



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

MODELAMIENTO CINÉTICO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BETA-IONONA EN *S. CEREVISIAE*.

KRITSYE MARION ANDREA LEIVA LEIVA

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:

EDUARDO AGOSIN TRUMPER

Santiago de Chile, abril, 2017

© 2017, Kritsye Leiva Leiva



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

MODELAMIENTO CINÉTICO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BETA-IONONA EN *S. CEREVISIAE*.

KRITSYE MARION ANDREA LEIVA LEIVA

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

EDUARDO AGOSIN TRUMPER

JOSÉ RICARDO PÉREZ - CORREA

ALEJANDRO MAASS

MARÍA RODRÍGUEZ - FERNÁNDEZ

JAIME NAVÓN COHEN

Para completar las exigencias del grado de Magíster en Ciencias de la
Ingeniería

Santiago de Chile, abril, 2017

A mi familia, compañeros y amigos,
que me apoyaron mucho.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor el Profesor Eduardo Agosín por su apoyo y sugerencias durante el periodo de mi Magíster. También, me gustaría agradecer a los Profesores Ricardo Pérez y María Rodríguez-Fernández, quienes me brindaron su apoyo y enriquecieron este trabajo con sus consejos. A su vez, quisiera agradecer al Profesor Víctor Cifuentes de la Universidad de Chile por las facilidades que presto para realizar análisis experimentales en su laboratorio.

Me gustaría agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Biotecnología: Waldo Acevedo, Francisco Saitúa, Paulina Torres, Ángela Contreras, Pablo Cañón, Javiera López, Trinidad Pizarro y Maximiliano Ibaceta, por su compañía y alegría durante este proceso. También, a los amigos que la Universidad Católica me regaló; Francisco Pinto, Min Bag, Aline Ovalle y Magdalena Ribbeck, porque han llenado de momentos increíbles este periodo académico.

Y, especialmente, me gustaría agradecer a mi familia por su increíble dedicación, confianza y amor. A mi madre, por su apoyo inmenso e incondicional, y a Gustavo porque colma de felicidad mis días.

Finalmente, me gustaría agradecer a la Agencia Nacional de Investigación Tecnológica y Científica, CONICYT, por su financiamiento para llevar a cabo mis estudios de Magíster en Ciencias de la Ingeniería en la Pontificia Universidad Católica de Chile (CONICYT-PCHA/Magíster Nacional/2014 – folio 22140612). Al Fondo Nacional para el Desarrollo Tecnológico y Científico de Chile, FONDECYT (N°1130822), por su subvención para el desarrollo de este proyecto.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	x
1. Introducción.....	1
1.1 Motivación	1
1.1.1 Aromas y Sabores	1
1.1.2 Hipótesis y Objetivos.....	3
1.2 Estado del Arte.....	4
1.2.1 Apocarotenoides, β -Ionona y aplicaciones	8
1.2.2 Síntesis de β -ionona.....	9
1.2.2.1 Síntesis química de β -ionona	10
1.2.2.2 Biocatálisis enzimática de β -ionona	13
1.2.2.3 Ingeniería metabólica para la síntesis <i>de novo</i> de β -ionona.	16
1.3 Modelamiento	19
1.3.1 Modelos Cinéticos de Redes Metabólicas	20
1.3.2 Formulación de Modelos Cinéticos	25
1.3.3 Estimación de Parámetros.....	28
1.3.4 Análisis de pre/post-Regresión	37
1.3.5 Análisis de control metabólico	40
2. Desarrollo de un modelo metabólico cinético para optimizar la síntesis de β -ionona en <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	42
2.1 Introducción	42
2.2 Materiales y Métodos	46

