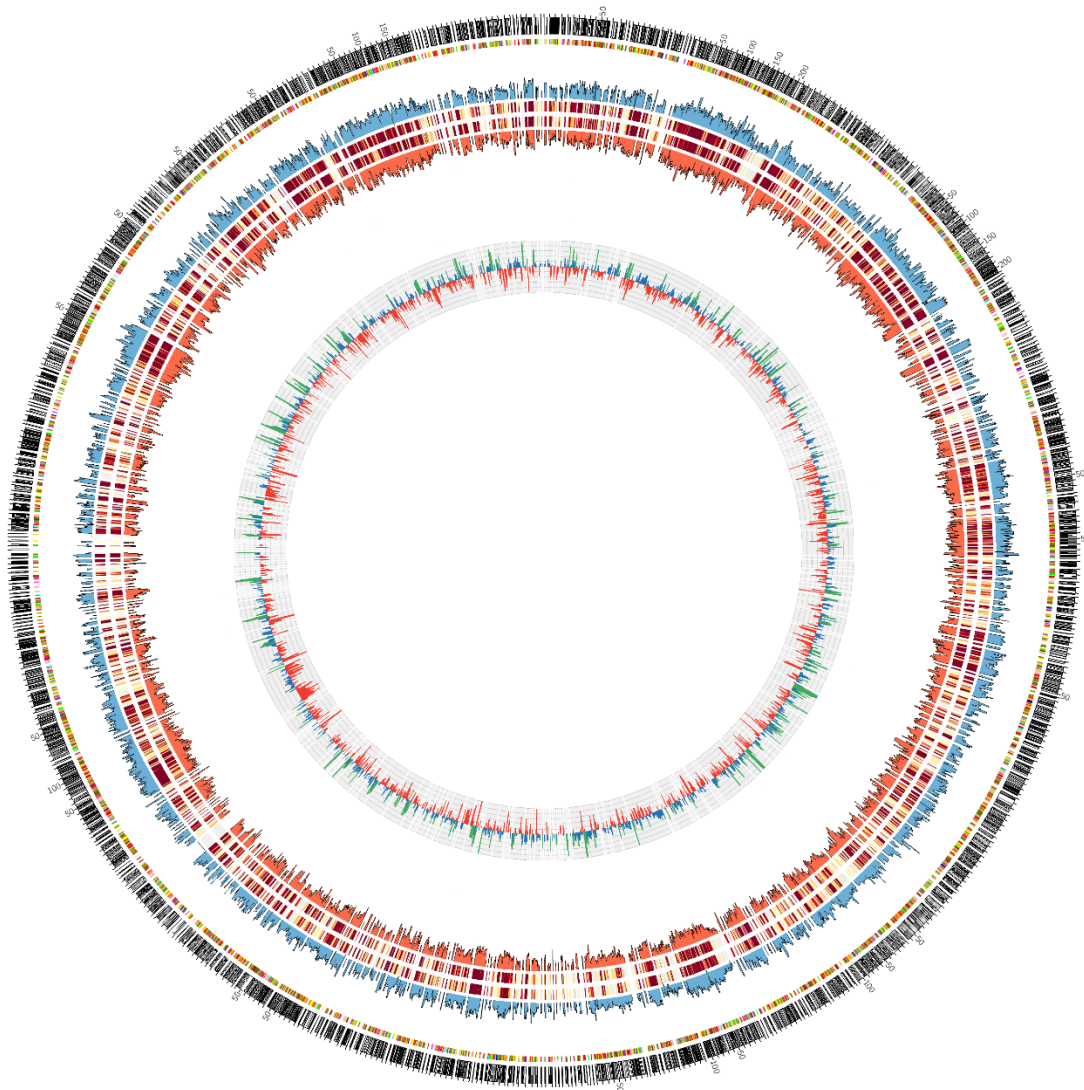
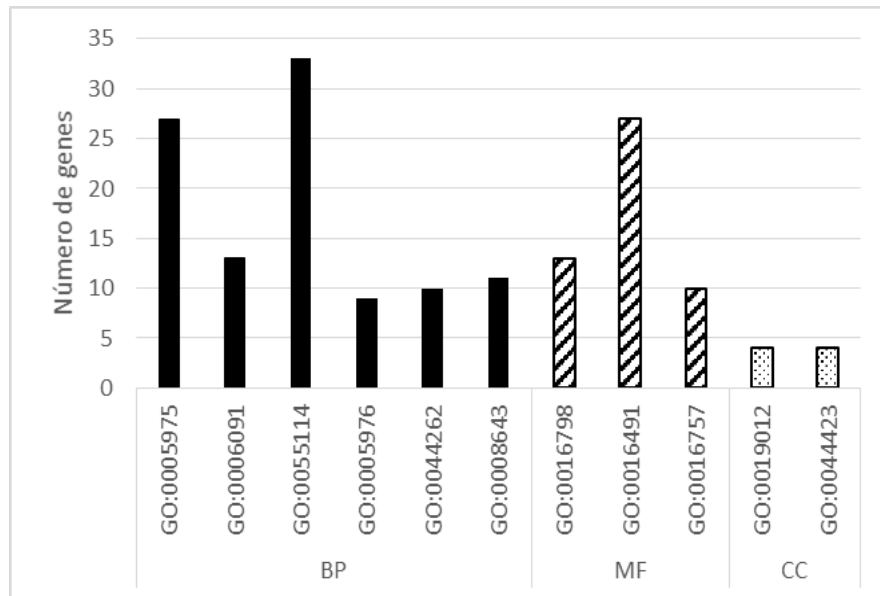


Figura 4-5. Representación circular del transcriptoma de *Clostridium* sp. IBUN13A en glucosa y glicerol. El orden de los círculos empezando por el más externo son: a) genoma, b) genes, c) Expresión de los genes en glucosa, d y e) Mapas de calor de expresión diferencial en TPM, f) Expresión de los genes en glicerol y g) Genes sobre-expresados (azul) y genes sub-expresados (rojo) en glicerol vs glucosa.

A.



B.

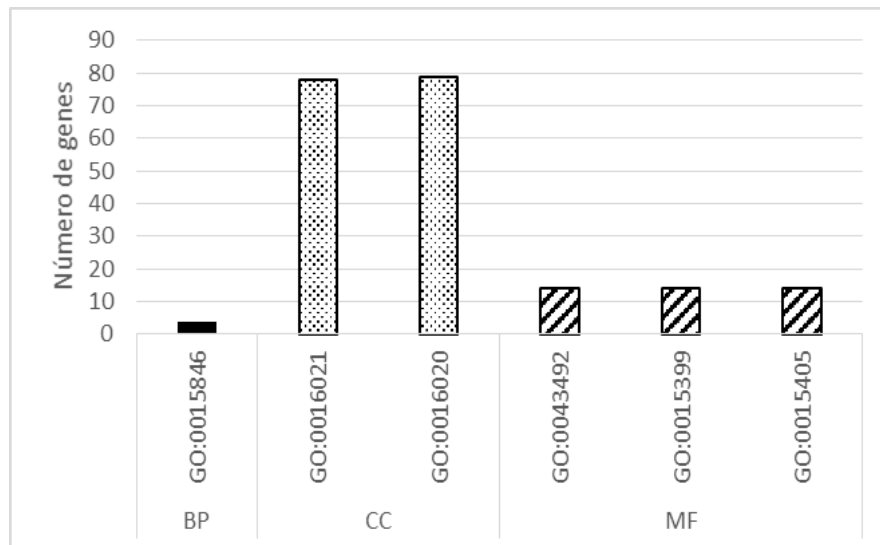
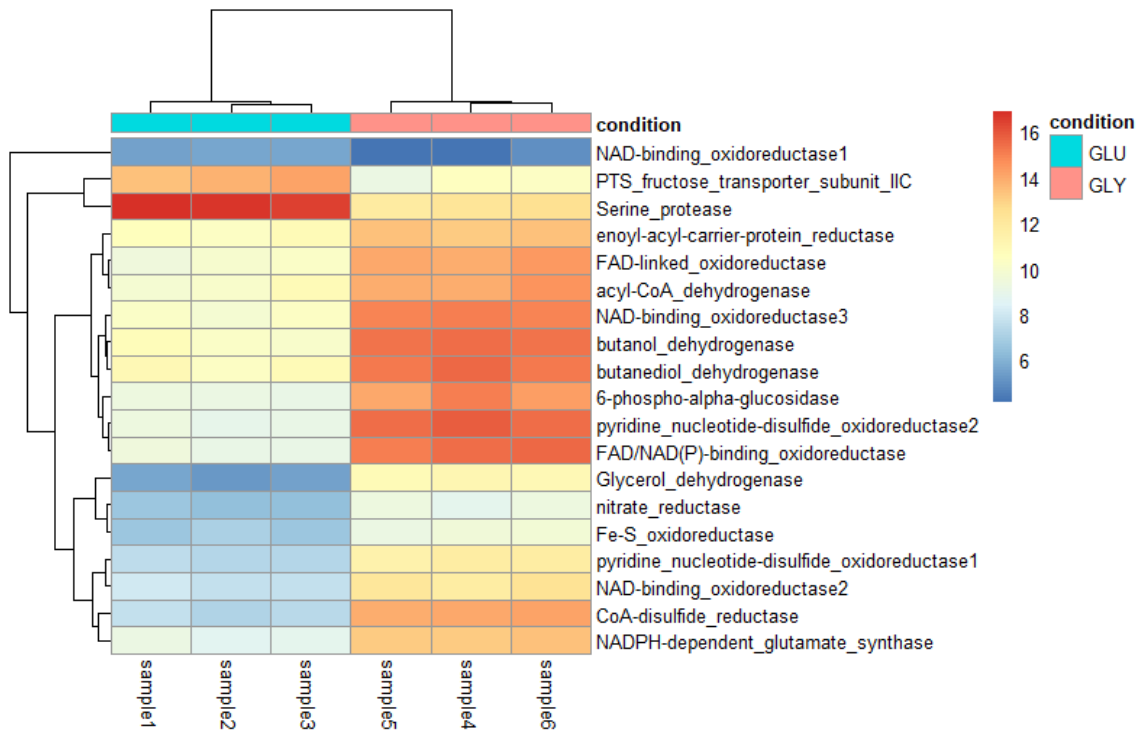


Figura 4-6. Categorías de ontología de genes con mayor número de genes diferencialmente expresados. A) Genes sobreexpresados, B) genes sub-expresados. BP (color negro) corresponde a términos GO de la categoría proceso biológico, MF (rayas diagonales) a términos GO de la categoría función molecular; y CC (puntos) a términos GO de la categoría componente celular.

Una vez se obtuvieron los términos GO con mayor número de genes diferencialmente expresados dentro de cada categoría (**Figura 4-6**) se realizaron mapas de calor para cada uno de ellos. Para la categoría de proceso biológico se consideraron el término GO:0055114 que corresponde a proceso de oxido-reducción (**Figura 4-7 A**), y GO:0005975 (proceso metabólico de carbohidratos)(Figura 4-7 B). En cuanto a los genes asociados a GO:0055114, el incremento en la expresión de la enzima butanol deshidrogenasa en presencia de glicerol es concordante con los resultados de fermentación expuestos previamente (**Tabla 4-1**) así como con lo determinado en un estudio previo del proteoma de una cepa nativa bajo cultivo de glicerol (Comba González *et al.*, 2013). La enzima CoA- disulfuro reductasa, que participa rompiendo enlaces disulfuro entre la Coenzima A y proteínas durante la germinación de endosporas (Setlow & Setlow, 1977) y cuya expresión aumenta en el cultivo de glicerol, hace uso del cofactor reducido NADH, lo que compite con la ruta de producción de 1,3-PD. Por otra parte, se destaca igualmente la proteína glicerol deshidrogenasa, que participa en la oxidación de glicerol para producir dihidroxiacetona y entrar a la ruta glicolítica y a la fermentación para conseguir energía en microorganismos anaeróbicos como *Clostridium*. Al observar los genes vinculados al término de proceso metabólico de carbohidratos (GO:0005975) vale la pena destacar las dos secuencias anotadas como piruvato formato liasa o formato acetil transferasa, que produce ácido fórmico a partir de piruvato.

A.



B.

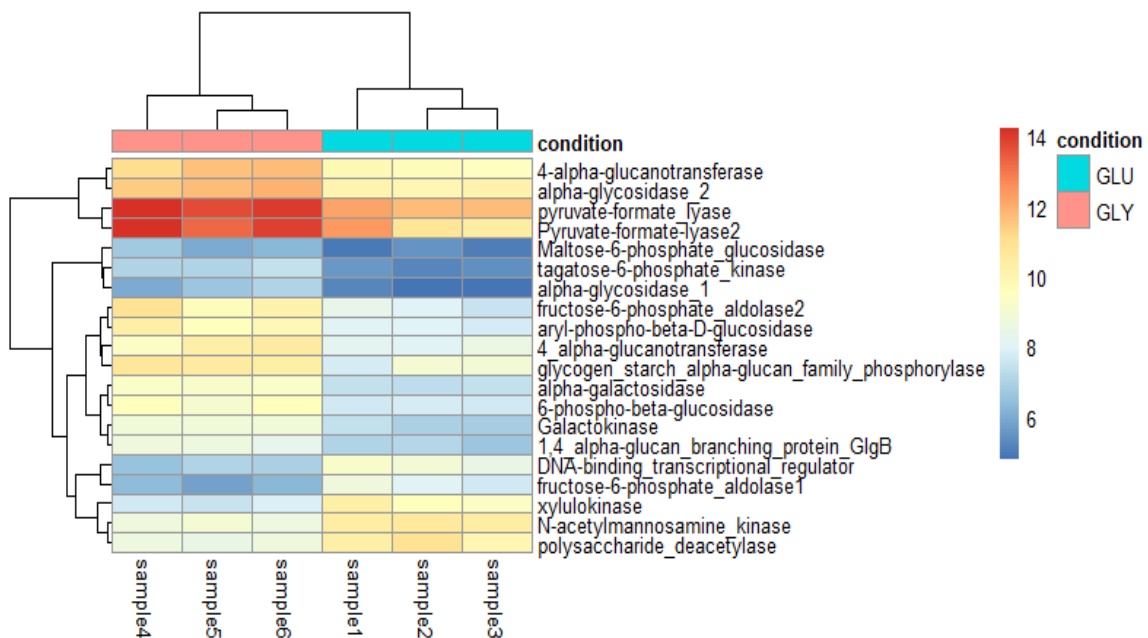


Figura 4-7 Mapas de calor de términos GO representativos en la categoría Proceso biológico para los genes diferencialmente expresados en *Clostridium* sp. IBUN13A bajo cultivos de glucosa y glicerol. A) GO:0055114 y B) GO:0005975.

Respecto a la categoría de función molecular se consideró el término GO:0016491 que corresponde a actividad de oxido-reducción, y en general se encontraron similitudes con lo encontrado para los genes asociados a GO:0055114 (proceso de oxido-reducción) (**Figura 4-8**).

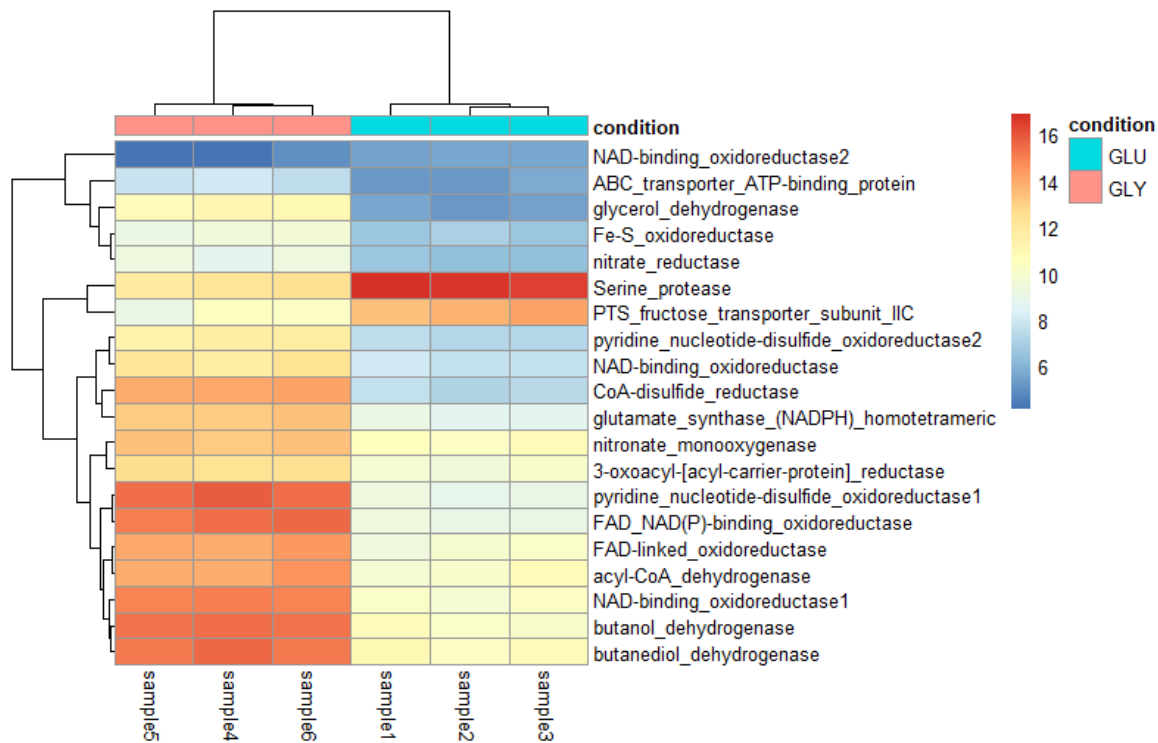


Figura 4-8 Mapa de calor de término GO representativo en la categoría Función Molecular para los genes diferencialmente expresados en *Clostridium* sp. IBUN13A bajo cultivos de glucosa y glicerol. El término asociado es GO:0016491 que corresponde a actividad de oxido-reducción.

Dentro de los genes asociados al término GO:0016020 (membrana) correspondiente a la categoría componente celular, se encuentra, como era de esperarse, la proteína facilitadora de la toma de glicerol (**Figura 4-9**), que es una acuagliceroporina de la familia de proteínas MIP (Major Intrinsic Proteins) que permite el transporte transmembranal no solo de glicerol sino de otros alcoholes como el propanodiol, y ácidos de cadena corta como el láctico (Bienert *et al.*, 2013; Maurel *et al.*, 1994). Se puede observar también que la proteína que se identificó en la anotación como RodA, homóloga del factor SpoVE en la bacteria *Bacillus* (Henriques *et al.*, 1998), se expresa diferencialmente de forma

negativa en glicerol respecto a glucosa, lo que indicaría que a las 24 horas de fermentación bajo este segundo sustrato la población se encuentra en fase estacionaria de crecimiento, y que existen condiciones de estrés en el cultivo que han inducido la esporulación.

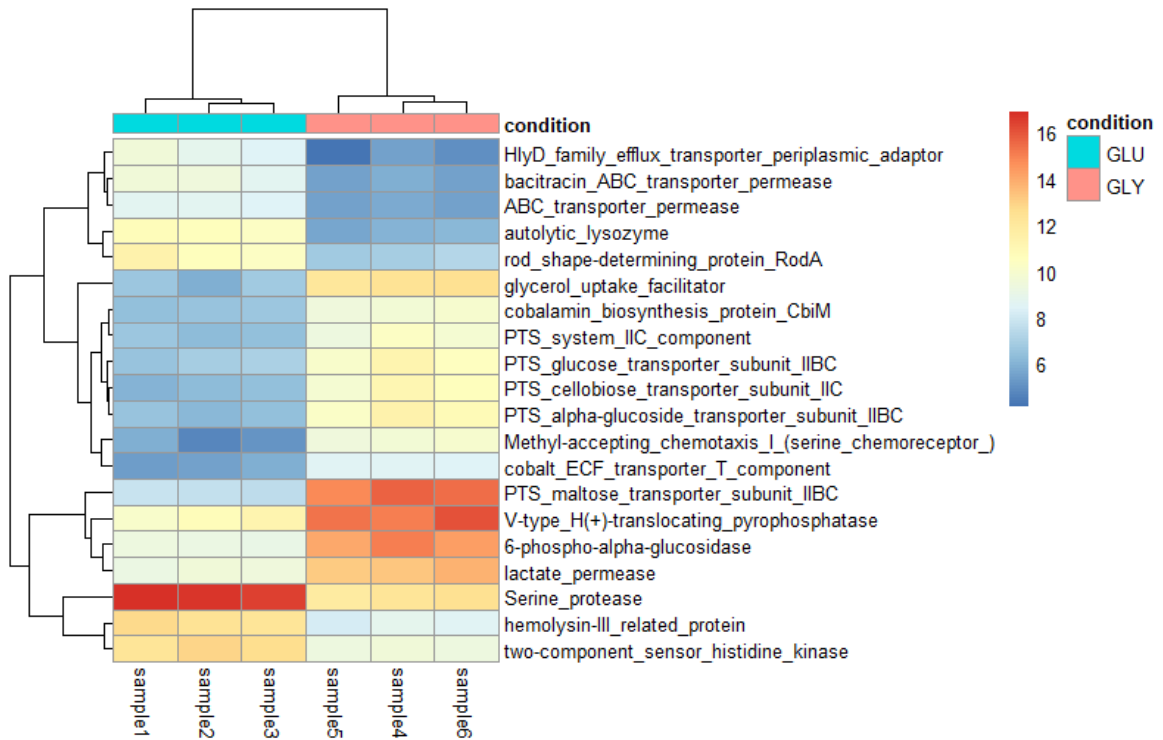


Figura 4-9 Mapa de calor de término GO representativo en la categoría Componente Celular para los genes diferencialmente expresados en *Clostridium* sp. IBUN13A bajo cultivos de glucosa y glicerol. El término asociado es GO:0016020 que corresponde a membrana.

Igualmente se obtuvo un mapa de calor que permitiera observar la dinámica de la expresión de los genes de la ruta de consumo de glicerol de *Clostridium* sp. IBUN13A (**Figura 4-10**). Dentro de las enzimas que muestran mayor expresión en glicerol que en glucosa se encuentra la piruvato ferredoxin oxidorreductasa, importante en la obtención de energía y el flujo de electrones en microorganismos anaeróbicos como los clostridios. Esta enzima cataliza la oxidación de piruvato a acetil-CoA utilizando ferredoxina como aceptor de electrones, conduciendo a la posterior producción de ácidos, ATP e hidrógeno molecular (Kerscher & Oesterhelt, 1982). La similitud en la expresión de enzimas relacionadas con la formación de co-productos como el lactato, butirato y etanol son coherentes con el comportamiento fenotípico durante las fermentaciones (**Tabla 4-1, Figura 4-1 A**). La formación de estos ácidos está ligada a la regeneración de cofactores

oxidados, que se podrían considerar como competitivos con la ruta reductiva de producción de 1,3-PD por cuanto se consume NADH en todos los casos. En el grupo de investigación de Bioprocesos y Bioprospección se han obtenido mutantes que evalúan el efecto de la interrupción de las rutas de obtención de estos productos, pero no se han obtenido efectos significativos sobre la producción de 1,3-PD (Bernal, n.d.).

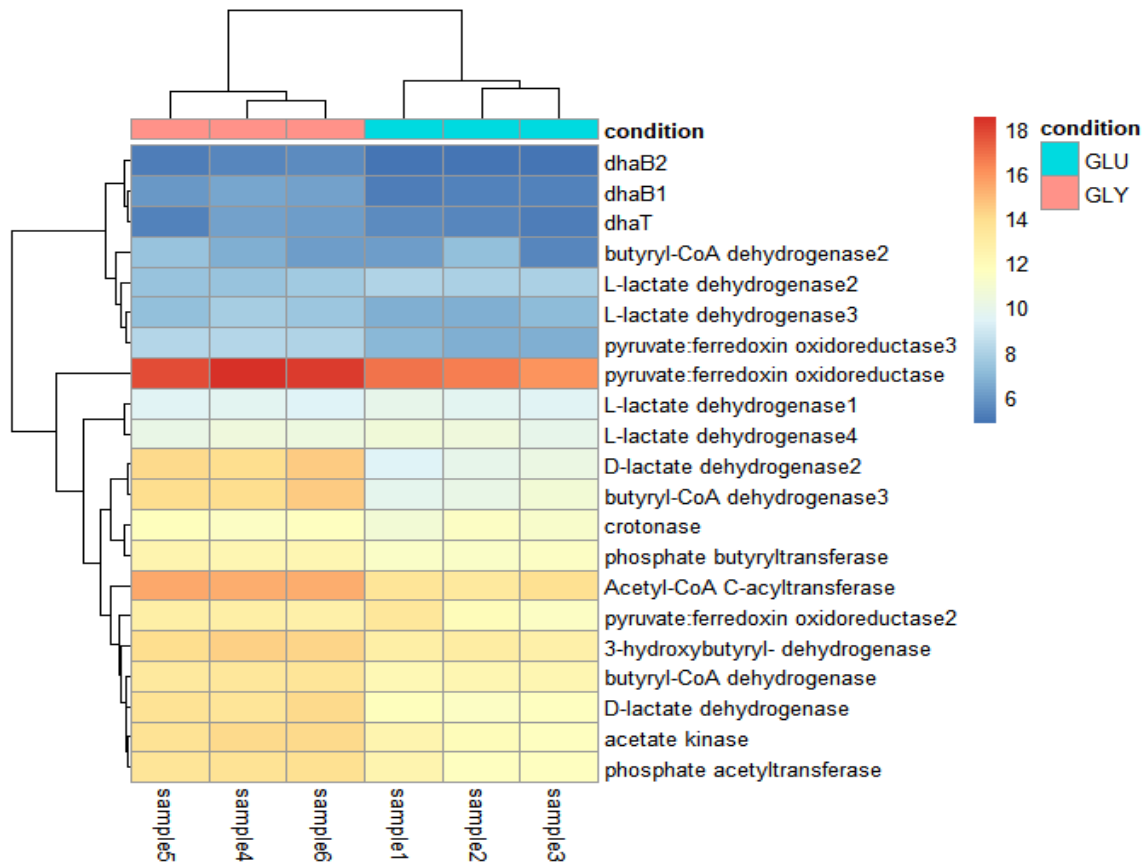


Figura 4.-10. Mapa de calor de la expresión de los genes de las rutas oxidativa y reductiva de consumo de glicerol en *Clostridium* sp. IBUN13A bajo cultivos de glucosa y glicerol.

4.4 Propuesta de blancos de Modificación genética para *Clostridium* sp. IBUN13A

La biotecnología, entendida como la ciencia que envuelve la obtención de productos por intermedio de organismos vivos o sus partes, requiere el desarrollo de bioprocesos con altos rendimientos y menores costos, especialmente cuando se pretende elaborar un bioproducto de bajo precio pero alto volumen (Lee, Lee, & Kim, 2005). Para esto, en

general se han implementado diversas metodologías de modificación genética, al azar o racional, basadas en el conocimiento previo experimental y en la información publicada. Actualmente, con la disponibilidad de nueva tecnología y la oportunidad de realizar análisis ómicos, se puede estudiar con mayor detalle la fisiología de los organismos a través de la biología de sistemas, que se convierte en una herramienta poderosa para comprender y diseñar funciones celulares (Becker & Wittmann, 2018). Por ende, este trabajo planteó el estudio del genoma y transcriptoma de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A, que ha mostrado potencial para producir 1,3-Propanodiol a partir de glicerol, y así mismo hacer uso del modelo metabólico de nuestro microorganismo y de esta forma poder plantear una estrategia de modificación genética racional para la obtención de una cepa hiperproductora de este diol que otorgue beneficios al momento de implementar el proceso a nivel industrial, acoplado a la producción de biodiesel en una biorrefinería.

Tomando en cuenta que el genoma contiene todo el repertorio genético de la bacteria, se procedió inicialmente a secuenciarlo y analizarlo, lo que permitió dar un contexto a nivel de genes de lo observado en otros estudios a nivel experimental de las rutas metabólicas que *Clostridium* sp IBUN13A, así como ser el insumo para la construcción de un modelo metabólico. Además, este trabajo otorgó evidencia para catalogar esta bacteria dentro de la especie *C. butyricum*. Así mismo, al realizar un análisis de genómica comparativa con otras 31 especies del mismo género se pudo obtener el genoma accesorio de la cepa en estudio, dentro del cual se encontraron 7 enzimas que al ser suprimidas *in silico* utilizando el modelo a escala genómica iCbu641, incrementaban ligeramente el rendimiento de 1,3-Propanodiol respecto a la cepa nativa, (capítulo 3). Cuatro de estas proteínas accesorias fueron contempladas en el siguiente paso de esta investigación que consistió en simular mutaciones triples que permitieran incrementar los rendimientos de 1,3-PD.

De las 5242 mutantes triples evaluadas *in silico*, tan solo 2 superaron el valor máximo de rendimiento obtenido al simular dobles mutantes y fue tan solo 2,26% mayor a la cepa sin modificar. Este incremento podría no ser representativo a nivel de costos en un proceso industrial por lotes. Un asunto importante es que se determinó, de acuerdo a un análisis FVA, que en estas mutantes las únicas reacciones cuyo flujo se altera ya que disminuye, son las de intercambio de ácido fórmico e hidrógeno, cuyas rutas de producción pueden ser competitivas con la producción del 1,3-Propanodiol por cuanto el flujo de electrones o

carbono se desvían hacia estos otros procesos. Sin embargo, en un estudio previo se evaluó la mutación del gen de la hidrogenasa I de la cepa *Clostridium* sp. IBUN158B y se obtuvieron valores de rendimiento menores a la cepa tipo, probablemente relacionado con la disminución de la tasa de crecimiento. La posibilidad de bloquear la producción de ácido fórmico al suprimir la actividad de la enzima **piruvato-formato liasa** para incrementar la producción de 1,3-PD no ha sido estudiada previamente, por lo que se propone como un blanco de manipulación genética.

De igual forma el estudio del transcriptoma en condiciones de producción de 1,3-PD respecto a condiciones de no producción por medio de RNA-seq, mostró que se detectaron 392 genes diferencialmente expresados, de los cuales 221 disminuyeron su expresión en glicerol respecto a glucosa y 171 la aumentaron. El enriquecimiento de términos GO mostró dentro de los genes diferencialmente expresados algunos relacionados con la ruta oxidativa de consumo de glicerol. Además, vale la pena destacar que dentro de los genes diferencialmente expresados asociados al término GO:0016020 (membrana) se encuentra la **proteína facilitadora de la toma de glicerol**, la cual se propone como un blanco de modificación por sobre-expresión, ya que podría incrementar la actividad de la enzima glicerol deshidratasa tal y como se observó en un estudio previo donde al sobre-expresar esta proteína se incrementó la conversión de glicerol 1,3 veces (Lindlbauer, Marx, & Sauer, 2017).

Dentro de los genes diferencialmente expresados, se encontraron 87 códigos EC asociados a los genes con mayor expresión en glicerol que en glucosa, de los que 18 fueron suprimidos *in silico* previamente (Serrano-Bermúdez et al., 2017), y ninguno mostró un rendimiento mayor de 1,3-PD que la cepa nativa. Dentro de estas simulaciones se reportó que eliminar la enzima 2.4.2.1 (purina nucleósido fosforilasa), sobreexpresada en glicerol, sería letal para la célula. Igualmente se encontraron 77 códigos EC asociados a los genes con expresión menor en glicerol que en glucosa. Dentro de estos solo 12 fueron contemplados dentro de las simulaciones *in silico* de mutantes sencillas, donde ninguno mostró rendimientos mayores a la cepa nativa y dos de ellas mostraron ser letales (2.3.1.51 y 6.3.4.2), lo cual puede ser previsible por cuanto intervienen en el metabolismo de lípidos de membrana o de pirimidinas. En el Anexo 3.D. se pueden observar los resultados de las dobles mutantes generadas por Serrano y colaboradores para las enzimas diferencialmente expresadas, así como las triples

obtenidas en este estudio. Se encontraron 2125 mutantes dobles que tuvieran una enzima cuya expresión se hubiera visto favorecida en glicerol. Dentro de estas se cuentan la enzima tiolasa (2.3.1.9) y la acetato quinasa (2.7.2.1), ambas pertenecientes al metabolismo oxidativo del glicerol, las cuales mostraron que al ser suprimidas disminuyen considerablemente la producción de 1,3-Propanodiol, lo que es consistente con estudios previos desarrollados dentro del grupo de investigación (Bernal, n.d.). Sin embargo, teóricamente, eliminar la producción de ácido butírico a partir de piruvato, lo que se podría conseguir con la delección de la tiolasa, podría incrementar la producción del diol (Zeng, 1996). Este fenómeno se da probablemente porque tanto en la producción de ácido acético como ácido butírico se dan fenómenos de fosforilación a nivel de sustrato que permiten obtener ATP a partir de glicerol, la cual es la única forma que tienen los anaerobios estrictos mesófilos quimiorganotrofos como IBUN13A para conseguir la energía química necesaria para producir biomasa.

Los resultados aquí presentados indican la posibilidad de investigar sobre los posibles blancos de manipulación genética para la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A aquí propuestos. Sin embargo, es importante tener en cuenta la necesidad de buscar otra metodología de mejoramiento para incrementar el rendimiento y la productividad, sea al evaluar diferentes métodos de fermentación o la posibilidad de insertar los genes del operon dha en otro hospedero que tenga mayores tasas de crecimiento.

4.5 Conclusiones

La obtención de muestras de ARN con una calidad y concentración suficiente para su posterior secuenciación y análisis se convirtió en un reto para el desarrollo de este trabajo, especialmente al trabajar con un microorganismo anaeróbico que produce menos ATP en su catabolismo, y por ende tiene un rendimiento bajo en biomasa, además de tener como productos principales ácidos orgánicos. Sin embargo, el uso de la tecnología de RNA-seq permitió contrastar la dinámica transcripcional del uso de glicerol como fuente de carbono para producir 1,3-Propanodiol VS el uso de glucosa donde no lo produce.

El análisis de expresión diferencial de los genes en glicerol respecto a glucosa muestra que los procesos más representados entre los genes sobreexpresados están

relacionados principalmente con el metabolismo energético (redox). Dentro de los genes sobre-expresados en glicerol respecto a glucosa es posible identificar algunos relacionados con el metabolismo de este triol, tales como la proteína facilitadora de toma de glicerol, piruvato-formato liasa, glicerol deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa.

4.6 Referencias

- Abbad-Andaloussi, S., Manginot-Durr, C., Amine, J., Petitdemange, E., & Petitdemange, H. (1995). Isolation and Characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 Mutants with Increased Resistance to 1,3-Propanediol and Altered Production of Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4413–7.
- Alsaker, K. V., & Papoutsakis, E. T. (2005). Transcriptional Program of Early Sporulation and Stationary-Phase Events in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 7103–7118.
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169.
- Barbirato, F., Himmi, E. H., Conte, T., & Bories, A. (1998). 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops and Products*, 7(2–3), 281–289.
- Becker, J., & Wittmann, C. (2018). From systems biology to metabolically engineered cells — an omics perspective on the development of industrial microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 180–188.
- Bernal, J. M. (n.d.). *Evaluación de la expresión de genes involucrados en la producción de 1,3-Propanodiol para una cepa nativa de Clostridium sp.* Universidad Nacional de Colombia.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. P., & Deckwer, W. D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(3), 289–97.
- Bienert, G. P., Desguin, B., Chaumont, F., & Hols, P. (2013). Channel-mediated lactic acid transport: a novel function for aquaglyceroporins in bacteria. *Biochemical Journal*,

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, *34*(5), 525–527.
- Calusinska, M., Hamilton, C., Monsieurs, P., Mathy, G., Leys, N., Franck, F., ... Wilmotte, A. (2015). Genome-wide transcriptional analysis suggests hydrogenase- and nitrogenase-mediated hydrogen production in *Clostridium butyricum* CWBI 1009. *Biotechnology for Biofuels*, *8*, 27.
- Chozhavendhan, S., Praveen Kumar, R., Elavazhagan, S., Barathiraja, B., Jayakumar, M., & Varjani, S. (2018). Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Industry for the Production of Value-Added Bioproducts. In R. R. Singhanian & R. Agarwal, R.A., Kumar, R.P., Sukumaran (Eds.), *Waste to Wealth (Energy, Environment, and Sustainability)*. Springer Singapore.
- Comba González, N., Vallejo, A. F., Sánchez-Gómez, M., & Montoya, D. (2013). Protein identification in two phases of 1,3-propanediol production by proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, *89*, 255–264.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *21*(18), 3674–6.
- Costa-Silva, J., Domingues, D., & Lopes, F. M. (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PLoS ONE*, *12*(12), e0190152.
- da Silva, P. G., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, *27*(1), 30–39.
- de Gérando, H. M., Wasels, F., Bisson, A., Clement, B., Bidard, F., Jourdir, E., ... Ferreira, N. L. (2018). Genome and transcriptome of the natural isopropanol producer *Clostridium beijerinckii*. *BMC Genomics*, *19*, 242–254.
- Everaert, C., Luypaert, M., Maag, J. L. V., Cheng, Q. X., Dinger, M. E., Hellemans, J., & Mestdagh, P. (2017). Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Scientific Reports*, *7*(1), 1559.

- Gene Ontology Consortium. (2017). Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D331–D338.
- González-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Andrade, J. C., Vasconcelos, I., & Soucaille, P. (2005). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering*, *7*(5–6), 329–36.
- Henriques, A. O., Glaser, P., Piggot, P. J., & Moran, C. P. (1998). Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *28*(2), 235–247.
- Hu, S., Zheng, H., Gu, Y., Zhao, J., Zhang, W., Yang, Y., ... Jiang, W. (2011). Comparative genomic and transcriptomic analysis revealed genetic characteristics related to solvent formation and xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* EA 2018. *BMC Genomics*, *12*, 93.
- Jones, S. W., Paredes, C. J., Tracy, B., Cheng, N., Sillers, R., Senger, R. S., & Papoutsakis, E. T. (2008). The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation. *Genome Biology*, *9*(7), R114.
- Kerscher, L., & Oesterhelt, D. (1982). Pyruvate : ferredoxin oxidoreductase - new findings on an ancient enzyme. *Trends in Biochemical Sciences*, *7*(10), 371–374.
- Kolde, R. (2018). Pretty Heatmaps R package . Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=pheatmap>
- Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, *28*(24), 3211–3217.
- Kubiak, P., Leja, K., Myszka, K., Celińska, E., Spychała, M., Szymanowska-Powalowska, D., ... Grajek, W. (2012). Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. *Process Biochemistry*, *47*(9), 1308–1319.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4), 357–359.
- Lee, S. Y., Lee, D.-Y., & Kim, T. Y. (2005). Systems biotechnology for strain

- improvement. *Trends in Biotechnology*, 23(7), 349–58.
- Lindlbauer, K. A., Marx, H., & Sauer, M. (2017). 3-Hydroxypropionaldehyde production from crude glycerol by *Lactobacillus diolivorans* with enhanced glycerol uptake. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 295.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I., Chrispeels, M. J., & Saier, M. H. (1994). Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus oocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 11869–11872.
- Montoya, D., Arévalo, C., Gonzales, S., Aristizabal, F., & Schwarz, W. H. (2001). New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27(5), 329–35.
- Montoya, D., Spitia, S., Silva, E., & Schwarz, W. H. (2000). Isolation of mesophilic solvent-producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 79(2), 117–26.
- Montoya, J. D. (2012). *Metabolic engineering of the Colombian strain Clostridium sp . IBUN 158B in order to improve the bioconversion of glycerol into 1, 3-propanediol*. Ulm University.
- Munir, R. I., Spicer, V., Krokhin, O. V., Shamshurin, D., Zhang, X., Taillefer, M., ... Levin, D. B. (2016). Transcriptomic and proteomic analyses of core metabolism in *Clostridium termitidis* CT1112 during growth on α -cellulose, xylan, cellobiose and xylose. *BMC Microbiology*, 16, 91.
- NCBI. (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D8–D13.
- Papanikolaou, S., Ruiz-Sanchez, P., Pariset, B., Blanchard, F., & Fick, M. (2000). High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*, 77(2–3), 191–208.

- Perez Mancilla, X. (2009). *Estandarización de la Concentración de Glicerol Industrial y de la Fuente de Nitrógeno en el Medio de Cultivo para la Producción de 1,3-Propanodiol utilizando una Cepa Nativa de Clostridium sp.* Universidad Nacional de Colombia.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139–40.
- Robinson, M. D., & Smyth, G. K. (2008). Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics*, 9(2), 321–332.
- Rosas-Morales, J. P., Perez-Mancilla, X., López-Kleine, L., Montoya Castaño, D., & Riaño-Pachón, D. M. (2015). Draft genome sequences of *Clostridium* strains native to Colombia with the potential to produce solvents. *Genome Announcements*, 3(3), e00486-15.
- Scaria, J., Mao, C., Chen, J. W., McDonough, S. P., Sobral, B., & Chang, Y. F. (2013). Differential stress transcriptome landscape of historic and recently emerged hypervirulent strains of *Clostridium difficile* strains determined using RNA-seq. *PLoS ONE*, 8(11), e78489.
- Schellenberg, J. J., Verbeke, T. J., McQueen, P., Krokhin, O. V., Zhang, X., Alvare, G., ... Sparling, R. (2014). Enhanced whole genome sequence and annotation of *Clostridium stercorarium* DSM8532T using RNA-seq transcriptomics and high-throughput proteomics. *BMC Genomics*, 15, 567.
- Serrano-Bermúdez, L. M., González Barrios, A. F., Maranas, C. D., & Montoya, D. (2017). *Clostridium butyricum* maximizes growth while minimizing enzyme usage and ATP production: Metabolic flux distribution of a strain cultured in glycerol. *BMC Systems Biology*, 11, 58.
- Setlow, B., & Setlow, P. (1977). Levels of acetyl coenzyme A, reduced and oxidized coenzyme A, and coenzyme A in disulfide linkage to protein in dormant and germinated spores and growing and sporulating cells of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, 132(2), 444–452.
- Tan, Y., Liu, J., Chen, X., Zheng, H., & Li, F. (2013). RNA-seq-based comparative

- transcriptome analysis of the syngas-utilizing bacterium *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 grown autotrophically and heterotrophically. *Molecular BioSystems*, 9(11), 2775.
- Tang, X., Tan, Y., Zhu, H., Zhao, K., & Shen, W. (2009). Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1628–1634.
- van Vliet, A. (2010). Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiology Letters*, 302, 1–7.
- Wang, Y., Li, X., Mao, Y., & Blaschek, H. P. (2011). Single-nucleotide resolution analysis of the transcriptome structure of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 using RNA-Seq. *BMC Genomics*, 12, 479.
- Wang, Y., Li, X., Mao, Y., & Blaschek, H. P. (2012). Genome-wide dynamic transcriptional profiling in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 using single-nucleotide resolution RNA-Seq. *BMC Genomics*, 13, 102.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63.
- Yabo, Y., Monsieurs, P., & Leys, N. (2017). RNA-seq data analysis for bacterial transcriptomics. In *3rd International Conference on Transcriptomics* (Vol. 5). Bangkok.
- Yang, I. S., & Kim, S. (2015). Analysis of Whole Transcriptome Sequencing Data: Workflow and Software. *Genomics & Informatics*, 13(4), 119–125.
- Zeng, A. (1996). Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Engineering*, 14, 169–175.
- Zeng, A., & Biebl, H. (2002). Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol Production. *Advances in Biochemical Engineering*, 74, 239–259.

Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En el marco de este estudio se obtuvo el genoma de la cepa nativa en estudio y de 3 cepas más, información que ya se encuentra disponible en NCBI y se constituyó en el insumo de una red metabólica a escala genómica elaborada dentro de nuestro grupo de investigación. Con base en la información obtenida del ADN, se determinó el potencial de usar glicerol y producir 1,3-Propanodiol (1,3-PD) por parte de *Clostridium* IBUN13A, además de su capacidad de fermentar otros azúcares simples. Igualmente, el análisis de las secuencias analizadas y de genómica comparativa con microorganismos del mismo género, permitieron coleccionar evidencia para concluir que *Clostridium* sp. IBUN13A está dentro de la especie *Clostridium butyricum*, así como corroborar la plasticidad génica de este taxón y evaluar genes contenidos dentro del genoma accesorio como posibles blancos de modificación genética *in silico*.

Para complementar estos hallazgos, se realizaron simulaciones de triples mutantes de las cuales solo 2 mostraron mayores rendimientos de 1,3-Propanodiol que la cepa nativa, en un porcentaje cercano al 2%. Este resultado otorga evidencia para tomar decisiones sobre el curso de la investigación en el laboratorio dirigida a la obtención de cepas hiperproductoras de 1,3-PD al mostrar la necesidad de encontrar una metodología diferente de mejoramiento para incrementar rendimiento y/o productividad.

En este trabajo se realizó un primer acercamiento al análisis transcriptómico global por medio de RNA-Seq para la cepa en estudio bajo consumo de glicerol como fuente de carbono para producir 1,3-Propanodiol, contrastándolo con el uso de glucosa donde no lo produce. Se pudo identificar que la función biológica más representativa de los genes que se sobreexpresan bajo la condición evaluada corresponde al metabolismo redox, fundamental en bacterias anaeróbicas para el flujo de electrones y la producción de energía por fosforilación a nivel de sustrato. Esta información, en conjunto con la demás

derivada de esta tesis, permitió postular genes de interés para evaluar el efecto de su modificación sobre la producción del diol.

Vale la pena destacar que a partir de este trabajo se obtuvieron productos como un artículo de revisión publicado en una revista nacional, un *genome announcement* y la respectiva publicación de 4 secuencias de genomas en NCBI, obtenidas a partir de esta tesis y de la asesoría de una tesis de maestría que se concibió bajo las necesidades de este proyecto. De igual forma se asesoró una segunda tesis de maestría, se presentó un poster en un congreso internacional, considerado como aquel que más microbiólogos reúne a nivel mundial y otro poster en un congreso nacional.

5.2 Recomendaciones

Con el fin de seguir mejorando la capacidad predictiva del modelo metabólico a escala genómica, se considera pertinente establecer relaciones gen –proteína-reacción dentro de la red.

Así mismo, se recomienda utilizar otras tecnologías de secuenciación de alto rendimiento para obtener el genoma completo del microorganismo, y obtener la información genómica de todas las cepas de interés biotecnológico contenidas en la colección del IBUN para poder encaminarse a nuevos estudios de bioprospección basados en este conocimiento.

De igual forma, se considera importante contemplar la posibilidad de establecer un hospedero cuyo material genético sea ampliamente conocido, que tenga altas tasas de crecimiento, sea fácil de manipular y que cuente con un amplio repertorio de investigaciones donde se hayan establecido estrategias de manipulación genéticas exitosas, y de esta forma poder expresar en este los genes de la cepa nativa que conduzcan a una mayor producción de 1,3-Propanodiol.

También puede ser relevante continuar trabajando en metodologías novedosas de mutación sitio-dirigida y/o sobreexpresión de genes en *Clostridium* aprovechando no solo el conocimiento adquirido a lo largo de todos los años de tradición del grupo de investigación sino los genes postulados en este estudio.

Anexo 1:

A. LISTADO DE ESPECIES UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE GENÓMICA COMPARATIVA

Tabla 1.A.1 Especies del género *Clostridium* en LPSN

MICROORGANISMO	IDENTIFICADOR GenBank
<i>Clostridium_novyi</i> _NT	GCA_000014125.1
<i>Clostridium_cellulolyticum</i> _H10	GCA_000022065.1
<i>Clostridium_saccharolyticum</i> _WM1	GCA_000144625.1
<i>Clostridium_cellulovorans</i> _743B	GCA_000145275.1
<i>Clostridium_scindens</i> _ATCC_35704	GCA_000154505.1
<i>Clostridium_spiroforme</i> _DSM_1552	GCA_000154805.1
<i>Clostridium_hiranonis</i> _DSM_13275	GCA_000156055.1
<i>Clostridium_asparagiforme</i> _DSM_15981	GCA_000158075.1
<i>Clostridium_methylpentosum</i> _DSM_5476	GCA_000158655.1
<i>Clostridium_papyrosolvens</i> _DSM_2782	GCA_000175795.2
<i>Clostridium_butyricum</i> _E4_str._BoNT_E_BL5262	GCA_000182605.1
<i>Clostridium_symbiosum</i> _WAL_14163	GCA_000189595.1
<i>Clostridium_clariflavum</i> _DSM_19732	GCA_000237085.1
<i>Gottschalkia_acidurici</i> _9a	GCA_000299355.1
<i>Clostridium_celatum</i> _DSM_1785	GCA_000320405.1
<i>Clostridium_stercorarium</i> _subsp._stercorarium_DSM_8532	GCA_000331995.1
<i>Clostridium_terminidis</i> _CT1112	GCA_000350485.1
<i>Clostridium_innocuum</i> _2959	GCA_000371425.1
<i>Clostridium_sartagoforme</i> _AAU1	GCA_000401215.1
<i>Clostridium_bolteae</i> _CAG_59	GCA_000431175.1
<i>Clostridium_leptum</i> _CAG_27	GCA_000431955.1
<i>Clostridium_hathewayi</i> _CAG_224	GCA_000433395.1
<i>Clostridium_clostridioforme</i> _CAG_132	GCA_000436455.1
<i>Clostridium_straminisolvens</i> _JCM_21531	GCA_000521465.1
<i>Clostridium_bornimense</i>	GCA_000577895.1
<i>Clostridium_tetanomorphum</i> _DSM_665	GCA_000647895.1
<i>Clostridium_haemolyticum</i> _NCTC_9693	GCA_000724225.2
<i>Clostridium_sulfidigenes</i>	GCA_000732635.1
<i>Clostridium_tetani</i> _ATCC_9441	GCA_000762315.1
<i>Clostridium_botulinum</i> _202F	GCA_000789355.1

<i>Clostridium</i> _sp._IBUN62F	GCA_000968235.1
<i>Clostridium</i> _sp._IBUN22A	GCA_000968245.1
<i>Clostridium</i> _sp._IBUN125C	GCA_000968265.1
<i>Clostridium</i> _sp._IBUN13A	GCA_000968315.1
<i>Clostridium</i> _scatologenes	GCA_000968375.1
<i>Clostridium</i> _sporogenes	GCA_000973705.1
<i>Clostridium</i> _carboxidivorans_P7	GCA_001038625.1
<i>Clostridium</i> _aceticum	GCA_001042715.1
<i>Clostridium</i> _cylindrosporum_DSM_605	GCA_001047375.1
<i>Clostridium</i> _disporicum	GCA_001404355.1
<i>Clostridium</i> _ventriculi_Sarcina_ventriculi_	GCA_001404895.1
<i>Clostridium</i> _paradoxum_JW_YL_7__DSM_7308	GCA_001584565.1
<i>Clostridium</i> _colicanis_DSM_13634	GCA_001593985.1
<i>Clostridium</i> _tepidiprofundum_DSM_19306	GCA_001594005.1
<i>Clostridium</i> _magnum_DSM_2767	GCA_001623875.1
<i>Clostridium</i> _coskatii	GCA_001636835.1
<i>Clostridium</i> _ljungdahlii	GCA_001636845.1
<i>Clostridium</i> _tyrobutyricum	GCA_001642655.1
<i>Clostridium</i> _saccharobutylicum_DSM_13864	GCA_001657435.1
<i>Clostridium</i> _ragdalei_P11	GCA_001675165.1
<i>Clostridium</i> _taeniosporum	GCA_001735765.2
<i>Clostridium</i> _acetireducens_DSM_10703	GCA_001758365.1
<i>Clostridium</i> _pasteurianum_DSM_525__ATCC_6013	GCA_001856645.1
<i>Clostridium</i> _estertheticum_subsp._estertheticum	GCA_001877035.1
<i>Clostridium</i> _kluuyveri	GCA_001902295.1
<i>Clostridium</i> _baratii	GCA_001991075.2
<i>Clostridium</i> _saccharoperbutylaceticum	GCA_002003305.1
<i>Clostridium</i> _roseum	GCA_002006175.1
<i>Clostridium</i> _aurantibutyricum	GCA_002006235.1
<i>Clostridium</i> _puniceum	GCA_002006345.1
<i>Clostridium</i> _felsineum_DSM_794	GCA_002006355.1
<i>Clostridium</i> _acetobutylicum	GCA_002006425.1
<i>Clostridium</i> _beijerinckii	GCA_002006445.1
<i>Clostridium</i> _tepidum	GCA_002008345.1
<i>Clostridium</i> _oryzae	GCA_002029235.1
<i>Clostridium</i> _chromiireducens	GCA_002029255.1
<i>Clostridium</i> _thermoalcaliphilum	GCA_002029295.1
<i>Clostridium</i> _thermobutyricum_DSM_4928	GCA_002050515.1
<i>Clostridium</i> _hungatei	GCA_002051585.1
<i>Clostridium</i> _argentinense	GCA_002074155.1
<i>Clostridium</i> _formicaceticum	GCA_002080475.1
<i>Clostridium</i> _autoethanogenum	GCA_002189005.1
<i>Clostridium</i> _neonatale	GCA_002553455.1
<i>Clostridium</i> _combesii	GCA_002749945.1
<i>Clostridium</i> _celerecrescens_18A	GCA_002797975.1
<i>Clostridium</i> _thermosuccinogenes	GCA_002896855.1

<i>Clostridium_igidicarnis_DSM_15099</i>	GCA_002934235.1
<i>Clostridium_vincentii</i>	GCA_002995745.1
<i>Clostridium_liquoris</i>	GCA_002995785.1
<i>Clostridium_thermopalmarium_DSM_5974</i>	GCA_002995795.1
<i>Clostridium_luticellarii</i>	GCA_002995845.1
<i>Clostridium_diolis</i>	GCA_003015255.1
<i>Clostridium_drakei</i>	GCA_003096175.1
<i>Clostridium_sufflavum_DSM_19573</i>	GCA_003208175.1
<i>Clostridium_lavalense</i>	GCA_900102595.1
<i>Clostridium_gasigenes</i>	GCA_900104115.1
<i>Clostridium_sphenoides_JCM_1415</i>	GCA_900105615.1
<i>Clostridium_fimetarium</i>	GCA_900111235.1
<i>Clostridium_polysaccharolyticum</i>	GCA_900111595.1
<i>Clostridium_frigidicarnis</i>	GCA_900111985.1
<i>Clostridium_uliginosum</i>	GCA_900112485.1
<i>Clostridium_populeti</i>	GCA_900112775.1
<i>Clostridium_homopropionicum</i>	GCA_900113195.1
<i>Clostridium_ultunense_Esp</i>	GCA_900120235.1
<i>Clostridium_fallax</i>	GCA_900129365.1
<i>Clostridium_grantii_DSM_8605</i>	GCA_900129965.1
<i>Clostridium_collagenovorans_DSM_3089</i>	GCA_900130005.1
<i>Clostridium_intestinale_DSM_6191</i>	GCA_900130055.1
<i>Clostridium_cavendishii_DSM_21758</i>	GCA_900141845.1
<i>Clostridium_amylolyticum</i>	GCA_900142075.1
<i>Clostridium_chauvoei_JF4335</i>	GCA_900168365.1
<i>Clostridium_acidisoli_DSM_12555</i>	GCA_900176305.1
<i>Clostridium_cochlearium</i>	GCA_900446985.1
<i>Clostridium_paraputrificum</i>	GCA_900461265.1
<i>Clostridium_perfringens</i>	GCA_900475545.1

Tabla 1.A.2 Especies pertenecientes al Cluster I *Clostridium sensu stricto*

MICROORGANISMO	IDENTIFICADOR GenBank
<i>Clostridium_novyi_NT</i>	GCA_000014125.1
<i>Clostridium_cellulovorans_743B</i>	GCA_000145275.1
<i>Clostridium_butyricum_E4_str_BoNT_E_BL5262</i>	GCA_000182605.1
<i>Clostridium_celatum_DSM_1785</i>	GCA_000320405.1
<i>Clostridium_sartagoforme_AAU1</i>	GCA_000401215.1
<i>Clostridium_tetanomorphum_DSM_665</i>	GCA_000647895.1
<i>Clostridium_tetani_ATCC_9441</i>	GCA_000762315.1
<i>Clostridium_botulinum_202F</i>	GCA_000789355.1
<i>Clostridium_scatologenes</i>	GCA_000968375.1
<i>Clostridium_sporogenes</i>	GCA_000973705.1
<i>Clostridium_carboxidivorans_P7</i>	GCA_001038625.1

<i>Clostridium_disporicum</i>	GCA_001404355.1
<i>Clostridium_colicanis</i> _DSM_13634	GCA_001593985.1
<i>Clostridium_tepidiprofundum</i> _DSM_19306	GCA_001594005.1
<i>Clostridium_magnum</i> _DSM_2767	GCA_001623875.1
<i>Clostridium_ljungdahlii</i>	GCA_001636845.1
<i>Clostridium_tyrobutyricum</i>	GCA_001642655.1
<i>Clostridium_saccharobutylicum</i> _DSM_13864	GCA_001657435.1
<i>Clostridium_pasteurianum</i> _DSM_525__ATCC_6013	GCA_001856645.1
<i>Clostridium_estertheticum</i> _subsp._estertheticum	GCA_001877035.1
<i>Clostridium_kluyveri</i>	GCA_001902295.1
<i>Clostridium_baratii</i>	GCA_001991075.2
<i>Clostridium_saccharoperbutylacetonicum</i>	GCA_002003305.1
<i>Clostridium_roseum</i>	GCA_002006175.1
<i>Clostridium_aurantibutyricum</i>	GCA_002006235.1
<i>Clostridium_puniceum</i>	GCA_002006345.1
<i>Clostridium_acetobutylicum</i>	GCA_002006425.1
<i>Clostridium_beijerinckii</i>	GCA_002006445.1
<i>Clostridium_thermobutyricum</i> _DSM_4928	GCA_002050515.1
<i>Clostridium_argentinense</i>	GCA_002074155.1
<i>Clostridium_algidicarnis</i> _DSM_15099	GCA_002934235.1
<i>Clostridium_vincentii</i>	GCA_002995745.1
<i>Clostridium_thermopalmarium</i> _DSM_5974	GCA_002995795.1
<i>Clostridium_diolis</i>	GCA_003015255.1
<i>Clostridium_drakei</i>	GCA_003096175.1
<i>Clostridium_gasigenes</i>	GCA_900104115.1
<i>Clostridium_frigidicarnis</i>	GCA_900111985.1
<i>Clostridium_uliginosum</i>	GCA_900112485.1
<i>Clostridium_fallax</i>	GCA_900129365.1
<i>Clostridium_grantii</i> _DSM_8605	GCA_900129965.1
<i>Clostridium_collagenovorans</i> _DSM_3089	GCA_900130005.1
<i>Clostridium_intestinale</i> _DSM_6191	GCA_900130055.1
<i>Clostridium_chauvoei</i> _JF4335	GCA_900168365.1
<i>Clostridium_acidisoli</i> _DSM_12555	GCA_900176305.1
<i>Clostridium_cochlearium</i>	GCA_900446985.1
<i>Clostridium_paraputrificum</i>	GCA_900461265.1
<i>Clostridium_perfringens</i>	GCA_900475545.1

Tabla 1.A.3. Especies de *Clostridium* con presencia del gen *dhaT* utilizadas en el estudio de genómica comparativa

MICROORGANISMO	IDENTIFICADOR GenBank
<i>Clostridium_novyi</i> _NT	GCA_000014125.1
<i>Clostridium_butyricum</i> _E4_str._BoNT_E_BL5262	GCA_000182605.1
<i>Clostridium_tetanomorphum</i> _DSM_665	GCA_000647895.1
<i>Clostridium_botulinum</i> _202F	GCA_000789355.1
<i>Clostridium</i> _sp._IBUN22A	GCA_000968245.1
<i>Clostridium</i> _sp._IBUN125C	GCA_000968265.1
<i>Clostridium</i> _sp._IBUN13A	GCA_000968315.1
<i>Clostridium_magnum</i> _DSM_2767	GCA_001623875.1
<i>Clostridium_coskatii</i>	GCA_001636835.1
<i>Clostridium_tyrobutyricum</i>	GCA_001642655.1
<i>Clostridium_saccharobutylicum</i> _DSM_13864	GCA_001657435.1
<i>Clostridium_ragsdalei</i> _P11	GCA_001675165.1
<i>Clostridium_pasteurianum</i> _DSM_525__ATCC_6013	GCA_001856645.1
<i>Clostridium_baratii</i>	GCA_001991075.2
<i>Clostridium_saccharoperbutylaceticum</i>	GCA_002003305.1
<i>Clostridium_puniceum</i>	GCA_002006345.1
<i>Clostridium_acetobutylicum</i>	GCA_002006425.1
<i>Clostridium_beijerinckii</i>	GCA_002006445.1
<i>Clostridium_chromiireducens</i>	GCA_002029255.1
<i>Clostridium_thermobutyricum</i> _DSM_4928	GCA_002050515.1
Rumini <i>Clostridium_hungatei</i>	GCA_002051585.1
<i>Clostridium_formicaceticum</i>	GCA_002080475.1
<i>Clostridium_autoethanogenum</i>	GCA_002189005.1
<i>Clostridium_vincentii</i>	GCA_002995745.1
<i>Clostridium_luticellarii</i>	GCA_002995845.1
<i>Clostridium_diolis</i>	GCA_003015255.1
<i>Clostridium_gasigenes</i>	GCA_900104115.1
<i>Clostridium_frigidicarnis</i>	GCA_900111985.1
<i>Clostridium_uliginosum</i>	GCA_900112485.1
<i>Clostridium_homopropionicum</i>	GCA_900113195.1
<i>Clostridium_fallax</i>	GCA_900129365.1
<i>Clostridium_perfringens</i>	GCA_900475545.1

B. LISTA DE SECUENCIAS CODIFICANTES CONSIDERADAS PARTE DEL GENOMA ACCESORIO DE *Clostridium* IBUN13A, QUE PODRÍAN CONSIDERARSE PARTE DEL GENOMA NÚCLEO.