2.2.1	Cepas, mantención y medios de cultivo	46
2.2.2	Modelamiento	47
2.2.3	Cultivos batch en bioreactor	49
2.2.4	Análisis Químico	50
2.2.4.1	Carotenoides	50
2.2.4.2	Esteroles	51
2.2.4.3	β -ionona	52
2.2.4.4	Metabolitos intermediarios de la vía del Mevalonato	53
2.3	Resultados	55
2.3.1	Calibración del Modelo	55
2.3.1.1	Estimación de Parámetros	55
2.3.1.2	Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> JLS07 en bioreactores	57
2.3.2	Análisis Pre/Post regresión	60
2.3.2.1	Identificabilidad	60
2.3.2.2	Sensibilidad	60
2.3.2.3	Significancia	60
2.3.3	Identificación de etapas limitantes en la biosíntesis de β -ionona ..	62
2.4	Discusión	68
2.4.1	Simulaciones	68
2.4.2	Análisis Pre/Post regresión	68
2.4.3	Identificación de etapas limitantes en la biosíntesis de β -ionona	70
2.5	Conclusión	76
3.	Conclusiones y perspectivas	78
4.	REFERENCIAS	81
5.	Anexos	115
5.1	Apéndice A. Material Suplementario	116
5.2	Apéndice B. Ecuaciones Cinéticas	132

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1-1: Revisión de Modelos cinéticos publicados recientemente	24
Tabla 2-1: Lista de cepas de <i>S. cerevisiae</i> usadas para la producción de β -ionona ...	46
Tabla 2-2: Resumen de Estimación de Parámetros	56
Tabla 2-3: Análisis de Control Metabólico. Control de la síntesis de β -ionona, β -caroteno, escualeno y ergosterol en <i>S. cerevisiae</i> JLS07	65
Tabla A-1: Constantes enzimáticas empleadas en los estudios de modelación.....	116
Tabla A-2: Constantes de disociación empleadas en los estudios de modelación...	120
Tabla A-3: Concentración de enzimas empleadas en los estudios de modelación ..	121
Tabla A-4: Concentración inicial de metabolitos empleadas en los estudios de modelación	123
Tabla A-5: Parámetros asociados al crecimiento empleadas en los estudios de modelación	126
Tabla A-6: Mecanismos de reacción de enzimas empleadas en los estudios de modelación	127
Tabla A-7: Análisis de Significancia	130

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1-1: Vía del Mevalonato, biosíntesis de carotenoides y esteroides	7
Figura 1-2: Síntesis química de Ionona.....	12
Figura 1-3: Esquema de clivaje simétrico de β -caroteno catalizado por la enzima CCD1.....	15
Figura 1-4: Vía de biosíntesis de β -ionona diseñada por ingeniería metabólica en <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	18
Figura 1-5: Principio general de modelamiento cinético	21
Figura 1-6: Diagrama del algoritmo de Búsqueda dispersa.....	36
Figura 2-1: Plataforma para la producción de β -ionona en <i>S. cerevisiae</i>	45
Figura 2-2: Comparación entre predicción del modelo (línea sólida) y datos experimentales (*) del cultivo batch de <i>S. cerevisiae</i> JLS07 crecida en bioreactor de 1,5 L	58
Figura 2-3: Análisis de Sensibilidad Relativa.....	61
Figura 2-4: Identificación de etapas limitantes en la Vía del Mevalonato, biosíntesis de β -ionona y esteroides de <i>S. cerevisiae</i> JLS07.....	63
Figura 2-5: Análisis de Perturbación de la biosíntesis de β -ionona en <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	67
Figura A-1: Representación gráfica de la matriz de correlación.....	129

RESUMEN

La producción biotecnológica de Aromas y Sabores (A&S) ha recibido menor atención que la de compuestos farmacéuticos o biocombustibles. Esto resulta sorprendente considerando que el mercado mundial de A&S ha sido estimado en US\$ 27,5 mil millones el año 2014 y tiene un crecimiento anual de 4% (Leffingwell & Associates, 2015). Dentro de estos compuestos, la β -ionona es una molécula promisoría presente en muchas flores y frutos, como moras, duraznos y damascos (López et al., 2015). Pero requiere la optimización de su biosíntesis mediante modelación matemática e ingeniería metabólica para convertirse en una alternativa económicamente viable.

Los modelos cinéticos están siendo cada vez más utilizados para predecir cómo los cambios de la expresión enzimática se relacionan con los cambios en los flujos metabólicos, para ayudar en los esfuerzos para aumentar el rendimiento, el título y la productividad de las vías metabólicas diseñadas. Los modelos cinéticos permiten una mejor comprensión de las dinámicas biológicas y pueden brindar una aproximación costo-efectiva para reducir los experimentos de ensayo y error. En esta tesis desarrollamos un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias para una vía heteróloga de biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae*, usando algunos parámetros cinéticos y concentraciones enzimáticas obtenidas de literatura. La calibración del modelo fue realizada para estimar los parámetros cinéticos más relevantes del sistema biológico no encontrados en la literatura. Se obtuvo un buen ajuste entre los módulos diseñados y la dinámica biológica registrada mediante análisis experimental. Además, efectuamos un diagnóstico de post-regresión para detectar posibles inconsistencias paramétricas del modelo. Finalmente, realizamos un análisis para identificar las etapas limitantes de la vía de biosíntesis de β -ionona en esta factoría celular. Las modificaciones genéticas propuestas mediante este trabajo proveen una alternativa para el diseño de una nueva plataforma para la síntesis *de novo* de β -ionona, que podría alcanzar mejores rendimientos que las estrategias biotecnológicas actuales.

Palabras Claves: Modelos metabólicos cinéticos, Industria biotecnológica, β -caroteno, β -ionona.

ABSTRACT

Biotechnological production of Flavors and Fragrances (F&F) has received fewer attention than pharmaceutical compounds or biofuels. This is surprising considering that the whole market for F&F has been estimated in US\$ 27.5 billion in 2014 with a 4% annual growth (Leffingwell & Associates, 2015). Among F&F compounds, β -Ionone is a prominent molecule present in many flowers and fruits, such as blackberries, peaches, and apricots (López et al., 2015). But in order to become economically viable it requires an optimization of its biosynthesis mechanism through mathematical modelling and metabolic engineering.

To aid in efforts to increase yield, titer, and productivity of engineered metabolic pathways, computational models are increasingly needed to predict how changes in enzyme expression map to changes in pathway flux. Kinetic Metabolic Models allow a better understanding of biological dynamics and can provide a cost-effective approach to reduce try-and-learn experiments. In this thesis, we developed an ordinary differential equation model for an engineered β -ionone biosynthetic pathway in *S. cerevisiae* using some kinetic parameters and enzyme concentrations culled from literature. Model calibration was performed to estimate the most relevant kinetic parameters of the biological system which are not reported in literature. A good agreement was achieved between the modules and biological dynamics reported by experimental analysis. In addition, a post-regression diagnostic was performed to detect possible parametric inconsistencies of the model. Finally, we performed an analysis to identify the limiting steps of the β -ionone biosynthesis pathway in this cell factory. The genetic modifications proposed by this work provide an alternative for the design of a new platform for *de novo* synthesis of β -ionone, which could achieve better yields than current biotechnological strategies.

Keywords: Kinetic Metabolic Models, Biotechnology Industry, β -carotene, β -ionone.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Motivación

1.1.1 Aromas y Sabores

Los aromas y sabores son componentes claves en múltiples áreas de nuestras vidas. No sólo afectan nuestra percepción de los alimentos y las bebidas (Guichard, 2002), sino que también desempeñan un papel importante en la industria de los cosméticos, detergentes y perfumes (Maldonado-Robledo et al., 2003). Tradicionalmente, estos compuestos se han extraído a partir de tejidos vegetales, pero estas técnicas se han vuelto poco atractivas debido al bajo rendimiento de los procesos de extracción y purificación; y la dependencia de las condiciones agrícolas y los factores ambientales (Cataldo et al., 2016; Longo & Sanromán, 2006). En este sentido, la biotecnología es una alternativa promisorio para producir compuestos aromáticos más sostenibles y naturales (Berger, 2009).