Tabla 1.B.1. Proteínas accesorias de *Clostridium* sp. IBUN13A que podrían considerarse parte del genoma núcleo o *core*.

ID 13A	Función	# CEPAS CON EL GEN
KJZ84490.1	DNA polymerase III	31
KJZ97186.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	30
KJZ97806.1	copper-translocating P-type ATPase	30
KJZ97679.1	calcium-translocating P-type PMCA-type	30
KJZ84918.1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	30
KJZ89960.1	leucine--tRNA ligase	31
KJZ84519.1	DNA translocase	30
KJZ96506.1	endopeptidase La	31
KJZ97807.1	Cell division	30
KJZ84535.1	translation initiation factor IF-2	30
KJZ92076.1	ABC transporter ATP-binding	30
KJZ94680.1	system C	30
KJZ97011.1	phosphoglucomutase	30
KJZ97356.1	phosphoenolpyruvate- phosphotransferase	30
KJZ97879.1	arginine--tRNA ligase	30
KJZ85496.1	transcription termination factor Rho	30
KJZ97883.1	bifunctional purine biosynthesis	30
KJZ95205.1	glutamine transport ATP-binding	31
KJZ97272.1	inosine-5 -monophosphate dehydrogenase	30
KJZ92908.1	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	30
KJZ96988.1	UDP-N-acetylmuramyl peptide synthase	30
KJZ85045.1	tRNA modification GTPase	30
KJZ92914.1	bifunctional UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase	30
KJZ92909.1	asparagine--tRNA ligase	30
KJZ96852.1	23S rRNA (uracil-5-)-methyltransferase	30
KJZ91962.1	acetyl- carboxylase biotin carboxylase subunit	30
KJZ94647.1	gluconeogenesis factor	30
KJZ84546.1	Signal recognition particle-docking	30
KJZ85021.1	replicative DNA helicase	31
KJZ84569.1	peptidase U32	31
KJZ84634.1	Reverse rubrerythrin-1	30
KJZ85005.1	adenylosuccinate synthase	31
KJZ85002.1	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	31

KJZ95510.1	argininosuccinate synthase	30
KJZ84520.1	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	31
KJZ88417.1	RNA methyltransferase	31
KJZ84549.1	tRNA-specific 2-thiouridylase	30
KJZ84913.1	twitching motility	30
KJZ84299.1	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	31
KJZ85053.1	DNA polymerase III subunit beta	31
KJZ84922.1	DNA integrity scanning	30
KJZ97294.1	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	30
KJZ83341.1	tRNA dihydrouridine synthase	31
KJZ85504.1	threonylcarbamoyl-AMP synthase	30
KJZ85487.1	Rod shape-determining	31
KJZ84487.1	phosphate acyltransferase	30
KJZ85814.1	Catabolite control A	30
KJZ84622.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	30
KJZ95504.1	UDP-glucose 4-epimerase	30
KJZ94657.1	6-phosphofructokinase	31
KJZ96138.1	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	30
KJZ91724.1	phosphatidylserine decarboxylase	30
KJZ84917.1	23S rRNA (guanosine(2251)-2 -O)-methyltransferase	31
KJZ95457.1	bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase phosphomethylpyrimidine kinase	31
KJZ84522.1	ribosome biogenesis GTPase	31
KJZ96182.1	tRNA dimethylallyltransferase	30
KJZ84516.1	nitronate monooxygenase	30
KJZ84586.1	methionyl-tRNA formyltransferase	30
KJZ97303.1	8-oxoguanine DNA glycosylase	30
KJZ97032.1	sulfonate ABC transporter permease	30
KJZ97003.1	aspartate carbamoyltransferase	30
KJZ97141.1	HPr kinase phosphorylase	30
KJZ97005.1	dihydroorotate dehydrogenase catalytic subunit	31
KJZ94695.1	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	31
KJZ89537.1	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	30
KJZ86732.1	Cysteine synthase	31
KJZ97693.1	GTPase Era	31
KJZ94660.1	16S rRNA (cytidine(1402)-2 -O)-methyltransferase	31
KJZ84591.1	ribosome biogenesis GTPase	30
KJZ95203.1	Methionine aminopeptidase	30
KJZ97796.1	ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	30
KJZ97331.1	fumarate hydratase	30
KJZ85019.1	nucleoid occlusion	30
KJZ89911.1	GTP pyrophosphokinase	31
KJZ92917.1	pur operon repressor	30

KJZ97034.1	spermidine putrescine ABC transporter ATP-binding	30
KJZ85003.1	Pyrroline-5-carboxylate reductase	31
KJZ86180.1	5 -methylthioadenosine S-adenosylhomocysteine nucleosidase	30
KJZ84583.1	phosphate ABC transporter ATP-binding	30
KJZ84537.1	isoprenyl transferase	30
KJZ84533.1	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor	30
KJZ86201.1	tRNA threonylcarbamoyladenosine dehydratase	30
KJZ96735.1	ABC transporter	31
KJZ94665.1	tRNA1(Val) (adenine(37)-N6)-methyltransferase	31
KJZ97368.1	type I methionyl aminopeptidase	31
KJZ89538.1	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	30
KJZ97715.1	RNA polymerase sigma-F factor	31
KJZ97814.1	arginine transport ATP-binding	31
KJZ92444.1	amino acid ABC transporter ATP-binding	30
KJZ84596.1	DNA-binding response regulator	31
KJZ84604.1	3-oxoacyl-[acyl-carrier-] reductase	31
KJZ97278.1	16S rRNA pseudouridine(516) synthase	30
KJZ97207.1	NAD-dependent deacylase	30
KJZ96991.1	glutamine amidotransferase	30
KJZ86777.1	DNA-binding response regulator	30
KJZ89948.1	serine threonine phosphatase	31
KJZ85044.1	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	30
KJZ94871.1	purine nucleoside phosphorylase -type	30
KJZ90336.1	transcriptional regulatory	31
KJZ96903.1	DNA repair	30
KJZ97723.1	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	31
KJZ85479.1	endodeoxyribonuclease	30
KJZ86742.1	endonuclease III	30
KJZ97373.1	50S ribosomal L6	30
KJZ97345.1	50S ribosomal L3	30
KJZ97188.1	50S ribosomal L10	30
KJZ85013.1	R3H domain	31
KJZ97347.1	50S ribosomal L4	30
KJZ85055.1	spore protease	31
KJZ84615.1	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	30
KJZ96525.1	GTP-binding	31
KJZ84825.1	translation initiation factor IF-3	30
KJZ97801.1	ribonuclease M5	30
KJZ97337.1	fumarate hydratase	30
KJZ85477.1	spore protease	30
KJZ97363.1	30S ribosomal S5	30

KJZ97627.1	chemoreceptor glutamine deamidase	30
KJZ97247.1	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	30
KJZ84600.1	peptide deformylase	30
KJZ96841.1	tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis	31
KJZ84609.1	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-] dehydratase	31
KJZ84621.1	transcriptional regulator	30
KJZ85034.1	50S ribosomal L9	30
KJZ97417.1	50S ribosomal L16	30
KJZ84483.1	Holliday junction resolvase	31
KJZ96532.1	transcriptional regulator	30
KJZ83340.1	RNA-binding S1	31
KJZ97378.1	30S ribosomal S8	30
KJZ97309.1	transcriptional regulator	30
KJZ97190.1	50S ribosomal L7 L12	36
KJZ97384.1	50S ribosomal L14	30
KJZ84834.1	response regulator	30
KJZ97409.1	50S ribosomal L18	30
KJZ84566.1	alkaline-shock	30
KJZ97404.1	50S ribosomal L17	30
KJZ84611.1	DNA-binding	30
KJZ92925.1	septation	31
KJZ97415.1	30S ribosomal S10	30
KJZ97406.1	50S ribosomal L23	31
KJZ85042.1	30S ribosomal S6	31
KJZ84625.1	DUF370 domain-containing	30
KJZ94640.1	family transcriptional regulator	31
KJZ91655.1	cold-shock	30
KJZ85517.1	stage III sporulation D	31
KJZ85522.1	ATP F0F1 synthase subunit C	30
KJZ97172.1	TSCPD domain	31
KJZ87947.1	family transcriptional regulator	31
KJZ90060.1	XRE family transcriptional regulator	30
KJZ85062.1	ribosome-associated	31
KJZ84836.1	50S ribosomal L35	30
KJZ92353.1	ferredoxin	30
KJZ86959.1	ABC transporter ATP-binding	30

C. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE GENÓMICA COMPARATIVA DE 101 CEPAS DE *Clostridium* LISTADAS EN LPSN Y 47 CEPAS DE *Clostridium Sensu Stricto* EN CONJUNTO CON 4 CEPAS DERIVADAS DE ESTE ESTUDIO

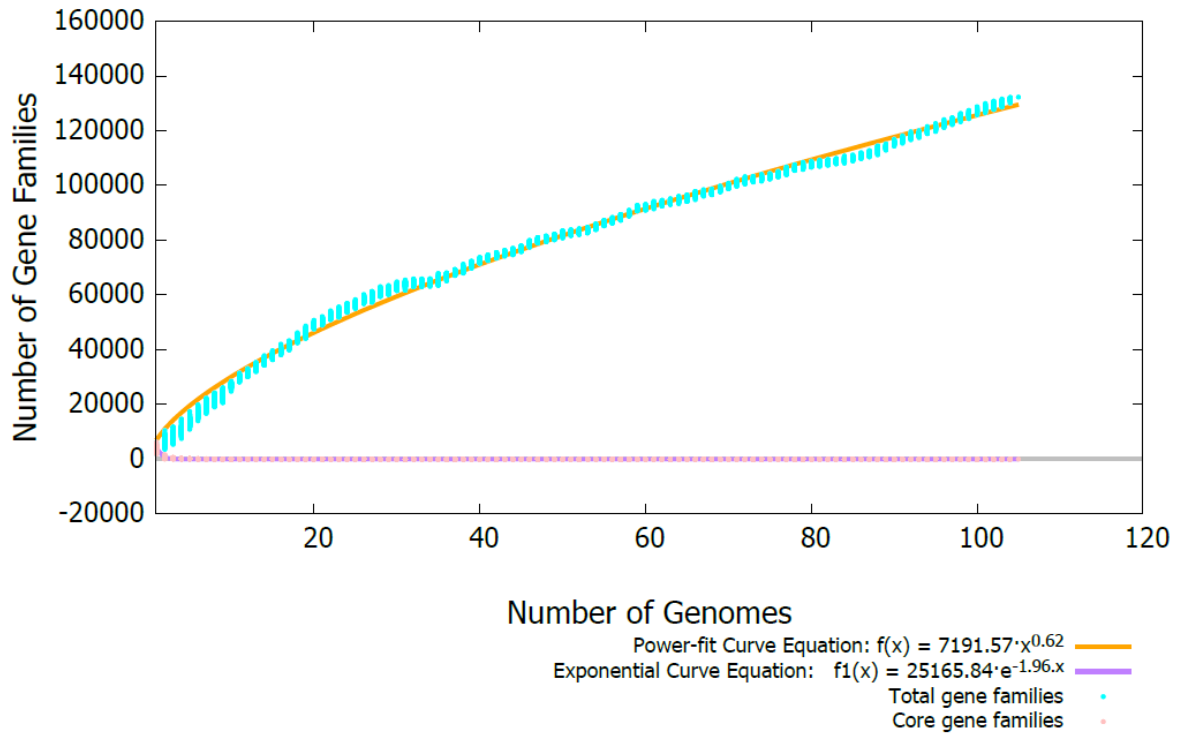


Figura 1.C.1. Distribución del perfil del pangenoma y core genoma para 105 cepas de *Clostridium* de acuerdo al agrupamiento con la herramienta USEARCH

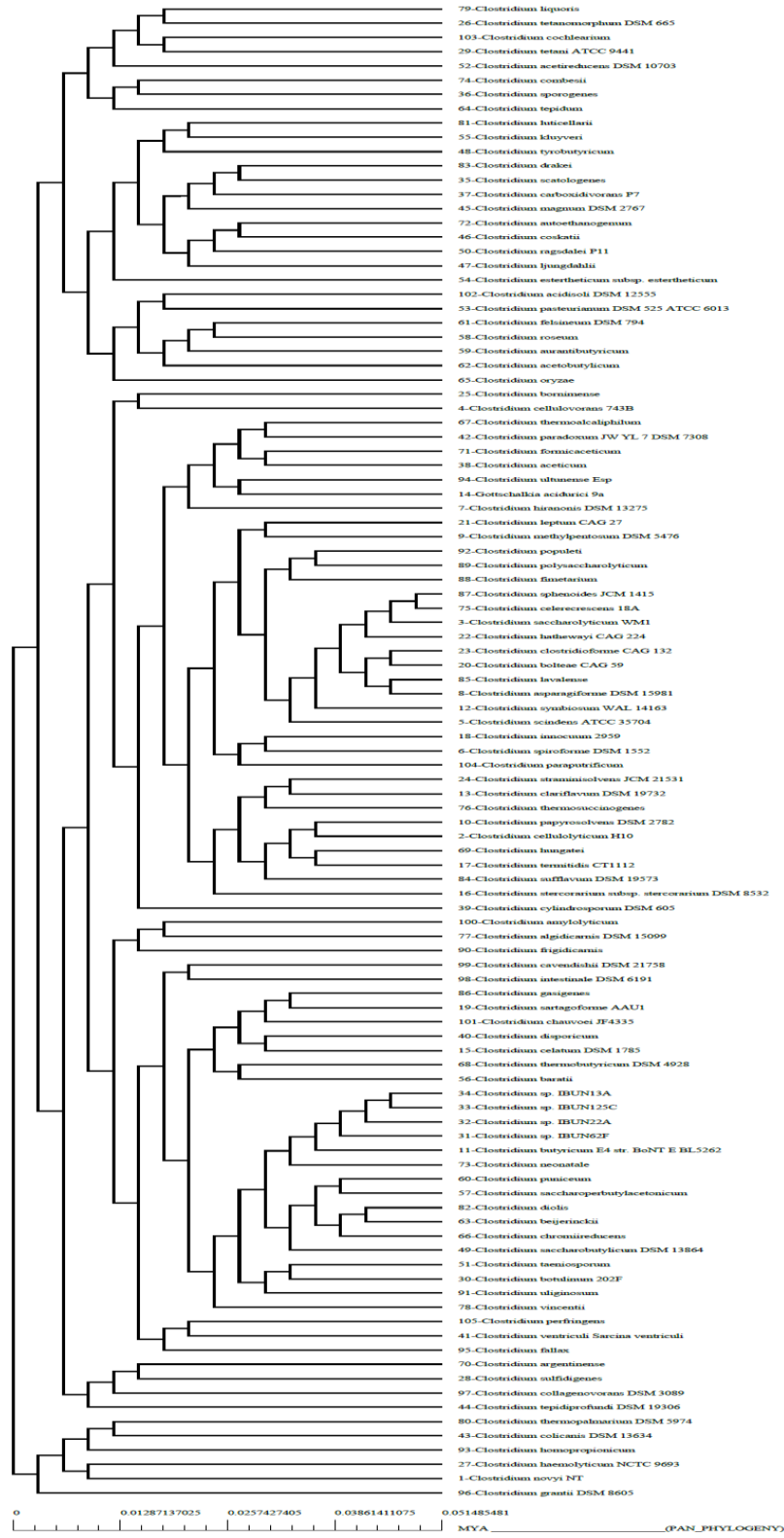


Figura 1.C.2. Análisis de agrupamiento para 105 especies de *Clostridium* basado en la matriz del pangenoma

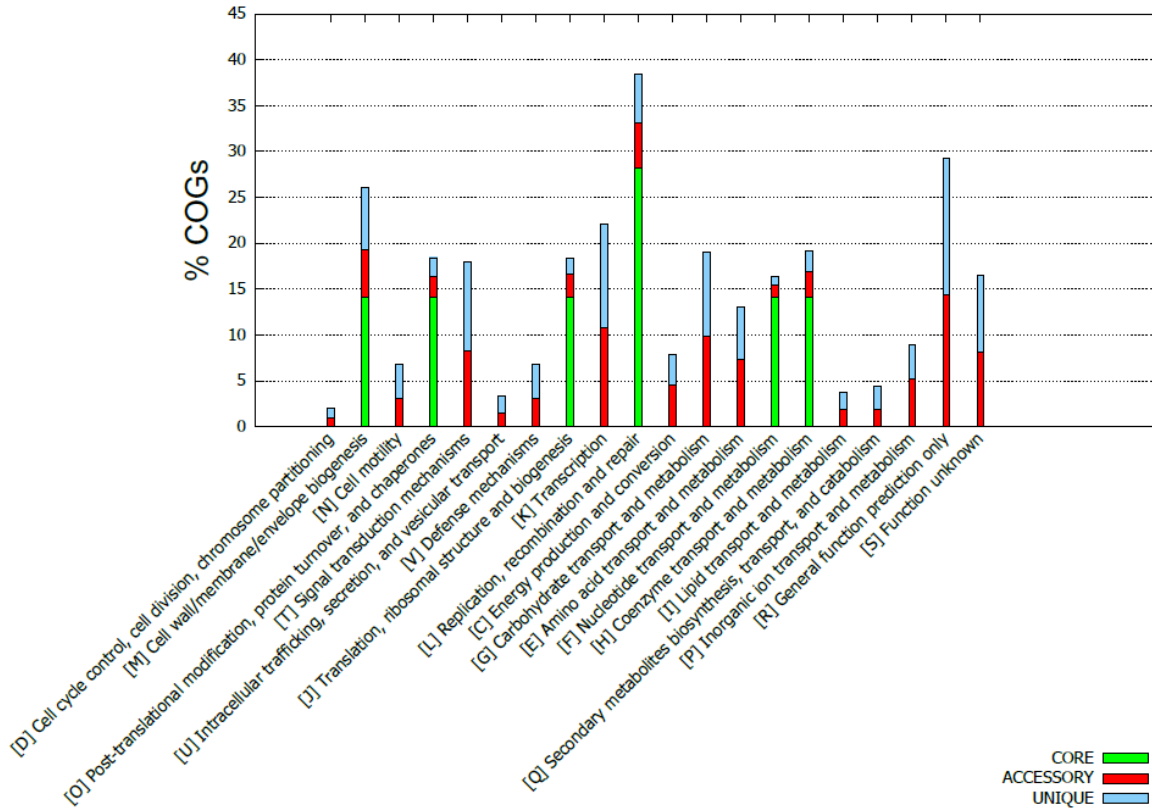


Figura 1.C.3. Distribución de COGs para genes core, accesorios y únicos determinados para 105 especies de *Clostridium*.

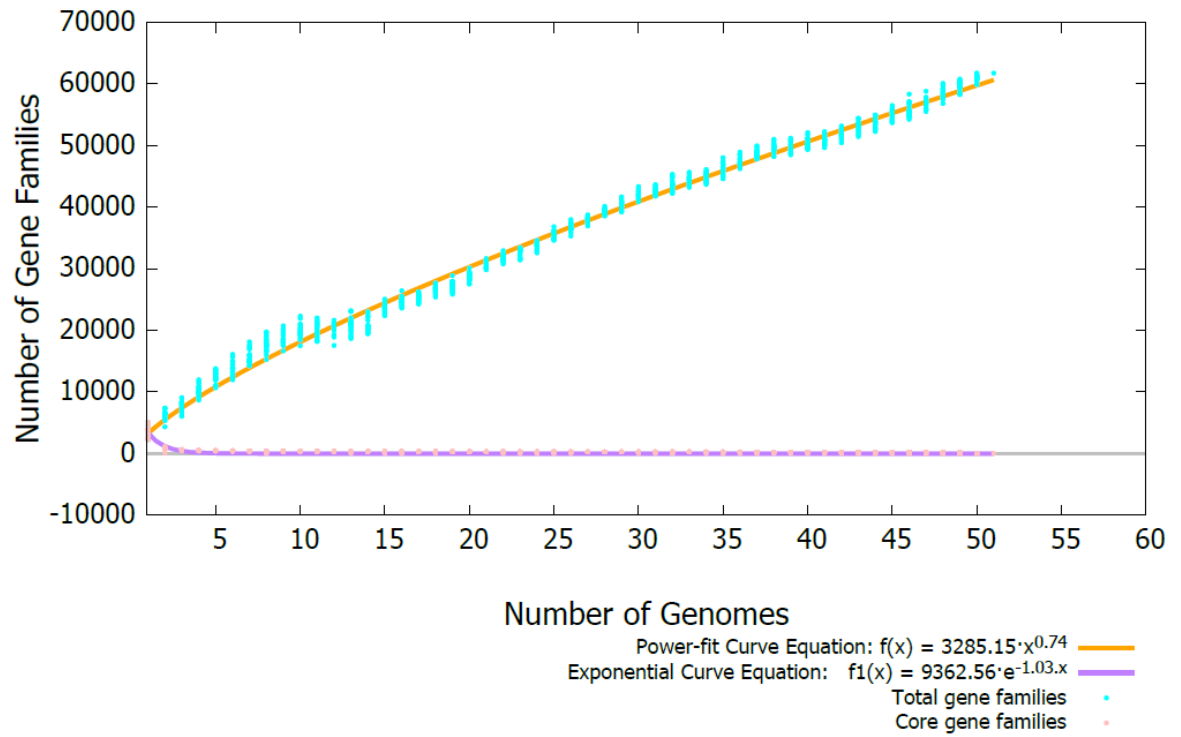


Figura 1.C.4. Distribución del perfil del pangenoma y core genoma para 51 cepas de *Clostridium sensu stricto* de acuerdo al agrupamiento con la herramienta USEARCH

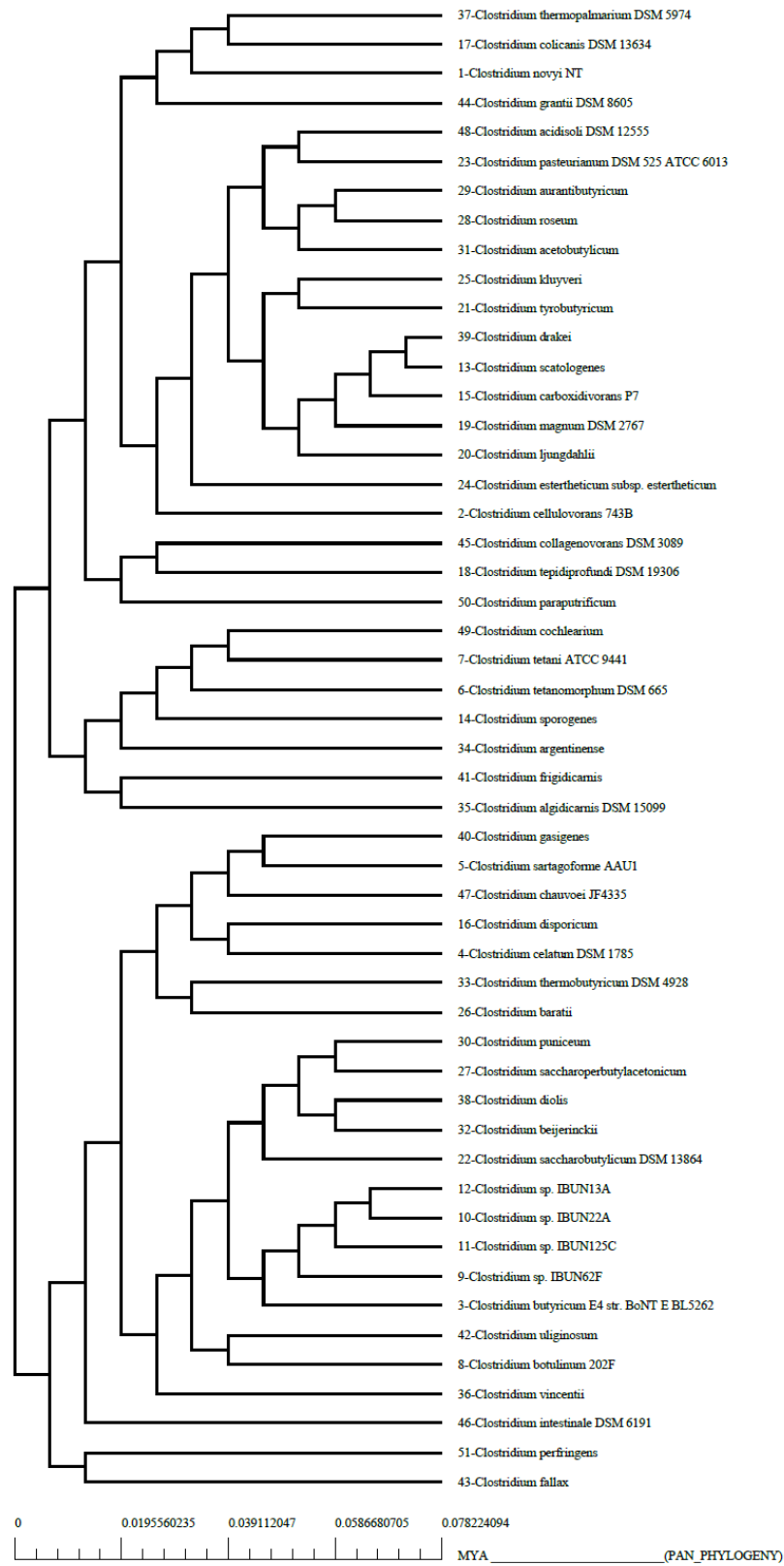


Figura 1.C.5. Análisis de agrupamiento para 51 especies de *Clostridium* sensu stricto basado en la matriz del pangenoma

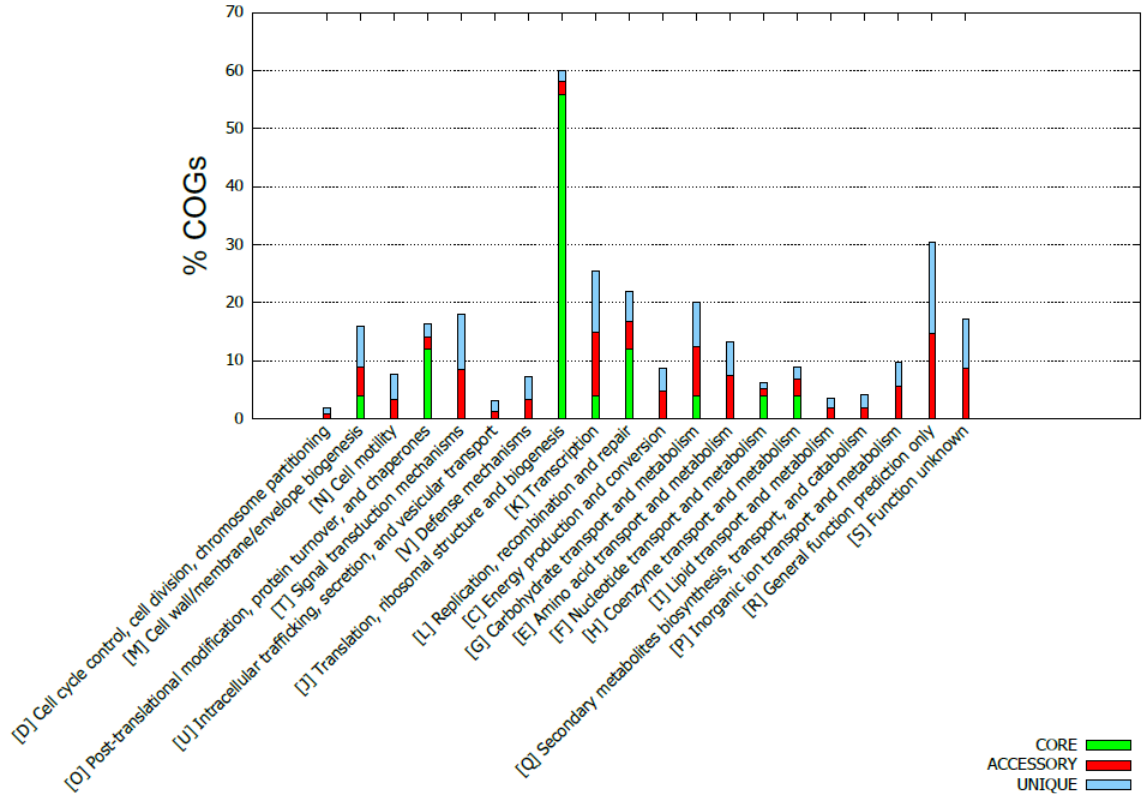


Figura 1.C.3. Distribucion de COGs para genes core, accesorios y únicos determinados para 51 especies de Clostridium sensu stricto.