Los apocarotenoides son compuestos naturales derivados de la escisión oxidativa - principalmente enzimática - de carotenoides. En las plantas, este amplio grupo de compuestos actúa como pigmentos, aromas y moléculas de señal y regulación (Walter et al., 2010). Dentro de los apocarotenoides, la β -ionona es una molécula que se encuentra presente en diversos frutos y flores, como violetas, rosas y en la flor del olivo dulce, entre otros (Baldermann et al., 2012; Simkin et al., 2004). Esta molécula es uno de los C13-apocarotenoides con mayor potencial en la industria de los aromas debido a su bajo umbral olfativo (7 ppt en agua) y atractivas propiedades sensoriales (Baldwin et al., 2000). Sin embargo, se encuentra en muy baja concentración en las plantas (del orden de ng/kg de peso fresco) y, por ende, se requiere la optimización de la vía de biosíntesis de β -ionona para generar una alternativa viable comercialmente. Una alternativa promisorio es su producción heteróloga en factorías celulares, como *Saccharomyces cerevisiae* (López et al., 2015). Sin embargo, los rendimientos y concentraciones obtenidos a la fecha son muy bajos para poder ser considerados a nivel industrial.

El modelamiento matemático ha sido empleado desde hace varias décadas como estrategia para incrementar la tasa de éxito del trabajo experimental, guiando la investigación hacia experimentos que tienen mayor probabilidad de lograr el resultado deseado. Predominantemente, los trabajos en modelación se han focalizado en los modelos basados en restricciones o modelos estequiométricos y los modelos cinéticos (Varner & Ramkrishna, 1999).

En los modelos estequiométricos, el sistema metabólico se describe como un sistema lineal de ecuaciones e inecuaciones con los flujos metabólicos como variables (Maarleveld et al., 2013). Una de las principales desventajas de estos modelos es que son incapaces de predecir cuantitativamente en qué medida ciertas actividades enzimáticas se deben modificar para conseguir un efecto deseado, como un aumento en la tasa de producción específica de un producto.

En oposición, los modelos cinéticos incorporan la concentración y propiedades catalíticas de las enzimas y metabolitos involucrados, y así permiten predecir la evolución temporal de la concentración de sustratos, intermediarios y productos. Además, permiten realizar experimentos *in silico* para evaluar el desempeño del sistema biológico en estudio, tales como la concentración de ciertas enzimas y su impacto en la distribución de flujos de la vía. Es por ello que desarrollar un modelo cinético de la vía de biosíntesis de β -ionona es una estrategia prometedora para detectar las etapas limitantes e incrementar la eficiencia del proceso.

1.1.2 Hipótesis y Objetivos

En este trabajo proponemos que el desarrollo de un modelo cinético calibrado de la vía de biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae* permitirá la formulación de propuestas de ingeniería metabólica para la construcción de una plataforma optimizada para la bio-producción de β -ionona.

En concordancia con la hipótesis propuesta, el objetivo general de esta tesis consiste en desarrollar y calibrar un modelo dinámico de la biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae*. Este objetivo puede ser dividido en cuatro objetivos específicos:

1. Desarrollo: construir un modelo matemático que represente la biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae*.
2. Calibración: calibrar el modelo con el fin de minimizar la diferencia entre los valores predichos y las mediciones experimentales.
3. Análisis de Post-Regresión: realizar un diagnóstico de problemas paramétricos de sensibilidad, identificabilidad y significancia.
4. Análisis de Control Metabólico: identificar las etapas limitantes de la biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae*.

Esta tesis está dividida en tres capítulos:

- El capítulo 1, o introducción, se subdivide en tres secciones: la sección 1, que incluye la motivación y los objetivos de este trabajo; la sección 2, un análisis del Estado del Arte sobre β -ionona, sus aplicaciones y métodos actuales de síntesis; y la sección 3, en la cual se describe los antecedentes de modelamiento relacionados a esta tesis.
- El capítulo 2 presenta los resultados de este trabajo y su análisis. Se escribió como un artículo científico para ser enviado a una revista de corriente principal.
- Finalmente, en el capítulo 3 se resume las conclusiones y perspectivas futuras de esta tesis.

1.2 Estado del Arte

La industria biotecnológica está actualmente focalizada en desarrollar nuevas tecnologías para la construcción de factorías celulares eficientes y, por lo tanto, proveer una fuente sustentable de compuestos biológicos. Dentro de los trabajos realizados, destaca la búsqueda de estrategias para la optimización de plataformas de bioingeniería en levaduras, debido al amplio rango de compuestos naturales que pueden producir y sus implicancias económicas. Una de las familias de productos naturales con mayor espectro de aplicaciones industriales corresponde a los isoprenoides.