Anexo 2.

A. CONTRIBUCIÓN AL CÁLCULO DE COMPONENTES DE BIOMASA BASADO EN LA INFORMACIÓN PUBLICADA PARA OTROS CLOSTRIDIOS Y PARA *Clostridium* sp. IBUN13A

Inicialmente se consideró la composición global de macromoléculas de biomasa contempladas para *Clostridium acetobutylicum* y *C. beijerinckii* (J. Lee et al., 2008; Milne et al., 2011a).

Respecto a la composición de biomasa de la cepa en estudio, para determinar el contenido de desoxiribonucleótidos, se utilizó la herramienta compseq de emboss para definir la prevalencia de cada uno de los nucleótidos en el genoma ensamblado (contigs) de *Clostridium* IBUN13A. El contenido de ribonucleótidos fue determinado por medio de la herramienta gcalculator, utilizando los marcos abiertos de lectura en el caso del mRNA y las secuencias predichas de ARN ribosomal con RNAmmer y de ARN de transferencia con tRNAscan. Para definir el contenido de aminoácidos, se realizó un conteo a partir de las proteínas predichas para el genoma ensamblado de *Clostridium* IBUN13A, utilizando comandos simples de shell. La cantidad de peptidoglicano, ácidos teicoicos y elementos traza fueron tomados de lo reportado para *C. acetobutylicum* (J. Lee et al., 2008) y la composición de lípidos se calculó de acuerdo con lo descrito en el Handbook of Clostridia (Goldstein & Johnston, 2005) bajo el procedimiento publicado para *C. beijerinckii* (Milne et al., 2011a).

Una vez se realizaron todos los cálculos con la información obtenida, se obtuvo la ecuación de biomasa para el microorganismo:

$$(0,2161) \text{ ala-L} + (0,1895) \text{ arg-L} + (0,2302) \text{ asn-L} + (0,2238) \text{ asp-L} + (0,1150) \text{ cys-L} \\ + (0,2290) \text{ glu-L} + (0,1665) \text{ gln-L} + (0,2237) \text{ gly} + (0,1173) \text{ his-L} + (0,2390) \text{ ile-L} +$$

(0,2379) leu-L + (0,2386) lys-L + (0,1805) met-L + (0,2124) phe-L + (0,1771) pro-L + (0,2309) ser-L + (0,2183) thr-L + (0,0704) trp-L + (0,2096) tyr-L + (0,2291) val-L + (0,0282) damp + (0,0116) dcmp + (0,0112) dgmp + (0,0286) dtmp + (0,0062) amp + (0,0046) cmp + (0,0069) gmp + (0,0047) ump + (0,0701) PE + (0,0220) PG + (0,0073) Cardiolipin + (0,1117)NAM + (0,1117)NAG + (0,1117) D-ala + (0,1117) ala-L + (0,1117) DAP + (0,1117) D-glu + (0,0601)Teich + (0,0889)udpglu+ (0,1778)udpgal + (0,0124) nad + (0,0111) nadp + (0,0108) coa + (0,0185) thf + (0,0181) fmn + (0,0105) fad (106) atp + (106) h2o → (106) adp + (106) h + (106) pi + X

B. PROPUESTA DE REACCIONES DENTRO DEL SUBSISTEMA DE METABOLISMO DE LÍPIDOS PARA ADICIONAR A LA RED iCbu641

De acuerdo con la composición de lípidos de membrana establecida en el punto anterior, y con la información obtenida con la anotación de RAST previamente, se colectaron las posibles reacciones conducentes a la formación de lípidos de membrana que se propone sean adicionadas a la red en reemplazo de las reacciones genéricas que hacen parte de esta.

KEGG Rxn ID	Rxn Definition	Rxn Equation	Ezyme ID	Gene	Lower Bound	Upper Bound	Seed ID
R00851	GLYC-3-P + Myristoyl-ACP => ACP + 1-tetradecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00093 + C05761 => C00229 + cpd15331	2.3.1.1 5	plsX ClosIBUN13A_CONTIG83 g00995	0	1000	rxn085 47
R00851	GLYC-3-P + Palmitoyl-ACP => ACP + 1-hexadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00093 + cpd15277 => C00229 + cpd15327	2.3.1.1 5	plsX ClosIBUN13A_CONTIG83 g00995	0	1000	rxn085 49
R00851	GLYC-3-P + Hexadecenoyl-ACP => ACP + 1-hexadec-9-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00093 + cpd15239 => C00229 + cpd15326	2.3.1.1 5	plsX ClosIBUN13A_CONTIG83 g00995	0	1000	rxn085 50
R00851	GLYC-3-P + Octadecanoyl-ACP => ACP + 1-octadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00093 + cpd15268 => C00229 + cpd15329	2.3.1.1 5	plsX ClosIBUN13A_CONTIG83 g00995	0	1000	rxn085 51
R00851	GLYC-3-P + Octadecenoyl-ACP => ACP + 1-octadec-11-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00093 + C01203 => C00229 + cpd15328	2.3.1.1 5	plsX ClosIBUN13A_CONTIG83 g00995	0	1000	rxn085 52
R00851	GLYC-3-P + Palmitoyl-CoA => CoA + 1-hexadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00093 + C00154 => C00010 + cpd15327	2.3.1.1 5	plsX ClosIBUN13A_CONTIG83 g00995	0	1000	rxn102 02

R00851	GLYC-3-P + Myristoyl-CoA => CoA + 1-tetradecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00093 + C02593 => C00010 + cpd15331	2.3.1.1 5	plsX ClosIBUN13A_CONTIG83 g00995	0	1000	rxn102 03
R00851	GLYC-3-P + strcoa => CoA + 1-octadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00093 + C00412 => C00010 + cpd15329	2.3.1.1 5	plsX ClosIBUN13A_CONTIG83 g00995	0	1000	rxn102 04
R02241	Myristoyl-ACP + 1-tetradecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate => ACP + 1,2-ditetradecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C05761 + cpd15331 => C00229 + cpd15522	2.3.1.5 1	CBU1726 CBU2431	0	1000	rxn080 84
R02241	Palmitoyl-ACP + 1-hexadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate => ACP + 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	cpd15277 + cpd15327 => C00229 + cpd15524	2.3.1.5 1	CBU1726 CBU2431	0	1000	rxn080 86
R02241	Hexadecenoyl-ACP + 1-hexadec-9-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate => ACP + 1,2-dihexadec-9-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate	cpd15239 + cpd15326 => C00229 + cpd15525	2.3.1.5 1	CBU1726 CBU2431	0	1000	rxn080 87
R02241	Octadecanoyl-ACP + 1-octadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate => ACP + 1,2-dioctadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	cpd15268 + cpd15329 => C00229 + cpd15526	2.3.1.5 1	CBU1726 CBU2431	0	1000	rxn080 88
R02241	Octadecenoyl-ACP + 1-octadec-11-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate => ACP + 1,2-dioctadec-11-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C01203 + cpd15328 => C00229 + cpd15527	2.3.1.5 1	CBU1726 CBU2431	0	1000	rxn080 89
R02241	Palmitoyl-CoA + 1-hexadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate => CoA + 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00154 + cpd15327 => C00010 + cpd15524	2.3.1.5 1	CBU1726 CBU2431	0	1000	rxn102 11
R02241	Myristoyl-CoA + 1-tetradecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate => CoA + 1,2-ditetradecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C02593 + cpd15331 => C00010 + cpd15522	2.3.1.5 1	CBU1726 CBU2431	0	1000	rxn102 12
R02241	strcoa + 1-octadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate => CoA + 1,2-dioctadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate	C00412 + cpd15329 => C00010 + cpd15526	2.3.1.5 1	CBU1726 CBU2431	0	1000	rxn102 13
R01799	CTP + 1,2-ditetradecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate <=> PPI + CDP-1,2-ditetradecanoylglycerol	C00063 + cpd15522 <=> C00013 + cpd15423	2.7.7.4 1	CBU1230	- 1000	1000	rxn083 07
R01799	CTP + 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate <=> PPI + CDP-1,2-dihexadecanoylglycerol	C00063 + cpd15524 <=> C00013 + cpd15419	2.7.7.4 1	CBU1230	- 1000	1000	rxn083 09

R01799	CTP + 1,2-dihexadec-9-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate <=> PPi + CDP-1,2-dihexadec-9-enoylglycerol	C00063 + cpd15525 <=> C00013 + cpd15418	2.7.7.4 1	CBU1230	- 1000	1000	rxn083 10
R01799	CTP + 1,2-dioctadecanoyl-sn-glycerol 3-phosphate <=> PPi + CDP-1,2-dioctadecanoylglycerol	C00063 + cpd15526 <=> C00013 + cpd15421	2.7.7.4 1	CBU1230	- 1000	1000	rxn083 11
R01799	CTP + 1,2-dioctadec-11-enoyl-sn-glycerol 3-phosphate <=> PPi + CDP-1,2-dioctadec-11-enoylglycerol	C00063 + cpd15527 <=> C00013 + cpd15420	2.7.7.4 1	CBU1230	- 1000	1000	rxn083 12
R01800	Serine + CDP-1,2-ditetradecanoylglycerol => CMP + H+ + phosphatidylserine ditetradecanoyl	C00065 + cpd15423 => C00055 + C00080 + cpd15553	2.7.8.8	CBU2408 CBU1692	0	1000	rxn092 06
R01800	Serine + CDP-1,2-dihexadecanoylglycerol => CMP + H+ + phosphatidylserine dihexadecanoyl	C00065 + cpd15419 => C00055 + C00080 + cpd15555	2.7.8.8	CBU2408 CBU1692	0	1000	rxn092 08
R01800	Serine + CDP-1,2-dihexadec-9-enoylglycerol => CMP + H+ + phosphatidylserine dihexadec-9-enoyl	C00065 + cpd15418 => C00055 + C00080 + cpd15556	2.7.8.8	CBU2408 CBU1692	0	1000	rxn092 09
R01800	Serine + CDP-1,2-dioctadecanoylglycerol => CMP + H+ + phosphatidylserine dioctadecanoyl	C00065 + cpd15421 => C00055 + C00080 + cpd15557	2.7.8.8	CBU2408 CBU1692	0	1000	rxn092 10
R01800	Serine + CDP-1,2-dioctadec-11-enoylglycerol => CMP + H+ + phosphatidylserine dioctadec-11-enoyl	C00065 + cpd15420 => C00055 + C00080 + cpd15558	2.7.8.8	CBU2408 CBU1692	0	1000	rxn092 11
R02055	2 H+ + phosphatidylserine ditetradecanoyl <=> CO2 + phosphatidylethanolamine ditetradecanoyl	2 C00080 + cpd15553 <=> C00011 + cpd15529	4.1.1.6 5	CBU2534	- 1000	1000	rxn091 98
R02055	2 H+ + phosphatidylserine dihexadecanoyl <=> CO2 + phosphatidylethanolamine dihexadecanoyl	2 C00080 + cpd15555 <=> C00011 + cpd15531	4.1.1.6 5	CBU2534	- 1000	1000	rxn092 00
R02055	2 H+ + phosphatidylserine dihexadec-9-enoyl <=> CO2 + phosphatidylethanolamine dihexadec-9-enoyl	2 C00080 + cpd15556 <=> C00011 + cpd15532	4.1.1.6 5	CBU2534	- 1000	1000	rxn092 01
R02055	2 H+ + phosphatidylserine dioctadecanoyl <=> CO2 + phosphatidylethanolamine dioctadecanoyl	2 C00080 + cpd15557 <=> C00011 + cpd15533	4.1.1.6 5	CBU2534	- 1000	1000	rxn092 02

R02055	2 H+ + phosphatidylserine dioctadec-11-enoyl <=> CO2 + phosphatidylethanolami ne dioctadec-11-enoyl	2 C00080 + cpd15558 <=> C00011 + cpd15534	4.1.1.6 5	CBU2534	- 1000	1000	rxn092 03
R01801	GLYC-3-P + CDP-1,2- ditetradecanoylglycerol <=> CMP + Phosphatidylglyceropho sphate ditetradecanoyl	C00093 + cpd15423 <=> C00055 + cpd15543	2.7.8.5	CBU1256	- 1000	1000	rxn091 09
R01801	GLYC-3-P + CDP-1,2- dihexadecanoylglycerol <=> CMP + Phosphatidylglyceropho sphate dihexadecanoyl	C00093 + cpd15419 <=> C00055 + cpd15545	2.7.8.5	CBU1256	- 1000	1000	rxn091 11
R01801	GLYC-3-P + CDP-1,2- dihexadec-9- enoylglycerol <=> CMP + Phosphatidylglyceropho sphate dihexadec-9- enoyl	C00093 + cpd15418 <=> C00055 + cpd15546	2.7.8.5	CBU1256	- 1000	1000	rxn091 12
R01801	GLYC-3-P + CDP-1,2- dioctadecanoylglycerol <=> CMP + Phosphatidylglyceropho sphate dioctadecanoyl	C00093 + cpd15421 <=> C00055 + cpd15547	2.7.8.5	CBU1256	- 1000	1000	rxn091 13
R01801	GLYC-3-P + CDP-1,2- dioctadec-11- enoylglycerol <=> CMP + Phosphatidylglyceropho sphate dioctadec-11- enoyl	C00093 + cpd15420 <=> C00055 + cpd15548	2.7.8.5	CBU1256	- 1000	1000	rxn091 14
R02029	H2O + Phosphatidylglyceropho sphate didodecanoyl => Phosphate + H+ + Phosphatidylglycerol didodecanoyl	C00001 + cpd15542 => C00009 + C00080 + cpd15535	3.1.3.2 7	CBU3843	0	1000	rxn091 01
R02030	H2O + Phosphatidylglyceropho sphate ditetradecanoyl => Phosphate + H+ + Phosphatidylglycerol ditetradecanoyl	C00001 + cpd15543 => C00009 + C00080 + cpd15536	3.1.3.2 7	CBU3843	0	1000	rxn091 02
R02032	H2O + Phosphatidylglyceropho sphate dihexadecanoyl => Phosphate + H+ + Phosphatidylglycerol dihexadecanoyl	C00001 + cpd15545 => C00009 + C00080 + cpd15538	3.1.3.2 7	CBU3843	0	1000	rxn091 04
R02033	H2O + Phosphatidylglyceropho sphate dihexadec-9- enoyl => Phosphate + H+ + Phosphatidylglycerol dihexadec-9-enoyl	C00001 + cpd15546 => C00009 + C00080 + cpd15539	3.1.3.2 7	CBU3843	0	1000	rxn091 05
R02034	H2O + Phosphatidylglyceropho sphate dioctadecanoyl => Phosphate + H+ + Phosphatidylglycerol dioctadecanoyl	C00001 + cpd15547 => C00009 + C00080 + cpd15540	3.1.3.2 7	CBU3843	0	1000	rxn091 06

R02035	H2O + Phosphatidylglycerophosphate dioctadec-11-enoyl => Phosphate + H+ + Phosphatidylglycerol dioctadec-11-enoyl	C00001 + cpd15548 => C00009 + C00080 + cpd15541	3.1.3.2 7	CBU3843	0	1000	rxn091 07
R07390	2 Phosphatidylglycerol dihexadecanoyl <=> GLYC + Palmitoylcardiolipin (B. subtilis)	2 cpd15538 <=> C00116 + cpd15791	2.7.8.-	A0A0F4WWH7 A0A0F4WAS1	- 1000	1000	rxn103 34
R07390	2 Phosphatidylglycerol ditetradecanoyl <=> GLYC + Myristoylcardiolipin (B. subtilis)	2 cpd15536 <=> C00116 + cpd15792	2.7.8.-	A0A0F4WWH7 A0A0F4WAS1	- 1000	1000	rxn103 35
R07390	2 Phosphatidylglycerol dioctadecanoyl <=> GLYC + Stearoylcardiolipin (B. subtilis)	2 cpd15540 <=> C00116 + cpd15793	2.7.8.-	A0A0F4WWH7 A0A0F4WAS1	- 1000	1000	rxn103 36

Anexo 3

A. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ARN

Inicialmente se realizaron cultivos en anaerobiosis, con un volumen efectivo de trabajo de 100 ml con medio TGY ya fuera usando glucosa o glicerol como sustrato, se tomaron muestras al final de la fase de latencia y en fase media exponencial y se probó el protocolo de extracción por solventes previamente estandarizado en el grupo de investigación y el kit comercial de extracción de Thermo Scientific GeneJet Blood RNA, del cual se disponía en el laboratorio. Los resultados que se observan en la figura 4.A.1. mostraron preliminarmente la degradación del material, por lo que se descartó su uso.

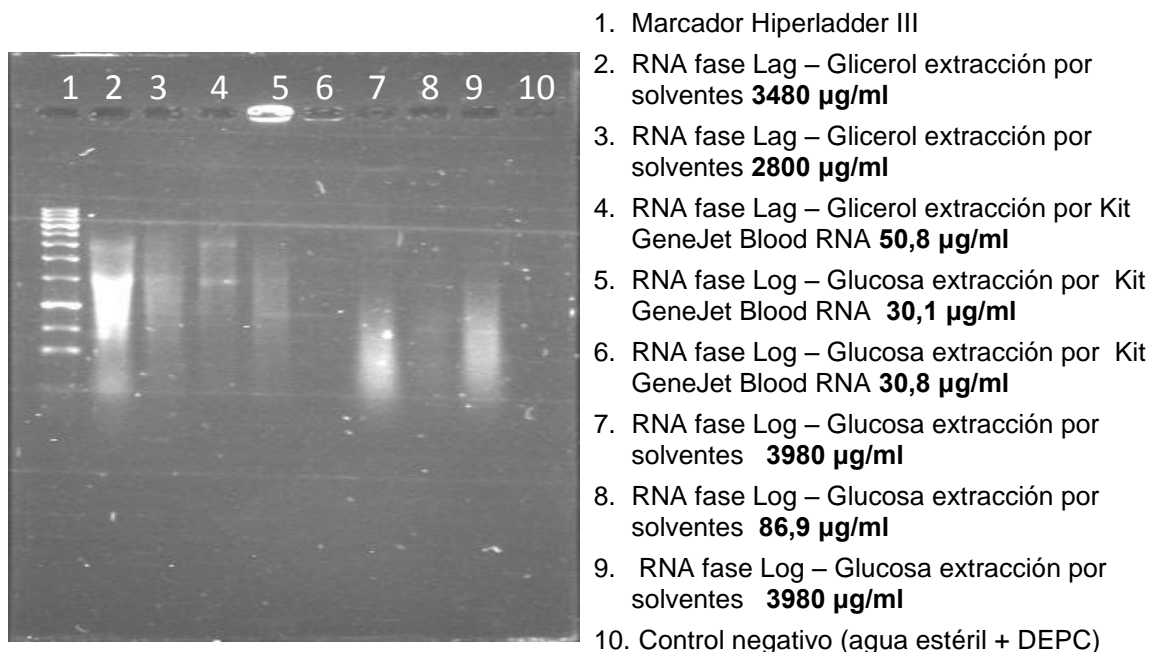


FIGURA 3.A.1. Gel de agarosa al 1,2% en condiciones denaturantes con extractos de diferentes fases de crecimiento bajo 2 métodos de extracción y purificación

Después de esto y de acuerdo con lo reportado en bibliografía y a lo recomendado por otros investigadores, se procedió a probar dos kits combinados respecto a la extracción

estandarizada en el laboratorio además del agente de protección (RNA-protect VS RNA Later). Para realizar este ensayo se cultivó el microorganismo en viales de 100 ml en medio TGY con glucosa y se realizaron las extracciones tal y como se relaciona en la figura 4.A.2. El resultado indicó que el procedimiento con mejores resultados correspondía a la combinación de los kits TRizol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (Invitrogen) y RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen), usando RNA protect para preservar la biomasa ya que permitió obtener la mayor concentración y menor degradación (figura 4.A.3).

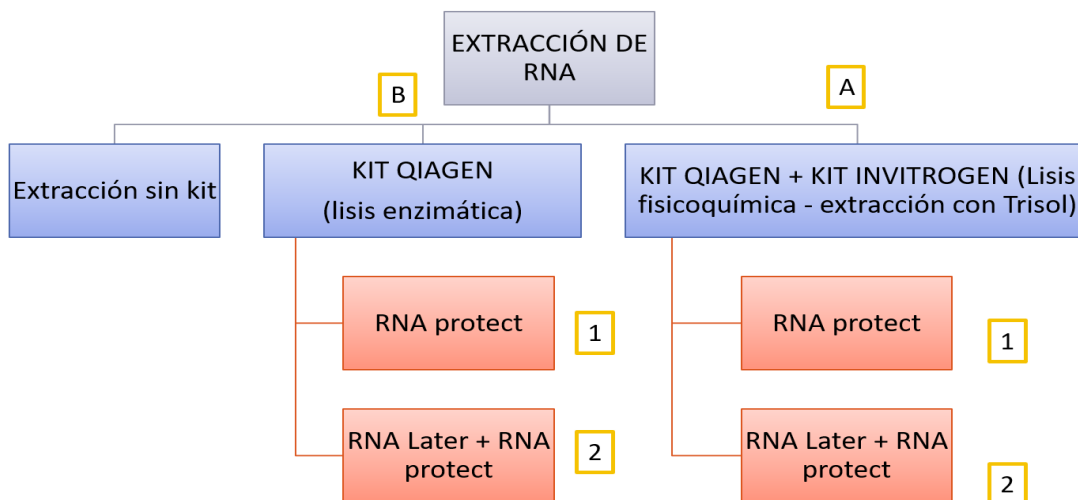


FIGURA 3.A.2. Esquema de tratamientos para determinar el procedimiento de extracción y purificación del ARN.

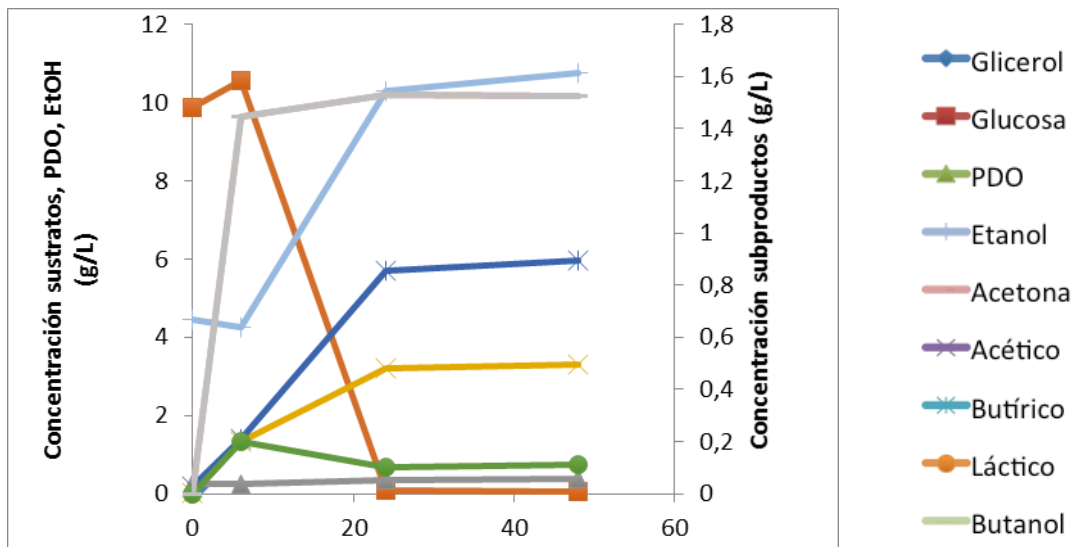


1. MARCADOR
2. RNA 6h glicerol < 0,05 µg/ml
3. RNA 24h glicerol < 0,05 µg/ml
4. RNA 48h glicerol 19,8 µg/ml
5. **Prueba 1A 718 µg/ml**
6. Prueba 2A 406 µg/ml
7. Prueba 1B 712 µg/ml
8. Prueba 2B 26 µg/ml
9. Control negativo (agua estéril + DEPC)

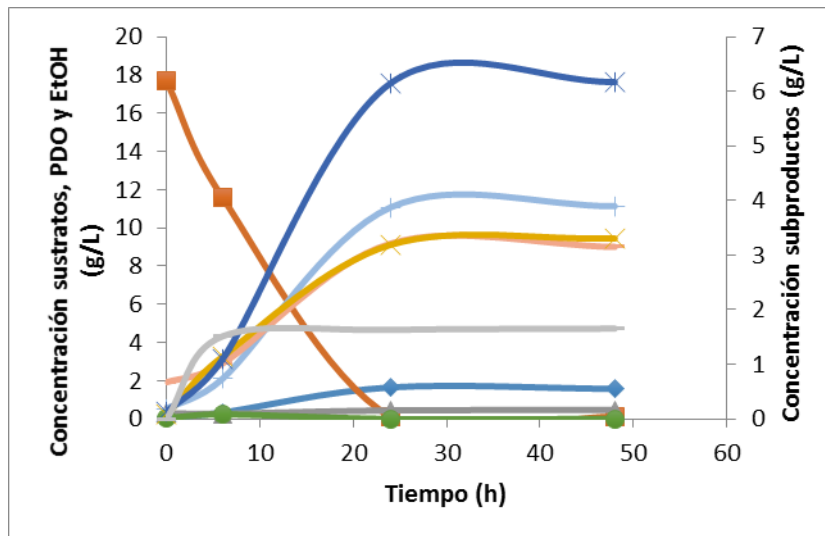
FIGURA 3.A.3. Gel de agarosa al 1,2% en condiciones denaturantes con extractos de cultivo en glucosa bajo diferentes combinaciones de procedimientos de preservación y extracción de ARN

De esta forma se continuó así el trabajo, para lo que se realizaron fermentaciones en volumen de 4 L, utilizando un medio de cultivo industrial estandarizado en el grupo de investigación, con glucosa (20 g/l) o con glicerol (40g/l) como fuente de carbono. Los resultados de las cinéticas de formación de productos para tres fermentaciones por duplicado utilizando glucosa como sustrato se pueden observar en la figura 4.A.4. A pesar de ser fermentaciones con pH controlado, se pudo observar la producción de solventes tipo acetona y butanol, sin embargo el producto principal de las fermentaciones fue el etanol.