Los isoprenoides, también llamados terpenoides, son el grupo más amplio y diverso de compuestos naturales encontrados en la naturaleza (Wang et al., 2005). A la fecha, más de 70.000 compuestos han sido descubiertos (Trikkka et al., 2015) y esta cantidad aumenta cada año (Thulasiram, 2007). Cumplen numerosas funciones celulares, desde un rol estructural (ergosterol y colesterol en membranas celulares) hasta funcional (carotenoides en fotosíntesis, ubiquinonas en transferencia de electrones) (Goldstein & Brown, 1990; Oldfield & Lin, 2012). Los isoprenoides son metabolitos ubicuos que se encuentran en todos los organismos vivos, siendo especialmente abundantes en el reino vegetal. La estructura básica de esta familia de compuestos es la molécula isopreno (2-metil-1,3-butadieno), cuyas formas activas son el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Así, mediante reacciones sucesivas de condensación y otras modificaciones químicas como ciclaciones y oxidaciones, entre otras, se genera la enorme complejidad y diversidad de esta clase de compuestos orgánicos (Oldfield & Lin, 2012). En la actualidad, los terpenoides tienen atractivas aplicaciones comerciales como biocombustibles, antisépticos, saborizantes y aromas, y como agentes medicinales, entre otros, lo cual ha incrementado el interés por su producción comercial (Burt, 2004; Gershenzon & Dudareva, 2007; Kirby & Keasling, 2009).

En plantas y levaduras, la vía de síntesis de isoprenoides sigue la ruta del mevalonato (MVA). Sin embargo, existe otra ruta, la vía del metileritritol fosfato (MEP), que ha sido descrita en eubacterias y plastidios (Disch & Rohmer, 1998; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002). La vía del MVA (resumida en Miziorko, 2011), se inicia con la síntesis de acetoacetil-CoA mediante la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por acción de la enzima acetil-CoA transferasa. Luego, se forma 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por la condensación de acetoacetil-CoA con una tercera molécula de acetil-CoA. A continuación, la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) cataliza la reacción limitante en la vía del mevalonato que corresponde a la conversión de HMG-CoA a MVA mediante dos reacciones de reducción. Posteriormente, en la ruta de síntesis de IPP, la enzima mevalonato quinasa (ERG12) cataliza la fosforilación del MVA, formando MVA-5-fosfato (MVAP); el cual es fosforilado por la enzima fosfomevalonato quinasa (ERG8), generando MVA 5-pirofosfato (MVAPP). Finalmente, por acción de la pirofosfomevalonato decarboxilasa (MVD1), el MVAPP es convertido en IPP, el precursor universal de la biosíntesis de isoprenoides, a partir del cual se derivan las rutas de biosíntesis de esteroides y carotenoides en organismos carotenogénicos (Figura 1-1).

Los esteroides son biomoléculas esenciales que participan en la regulación de la fluidez y permeabilidad de la membrana, regulación de la actividad de enzimas unidas a membrana y la modulación de la tasa de crecimiento. Además, son precursores de moléculas bioactivas tales como: hormonas esteroidales en mamíferos, hormonas brasinoesteroides en plantas, y ecdiesteroides en insectos que regulan procesos del desarrollo (Lepesheva & Waterman, 2007). El ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) es el principal esteroide fúngico y su ruta biosintética ha sido caracterizada en diversos organismos, aunque los mecanismos de regulación de su biosíntesis aún no se han dilucidado completamente (Arthington-Skaggs et al., 1996).

Por otra parte, los carotenoides son pigmentos naturales de colores amarillo, naranja y rojo, producidos por una gran variedad de microorganismos y plantas. Son el grupo más

representativo de los tetraterpenos (C₄₀) y se clasifican como carotenos y xantófilas, donde los últimos presentan grupos funcionales oxigenados a diferencia de los primeros. Los carotenoides presentan diversas aplicaciones industriales como colorantes y, debido a sus diversas propiedades benéficas para la salud, son explotados en la industria de alimentos, nutracéutica y, más recientemente, en el mercado farmacológico. Entre ellos, destacan los apocarotenoides, una subclase de isoprenoides derivados de los carotenoides, altamente apreciados en la industria de colorantes, y de aromas y sabores, entre otros (Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007).