A.



B.



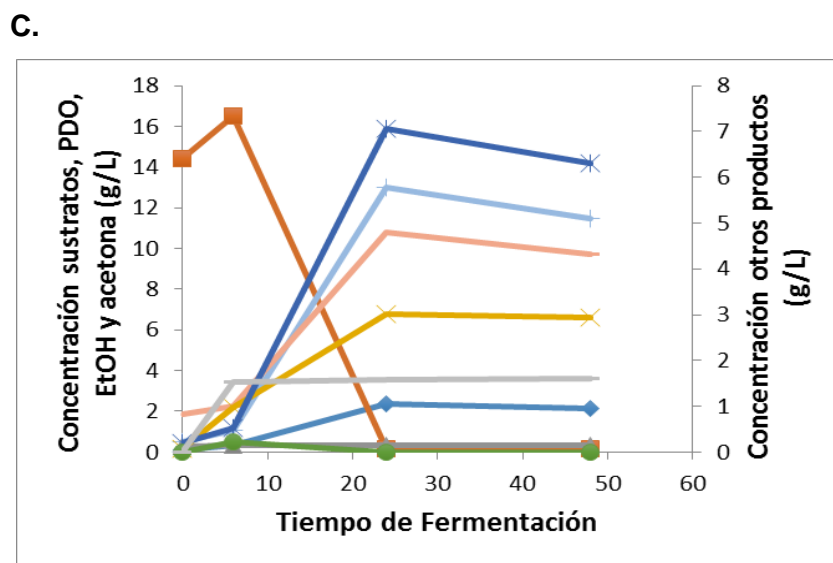
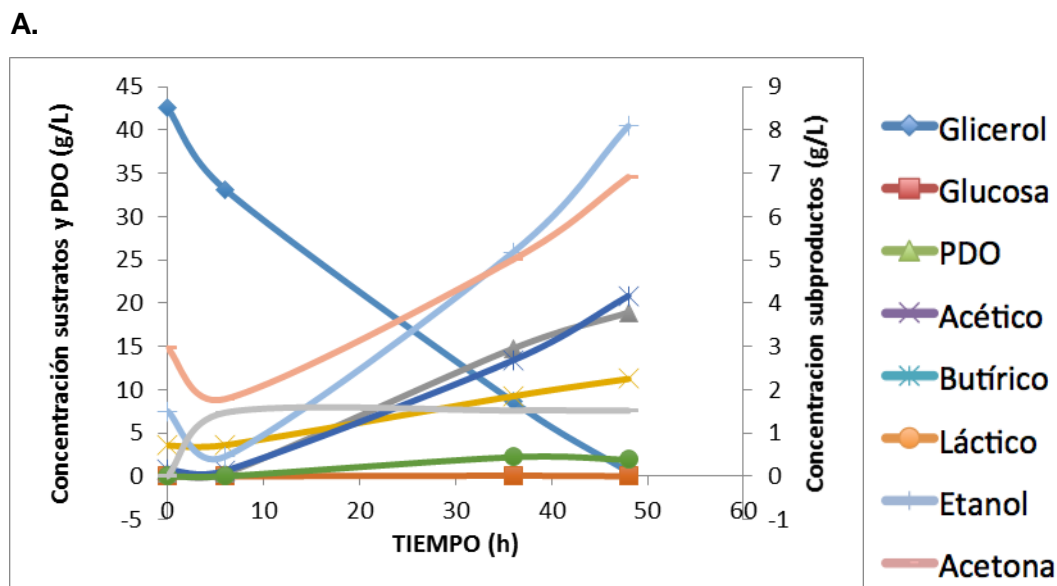


FIGURA 3.A.4. Cinéticas de formación de producto utilizando como sustrato glucosa (20g/L) **A.** Primera réplica; **B.** Segunda réplica; **C.** Tercera réplica. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Los resultados de las cinéticas de formación de productos para tres fermentaciones por duplicado utilizando glicerol como sustrato se pueden observar en la figura 4.A.5. Para este caso, como era de esperarse, el mayor producto de la fermentación es el 1,3-Propanodiol. La producción de ácido láctico fue casi nula para los dos sustratos probados, y como subproducto predominó el etanol. Para el caso del glicerol se observó una producción incipiente de los solventes acetona y butanol.



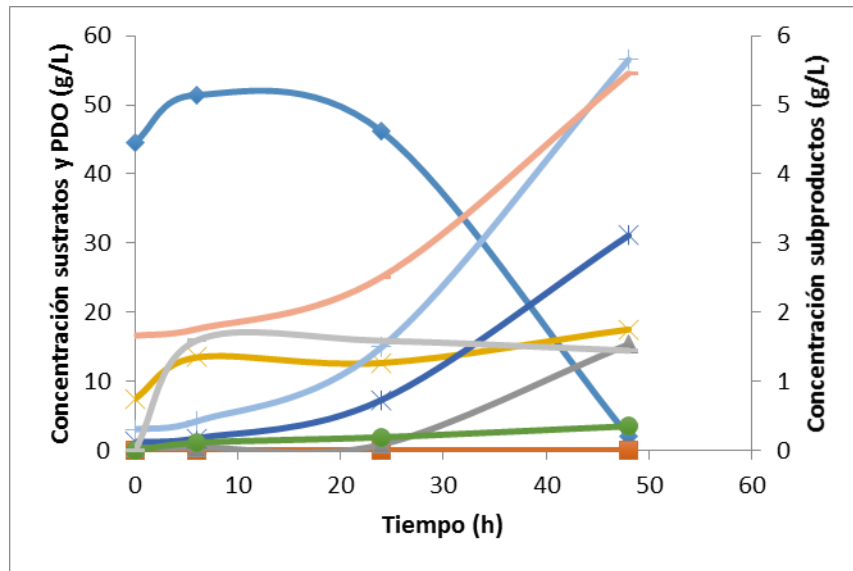
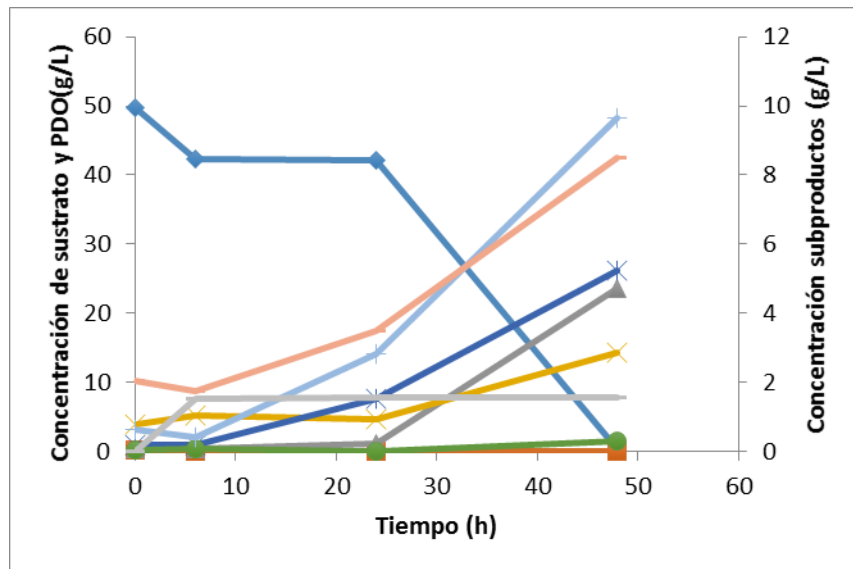
B.**C.**

FIGURA 3.A.5. Cinéticas de formación de producto utilizando como sustrato glicerol (40g/L) **A.** Primera réplica; **B.** Segunda réplica; **C.** Tercera réplica. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

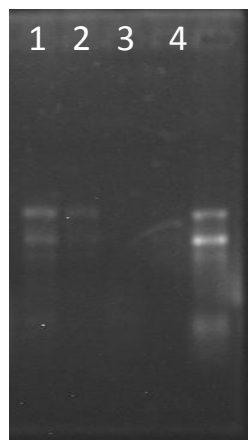
Por otra parte, se obtuvieron las muestras de ARN, las cuales fueron analizadas en MacroGen para verificar que fueran aptas para la secuenciación. Los resultados se pueden observar en la Tabla 4.A.1. Debido a que se ha considerado que un número RIN cercano a 7 es apto para la construcción de librerías de hebra sencilla direccionada, y de

acuerdo con los resultados obtenidos, solo dos muestras tuvieron resultados propicios para la continuación del trabajo.

Tabla 4.A.1. Resultados de calidad de las muestras de ARN obtenidas en este estudio. Las filas en color azul señalan las muestras que pasaron los umbrales de calidad.

MUESTRA	CONC. Nanodrop (ng/μL)	260/280	CONC. MACROGEN (ng/μL)	RIN
Glicerol 1-6h	1135,85	2,195	203,42	4,7
Glicerol 1-48h	1131,5	2,155	450,04	3,4
Glucosa 1-6h	455,2	2,145	118,16	7,1
Glucosa 1-48h	185,15	2,095	57,53	5,4
Glicerol 2-6h	1170,3	2,195	187,99	3,4
Glicerol 2-48h	1833,4	2,165	636,041	4,3
Glucosa 2-6h	187,65	2,06	48,40	4,8
Glucosa 2-48h	208,45	2,1	20,64	4,7
Glicerol 3-6h	353,15	2,075	64,06	4,3
Glicerol 3-48h	2215,55	2,135	1032,78	5,1
Glucosa 3-6h	1090,1	2,135	468,65	6,6
Glucosa 3-48h	289,9	1,975	104,87	5,4

Por tal razón, se decidió repetir los experimentos, sin embargo, con el fin de agilizar la toma de muestras y obtener una concentración importante de células en un menor volumen, se decidió trabajar en viales de 40 ml. Inicialmente se planteó la posibilidad de cambiar el método de lisis celular, por lo que se evaluó la posibilidad de usar la técnica de *Bead Beating*. Los resultados finales se pueden observar en la figura 4.A.6. donde se puede observar que las condiciones inicialmente trabajadas son propicias para obtener ARN (carril 5).



1. Bead Beating 4 ciclos 20 seg : 28,9 ng de ARN/mL
2. Bead Beating un ciclo 1 minuto: 25, 6 ng de ARN/mL
3. Réplica Bead Beating un ciclo 1 minuto: < 20 ng de ARN/mL
4. Max Bacterial Enhancement + 400 μl de biomasa : 20,3 ng de ARN/mL

FIGURA 3.A.6. Gel en condiciones denaturantes con formaldehído para la evaluación del método de lisis celular. Las relaciones de absorbancia 260/280 fueron del orden de 2,05 a 2,1.

Los resultados obtenidos respecto a las muestras de ARN obtenidas por medio de fermentaciones con glucosa o glicerol en un volumen efectivo de trabajo de 40 ml se pueden observar en la tabla 4.A.2. Se realizó análisis de 12 muestras con concentraciones aptas para su envío a secuenciar. Como ninguna de ellas mostró valores de calidad deseados se decidió enviar a secuenciar muestras tomadas en un único punto de la fermentación bajo los dos sustratos, por recomendación del comité tutorial.

Tabla 3.A.2. Resultados de concentración de las muestras de ARN obtenidas en este estudio. Las primeras 14 filas corresponden a muestras que cumplen con los requisitos de concentración requeridos por Macrogen

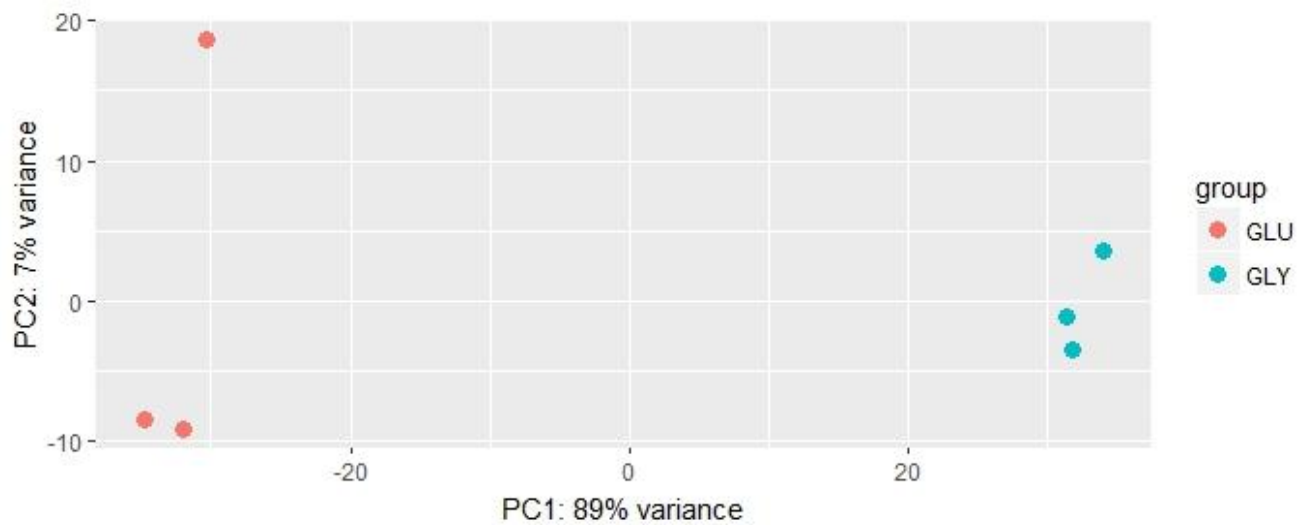
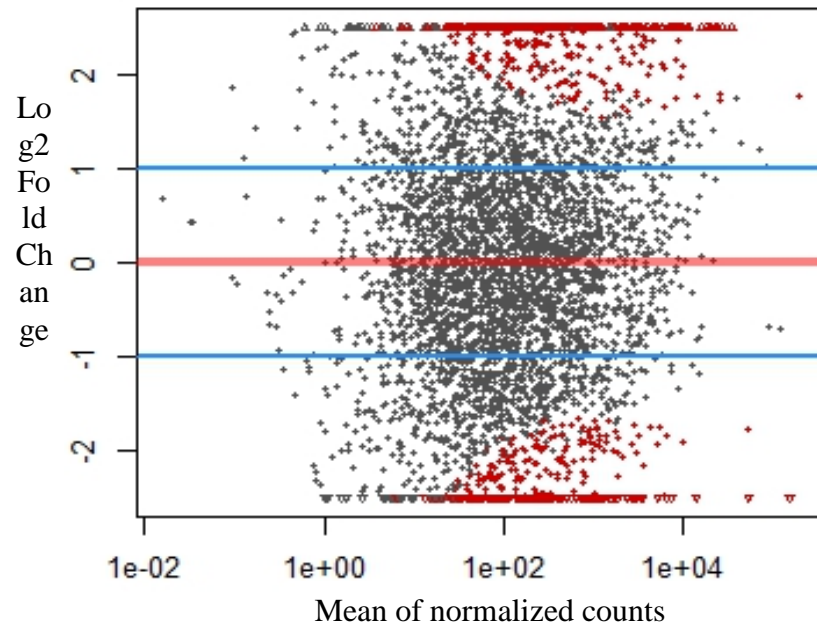
Nº	SUSTRATO	HORA	CONC. QUBIT (ng/µL)	CONC. (µg/ 30µL)	RIN
1	Glicerol	6	158	4,74	3,2
2	Glicerol	6	159,6	4,788	3,6
3	Glicerol	6	1432	42,96	2,5
4	Glicerol	36	154	4,62	2,3
5	Glicerol	36	216	6,48	2,5
6	Glicerol	36	604	18,12	2,3
7	Glucosa	6	134	4,02	2,5
8	Glucosa	6	138	4,14	N.D
9	Glucosa	6	1508	45,24	2,5
10	Glucosa	24	150	4,5	2,9
11	Glucosa	24	136	4,08	5,1
12	Glucosa	24	840	25,2	
13	Glicerol	6	170	5,1	
14	Glicerol	36	136	4,08	
15	Glicerol	6	65,6	1,968	
16	Glicerol	6	69	2,07	
17	Glicerol	6	108	3,24	
18	Glicerol	36	84	2,52	
19	Glicerol	6	41,6	1,248	
20	Glicerol	36	77	2,31	
21	Glicerol	6	24	0,72	
22	Glicerol	6	19,5	0,585	
23	Glicerol	6	14	0,42	
24	Glucosa	6	118	3,54	
25	Glucosa	36	39,6	1,188	
26	Glucosa	36	25,6	0,768	
27	Glucosa	36	50,4	1,512	
28	Glucosa	24	106	3,18	

B. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR DESeq2

Código DESeq2 muestras RNA-Seq lenguaje R.

Ximena Carolina Pérez Mancilla

```
library(DESeq2)
library(tximport)
library("vsn")
samples<-read.table("ARCHIVO_IDS_MUESTRAS.txt", header=T)
files <- file.path("CARPETA-ARCHIVOS_ABUNDANCIAS_KALLISTO",
"ARCHIVO_ABUNDANCIA_KALLISTO.h5")
names(files) <- paste0("sample", 1:6)
txi.kallisto <- tximport(files, type = "kallisto", txOut = TRUE)
head(txi.kallisto$counts)
sampleTable <- data.frame(condition = factor(rep(c("GLU", "GLU", "GLU", "GLY", "GLY",
"GLY"))))
rownames(txi.kallisto$counts) <- as.character(rownames(txi.kallisto$counts))
dds <- DESeqDataSetFromTximport(txi.kallisto, sampleTable, ~condition)
dds <- DESeq(dds)
res <- results(dds)
summary(res)
sum(res$padj < 0.1, na.rm=TRUE)
plotMA(res, ylim=c(-2,2))
plotCounts(dds, gene=which.min(res$padj), intgroup="condition")
ddsNoPrior <- DESeq(dds, betaPrior=FALSE)
par(mfrow=c(2,2),mar=c(2,2,1,1))
yl <- c(-2.5,2.5)
resGA <- results(dds, lfcThreshold=1, altHypothesis="greaterAbs")
plotMA(resGA, ylim=yl)
abline(h=c(-1,1),col="dodgerblue",lwd=2)
write.csv(as.data.frame(resGA),file="resGA_todas_sep18.csv")
ntd <- normTransform(ddsNoPrior)
meanSdPlot(assay(ntd))
rld <- rlog(ddsNoPrior, blind=FALSE)
vsd <- varianceStabilizingTransformation(ddsNoPrior, blind=FALSE)
meanSdPlot(assay(rld))
meanSdPlot(assay(vsd))
plotPCA(rld, intgroup=c("condition"))
```

Figura 3.B.1. MA-PLOT de la expresión de genes de glicerol VS glucosa**Figura 3.B.2.** Análisis de Componentes principales de las muestras.

C. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO POR MEDIO DE LA HERRAMIENTA BINGO

Tabla 3.C.1. Análisis de enriquecimiento de ontología de genes sub-regulados en cultivo de glicerol vs glucosa de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A. x: número de genes en el cluster anotados a alguna clase de GO, n: número de genes en la referencia (genoma del microorganismo) anotados a alguna clase de GO, X: número total de genes en el cluster, N: Número total de genes en la referencia (genoma del microorganismo).

GO-ID	p-value	corr p-value	x	n	X	N	Description
16021	6.02E-04	9.46E-02	78	1083	184	3480	integral component of membrane
31224	6.21E-04	9.46E-02	78	1084	184	3480	intrinsic component of membrane
15846	7.73E-04	9.46E-02	4	9	184	3480	polyamine transport
44425	7.95E-04	9.46E-02	78	1092	184	3480	membrane part
16020	1.19E-03	9.46E-02	79	1123	184	3480	membrane
43492	1.68E-03	9.46E-02	14	110	184	3480	ATPase activity, coupled to movement of substances
42626	1.68E-03	9.46E-02	14	110	184	3480	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances
5575	2.25E-03	9.46E-02	108	1679	184	3480	cellular_component
15399	2.58E-03	9.46E-02	14	115	184	3480	primary active transmembrane transporter activity
15405	2.58E-03	9.46E-02	14	115	184	3480	P-P-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity
27	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	ribosomal large subunit assembly
22618	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	ribonucleoprotein complex assembly
71826	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	ribonucleoprotein complex subunit organization
6656	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	phosphatidylcholine biosynthetic process
6657	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	CDP-choline pathway
15101	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	organic cation transmembrane transporter activity
19037 11	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	spermidine transmembrane transport
15489	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	putrescine transmembrane transporter activity
15594	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	putrescine-importing ATPase activity
15595	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	spermidine-importing ATPase activity
15606	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	spermidine transmembrane transporter activity
42255	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	ribosome assembly

42273	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	ribosomal large subunit biogenesis
46470	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	phosphatidylcholine metabolic process
15847	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	putrescine transport
15848	2.78E-03	9.46E-02	2	2	184	3480	spermidine transport

Tabla 3.C.2. Análisis de enriquecimiento de ontología de genes sobre-regulados en cultivo de glicerol vs glucosa de la cepa *Clostridium* sp. IBUN13A. x: número de genes en el cluster anotados a alguna clase de GO, n: número de genes en la referencia (genoma del microorganismo) anotados a alguna clase de GO, X:número total de genes en el cluster, N: Número total de genes en la referencia (genoma del microorganismo).

GO-ID	p-value	corr p-value	x	n	X	N	Description
15980	2.63E-07	1.36E-04	7	13	145	3480	energy derivation by oxidation of organic compounds
5975	3.58E-07	1.36E-04	27	227	145	3480	carbohydrate metabolic process
44264	5.07E-07	1.36E-04	7	14	145	3480	cellular polysaccharide metabolic process
44042	8.64E-07	1.39E-04	6	10	145	3480	glucan metabolic process
6073	8.64E-07	1.39E-04	6	10	145	3480	cellular glucan metabolic process
6091	1.16E-06	1.55E-04	13	63	145	3480	generation of precursor metabolites and energy
55114	5.51E-06	6.32E-04	33	357	145	3480	oxidation-reduction process
5976	6.36E-06	6.37E-04	9	34	145	3480	polysaccharide metabolic process
5977	1.29E-05	1.04E-03	5	9	145	3480	glycogen metabolic process
6112	1.29E-05	1.04E-03	5	9	145	3480	energy reserve metabolic process
44262	2.84E-05	2.07E-03	10	50	145	3480	cellular carbohydrate metabolic process
16408	4.07E-05	2.51E-03	4	6	145	3480	C-acyltransferase activity
16453	4.07E-05	2.51E-03	4	6	145	3480	C-acetyltransferase activity
4553	1.65E-04	9.26E-03	12	85	145	3480	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
271	1.73E-04	9.26E-03	5	14	145	3480	polysaccharide biosynthetic process
15923	2.75E-04	1.38E-02	3	4	145	3480	mannosidase activity
33692	3.10E-04	1.38E-02	4	9	145	3480	cellular polysaccharide biosynthetic process
34637	3.10E-04	1.38E-02	4	9	145	3480	cellular carbohydrate biosynthetic process
16758	3.41E-04	1.44E-02	6	24	145	3480	transferase activity, transferring hexosyl groups
16798	4.49E-04	1.80E-02	13	108	145	3480	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
16491	6.45E-04	2.32E-02	27	341	145	3480	oxidoreductase activity
9250	6.66E-04	2.32E-02	3	5	145	3480	glucan biosynthetic process

5978	6.66E-04	2.32E-02	3	5	145	3480	glycogen biosynthetic process
16757	1.27E-03	4.26E-02	10	78	145	3480	transferase activity, transferring glycosyl groups
16655	1.72E-03	4.35E-02	2	2	145	3480	oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, quinone or similar compound as acceptor
4602	1.72E-03	4.35E-02	2	2	145	3480	glutathione peroxidase activity
50136	1.72E-03	4.35E-02	2	2	145	3480	NADH dehydrogenase (quinone) activity
3844	1.72E-03	4.35E-02	2	2	145	3480	1,4-alpha-glucan branching enzyme activity
3985	1.72E-03	4.35E-02	2	2	145	3480	acetyl-CoA C-acetyltransferase activity
3988	1.72E-03	4.35E-02	2	2	145	3480	acetyl-CoA C-acyltransferase activity
8137	1.72E-03	4.35E-02	2	2	145	3480	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity
16051	1.74E-03	4.35E-02	5	22	145	3480	carbohydrate biosynthetic process
8643	3.30E-03	8.01E-02	11	103	145	3480	carbohydrate transport
19012	3.56E-03	8.15E-02	4	16	145	3480	virion
44423	3.56E-03	8.15E-02	4	16	145	3480	virion part
4601	4.95E-03	9.39E-02	3	9	145	3480	peroxidase activity
4134	5.03E-03	9.39E-02	2	3	145	3480	4-alpha-glucanotransferase activity
8410	5.03E-03	9.39E-02	2	3	145	3480	CoA-transferase activity
4567	5.03E-03	9.39E-02	2	3	145	3480	beta-mannosidase activity
8775	5.03E-03	9.39E-02	2	3	145	3480	acetate CoA-transferase activity
16985	5.03E-03	9.39E-02	2	3	145	3480	mannan endo-1,4-beta-mannosidase activity
46391	5.03E-03	9.39E-02	2	3	145	3480	5-phosphoribose 1-diphosphate metabolic process
6015	5.03E-03	9.39E-02	2	3	145	3480	5-phosphoribose 1-diphosphate biosynthetic process

D. RENDIMIENTOS RELATIVOS DE 1,3-PROPANODIOL ENCONTRADOS PARA ENZIMAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS POR *Clostridium* sp. IBUN13A EN GLICEROL RESPECTO A GLUCOSA

Tabla 3.D.1. Rendimientos relativos de dobles mutantes que incluyen enzimas sobreexpresadas en glicerol respecto a glucosa, de acuerdo con lo publicado por Serrano-Bermudez (2017). En la fila se encuentran las enzimas sobreexpresadas para los que se encontraron datos de delección y en la columna todas las enzimas evaluadas por Serrano-Bermudez. Los recuadros verdes indican rendimientos relativos mayores que en la cepa nativa, y en rojo a aquellos menores en al menos 20%.