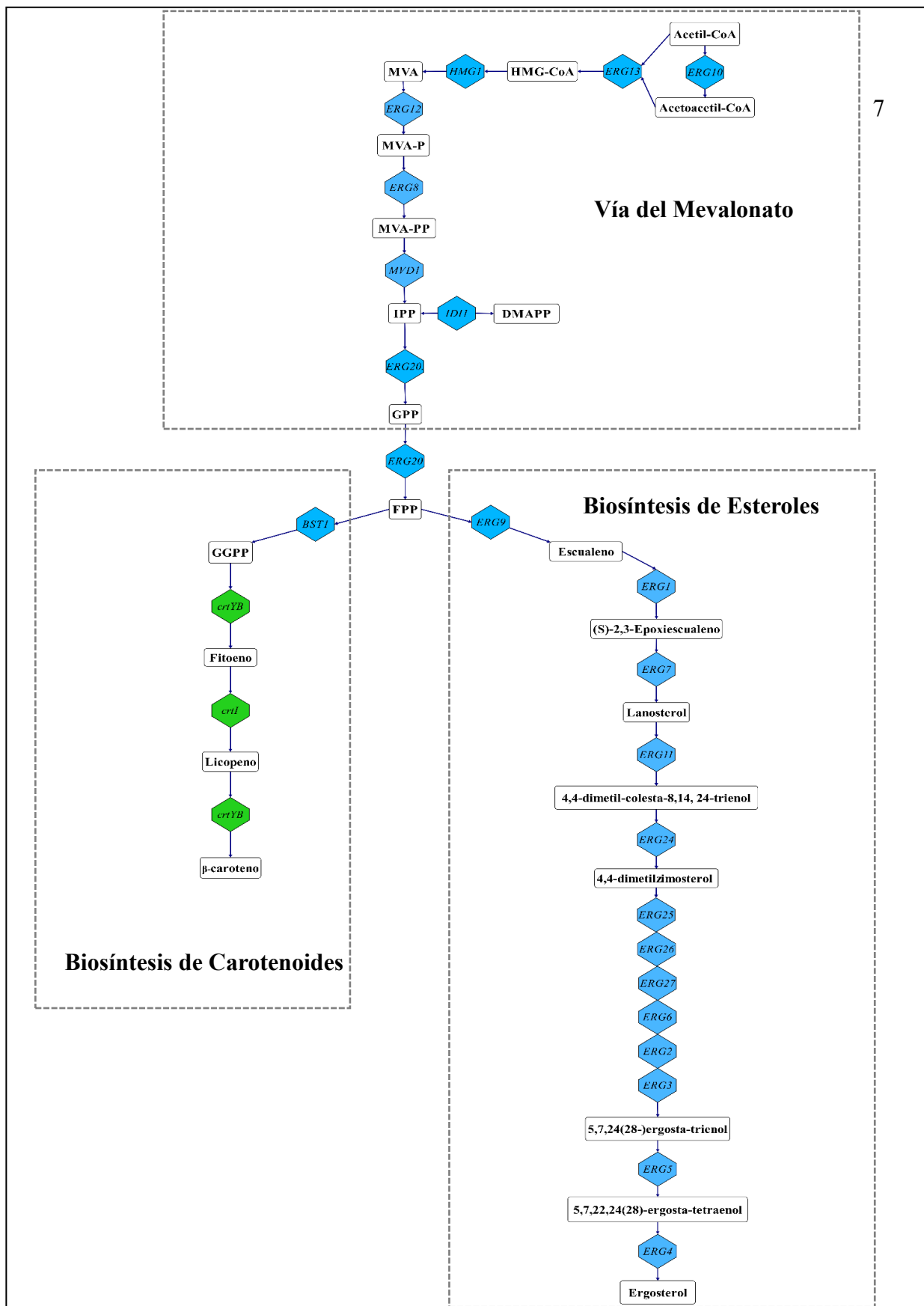


Figura 1-1. Vía del Mevalonato, biosíntesis de carotenoides y esteroides. Las flechas representan los pasos catalíticos de las rutas enzimáticas descritas. En hexágonos verdes se muestran los genes que codifican enzimas carotenogénicas. Abreviaturas: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), mevalonato (MVA), mevalonato-5-fosfato (MVA-P), mevalonato-5-pirofosfato (MVA-PP), isopentenil-pirofosfato (IPP), dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), geranil pirofosfato (GPP), farnesil-pirofosfato (FPP), geranilgeranil-pirofosfato (GGPP). Adaptado de Leiva et al., 2015.