	2.4.1.1	2.7.7.4	2.8.3.8	3.5.4.5	2.7.8.7	2.4.1.18	5.4.2.7	2.4.2.3	2.4.1.21	1.2.1.10	2.7.2.1	4.3.1.1	2.6.1.57	1.1.1.1	3.6.1.15	2.3.1.9	3.2.1.1
1.1.1.1	99.78	99.09	97.54	99.76	99.23	99.23	99.26	99.29	99.3	99.51	77.3	99.23	99.26	99.26	99.66	77.47	99.76
1.1.1.157	97.71	97.42	77.47	97.68	96.99	97.69	97.7	97.7	97.68	97.19	70.78	97.42	97.7	97	97.44	74.61	97.67
1.1.1.205	100.59	100.61	96.78	100.6	100.38	100.59	100.61	100.6	100.38	100.47	77.08	100.61	100.61	100.59	100.59	77.49	100.38
1.1.1.23	99.65	99.23	97.55	99.82	99.24	99.23	99.29	99.77	99.23	100.05	77.3	99.23	99.29	99.76	99.23	77.48	99.24
1.1.1.25	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.76	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.82
1.1.1.27	99.25	99.51	96.91	99.23	99.23	99.23	99.23	99.23	99.24	99.48	77.31	99.77	99.23	99.24	99.24	77.48	99.25
1.1.1.28	99.25	99.51	96.75	99.23	99.23	99.23	99.23	99.23	99.24	99.48	77.31	99.77	99.23	99.24	99.24	77.48	99.25
1.1.1.282	99.89	99.81	96.94	99.88	99.32	99.41	99.71	99.33	99.84	99.48	77.31	99.84	99.71	99.83	99.86	77.47	99.88
1.1.1.35	97.71	97.68	77.47	97.71	97.68	97	97.42	97.63	97.43	97.17	70.8	97.67	97.42	97	97.42	74.62	97.71
1.1.1.42	101.03	101.03	96.94	101	101.01	101	100.53	101	101.03	101.21	58	100.89	100.53	101	101	77.49	101
1.1.1.60	99.24	99.75	97.53	99.76	99.81	99.76	99.23	99.77	99.77	99.49	77.31	99.76	99.23	99.26	99.29	77.48	99.76
1.1.1.94	99.23	99.23	97.55	99.25	99.27	99.23	99.24	99.25	99.23	100.03	77.31	99.77	99.24	99.75	99.81	77.47	99.77
1.1.1.95	99.94	99.94	97.38	99.96	99.93	99.93	99.94	99.95	99.94	100.06	76.48	99.93	99.94	99.94	99.94	76.08	99.93
1.17.1.4	99.23	99.52	97.55	99.25	99.23	99.23	99.23	99.77	99.24	99.48	77.31	99.65	99.23	99.24	99.23	77.48	99.25
1.17.4.1	100.69	100.72	97.54	100.72	99.78	100.63	100.71	99.78	99.94	100.44	77.31	99.76	100.71	100.72	100.12	77.47	99.78

1.17.4.2	99.76	99.75	97.54	99.23	99.31	99.3	99.82	99.82	99.78	99.48	77.29	99.23	99.82	99.24	99.76	74.63	99.23
1.18.1.2	99.52	99.52	97.2	99.52	99.52	99.52	99.52	99.52	99.52	99.74	75.77	99.52	99.52	99.52	99.52	76.51	99.52
1.2.1.10	99.5	100.03	96.85	99.5	99.49	99.49	99.51	99.5	99.52	99.51	73.62	99.5	99.51	99.51	99.5	77.48	100.02
1.2.1.3	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.76	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.82
1.2.1.5	99.23	99.29	96.93	99.24	99.29	99.23	99.76	99.3	99.23	99.49	77.3	99.26	99.76	99.25	99.24	77.47	99.81
1.2.1.8	100.71	100.71	96.94	100.71	100.71	100.71	100.71	100.71	100.71	99.9	77.25	100.56	100.71	100.71	100.71	76.5	100.71
1.2.1.9	99.77	99.8	97.54	99.82	99.29	99.76	99.23	99.29	99.24	99.48	77.3	99.23	99.23	99.24	99.76	77.47	99.23
1.3.1.12	99.88	99.24	97.54	99.76	99.23	99.23	99.23	99.24	99.25	99.52	77.31	99.23	99.23	99.76	99.78	77.48	99.24
1.3.1.13	99.23	99.74	97.54	99.23	99.23	99.31	99.3	99.81	99.77	99.52	77.3	99.82	99.3	99.81	99.24	77.48	99.26
1.3.8.1	99.29	99.29	97.47	99.12	99.27	99.28	99.29	99.24	99.28	99.51	77.28	99.79	99.29	99.28	99.28	77.47	99.28
1.4.1.13	97.68	97.69	82.1	97	97.69	97.69	96.99	97	96.99	97.31	70.24	96.99	96.99	97.69	96.98	74.07	97.69
1.4.1.14	99.23	99.24	96.98	99.23	99.31	100.63	99.25	99.24	99.24	99.53	77.3	99.23	99.25	99.3	99.23	77.49	99.23
1.8.99.2	99.81	99.79	97.46	99.09	99.23	100.57	99.79	99.75	99.24	100.03	77.87	99.78	99.79	99.09	99.51	77.47	99.24
2.1.1.10	99.23	99.81	96.93	99.23	99.23	99.82	99.24	99.23	99.27	99.52	77.3	99.3	99.24	99.27	99.25	74.61	99.23
2.1.2.1	99.23	99.51	97.23	99.25	99.25	99.23	99.23	99.23	99.76	99.52	77.29	99.28	99.23	99.25	99.23	77.47	99.23
2.3.1.-	99.28	99.29	97.54	99.28	99.28	99.24	99.28	99.28	99.28	100.03	77.32	99.8	99.28	99.24	99.28	77.48	99.28
2.3.1.1	99.8	100.57	97.54	99.23	99.23	99.65	99.26	99.65	99.81	99.5	77.3	99.74	99.26	99.24	99.23	75.41	99.82
2.3.1.19	97	97	77.47	97.04	97.28	97.56	97.28	97.01	97.28	97.18	70.81	96.99	97.28	97.55	97	77.48	97.54
2.3.1.35	99.78	100.57	96.94	99.24	99.74	99.24	99.29	99.24	99.81	100.02	77.32	99.66	99.29	99.24	99.76	77.47	99.82
2.3.1.46	99.82	99.91	96.93	99.77	99.23	99.23	99.76	99.66	99.23	100.03	77.29	99.28	99.76	99.23	99.23	77.48	99.25
2.3.1.89	100.06	99.93	97.21	100.06	100.06	100.06	99.96	100.06	100.06	100.37	76.77	100.06	99.96	100.06	100.06	76.13	100.06
2.3.1.9	77.49	77.48	74.61	77.48	77.48	77.48	77.47	77.49	77.49	77.48	58.89	77.48	77.47	77.47	77.48	77.47	77.47

2.4.1.1	99.26	99.81	96.93	99.82	99.29	99.77	99.26	99.27	99.3	99.5	77.3	99.75	99.26	99.78	100.6	77.49	99.26	
2.4.1.18	99.77	100.57	97.54	99.82	99.28	99.77	99.77	99.23	99.77	99.49	77.3	99.23	99.77	99.23	99.65	77.48	99.77	
2.4.1.21	99.3	99.24	97.54	99.23	99.23	99.77	99.76	99.24	99.76	99.52	77.3	99.3	99.76	99.3	99.23	77.49	99.76	
2.4.2.2	99.23	99.23	96.75	99.23	99.23	99.81	99.77	99.75	99.23	100.02	77.3	99.23	99.77	99.23	99.23	77.48	99.77	
2.4.2.22	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.76	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.82	
2.4.2.3	99.27	99.75	96.95	99.83	99.24	99.23	99.76	99.76	99.24	99.5	77.31	99.25	99.76	99.29	99.76	77.49	99.23	
2.4.2.7	99.24	99.52	97.59	99.24	99.24	99.21	99.24	99.24	99.24	99.91	70.72	99.23	99.24	99.1	99.23	77.47	99.24	
2.4.2.8	99.23	99.81	96.94	99.29	99.24	99.29	99.76	99.23	99.82	99.48	77.31	99.77	99.76	99.23	99.23	77.49	99.23	
2.4.2.9	99.25	99.51	97.54	99.82	99.25	99.23	99.23	99.24	99.23	100.04	77.3	99.25	99.23	99.23	99.23	77.48	99.82	
2.5.1.3	99.81	99.76	97.54	99.23	99.25	99.81	99.23	99.23	99.76	99.5	77.32	99.23	99.23	99.25	99.23	77.48	99.8	
2.5.1.47	99.25	99.75	96.94	99.24	99.25	99.81	99.81	99.73	99.3	99.51	77.3	99.25	99.81	99.23	99.24	77.49	99.75	
2.5.1.48	99.93	99.76	97.55	99.76	99.31	99.65	99.52	99.24	99.23	100.03	76.92	99.81	99.52	99.28	99.79	77.49	99.52	
2.5.1.49	99.82	99.25	96.94	99.3	99.23	99.79	99.24	99.73	99.31	100.03	70.4	99.26	99.24	99.79	99.23	77.49	99.23	
2.6.1.-	100.06	99.93	97.21	100.06	100.06	100.06	100.06	100.06	100.04	100.06	99.76	76.76	100.06	100.06	100.06	100.06	76.01	100.06
2.6.1.19	99.75	99.23	97.54	99.26	99.77	99.89	99.3	99.25	99.8	99.48	77.29	99.25	99.3	99.25	99.23	77.47	99.3	
2.6.1.21	99.76	99.23	97.2	99.38	99.23	99.54	99.26	99.2	99.27	99.5	76.81	99.12	99.26	99.72	99.27	77.48	99.26	
2.6.1.52	99.94	99.94	97.38	99.96	99.93	99.93	99.94	100.08	99.94	100.06	76.48	99.93	99.94	99.94	99.94	76.08	99.93	
2.6.1.57	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.24	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.82	
2.6.1.82	99.75	99.23	97.54	99.26	99.77	99.89	99.3	99.25	99.8	99.48	77.29	99.25	99.3	99.25	99.23	77.49	99.3	
2.6.1.85	99.23	99.24	96.95	99.25	99.23	99.23	99.23	99.1	99.23	99.48	77.3	99.24	99.23	99.77	99.65	77.47	99.25	
2.7.1.11	99.23	99.78	96.94	99.25	99.3	99.23	99.27	99.23	99.27	100.02	77.3	99.29	99.27	99.81	99.78	77.47	99.3	
2.7.1.2	99.82	99.23	97.54	99.76	99.29	99.82	99.82	99.28	99.3	99.48	77.3	99.23	99.82	99.23	99.23	77.48	99.82	

2.7.1.26	99.77	99.37	96.93	99.24	99.27	99.66	99.24	99.24	99.24	99.48	77.3	99.23	99.24	99.24	99.24	77.49	99.24
2.7.1.30	99.23	99.76	97.43	99.8	99.23	99.23	99.23	99.23	99.23	100.02	77.31	99.23	99.23	99.65	99.24	77.47	99.23
2.7.1.31	99.3	99.75	96.94	99.29	99.29	99.23	99.23	99.24	99.23	100.03	77.29	99.23	99.23	99.26	99.23	74.61	99.26
2.7.1.48	99.23	99.26	97.51	99.23	99.23	99.23	99.28	99.24	99.65	99.51	77.29	99.65	99.28	99.23	99.25	77.48	99.23
2.7.1.50	99.81	99.76	97.54	99.23	99.25	99.81	99.23	99.23	99.76	99.5	77.32	99.23	99.23	99.25	99.23	77.48	99.8
2.7.1.56	100.71	100.72	96.75	100.71	100.71	100.71	100.71	99.1	100.71	99.52	77.29	100.71	100.71	100.71	100.71	76.51	100.71
2.7.2.1	77.3	77.87	63.03	77.31	77.31	77.3	77.31	70.72	77.3	73.62	77.31	77.3	77.31	77.3	77.31	58.89	77.31
2.7.2.7	97	97	77.53	97.04	97.28	97.54	97.28	97.41	97.28	97.18	70.78	96.99	97.28	97.55	97.53	77.47	97.28
2.7.4.16	100.6	99.51	96.76	99.23	99.24	99.65	99.23	99.23	99.23	99.5	77.31	99.24	99.23	99.66	99.23	77.48	99.23
2.7.4.7	99.81	99.76	97.54	99.23	99.25	99.81	99.23	99.23	99.76	99.5	77.32	99.23	99.23	99.25	99.23	77.48	99.8
2.7.6.3	99.27	99.23	96.94	99.26	99.23	99.75	99.27	99.24	99.31	99.51	77.31	99.3	99.27	99.25	99.83	77.47	99.77
2.7.7.10	99.29	99.74	96.94	99.24	99.82	99.76	99.29	99.23	99.81	99.52	77.3	99.23	99.29	99.65	99.26	77.47	99.3
2.7.7.12	99.29	99.74	96.94	99.24	99.82	99.76	99.29	99.23	99.81	99.52	77.3	99.23	99.29	99.65	99.26	77.47	99.3
2.7.7.27	99.3	99.24	97.54	99.23	99.23	99.77	99.76	99.24	99.76	99.52	77.3	99.3	99.76	99.3	99.23	77.49	99.76
2.7.7.4	99.81	99.79	97.46	99.09	99.23	100.57	99.79	99.52	99.24	100.03	77.87	99.78	99.79	99.09	99.51	77.48	99.24
2.7.7.9	99.23	99.76	97.54	99.23	99.22	99.23	99.26	99.75	99.26	100.02	77.31	99.23	99.26	99.76	99.76	77.47	99.76
2.7.8.7	99.29	99.23	97.54	99.24	99.23	99.28	99.23	99.24	99.23	99.49	77.31	99.26	99.23	99.23	99.24	77.48	99.25
2.7.9.1	99.23	99.91	96.94	99.65	99.24	99.28	99.23	99.24	99.76	99.5	77.3	99.23	99.23	99.26	99.25	77.48	99.23
2.8.3.8	96.93	97.46	97.54	96.94	97.54	97.54	97.54	97.59	97.54	96.85	63.03	96.95	97.54	97.54	96.76	74.61	97.54
3.1.3.2	99.23	99.36	96.94	99.23	99.25	99.23	99.23	99.1	99.24	99.48	77.28	99.24	99.23	99.75	99.24	77.48	99.23
3.1.3.5	100.69	100.69	96.92	100.69	100.69	100.71	100.69	100.68	100.69	100.9	77.15	100.69	100.69	100.8	100.69	77.43	100.69
3.2.1.1	99.26	99.24	97.54	99.24	99.25	99.77	99.82	99.24	99.76	100.02	77.31	99.81	99.82	99.76	99.23	77.47	99.82

3.2.1.10	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.24	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.82
3.2.1.20	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.24	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.75
3.2.1.26	99.29	99.77	96.93	99.23	99.82	99.78	99.26	99.24	99.76	99.52	77.3	99.23	99.26	99.23	99.78	77.47	99.23
3.2.1.33	99.26	99.77	96.95	99.23	99.31	99.77	99.23	99.24	99.76	100.04	77.31	99.23	99.23	99.29	99.25	74.61	99.8
3.5.1.1	99.24	99.75	97.54	99.23	99.24	99.23	99.23	99.23	99.77	99.91	77.31	99.24	99.23	99.23	99.25	74.62	99.25
3.5.1.16	99.29	100.58	97.5	99.23	99.24	99.23	99.31	99.23	99.81	100.03	77.3	99.65	99.31	99.23	99.23	77.47	99.83
3.5.1.19	99.27	99.23	96.93	99.81	99.3	99.78	99.24	99.24	99.25	99.53	77.3	99.24	99.24	99.23	99.77	77.48	99.24
3.5.1.25	99.77	99.24	96.75	99.24	99.23	99.76	99.76	99.73	99.23	99.48	77.31	99.23	99.76	99.65	99.29	77.47	99.23
3.5.1.47	100.06	99.93	97.21	100.06	100.06	100.06	100.06	100.04	100.06	99.76	76.76	100.06	100.06	100.06	100.06	76.01	100.06
3.5.1.5	99.76	99.76	97	99.65	99.24	99.77	99.26	99.27	99.76	99.51	77.3	99.65	99.26	99.24	99.65	77.49	99.26
3.5.3.1	99.23	99.27	97.54	99.23	99.24	99.24	99.81	99.23	99.78	99.48	77.31	99.29	99.81	99.23	99.24	77.48	99.81
3.5.3.11	99.75	99.23	97.54	99.26	99.77	99.89	99.3	99.25	99.8	99.48	77.29	99.25	99.3	99.25	99.23	77.47	99.3
3.5.4.1	99.23	99.23	96.75	99.23	99.23	99.81	99.77	99.23	99.23	100.02	77.3	99.23	99.77	99.23	99.23	77.48	99.77
3.5.4.12	99.23	99.76	97.54	99.23	99.25	99.65	99.24	99.24	99.25	99.48	77.31	99.26	99.24	99.24	99.76	77.48	99.23
3.5.4.13	99.27	99.75	96.94	99.23	99.3	99.24	99.65	99.79	99.77	99.91	77.3	99.82	99.65	99.77	99.23	77.48	99.81
3.5.4.2	99.78	99.76	97.53	99.8	99.24	99.3	99.25	99.28	99.3	99.91	77.3	99.76	99.25	99.29	99.78	77.47	99.23
3.5.4.4	99.83	99.79	97.54	99.8	99.29	99.81	99.65	99.22	99.77	99.48	77.3	99.77	99.65	99.76	99.81	77.48	99.65
3.5.4.5	99.82	99.09	96.94	99.65	99.24	99.82	99.65	99.24	99.23	99.5	77.31	99.24	99.65	99.76	99.23	77.48	99.24
3.5.99.2	99.81	99.76	97.54	99.23	99.25	99.81	99.23	99.23	99.76	99.5	77.32	99.23	99.23	99.25	99.23	77.48	99.8
3.5.99.6	99.76	99.75	96.94	99.26	99.3	99.23	99.77	99.24	99.3	100.04	77.31	99.23	99.77	99.65	99.23	77.48	99.76
3.6.1.15	100.6	99.51	96.76	99.23	99.24	99.65	99.23	99.23	99.23	99.5	77.31	99.24	99.23	99.66	99.23	77.48	99.23
3.6.1.19	99.28	99.74	96.95	99.23	99.23	99.81	99.23	99.24	99.65	99.5	77.3	99.25	99.23	99.25	99.25	77.48	99.23

3.6.1.23	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.24	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.82
3.6.1.7	99.65	99.75	97.55	99.23	99.23	99.77	99.76	99.1	99.25	99.48	77.29	99.23	99.76	99.24	99.24	77.48	99.23
4.1.1.19	99.75	99.23	97.54	99.26	99.77	99.89	99.3	99.25	99.8	99.48	77.29	99.25	99.3	99.25	99.23	77.47	99.3
4.1.2.4	100.8	100.8	96.76	100.45	100.69	100.69	100.69	100.7	100.69	100.89	77.18	100.69	100.69	100.69	100.69	77.43	100.69
4.2.1.55	97.71	97.42	77.47	97.68	96.99	97.69	97.7	97.56	97.68	97.19	70.78	97.42	97.7	97	97.44	77.47	97.67
4.3.1.1	99.75	99.78	96.95	99.24	99.26	99.23	99.23	99.23	99.3	99.5	77.3	99.23	99.23	99.23	99.24	77.48	99.81
4.3.1.17	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.24	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.82
4.3.1.19	99.65	100.72	97.54	99.25	99.23	99.27	99.23	99.24	99.23	99.91	77.32	99.23	99.23	99.81	99.23	77.47	99.77
4.4.1.1	99.79	99.91	97.54	99.25	99.23	99.65	99.26	99.1	99.3	99.54	77.3	99.23	99.26	99.82	99.23	77.48	99.81
4.4.1.8	99.22	LD	98	99.24	99.27	99.3	99.3	99.25	99.22	99.83	77.18	99.37	99.3	99.3	99.23	77.3	99.3
5.1.1.1	100.69	100.69	97.31	100.69	100.69	100.69	100.69	99.21	100.69	100.58	76.92	100.69	100.69	100.69	100.69	77.47	100.69
5.1.1.3	99.76	99.23	97.66	99.38	99.23	99.54	99.26	99.2	99.27	99.58	76.81	99.12	99.26	99.72	99.27	74.62	99.26
5.1.3.14	99.77	99.24	96.94	99.24	99.23	99.76	99.76	99.73	99.23	99.48	77.31	99.23	99.76	99.65	99.29	77.48	99.23
5.1.3.3	99.29	99.75	96.95	99.23	99.3	99.75	99.28	99.1	99.23	100.03	77.31	99.24	99.28	99.23	99.77	77.47	99.81
5.1.3.9	99.77	99.24	96.75	99.24	99.23	99.76	99.76	99.73	99.23	99.48	77.31	99.23	99.76	99.65	99.29	77.47	99.23
5.4.2.7	99.26	99.79	97.54	99.65	99.23	99.77	99.23	99.24	99.76	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.23	77.47	99.82
6.2.1.3	99.78	99.76	96.95	99.23	99.24	99.29	99.25	99.28	99.24	99.52	77.31	99.24	99.25	99.24	99.27	77.49	99.24
6.3.1.1	99.75	99.73	97.65	99.27	99.26	99.25	99.26	99.23	99.78	99.5	76.98	99.26	99.26	99.27	99.26	77.49	99.25
6.3.3.2	99.26	99.23	96.94	99.23	99.31	99.78	99.23	99.24	99.77	99.51	77.31	99.23	99.23	99.26	99.25	77.49	99.23
6.3.4.14	99.23	100.62	97.51	99.23	99.29	99.31	99.65	99.1	99.76	100.03	77.31	99.23	99.65	99.3	99.23	77.49	99.24
6.3.4.21	99.24	99.78	97.53	99.29	99.23	99.23	99.26	99.1	99.23	99.48	77.31	99.25	99.26	99.66	99.23	74.62	99.26
6.3.5.4	99.77	99.75	97.54	99.23	99.23	99.26	99.24	99.79	99.23	100.05	77.3	99.26	99.24	99.24	99.24	77.48	99.23

Tabla 3.D.2. Rendimientos relativos de dobles mutantes que incluyen enzimas subexpresadas en glicerol respecto a glucosa, de acuerdo con lo publicado por Serrano-Bermudez (2017). En la fila se encuentran las enzimas subexpresadas para los que se encontraron datos de delección y en la columna todas las enzimas evaluadas por Serrano-Bermudez. Los recuadros verdes indican rendimientos relativos mayores que en la cepa nativa, y en rojo a aquellos menores en al menos 20%. (L.D = Delección letal)

%Ypdo	2.6.1.52	2.4.2.22	2.6.1.57	2.7.1.48	3.1.3.2	3.6.1.15	3.6.1.19	3.6.1.23	6.3.1.1	6.3.3.2
1.1.1.1	99.94	99.26	99.26	99.23	99.75	99.66	99.25	99.26	99.27	99.26
1.1.1.157	96.06	97.7	97.7	97.42	97.68	97.44	97.69	97.7	97.37	97.42
1.1.1.205	100.06	100.61	100.61	100.7	100.58	100.59	100.4	100.61	100.55	100.61
1.1.1.23	99.93	99.29	99.29	99.23	99.3	99.23	99.65	99.29	99.24	99.29
1.1.1.25	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.23	99.23	99.26	99.23
1.1.1.27	100.14	99.23	99.23	99.23	99.28	99.24	99.23	99.23	99.26	99.24
1.1.1.28	99.93	99.23	99.23	99.23	99.28	99.24	99.23	99.23	99.26	99.24
1.1.1.282	99.93	99.71	99.71	99.71	99.89	99.86	99.41	99.71	99.72	99.88
1.1.1.35	96.28	97.42	97.42	97.68	97.42	97.42	97.42	97.42	97.39	97.42
1.1.1.42	100.11	100.53	100.53	100.54	100.54	101	100.88	100.53	101.03	100.53
1.1.1.60	99.94	99.23	99.23	99.29	99.89	99.29	99.29	99.23	99.27	99.23
1.1.1.94	99.94	99.24	99.24	100.32	99.23	99.81	99.23	99.24	99.28	99.24
1.1.1.95	99.94	99.94	99.94	99.93	99.96	99.94	100.13	99.94	100.1	99.94
1.17.1.4	99.94	99.23	99.23	99.24	99.23	99.23	99.29	99.23	99.27	99.23
1.17.4.1	100.11	100.71	100.71	99.7	100.71	100.12	100.06	100.71	100.69	100.55
1.17.4.2	99.94	99.82	99.82	99.23	99.25	99.76	99.23	99.82	99.74	99.82
1.18.1.2	100.14	99.52	99.52	99.52	99.52	99.52	99.52	99.52	99.52	99.52
1.2.1.10	100.06	99.51	99.51	99.51	99.48	99.5	99.5	99.51	99.5	99.51
1.2.1.3	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.23	99.23	99.26	99.23
1.2.1.5	99.93	99.76	99.76	99.29	99.23	99.24	99.29	99.76	99.25	99.76
1.2.1.8	99.95	100.71	100.71	100.71	99.23	100.71	100.71	100.71	100.69	100.71
1.2.1.9	99.94	99.23	99.23	99.23	99.79	99.76	99.23	99.23	99.26	99.23
1.3.1.12	99.95	99.23	99.23	99.23	100.6	99.78	99.23	99.23	99.25	99.23

1.3.1.13	99.93	99.3	99.3	99.78	99.23	99.24	99.26	99.3	99.75	99.3
1.3.8.1	99.94	99.29	99.29	99.29	99.23	99.28	99.28	99.29	99.26	99.29
1.4.1.13	97.94	96.99	96.99	97.69	97	96.98	97.69	96.99	97.01	97
1.4.1.14	99.93	99.25	99.25	99.3	99.25	99.23	99.23	99.25	99.27	99.25
1.8.99.2	100.13	99.79	99.79	99.26	99.36	99.51	99.74	99.79	99.73	99.23
2.1.1.10	99.94	99.24	99.24	99.23	99.23	99.25	99.25	99.24	99.78	99.23
2.1.2.1	L.D	99.23	99.23	99.3	99.76	99.23	99.23	99.23	99.25	99.23
2.3.1.-	99.93	99.28	99.28	99.3	99.23	99.28	99.3	99.28	99.25	99.29
2.3.1.1	99.94	99.26	99.26	99.23	99.23	99.23	99.79	99.26	99.32	99.76
2.3.1.19	95	97.28	97.28	97.52	97.48	97	97.28	97.28	97.25	97.55
2.3.1.35	100.04	99.29	99.29	99.24	99.24	99.76	99.27	99.29	99.44	99.24
2.3.1.46	99.93	99.76	99.76	99.26	99.31	99.23	99.23	99.76	99.67	99.76
2.3.1.89	99.63	99.96	99.96	100.06	100.06	100.06	100.07	99.96	99.96	100.06
2.3.1.9	76.08	77.47	77.47	77.48	77.48	77.48	77.48	77.47	77.49	77.49
2.4.1.1	99.94	99.26	99.26	99.23	99.23	100.6	99.28	99.26	99.75	99.26
2.4.1.18	99.93	99.77	99.77	99.23	99.23	99.65	99.81	99.77	99.25	99.78
2.4.1.21	99.94	99.76	99.76	99.65	99.24	99.23	99.65	99.76	99.78	99.77
2.4.2.2	99.94	99.77	99.77	99.29	99.26	99.23	99.23	99.77	99.27	99.77
2.4.2.22	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.23	99.23	99.26	99.23
2.4.2.3	99.95	99.76	99.76	99.27	99.24	99.76	99.3	99.76	99.26	99.76
2.4.2.7	100.08	99.24	99.24	99.24	99.1	99.23	99.24	99.24	99.23	99.24
2.4.2.8	99.93	99.81	99.76	99.23	99.29	99.23	99.65	99.76	99.79	99.76
2.4.2.9	99.93	99.23	99.23	99.29	99.66	99.23	99.76	99.23	99.29	99.23
2.5.1.3	100.14	99.23	99.23	99.25	99.24	99.23	99.79	99.23	99.73	99.23
2.5.1.47	99.93	99.81	99.81	99.3	99.24	99.24	99.81	99.81	99.74	99.81
2.5.1.48	100.1	99.52	99.52	99.23	99.23	99.79	99.25	99.52	99.76	99.52
2.5.1.49	100.09	99.24	99.24	99.23	99.23	99.23	99.29	99.24	99.74	99.79
2.6.1.-	99.63	100.06	100.06	100.06	100.06	100.06	100.06	100.06	101.02	100.06
2.6.1.19	99.94	99.3	99.3	99.82	99.28	99.23	99.24	99.3	99.27	99.3

2.6.1.21	100.1	99.26	99.26	99.68	99.26	99.27	99.26	99.26	99.22	99.26
2.6.1.52	99.94	99.94	99.94	99.93	99.96	99.94	100.13	99.94	100.1	99.94
2.6.1.57	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.23	99.23	99.26	99.23
2.6.1.82	99.94	99.3	99.3	99.82	99.28	99.23	99.24	99.3	99.27	99.3
2.6.1.85	99.94	99.23	99.23	99.24	99.23	99.65	99.8	99.23	99.27	99.23
2.7.1.11	99.93	99.27	99.27	99.26	99.23	99.78	99.23	99.27	99.8	99.27
2.7.1.2	99.94	99.82	99.82	99.28	99.23	99.23	99.3	99.82	99.26	99.3
2.7.1.26	99.93	99.24	99.24	99.24	L.D	99.24	99.29	99.24	99.74	99.24
2.7.1.30	99.94	99.23	99.23	99.23	99.23	99.24	99.78	99.23	99.26	99.23
2.7.1.31	99.93	99.23	99.23	99.23	99.76	99.23	99.25	99.23	99.25	99.23
2.7.1.48	99.93	99.28	99.28	99.28	99.24	99.25	99.23	99.28	99.24	99.28
2.7.1.50	100.14	99.23	99.23	99.25	99.24	99.23	99.79	99.23	99.73	99.23
2.7.1.56	100.1	100.71	100.71	100.71	99.23	100.71	100.72	100.71	100.69	100.71
2.7.2.1	76.48	77.31	77.31	77.29	77.28	77.31	77.3	77.31	76.98	77.31
2.7.2.7	95	97.28	97.28	97.52	97.48	97.53	97.28	97.28	97.25	97.28
2.7.4.16	99.94	99.23	99.23	99.25	99.24	99.23	99.25	99.23	99.26	99.25
2.7.4.7	100.14	99.23	99.23	99.25	99.24	99.23	99.79	99.23	99.73	99.23
2.7.6.3	99.94	99.27	99.27	99.66	99.28	99.83	99.29	99.27	99.25	99.27
2.7.7.10	99.94	99.29	99.29	100.63	99.25	99.26	99.29	99.29	99.27	99.29
2.7.7.12	99.94	99.29	99.29	100.63	99.25	99.26	99.29	99.29	99.27	99.29
2.7.7.27	99.94	99.76	99.76	99.65	99.24	99.23	99.65	99.76	99.78	99.77
2.7.7.4	99.94	99.79	99.79	99.26	99.36	99.51	99.74	99.79	99.73	99.23
2.7.7.9	99.95	99.26	99.26	99.25	99.23	99.76	99.25	99.26	99.66	99.26
2.7.8.7	99.93	99.23	99.23	99.23	99.25	99.24	99.23	99.23	99.26	99.31
2.7.9.1	99.92	99.23	99.23	99.31	99.24	99.25	99.23	99.23	99.25	99.23
2.8.3.8	97.38	97.54	97.54	97.51	96.94	96.76	96.95	97.54	97.65	96.94
3.1.3.2	99.96	99.23	99.23	99.24	99.23	99.24	99.25	99.23	99.25	99.23
3.1.3.5	100.07	100.69	100.69	100.69	100.69	100.69	100.86	100.69	100.67	100.69
3.2.1.1	99.93	99.82	99.82	99.23	99.23	99.23	99.23	99.82	99.25	99.23

3.2.1.10	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.23	99.23	99.26	99.23
3.2.1.20	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.25	99.23	99.26	99.23
3.2.1.26	99.97	99.26	99.26	99.81	99.23	99.78	99.26	99.26	99.27	99.77
3.2.1.33	99.94	99.23	99.23	99.3	99.26	99.25	99.8	99.23	99.74	99.23
3.5.1.1	99.93	99.23	99.23	99.23	99.24	99.25	99.75	99.23	99.73	99.23
3.5.1.16	99.94	99.31	99.31	99.23	99.23	99.23	99.28	99.31	99.34	99.23
3.5.1.19	99.94	99.24	99.24	99.23	99.23	99.77	99.8	99.24	99.36	99.24
3.5.1.25	99.93	99.76	99.76	99.23	99.23	99.29	99.23	99.76	99.66	99.76
3.5.1.47	99.63	100.06	100.06	100.06	100.06	100.06	100.06	100.06	101.02	100.06
3.5.1.5	99.94	99.26	99.26	99.29	99.23	99.65	99.65	99.26	99.75	99.26
3.5.3.1	99.94	99.81	99.81	99.3	99.23	99.24	99.24	99.81	99.76	99.81
3.5.3.11	99.94	99.3	99.3	99.82	99.28	99.23	99.24	99.3	99.27	99.3
3.5.4.1	99.94	99.77	99.77	99.29	99.26	99.23	99.23	99.77	99.27	99.77
3.5.4.12	99.94	99.24	99.24	99.23	99.23	99.76	99.29	99.24	99.73	99.24
3.5.4.13	99.93	99.65	99.65	99.23	99.23	99.23	99.23	99.65	99.25	99.65
3.5.4.2	99.93	99.25	99.25	99.23	99.23	99.78	99.25	99.25	99.25	99.25
3.5.4.4	99.97	99.65	99.65	99.76	99.26	99.81	99.29	99.65	99.73	99.8
3.5.4.5	99.96	99.65	99.65	99.23	99.23	99.23	99.23	99.65	99.27	99.23
3.5.99.2	100.14	99.23	99.23	99.25	99.24	99.23	99.79	99.23	99.73	99.23
3.5.99.6	99.94	99.77	99.77	99.26	99.23	99.23	99.25	99.77	99.27	99.77
3.6.1.15	99.94	99.23	99.23	99.25	99.24	99.23	99.25	99.23	99.26	99.25
3.6.1.19	100.13	99.23	99.23	99.23	99.25	99.25	99.23	99.28	99.73	99.23
3.6.1.23	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.28	99.23	99.26	99.23
3.6.1.7	100	99.76	99.76	99.23	99.23	99.24	99.23	99.76	99.73	99.76
4.1.1.19	99.94	99.3	99.3	99.82	99.28	99.23	99.24	99.3	99.27	99.3
4.1.2.4	100	100.69	100.69	100.69	100.8	100.69	100.69	100.69	100.66	100.69
4.2.1.55	96.06	97.7	97.7	97.42	97.68	97.44	97.69	97.7	97.37	97.42
4.3.1.1	99.93	99.23	99.23	99.65	99.24	99.24	99.25	99.23	99.26	99.23
4.3.1.17	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.23	99.23	99.26	99.23

4.3.1.19	99.93	99.23	99.23	99.23	99.25	99.23	99.25	99.23	99.25	99.23
4.4.1.1	99.93	99.26	99.26	99.31	99.25	99.23	99.23	99.26	99.25	99.26
4.4.1.8	101.23	99.3	99.3	99.3	99.61	99.23	99.26	99.3	99.84	99.3
5.1.1.1	100.1	100.69	100.69	100.69	100.67	100.69	100.69	100.69	100.49	100.69
5.1.1.3	100.1	99.26	99.26	99.68	99.26	99.27	99.26	99.26	99.22	99.26
5.1.3.14	99.93	99.76	99.76	99.23	99.23	99.29	99.23	99.76	99.66	99.76
5.1.3.3	99.93	99.28	99.28	99.23	99.24	99.77	99.26	99.28	99.34	99.28
5.1.3.9	99.93	99.76	99.76	99.23	99.23	99.29	99.23	99.76	99.66	99.76
5.4.2.7	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.23	99.23	99.23	99.26	99.23
6.2.1.3	99.94	99.25	99.25	99.25	99.24	99.27	99.23	99.25	99.25	99.25
6.3.1.1	100.1	99.26	99.26	99.24	99.25	99.26	99.73	99.26	99.26	99.26
6.3.3.2	99.94	99.23	99.23	99.28	99.23	99.25	99.23	99.23	99.26	99.23
6.3.4.14	100.14	99.65	99.65	99.79	99.23	99.23	99.29	99.65	99.28	99.65
6.3.4.21	99.93	99.26	99.26	99.23	99.23	99.23	99.29	99.26	99.73	99.65
6.3.5.4	99.93	99.24	99.24	99.26	99.23	99.24	99.23	99.24	L.D	99.24

Tabla 3.D.3. Rendimientos relativos de 1,3-PD de triples mutantes que incluyen enzimas sobre-expresadas en glicerol respecto a glucosa, de acuerdo con lo evaluado en este estudio. (L.D = Delección letal)

			Y _{1,3-PD} relativo
2.4.1.1	1.1.1.205	1.1.1.42	101.03
2.4.1.1	1.1.1.205	1.2.1.8	100.69
2.4.1.1	1.1.1.205	3.1.3.5	100.82
2.4.1.1	1.1.1.205	4.1.2.4	100.66
2.4.1.1	1.1.1.42	1.1.1.205	101.03
2.4.1.1	1.1.1.42	1.2.1.8	101
2.4.1.1	1.1.1.42	3.1.3.5	100.86
2.4.1.1	1.1.1.42	4.1.2.4	100.55
2.4.1.1	1.17.4.1	1.1.1.205	100.71
2.4.1.1	1.17.4.1	1.1.1.42	100.56
2.4.1.1	1.17.4.1	1.2.1.8	100.7
2.4.1.1	1.17.4.1	3.1.3.5	100.69
2.4.1.1	1.17.4.1	4.1.2.4	100.69
2.4.1.1	1.2.1.8	1.1.1.205	100.69
2.4.1.1	1.2.1.8	1.1.1.42	101
2.4.1.1	1.2.1.8	3.1.3.5	100.99
2.4.1.1	1.2.1.8	4.1.2.4	100.68
2.4.1.1	2.3.1.89	1.1.1.205	100.09
2.4.1.1	2.3.1.89	1.1.1.42	101.38
2.4.1.1	2.3.1.89	1.2.1.8	100.06
2.4.1.1	2.3.1.89	3.1.3.5	99.95
2.4.1.1	2.3.1.89	4.1.2.4	100.08
2.7.1.56	2.4.1.1	1.1.1.205	100.7
2.7.1.56	2.4.1.1	1.1.1.42	101.03
2.7.1.56	2.4.1.1	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	2.4.1.1	3.1.3.5	100.8
2.7.1.56	2.4.1.1	4.1.2.4	100.69
2.6.1.-	2.4.1.1	1.1.1.205	100.09
2.6.1.-	2.4.1.1	1.1.1.42	101.38
2.6.1.-	2.4.1.1	1.2.1.8	100.06
2.6.1.-	2.4.1.1	3.1.3.5	99.95
2.6.1.-	2.4.1.1	4.1.2.4	101.24
3.1.3.5	2.4.1.1	1.1.1.205	100.82
3.1.3.5	2.4.1.1	1.1.1.42	100.86
3.1.3.5	2.4.1.1	1.2.1.8	100.99
3.1.3.5	2.4.1.1	4.1.2.4	100.69
3.5.1.47	2.4.1.1	1.1.1.205	100.09

3.5.1.47	2.4.1.1	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.4.1.1	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	2.4.1.1	3.1.3.5	99.95
3.5.1.47	2.4.1.1	4.1.2.4	101.24
3.6.1.15	2.4.1.1	1.1.1.205	100.72
3.6.1.15	2.4.1.1	1.1.1.42	100.89
3.6.1.15	2.4.1.1	1.2.1.8	100.71
3.6.1.15	2.4.1.1	3.1.3.5	100.69
3.6.1.15	2.4.1.1	4.1.2.4	100.69
4.1.2.4	2.4.1.1	1.1.1.205	100.66
4.1.2.4	2.4.1.1	1.1.1.42	100.55
4.1.2.4	2.4.1.1	1.2.1.8	100.68
4.1.2.4	2.4.1.1	3.1.3.5	100.69
5.1.1.1	2.4.1.1	1.1.1.205	100.59
5.1.1.1	2.4.1.1	1.1.1.42	101
5.1.1.1	2.4.1.1	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.4.1.1	3.1.3.5	100.99
5.1.1.1	2.4.1.1	4.1.2.4	100.67
2.7.7.4	1.1.1.205	1.1.1.42	101.03
2.7.7.4	1.1.1.205	1.2.1.8	100.7
2.7.7.4	1.1.1.205	3.1.3.5	100.68
2.7.7.4	1.1.1.205	4.1.2.4	100.79
2.7.7.4	1.1.1.42	1.1.1.205	101.03
2.7.7.4	1.1.1.42	1.2.1.8	101
2.7.7.4	1.1.1.42	3.1.3.5	100.99
2.7.7.4	1.1.1.42	4.1.2.4	100.95
2.7.7.4	1.17.4.1	1.1.1.205	100.7
2.7.7.4	1.17.4.1	1.1.1.42	100.56
2.7.7.4	1.17.4.1	1.2.1.8	100.71
2.7.7.4	1.17.4.1	3.1.3.5	100.69
2.7.7.4	1.17.4.1	4.1.2.4	100.45
2.7.7.4	1.2.1.10	1.1.1.205	100.35
2.7.7.4	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
2.7.7.4	1.2.1.10	1.2.1.8	100.66
2.7.7.4	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
2.7.7.4	1.2.1.10	4.1.2.4	100.91
2.7.7.4	1.2.1.8	1.1.1.205	100.7
2.7.7.4	1.2.1.8	1.1.1.42	101
2.7.7.4	1.2.1.8	3.1.3.5	100.68
2.7.7.4	1.2.1.8	4.1.2.4	100.68
2.7.7.4	2.3.1.1	1.1.1.205	100.6
2.7.7.4	2.3.1.1	1.1.1.42	101.03
2.7.7.4	2.3.1.1	1.2.1.8	100.71

2.7.7.4	2.3.1.1	3.1.3.5	100.54
2.7.7.4	2.3.1.1	4.1.2.4	100.69
2.7.7.4	2.3.1.35	1.1.1.205	100.49
2.7.7.4	2.3.1.35	1.1.1.42	100.89
2.7.7.4	2.3.1.35	1.2.1.8	99.23
2.7.7.4	2.3.1.35	3.1.3.5	100.68
2.7.7.4	2.3.1.35	4.1.2.4	100.68
2.7.7.4	2.4.1.18	1.1.1.205	100.6
2.7.7.4	2.4.1.18	1.1.1.42	100.75
2.7.7.4	2.4.1.18	1.2.1.8	100.71
2.7.7.4	2.4.1.18	3.1.3.5	100.69
2.7.7.4	2.4.1.18	4.1.2.4	100.69
2.7.7.4	2.7.1.56	1.1.1.205	100.71
2.7.7.4	2.7.1.56	1.1.1.42	101
2.7.7.4	2.7.1.56	1.2.1.8	100.71
2.7.7.4	2.7.1.56	3.1.3.5	100.69
2.7.7.4	2.7.1.56	4.1.2.4	100.69
3.1.3.5	2.7.7.4	1.1.1.205	100.68
3.1.3.5	2.7.7.4	1.1.1.42	100.99
3.1.3.5	2.7.7.4	1.2.1.8	100.68
3.1.3.5	2.7.7.4	4.1.2.4	100.69
3.5.1.16	2.7.7.4	1.1.1.205	100.6
3.5.1.16	2.7.7.4	1.1.1.42	100.89
3.5.1.16	2.7.7.4	1.2.1.8	100.71
3.5.1.16	2.7.7.4	3.1.3.5	100.69
3.5.1.16	2.7.7.4	4.1.2.4	100.69
4.1.2.4	2.7.7.4	1.1.1.205	100.79
4.1.2.4	2.7.7.4	1.1.1.42	100.95
4.1.2.4	2.7.7.4	1.2.1.8	100.68
4.1.2.4	2.7.7.4	3.1.3.5	100.69
4.3.1.19	2.7.7.4	1.1.1.205	100.61
4.3.1.19	2.7.7.4	1.1.1.42	101
4.3.1.19	2.7.7.4	1.2.1.8	100.71
4.3.1.19	2.7.7.4	3.1.3.5	100.69
4.3.1.19	2.7.7.4	4.1.2.4	100.69
5.1.1.1	2.7.7.4	1.1.1.205	100.58
5.1.1.1	2.7.7.4	1.1.1.42	101.02
5.1.1.1	2.7.7.4	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.7.7.4	3.1.3.5	100.67
5.1.1.1	2.7.7.4	4.1.2.4	100.99
6.3.4.14	2.7.7.4	1.1.1.205	100.61
6.3.4.14	2.7.7.4	1.1.1.42	100.77
6.3.4.14	2.7.7.4	1.2.1.8	99.24

6.3.4.14	2.7.7.4	3.1.3.5	100.69
6.3.4.14	2.7.7.4	4.1.2.4	100.69
2.7.8.7	1.1.1.205	1.1.1.42	100.86
2.7.8.7	1.1.1.205	1.2.1.8	100.7
2.7.8.7	1.1.1.205	3.1.3.5	100.67
2.7.8.7	1.1.1.205	4.1.2.4	100.67
2.7.8.7	1.1.1.42	1.1.1.205	100.86
2.7.8.7	1.1.1.42	1.2.1.8	101
2.7.8.7	1.1.1.42	3.1.3.5	101.01
2.7.8.7	1.1.1.42	4.1.2.4	100.86
2.7.8.7	1.2.1.8	1.1.1.205	100.7
2.7.8.7	1.2.1.8	1.1.1.42	101
2.7.8.7	1.2.1.8	3.1.3.5	100.68
2.7.8.7	1.2.1.8	4.1.2.4	100.79
2.7.8.7	2.3.1.89	1.1.1.205	99.97
2.7.8.7	2.3.1.89	1.1.1.42	101.38
2.7.8.7	2.3.1.89	1.2.1.8	100.06
2.7.8.7	2.3.1.89	3.1.3.5	100.04
2.7.8.7	2.3.1.89	4.1.2.4	100.07
2.7.8.7	2.6.1.-	1.1.1.205	100.09
2.7.8.7	2.6.1.-	1.1.1.42	101.38
2.7.8.7	2.6.1.-	1.2.1.8	100.06
2.7.8.7	2.6.1.-	3.1.3.5	100.02
2.7.8.7	2.6.1.-	4.1.2.4	100.02
2.7.8.7	2.7.1.56	1.1.1.205	100.69
2.7.8.7	2.7.1.56	1.1.1.42	101.01
2.7.8.7	2.7.1.56	1.2.1.8	100.71
2.7.8.7	2.7.1.56	3.1.3.5	100.69
2.7.8.7	2.7.1.56	4.1.2.4	100.69
3.5.1.47	2.7.8.7	1.1.1.205	100.09
3.5.1.47	2.7.8.7	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.7.8.7	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	2.7.8.7	3.1.3.5	100.02
3.5.1.47	2.7.8.7	4.1.2.4	100.02
5.1.1.1	2.7.8.7	1.1.1.205	100.69
5.1.1.1	2.7.8.7	1.1.1.42	100.78
5.1.1.1	2.7.8.7	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.7.8.7	3.1.3.5	100.67
5.1.1.1	2.7.8.7	4.1.2.4	100.66
2.4.1.18	1.1.1.205	1.1.1.42	100.88
2.4.1.18	1.1.1.205	1.2.1.8	100.7
2.4.1.18	1.1.1.205	3.1.3.5	100.68
2.4.1.18	1.1.1.205	4.1.2.4	100.67

2.4.1.18	1.1.1.42	1.1.1.205	100.88
2.4.1.18	1.1.1.42	1.2.1.8	101.03
2.4.1.18	1.1.1.42	3.1.3.5	100.86
2.4.1.18	1.1.1.42	4.1.2.4	100.72
2.4.1.18	1.17.4.1	1.1.1.205	100.71
2.4.1.18	1.17.4.1	1.1.1.42	100.77
2.4.1.18	1.17.4.1	1.2.1.8	100.71
2.4.1.18	1.17.4.1	3.1.3.5	100.8
2.4.1.18	1.17.4.1	4.1.2.4	100.69
2.4.1.18	1.2.1.8	1.1.1.205	100.7
2.4.1.18	1.2.1.8	1.1.1.42	101.03
2.4.1.18	1.2.1.8	3.1.3.5	100.53
2.4.1.18	1.2.1.8	4.1.2.4	100.39
2.4.1.18	1.4.1.14	1.1.1.205	100.6
2.4.1.18	1.4.1.14	1.1.1.42	101.01
2.4.1.18	1.4.1.14	1.2.1.8	100.71
2.4.1.18	1.4.1.14	3.1.3.5	100.69
2.4.1.18	1.4.1.14	4.1.2.4	100.69
2.4.1.18	1.8.99.2	1.1.1.205	100.6
2.4.1.18	1.8.99.2	1.1.1.42	100.75
2.4.1.18	1.8.99.2	1.2.1.8	100.71
2.4.1.18	1.8.99.2	3.1.3.5	100.69
2.4.1.18	1.8.99.2	4.1.2.4	100.69
2.4.1.18	2.3.1.89	1.1.1.205	99.97
2.4.1.18	2.3.1.89	1.1.1.42	101.38
2.4.1.18	2.3.1.89	1.2.1.8	100.05
2.4.1.18	2.3.1.89	3.1.3.5	100.05
2.4.1.18	2.3.1.89	4.1.2.4	100.08
2.7.1.56	2.4.1.18	1.1.1.205	100.69
2.7.1.56	2.4.1.18	1.1.1.42	100.88
2.7.1.56	2.4.1.18	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	2.4.1.18	3.1.3.5	100.69
2.7.1.56	2.4.1.18	4.1.2.4	100.69
2.7.7.4	2.4.1.18	1.1.1.205	100.6
2.7.7.4	2.4.1.18	1.1.1.42	100.75
2.7.7.4	2.4.1.18	1.2.1.8	100.71
2.7.7.4	2.4.1.18	3.1.3.5	100.69
2.7.7.4	2.4.1.18	4.1.2.4	100.69
2.6.1.-	2.4.1.18	1.1.1.205	99.97
2.6.1.-	2.4.1.18	1.1.1.42	101.38
2.6.1.-	2.4.1.18	1.2.1.8	100.06
2.6.1.-	2.4.1.18	3.1.3.5	100.03
2.6.1.-	2.4.1.18	4.1.2.4	100.08

3.5.1.47	2.4.1.18	1.1.1.205	99.97
3.5.1.47	2.4.1.18	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.4.1.18	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	2.4.1.18	3.1.3.5	100.03
3.5.1.47	2.4.1.18	4.1.2.4	100.08
4.1.2.4	2.4.1.18	3.1.3.5	100.69
5.1.1.1	2.4.1.18	1.1.1.205	100.69
5.1.1.1	2.4.1.18	1.1.1.42	100.86
5.1.1.1	2.4.1.18	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.4.1.18	3.1.3.5	100.99
5.1.1.1	2.4.1.18	4.1.2.4	100.76
2.4.2.3	1.1.1.205	1.1.1.42	100.88
2.4.2.3	1.1.1.205	1.2.1.8	100.68
2.4.2.3	1.1.1.205	3.1.3.5	100.68
2.4.2.3	1.1.1.205	4.1.2.4	100.68
2.4.2.3	1.1.1.42	1.1.1.205	100.88
2.4.2.3	1.1.1.42	1.2.1.8	101
2.4.2.3	1.1.1.42	3.1.3.5	100.99
2.4.2.3	1.1.1.42	4.1.2.4	101
2.4.2.3	1.2.1.8	1.1.1.205	100.68
2.4.2.3	1.2.1.8	1.1.1.42	101
2.4.2.3	1.2.1.8	3.1.3.5	100.68
2.4.2.3	1.2.1.8	4.1.2.4	100.51
2.4.2.3	2.3.1.89	1.1.1.205	100.1
2.4.2.3	2.3.1.89	1.1.1.42	101.38
2.4.2.3	2.3.1.89	1.2.1.8	100.06
2.4.2.3	2.3.1.89	3.1.3.5	100.04
2.4.2.3	2.3.1.89	4.1.2.4	100.06
2.7.1.56	2.4.2.3	1.1.1.205	100.67
2.7.1.56	2.4.2.3	1.1.1.42	100.75
2.7.1.56	2.4.2.3	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	2.4.2.3	3.1.3.5	100.69
2.7.1.56	2.4.2.3	4.1.2.4	100.69
2.6.1.-	2.4.2.3	1.1.1.205	100.1
2.6.1.-	2.4.2.3	1.1.1.42	101.38
2.6.1.-	2.4.2.3	1.2.1.8	100.06
2.6.1.-	2.4.2.3	3.1.3.5	100.11
2.6.1.-	2.4.2.3	4.1.2.4	100.07
3.1.3.5	2.4.2.3	4.1.2.4	100.69
3.5.1.47	2.4.2.3	1.1.1.205	100.1
3.5.1.47	2.4.2.3	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.4.2.3	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	2.4.2.3	3.1.3.5	100.11

3.5.1.47	2.4.2.3	4.1.2.4	100.07
5.1.1.1	2.4.2.3	1.1.1.205	100.69
5.1.1.1	2.4.2.3	1.1.1.42	100.56
5.1.1.1	2.4.2.3	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.4.2.3	3.1.3.5	100.99
5.1.1.1	2.4.2.3	4.1.2.4	100.83
2.4.1.21	1.1.1.205	1.1.1.42	101.03
2.4.1.21	1.1.1.205	1.2.1.8	100.7
2.4.1.21	1.1.1.205	3.1.3.5	101
2.4.1.21	1.1.1.205	4.1.2.4	100.67
2.4.1.21	1.1.1.42	1.1.1.205	101.03
2.4.1.21	1.1.1.42	1.2.1.8	100.86
2.4.1.21	1.1.1.42	3.1.3.5	100.55
2.4.1.21	1.1.1.42	4.1.2.4	100.99
2.4.1.21	1.2.1.8	1.1.1.205	100.7
2.4.1.21	1.2.1.8	1.1.1.42	100.86
2.4.1.21	1.2.1.8	3.1.3.5	100.68
2.4.1.21	1.2.1.8	4.1.2.4	100.67
2.4.1.21	2.3.1.89	1.1.1.205	100.09
2.4.1.21	2.3.1.89	1.1.1.42	101.38
2.4.1.21	2.3.1.89	1.2.1.8	100.06
2.4.1.21	2.3.1.89	3.1.3.5	100.01
2.4.1.21	2.3.1.89	4.1.2.4	100.07
2.7.1.56	2.4.1.21	1.1.1.205	100.69
2.7.1.56	2.4.1.21	1.1.1.42	101
2.7.1.56	2.4.1.21	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	2.4.1.21	3.1.3.5	100.69
2.7.1.56	2.4.1.21	4.1.2.4	101
2.6.1.-	2.4.1.21	1.1.1.205	100.09
2.6.1.-	2.4.1.21	1.1.1.42	101.38
2.6.1.-	2.4.1.21	1.2.1.8	100.06
2.6.1.-	2.4.1.21	3.1.3.5	100.02
2.6.1.-	2.4.1.21	4.1.2.4	99.8
3.1.3.5	2.4.1.21	1.1.1.205	101
3.1.3.5	2.4.1.21	1.1.1.42	100.55
3.1.3.5	2.4.1.21	1.2.1.8	100.68
3.1.3.5	2.4.1.21	4.1.2.4	100.69
3.5.1.47	2.4.1.21	1.1.1.205	100.09
3.5.1.47	2.4.1.21	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.4.1.21	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	2.4.1.21	3.1.3.5	100.02
3.5.1.47	2.4.1.21	4.1.2.4	99.8
5.1.1.1	2.4.1.21	1.1.1.205	100.59

5.1.1.1	2.4.1.21	1.1.1.42	101
5.1.1.1	2.4.1.21	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.4.1.21	3.1.3.5	100.67
5.1.1.1	2.4.1.21	4.1.2.4	100.66
1.2.1.10	1.1.1.205	1.1.1.42	101.21
1.2.1.10	1.1.1.205	1.2.1.8	100.49
1.2.1.10	1.1.1.205	3.1.3.5	100.9
1.2.1.10	1.1.1.205	4.1.2.4	100.9
1.2.1.10	1.1.1.23	1.1.1.205	100.33
1.2.1.10	1.1.1.23	1.1.1.42	101.21
1.2.1.10	1.1.1.23	1.2.1.8	99.52
1.2.1.10	1.1.1.23	3.1.3.5	100.9
1.2.1.10	1.1.1.23	4.1.2.4	100.9
1.2.1.10	1.1.1.42	1.1.1.205	101.21
1.2.1.10	1.1.1.42	1.2.1.8	101.17
1.2.1.10	1.1.1.42	3.1.3.5	101.18
1.2.1.10	1.1.1.42	4.1.2.4	101.08
1.2.1.10	1.1.1.94	1.1.1.205	100.35
1.2.1.10	1.1.1.94	1.1.1.42	101.21
1.2.1.10	1.1.1.94	1.2.1.8	99.52
1.2.1.10	1.1.1.94	3.1.3.5	100.9
1.2.1.10	1.1.1.94	4.1.2.4	100.92
1.2.1.10	1.1.1.95	1.1.1.205	100.07
1.2.1.10	1.1.1.95	1.1.1.42	99.95
1.2.1.10	1.1.1.95	1.2.1.8	98.99
1.2.1.10	1.1.1.95	3.1.3.5	99.24
1.2.1.10	1.1.1.95	4.1.2.4	99.17
1.2.1.10	1.17.4.1	1.1.1.205	100.91
1.2.1.10	1.17.4.1	1.1.1.42	101.21
1.2.1.10	1.17.4.1	1.2.1.8	100.94
1.2.1.10	1.17.4.1	3.1.3.5	100.9
1.2.1.10	1.17.4.1	4.1.2.4	100.48
1.8.99.2	1.2.1.10	1.1.1.205	100.35
1.8.99.2	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
1.8.99.2	1.2.1.10	1.2.1.8	100.66
1.8.99.2	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
1.8.99.2	1.2.1.10	4.1.2.4	100.35
2.3.1.-	1.2.1.10	1.1.1.205	100.14
2.3.1.-	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
2.3.1.-	1.2.1.10	1.2.1.8	99.48
2.3.1.-	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
2.3.1.-	1.2.1.10	4.1.2.4	101.18
2.3.1.35	1.2.1.10	1.1.1.205	100.37

2.3.1.35	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
2.3.1.35	1.2.1.10	1.2.1.8	99.5
2.3.1.35	1.2.1.10	3.1.3.5	101.17
2.3.1.35	1.2.1.10	4.1.2.4	101.17
2.3.1.46	1.2.1.10	1.1.1.205	100.36
2.3.1.46	1.2.1.10	1.1.1.42	101.18
2.3.1.46	1.2.1.10	1.2.1.8	99.5
2.3.1.46	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
2.3.1.46	1.2.1.10	4.1.2.4	101.18
2.3.1.89	1.2.1.10	1.1.1.205	100.03
2.3.1.89	1.2.1.10	1.1.1.42	101.09
2.3.1.89	1.2.1.10	1.2.1.8	100.65
2.3.1.89	1.2.1.10	3.1.3.5	99.76
2.3.1.89	1.2.1.10	4.1.2.4	99.76
2.4.2.2	1.2.1.10	1.1.1.205	100.38
2.4.2.2	1.2.1.10	1.1.1.42	101.17
2.4.2.2	1.2.1.10	1.2.1.8	99.51
2.4.2.2	1.2.1.10	3.1.3.5	100.96
2.4.2.2	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
2.4.2.9	1.2.1.10	1.1.1.205	100.36
2.4.2.9	1.2.1.10	1.1.1.42	101.18
2.4.2.9	1.2.1.10	1.2.1.8	99.48
2.4.2.9	1.2.1.10	3.1.3.5	100.96
2.4.2.9	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
2.5.1.48	1.2.1.10	1.1.1.205	100.35
2.5.1.48	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
2.5.1.48	1.2.1.10	1.2.1.8	99.51
2.5.1.48	1.2.1.10	3.1.3.5	100.18
2.5.1.48	1.2.1.10	4.1.2.4	100.86
2.5.1.49	1.2.1.10	1.1.1.205	100.85
2.5.1.49	1.2.1.10	1.1.1.42	101.17
2.5.1.49	1.2.1.10	1.2.1.8	99.53
2.5.1.49	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
2.5.1.49	1.2.1.10	4.1.2.4	101.16
2.7.7.4	1.2.1.10	1.1.1.205	100.35
2.7.7.4	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
2.7.7.4	1.2.1.10	1.2.1.8	100.66
2.7.7.4	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
2.7.7.4	1.2.1.10	4.1.2.4	100.91
2.7.7.9	1.2.1.10	1.1.1.205	100.35
2.7.7.9	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
2.7.7.9	1.2.1.10	1.2.1.8	100.02
2.7.7.9	1.2.1.10	3.1.3.5	100.89

2.7.7.9	1.2.1.10	4.1.2.4	100.92
2.6.1.52	1.2.1.10	1.1.1.205	100.07
2.6.1.52	1.2.1.10	1.1.1.42	99.95
2.6.1.52	1.2.1.10	1.2.1.8	98.99
2.6.1.52	1.2.1.10	3.1.3.5	99.24
2.6.1.52	1.2.1.10	4.1.2.4	99.17
2.7.1.11	1.2.1.10	1.1.1.205	100.38
2.7.1.11	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
2.7.1.11	1.2.1.10	1.2.1.8	99.51
2.7.1.11	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
2.7.1.11	1.2.1.10	4.1.2.4	100.97
2.7.1.30	1.2.1.10	1.1.1.205	100.51
2.7.1.30	1.2.1.10	1.1.1.42	101.17
2.7.1.30	1.2.1.10	1.2.1.8	99.5
2.7.1.30	1.2.1.10	3.1.3.5	100.89
2.7.1.30	1.2.1.10	4.1.2.4	100.89
2.7.1.31	1.2.1.10	1.1.1.205	100.33
2.7.1.31	1.2.1.10	1.1.1.42	101.17
2.7.1.31	1.2.1.10	1.2.1.8	Lethal_deletions
2.7.1.31	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
2.7.1.31	1.2.1.10	4.1.2.4	100.89
3.1.3.5	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
3.2.1.1	1.2.1.10	1.1.1.205	100.34
3.2.1.1	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
3.2.1.1	1.2.1.10	1.2.1.8	99.51
3.2.1.1	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
3.2.1.1	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
3.2.1.33	1.2.1.10	1.1.1.205	100.39
3.2.1.33	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
3.2.1.33	1.2.1.10	1.2.1.8	99.52
3.2.1.33	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
3.2.1.33	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
3.5.1.16	1.2.1.10	1.1.1.205	100.48
3.5.1.16	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
3.5.1.16	1.2.1.10	1.2.1.8	99.53
3.5.1.16	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
3.5.1.16	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
3.5.4.1	1.2.1.10	1.1.1.205	100.38
3.5.4.1	1.2.1.10	1.1.1.42	101.17
3.5.4.1	1.2.1.10	1.2.1.8	99.51
3.5.4.1	1.2.1.10	3.1.3.5	100.96
3.5.4.1	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
3.5.99.6	1.2.1.10	1.1.1.205	100.35

3.5.99.6	1.2.1.10	1.1.1.42	101.21
3.5.99.6	1.2.1.10	1.2.1.8	99.51
3.5.99.6	1.2.1.10	3.1.3.5	101.17
3.5.99.6	1.2.1.10	4.1.2.4	100.92
5.1.3.3	1.2.1.10	1.1.1.205	100.38
5.1.3.3	1.2.1.10	1.1.1.42	101.16
5.1.3.3	1.2.1.10	1.2.1.8	99.5
5.1.3.3	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
5.1.3.3	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
6.3.4.14	1.2.1.10	1.1.1.205	100.35
6.3.4.14	1.2.1.10	1.1.1.42	101.2
6.3.4.14	1.2.1.10	1.2.1.8	99.48
6.3.4.14	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
6.3.4.14	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
6.3.5.4	1.2.1.10	1.1.1.205	100.48
6.3.5.4	1.2.1.10	1.1.1.42	101.2
6.3.5.4	1.2.1.10	1.2.1.8	99.5
6.3.5.4	1.2.1.10	3.1.3.5	100.9
6.3.5.4	1.2.1.10	4.1.2.4	100.9
2.6.1.57	1.1.1.205	1.1.1.42	101.03
2.6.1.57	1.1.1.205	1.2.1.8	100.7
2.6.1.57	1.1.1.205	3.1.3.5	100.67
2.6.1.57	1.1.1.205	4.1.2.4	100.68
2.6.1.57	1.1.1.42	1.1.1.205	101.03
2.6.1.57	1.1.1.42	1.2.1.8	101.03
2.6.1.57	1.1.1.42	3.1.3.5	101
2.6.1.57	1.1.1.42	4.1.2.4	101
2.6.1.57	1.17.4.1	1.1.1.205	100.7
2.6.1.57	1.17.4.1	1.1.1.42	101.02
2.6.1.57	1.17.4.1	1.2.1.8	100.71
2.6.1.57	1.17.4.1	3.1.3.5	100.69
2.6.1.57	1.17.4.1	4.1.2.4	100.69
2.6.1.57	1.2.1.8	1.1.1.205	100.7
2.6.1.57	1.2.1.8	1.1.1.42	101.03
2.6.1.57	1.2.1.8	3.1.3.5	100.68
2.6.1.57	1.2.1.8	4.1.2.4	100.68
2.6.1.57	2.6.1.-	1.1.1.205	100.11
2.6.1.57	2.6.1.-	1.1.1.42	101.38
2.6.1.57	2.6.1.-	1.2.1.8	100.06
2.6.1.57	2.6.1.-	3.1.3.5	99.95
2.6.1.57	2.6.1.-	4.1.2.4	100.14
2.7.1.56	2.6.1.57	1.1.1.205	100.7
2.7.1.56	2.6.1.57	1.1.1.42	100.55

2.7.1.56	2.6.1.57	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	2.6.1.57	3.1.3.5	100.69
2.7.1.56	2.6.1.57	4.1.2.4	100.61
3.5.1.47	2.6.1.57	1.1.1.205	100.11
3.5.1.47	2.6.1.57	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.6.1.57	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	2.6.1.57	3.1.3.5	99.95
3.5.1.47	2.6.1.57	4.1.2.4	100.14
4.1.2.4	2.6.1.57	3.1.3.5	100.69
5.1.1.1	2.6.1.57	1.1.1.205	100.59
5.1.1.1	2.6.1.57	1.1.1.42	100.78
5.1.1.1	2.6.1.57	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.6.1.57	3.1.3.5	100.58
5.1.1.1	2.6.1.57	4.1.2.4	100.99
1.1.1.205	1.1.1.1	1.1.1.42	100.88
1.1.1.205	1.1.1.1	1.2.1.8	100.7
1.1.1.205	1.1.1.1	3.1.3.5	100.52
1.1.1.205	1.1.1.1	4.1.2.4	100.67
1.1.1.42	1.1.1.1	1.1.1.205	100.88
1.1.1.42	1.1.1.1	1.2.1.8	101.03
1.1.1.42	1.1.1.1	3.1.3.5	101
1.1.1.42	1.1.1.1	4.1.2.4	100.77
1.17.4.1	1.1.1.1	1.1.1.205	100.7
1.17.4.1	1.1.1.1	1.1.1.42	100.88
1.17.4.1	1.1.1.1	1.2.1.8	100.64
1.17.4.1	1.1.1.1	3.1.3.5	100.45
1.17.4.1	1.1.1.1	4.1.2.4	100.69
1.2.1.8	1.1.1.1	1.1.1.205	100.7
1.2.1.8	1.1.1.1	1.1.1.42	101.03
1.2.1.8	1.1.1.1	3.1.3.5	100.68
1.2.1.8	1.1.1.1	4.1.2.4	100.61
2.3.1.89	1.1.1.1	1.1.1.205	100.09
2.3.1.89	1.1.1.1	1.1.1.42	101.38
2.3.1.89	1.1.1.1	1.2.1.8	100.06
2.3.1.89	1.1.1.1	3.1.3.5	99.95
2.3.1.89	1.1.1.1	4.1.2.4	100.06
2.6.1.-	1.1.1.1	1.1.1.205	99.97
2.6.1.-	1.1.1.1	1.1.1.42	101.38
2.6.1.-	1.1.1.1	1.2.1.8	100.06
2.6.1.-	1.1.1.1	3.1.3.5	99.95
2.6.1.-	1.1.1.1	4.1.2.4	100.03
2.7.1.56	1.1.1.1	1.1.1.205	100.7
2.7.1.56	1.1.1.1	1.1.1.42	101.01

2.7.1.56	1.1.1.1	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	1.1.1.1	3.1.3.5	100.69
2.7.1.56	1.1.1.1	4.1.2.4	100.69
3.1.3.5	1.1.1.1	1.1.1.205	100.52
3.1.3.5	1.1.1.1	1.1.1.42	101
3.1.3.5	1.1.1.1	1.2.1.8	100.68
3.1.3.5	1.1.1.1	4.1.2.4	100.55
3.5.1.47	1.1.1.1	1.1.1.205	99.97
3.5.1.47	1.1.1.1	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	1.1.1.1	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	1.1.1.1	3.1.3.5	99.95
3.5.1.47	1.1.1.1	4.1.2.4	100.03
4.1.2.4	1.1.1.1	1.1.1.205	100.67
4.1.2.4	1.1.1.1	1.1.1.42	100.77
4.1.2.4	1.1.1.1	1.2.1.8	100.61
4.1.2.4	1.1.1.1	3.1.3.5	100.55
5.1.1.1	1.1.1.1	1.1.1.205	100.58
5.1.1.1	1.1.1.1	1.1.1.42	101.02
5.1.1.1	1.1.1.1	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	1.1.1.1	3.1.3.5	100.67
5.1.1.1	1.1.1.1	4.1.2.4	100.66

Tabla 3.D.4. Rendimientos relativos de 1,3-PD de triples mutantes que incluyen enzimas sub-expresadas en glicerol respecto a glucosa, de acuerdo con lo evaluado en este estudio. (L.D = Delección letal)

			Y _{1,3-PD} relativo
2.4.2.22	1.1.1.205	1.1.1.42	101.03
2.4.2.22	1.1.1.205	1.2.1.8	100.7
2.4.2.22	1.1.1.205	3.1.3.5	100.67
2.4.2.22	1.1.1.205	4.1.2.4	100.68
2.4.2.22	1.1.1.42	1.1.1.205	101.03
2.4.2.22	1.1.1.42	1.2.1.8	101.03
2.4.2.22	1.1.1.42	3.1.3.5	101
2.4.2.22	1.1.1.42	4.1.2.4	101
2.4.2.22	1.17.4.1	1.1.1.205	100.7
2.4.2.22	1.17.4.1	1.1.1.42	101.02
2.4.2.22	1.17.4.1	1.2.1.8	100.71
2.4.2.22	1.17.4.1	3.1.3.5	100.69
2.4.2.22	1.17.4.1	4.1.2.4	100.69
2.4.2.22	1.2.1.8	1.1.1.205	100.7
2.4.2.22	1.2.1.8	1.1.1.42	101.03

2.4.2.22	1.2.1.8	3.1.3.5	100.68
2.4.2.22	1.2.1.8	4.1.2.4	100.68
2.7.1.56	2.4.2.22	1.1.1.205	100.7
2.7.1.56	2.4.2.22	1.1.1.42	100.55
2.7.1.56	2.4.2.22	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	2.4.2.22	3.1.3.5	100.69
2.7.1.56	2.4.2.22	4.1.2.4	100.61
2.6.1.-	2.4.2.22	1.1.1.205	100.11
2.6.1.-	2.4.2.22	1.1.1.42	101.38
2.6.1.-	2.4.2.22	1.2.1.8	100.06
2.6.1.-	2.4.2.22	3.1.3.5	99.95
2.6.1.-	2.4.2.22	4.1.2.4	100.14
3.1.3.5	2.4.2.22	1.1.1.205	100.67
3.1.3.5	2.4.2.22	1.1.1.42	101
3.1.3.5	2.4.2.22	1.2.1.8	100.68
3.1.3.5	2.4.2.22	4.1.2.4	100.69
3.5.1.47	2.4.2.22	1.1.1.205	100.11
3.5.1.47	2.4.2.22	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.4.2.22	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	2.4.2.22	3.1.3.5	99.95
3.5.1.47	2.4.2.22	4.1.2.4	100.14
4.1.2.4	2.4.2.22	1.1.1.205	100.68
4.1.2.4	2.4.2.22	1.1.1.42	101
4.1.2.4	2.4.2.22	1.2.1.8	100.68
4.1.2.4	2.4.2.22	3.1.3.5	100.69
5.1.1.1	2.4.2.22	1.1.1.205	100.59
5.1.1.1	2.4.2.22	1.1.1.42	100.78
5.1.1.1	2.4.2.22	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.4.2.22	3.1.3.5	100.58
5.1.1.1	2.4.2.22	4.1.2.4	100.99
2.6.1.52	1.1.1.205	1.1.1.42	100.09
2.6.1.52	1.1.1.205	1.2.1.8	100.07
2.6.1.52	1.1.1.205	3.1.3.5	99.88
2.6.1.52	1.1.1.205	4.1.2.4	102.26
2.6.1.52	1.1.1.27	1.1.1.205	100.06
2.6.1.52	1.1.1.27	1.1.1.42	100.11
2.6.1.52	1.1.1.27	1.2.1.8	99.95
2.6.1.52	1.1.1.27	3.1.3.5	100.07
2.6.1.52	1.1.1.27	4.1.2.4	100.07
2.6.1.52	1.1.1.42	1.1.1.205	100.09
2.6.1.52	1.1.1.42	1.2.1.8	100.09
2.6.1.52	1.1.1.42	3.1.3.5	100.04
2.6.1.52	1.1.1.42	4.1.2.4	100.07

2.6.1.52	1.17.4.1	1.1.1.205	100.06
2.6.1.52	1.17.4.1	1.1.1.42	100.1
2.6.1.52	1.17.4.1	1.2.1.8	100.1
2.6.1.52	1.17.4.1	3.1.3.5	100.07
2.6.1.52	1.17.4.1	4.1.2.4	100.07
2.6.1.52	1.18.1.2	1.1.1.205	100.09
2.6.1.52	1.18.1.2	1.1.1.42	90.18
2.6.1.52	1.18.1.2	1.2.1.8	100.12
2.6.1.52	1.18.1.2	3.1.3.5	99.5
2.6.1.52	1.18.1.2	4.1.2.4	100.07
2.6.1.52	1.2.1.10	1.1.1.205	100.07
2.6.1.52	1.2.1.10	1.1.1.42	99.95
2.6.1.52	1.2.1.10	1.2.1.8	98.99
2.6.1.52	1.2.1.10	3.1.3.5	99.24
2.6.1.52	1.2.1.10	4.1.2.4	99.17
2.6.1.52	1.8.99.2	1.1.1.205	100.06
2.6.1.52	1.8.99.2	1.1.1.42	100.14
2.6.1.52	1.8.99.2	1.2.1.8	99.95
2.6.1.52	1.8.99.2	3.1.3.5	100.07
2.6.1.52	1.8.99.2	4.1.2.4	100.07
2.6.1.52	2.3.1.35	1.1.1.205	100.1
2.6.1.52	2.3.1.35	1.1.1.42	100.07
2.6.1.52	2.3.1.35	1.2.1.8	100.09
2.6.1.52	2.3.1.35	3.1.3.5	99.85
2.6.1.52	2.3.1.35	4.1.2.4	99.21
2.6.1.52	2.4.2.7	1.1.1.205	100.1
2.6.1.52	2.4.2.7	1.1.1.42	100.1
2.6.1.52	2.4.2.7	1.2.1.8	100.03
2.6.1.52	2.4.2.7	3.1.3.5	99.9
2.6.1.52	2.4.2.7	4.1.2.4	100.08
2.6.1.52	2.5.1.3	1.1.1.205	100.1
2.6.1.52	2.5.1.3	1.1.1.42	100.14
2.6.1.52	2.5.1.3	1.2.1.8	100.09
2.6.1.52	2.5.1.3	3.1.3.5	100.08
2.6.1.52	2.5.1.3	4.1.2.4	99.83
2.6.1.52	2.5.1.48	1.1.1.205	100.1
2.6.1.52	2.5.1.48	1.1.1.42	100.09
2.6.1.52	2.5.1.48	1.2.1.8	99.95
2.6.1.52	2.5.1.48	3.1.3.5	100.07
2.6.1.52	2.5.1.48	4.1.2.4	100.07
2.6.1.52	2.5.1.49	1.1.1.205	100.11
2.6.1.52	2.5.1.49	1.1.1.42	100.14
2.6.1.52	2.5.1.49	1.2.1.8	99.95

2.6.1.52	2.5.1.49	3.1.3.5	99.7
2.6.1.52	2.5.1.49	4.1.2.4	100.07
2.6.1.52	2.6.1.21	1.1.1.205	99.58
2.6.1.52	2.6.1.21	1.1.1.42	100.02
2.6.1.52	2.6.1.21	1.2.1.8	99.45
2.6.1.52	2.6.1.21	3.1.3.5	99.95
2.6.1.52	2.6.1.21	4.1.2.4	99.88
2.7.1.50	2.6.1.52	1.1.1.205	100.1
2.7.1.50	2.6.1.52	1.1.1.42	100.14
2.7.1.50	2.6.1.52	1.2.1.8	100.09
2.7.1.50	2.6.1.52	3.1.3.5	100.08
2.7.1.50	2.6.1.52	4.1.2.4	99.83
2.7.1.56	2.6.1.52	1.1.1.205	100.1
2.7.1.56	2.6.1.52	1.1.1.42	100.1
2.7.1.56	2.6.1.52	1.2.1.8	100.09
2.7.1.56	2.6.1.52	3.1.3.5	99.3
2.7.1.56	2.6.1.52	4.1.2.4	100.02
2.7.4.7	2.6.1.52	1.1.1.205	100.1
2.7.4.7	2.6.1.52	1.1.1.42	100.14
2.7.4.7	2.6.1.52	1.2.1.8	100.09
2.7.4.7	2.6.1.52	3.1.3.5	100.08
2.7.4.7	2.6.1.52	4.1.2.4	99.83
3.5.99.2	2.6.1.52	1.1.1.205	100.1
3.5.99.2	2.6.1.52	1.1.1.42	100.14
3.5.99.2	2.6.1.52	1.2.1.8	100.09
3.5.99.2	2.6.1.52	3.1.3.5	100.08
3.5.99.2	2.6.1.52	4.1.2.4	99.83
3.6.1.19	2.6.1.52	1.1.1.205	100.06
3.6.1.19	2.6.1.52	1.1.1.42	100.13
3.6.1.19	2.6.1.52	1.2.1.8	99.95
3.6.1.19	2.6.1.52	3.1.3.5	100.07
3.6.1.19	2.6.1.52	4.1.2.4	100.07
3.6.1.7	2.6.1.52	1.1.1.205	100.07
3.6.1.7	2.6.1.52	1.1.1.42	100.06
3.6.1.7	2.6.1.52	1.2.1.8	100.1
3.6.1.7	2.6.1.52	3.1.3.5	100.07
3.6.1.7	2.6.1.52	4.1.2.4	99.31
4.1.2.4	2.6.1.52	3.1.3.5	100.07
4.4.1.8	2.6.1.52	1.1.1.205	98.86
4.4.1.8	2.6.1.52	1.1.1.42	101.6
4.4.1.8	2.6.1.52	1.2.1.8	99.92
4.4.1.8	2.6.1.52	3.1.3.5	102.11
4.4.1.8	2.6.1.52	4.1.2.4	99.09

5.1.1.1	2.6.1.52	1.1.1.205	99.15
5.1.1.1	2.6.1.52	1.1.1.42	100.07
5.1.1.1	2.6.1.52	1.2.1.8	99.39
5.1.1.1	2.6.1.52	3.1.3.5	99.07
5.1.1.1	2.6.1.52	4.1.2.4	99.39
5.1.1.3	2.6.1.52	1.1.1.205	99.56
5.1.1.3	2.6.1.52	1.1.1.42	100.02
5.1.1.3	2.6.1.52	1.2.1.8	99.39
5.1.1.3	2.6.1.52	3.1.3.5	99.95
5.1.1.3	2.6.1.52	4.1.2.4	99.95
6.3.1.1	2.6.1.52	1.1.1.205	99.48
6.3.1.1	2.6.1.52	1.1.1.42	100.1
6.3.1.1	2.6.1.52	1.2.1.8	100.1
6.3.1.1	2.6.1.52	3.1.3.5	99.83
6.3.1.1	2.6.1.52	4.1.2.4	99.39
6.3.4.14	2.6.1.52	1.1.1.205	100.06
6.3.4.14	2.6.1.52	1.1.1.42	100.14
6.3.4.14	2.6.1.52	1.2.1.8	99.95
6.3.4.14	2.6.1.52	3.1.3.5	100.07
6.3.4.14	2.6.1.52	4.1.2.4	100.07
2.6.1.57	1.1.1.205	1.1.1.42	101.03
2.6.1.57	1.1.1.205	1.2.1.8	100.7
2.6.1.57	1.1.1.205	3.1.3.5	100.67
2.6.1.57	1.1.1.205	4.1.2.4	100.68
2.6.1.57	1.1.1.42	1.1.1.205	101.03
2.6.1.57	1.1.1.42	1.2.1.8	101.03
2.6.1.57	1.1.1.42	3.1.3.5	101
2.6.1.57	1.1.1.42	4.1.2.4	101
2.6.1.57	1.17.4.1	1.1.1.205	100.7
2.6.1.57	1.17.4.1	1.1.1.42	101.02
2.6.1.57	1.17.4.1	1.2.1.8	100.71
2.6.1.57	1.17.4.1	3.1.3.5	100.69
2.6.1.57	1.17.4.1	4.1.2.4	100.69
2.6.1.57	1.2.1.8	1.1.1.205	100.7
2.6.1.57	1.2.1.8	1.1.1.42	101.03
2.6.1.57	1.2.1.8	3.1.3.5	100.68
2.6.1.57	1.2.1.8	4.1.2.4	100.68
2.6.1.57	2.6.1.-	1.1.1.205	100.11
2.6.1.57	2.6.1.-	1.1.1.42	101.38
2.6.1.57	2.6.1.-	1.2.1.8	100.06
2.6.1.57	2.6.1.-	3.1.3.5	99.95
2.6.1.57	2.6.1.-	4.1.2.4	100.14
2.7.1.56	2.6.1.57	1.1.1.205	100.7

2.7.1.56	2.6.1.57	1.1.1.42	100.55
2.7.1.56	2.6.1.57	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	2.6.1.57	3.1.3.5	100.69
2.7.1.56	2.6.1.57	4.1.2.4	100.61
3.5.1.47	2.6.1.57	1.1.1.205	100.11
3.5.1.47	2.6.1.57	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.6.1.57	1.2.1.8	100.06
3.5.1.47	2.6.1.57	3.1.3.5	99.95
3.5.1.47	2.6.1.57	4.1.2.4	100.14
4.1.2.4	2.6.1.57	3.1.3.5	100.69
5.1.1.1	2.6.1.57	1.1.1.205	100.59
5.1.1.1	2.6.1.57	1.1.1.42	100.78
5.1.1.1	2.6.1.57	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.6.1.57	3.1.3.5	100.58
5.1.1.1	2.6.1.57	4.1.2.4	100.99
2.7.1.48	1.1.1.205	1.1.1.42	100.88
2.7.1.48	1.1.1.205	1.2.1.8	100.7
2.7.1.48	1.1.1.205	3.1.3.5	100.68
2.7.1.48	1.1.1.205	4.1.2.4	100.67
2.7.1.48	1.1.1.42	1.1.1.205	100.88
2.7.1.48	1.1.1.42	1.2.1.8	100.88
2.7.1.48	1.1.1.42	3.1.3.5	101
2.7.1.48	1.1.1.42	4.1.2.4	101
2.7.1.48	1.1.1.94	1.1.1.205	100.4
2.7.1.48	1.1.1.94	1.1.1.42	101.03
2.7.1.48	1.1.1.94	1.2.1.8	100.71
2.7.1.48	1.1.1.94	3.1.3.5	100.69
2.7.1.48	1.1.1.94	4.1.2.4	100.69
2.7.1.48	1.2.1.8	1.1.1.205	100.7
2.7.1.48	1.2.1.8	1.1.1.42	100.88
2.7.1.48	1.2.1.8	3.1.3.5	100.68
2.7.1.48	1.2.1.8	4.1.2.4	100.68
2.7.1.48	2.3.1.89	1.1.1.205	99.97
2.7.1.48	2.3.1.89	1.1.1.42	101.38
2.7.1.48	2.3.1.89	1.2.1.8	100.05
2.7.1.48	2.3.1.89	3.1.3.5	100.04
2.7.1.48	2.3.1.89	4.1.2.4	100.1
2.7.1.48	2.6.1.-	1.1.1.205	100.09
2.7.1.48	2.6.1.-	1.1.1.42	101.38
2.7.1.48	2.6.1.-	1.2.1.8	100.05
2.7.1.48	2.6.1.-	3.1.3.5	100.11
2.7.1.48	2.6.1.-	4.1.2.4	100.06
2.7.1.56	2.7.1.48	1.1.1.205	100.69

2.7.1.56	2.7.1.48	1.1.1.42	100.88
2.7.1.56	2.7.1.48	1.2.1.8	100.71
2.7.1.56	2.7.1.48	3.1.3.5	100.69
2.7.1.56	2.7.1.48	4.1.2.4	100.8
2.7.7.10	2.7.1.48	1.1.1.205	100.71
2.7.7.10	2.7.1.48	1.1.1.42	101.03
2.7.7.10	2.7.1.48	1.2.1.8	99.24
2.7.7.10	2.7.1.48	3.1.3.5	100.69
2.7.7.10	2.7.1.48	4.1.2.4	100.69
2.7.7.12	2.7.1.48	1.1.1.205	100.71
2.7.7.12	2.7.1.48	1.1.1.42	101.03
2.7.7.12	2.7.1.48	1.2.1.8	99.24
2.7.7.12	2.7.1.48	3.1.3.5	100.69
2.7.7.12	2.7.1.48	4.1.2.4	100.69
3.5.1.47	2.7.1.48	1.1.1.205	100.09
3.5.1.47	2.7.1.48	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	2.7.1.48	1.2.1.8	100.05
3.5.1.47	2.7.1.48	3.1.3.5	100.11
3.5.1.47	2.7.1.48	4.1.2.4	100.06
4.1.2.4	2.7.1.48	3.1.3.5	100.69
5.1.1.1	2.7.1.48	1.1.1.205	100.69
5.1.1.1	2.7.1.48	1.1.1.42	100.56
5.1.1.1	2.7.1.48	1.2.1.8	100.69
5.1.1.1	2.7.1.48	3.1.3.5	100.99
5.1.1.1	2.7.1.48	4.1.2.4	100.52
3.1.3.2	1.1.1.205	1.1.1.42	101.02
3.1.3.2	1.1.1.205	1.2.1.8	100.69
3.1.3.2	1.1.1.205	3.1.3.5	100.67
3.1.3.2	1.1.1.205	4.1.2.4	100.66
3.1.3.2	1.1.1.42	1.1.1.205	101.02
3.1.3.2	1.1.1.42	1.2.1.8	100.86
3.1.3.2	1.1.1.42	3.1.3.5	100.72
3.1.3.2	1.1.1.42	4.1.2.4	101
3.1.3.2	1.17.4.1	1.1.1.205	100.7
3.1.3.2	1.17.4.1	1.1.1.42	100.54
3.1.3.2	1.17.4.1	1.2.1.8	100.7
3.1.3.2	1.17.4.1	3.1.3.5	100.69
3.1.3.2	1.17.4.1	4.1.2.4	100.79
3.1.3.2	1.3.1.12	1.1.1.205	100.6
3.1.3.2	1.3.1.12	1.1.1.42	101.03
3.1.3.2	1.3.1.12	1.2.1.8	99.23
3.1.3.2	1.3.1.12	3.1.3.5	100.69
3.1.3.2	1.3.1.12	4.1.2.4	100.8

3.1.3.2	2.3.1.89	1.1.1.205	100.09
3.1.3.2	2.3.1.89	1.1.1.42	101.38
3.1.3.2	2.3.1.89	1.2.1.8	100.01
3.1.3.2	2.3.1.89	3.1.3.5	99.95
3.1.3.2	2.3.1.89	4.1.2.4	100.05
3.1.3.2	2.6.1.-	1.1.1.205	100.09
3.1.3.2	2.6.1.-	1.1.1.42	101.38
3.1.3.2	2.6.1.-	1.2.1.8	100.03
3.1.3.2	2.6.1.-	3.1.3.5	99.95
3.1.3.2	2.6.1.-	4.1.2.4	100.06
3.1.3.5	3.1.3.2	1.2.1.8	100.68
3.1.3.5	3.1.3.2	4.1.2.4	100.61
3.5.1.47	3.1.3.2	1.1.1.205	100.09
3.5.1.47	3.1.3.2	1.1.1.42	101.38
3.5.1.47	3.1.3.2	1.2.1.8	100.03
3.5.1.47	3.1.3.2	3.1.3.5	99.95
3.5.1.47	3.1.3.2	4.1.2.4	100.06
5.1.1.1	3.1.3.2	1.1.1.205	100.56
5.1.1.1	3.1.3.2	1.1.1.42	100.99
5.1.1.1	3.1.3.2	1.2.1.8	100.68
5.1.1.1	3.1.3.2	3.1.3.5	100.66
5.1.1.1	3.1.3.2	4.1.2.4	100.67