1.2.1 Apocarotenoides, β -Ionona y aplicaciones

En plantas, los apocarotenoides son producidos mediante el clivaje de carotenoides por la acción de enzimas CCDs (dioxigenasas de clivaje de carotenoides), una familia de enzimas oxidativas que clivan de forma específica enlaces dobles (Auldridge et al., 2006). Están ampliamente distribuidos en frutos y vegetales, pero también tienen importantes funciones en vertebrados y microorganismos. Dentro de las muchas funciones que los apocarotenoides realizan *in vivo*, cabe destacar la atracción de polinizadores de plantas a través del aroma (por ejemplo: safranal, iononas, damasconas y damascenonas) y la coloración de las flores (por ejemplo: bixina y crocina), la regulación del crecimiento de brotes mediante hormonas vegetales (por ejemplo: ácido abscísico y estrigolactonas) y funciones fundamentales en la visión de mamíferos (retinal) (Bruno et al., 2015; Walter & Strack, 2011). Además, recientes estudios han demostrado propiedades anti-proliferativas, anti-metastásicas y de inducción de apoptosis para β -ionona y compuestos relacionados *in vitro* e *in vivo* (Ansari & Emami, 2016). Por último, pero no menos importante, el valor de mercado de estos productos, sintetizados naturalmente, oscila entre US\$100 y US\$10.000/kg, dependiendo de su disponibilidad.

Dentro de los apocarotenoides, la β -ionona es una molécula que se encuentra presente en diversos frutos y flores, como violetas, rosas y en la flor del olivo dulce, entre otros (Baldermann et al., 2012; Simkin et al., 2004). Es uno de los C13-apocarotenoides con mayor potencial en la industria de los aromas debido a su bajo umbral olfativo (7 ppt en agua) y atractivas propiedades sensoriales (Baldwin et al., 2000). Su aroma es descrito generalmente como frutal y tipo violeta (Burdock, 2009); es por ello que se utiliza ampliamente como fragancia para diversos productos de cuidado personal, como: perfumes, lociones corporales, productos capilares, entre otros (Lalko et al., 2007). Además, es extensamente utilizada en la industria de los alimentos como aromatizante, en productos como té o cerveza (Burdock, 2009); y es empleada como un intermediario para la síntesis química de β -caroteno, vitamina A y otros compuestos químicos

aromáticos. En cosméticos, la concentración usual de β -ionona está sobre 0,3% y en productos alimenticios la cantidad máxima oscila entre 0,5 y 10 ppm; mientras que la concentración final en productos de uso doméstico, generalmente es: 0,03% (jabón), 0,003% (detergente), 0,016% (cremas y lociones) y 0,3% (perfumes) (OECD SIDS, 2004).

Más aún, recientemente, la industria farmacéutica ha mostrado interés en la β -ionona, dado que se ha demostrado que su consumo brinda diversos beneficios para la salud. En efecto, estudios en modelos animales indican que la β -ionona presenta propiedades anticarcinógenas para cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, gástrico, osterosarcoma y hepatocarcinoma, entre otros (Asokkumar et al., 2012; Huang et al., 2012; Liu et al., 2008; Zhu et al., 2010). De esta forma, la β -ionona se ha convertido en un prometedor agente quimiopreventivo y quimioterapéutico, debido a su selectividad contra células tumorales y sus propiedades de inducción de apoptosis y anti-metástasis *in vitro* e *in vivo* (Ansari & Emami, 2016).

Finalmente, se ha descubierto que la β -ionona presenta una serie de propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, por lo que se está investigando como candidato para desarrollar un agente terapéutico contra estrés oxidativo e inflamación en enfermedades del sistema nervioso central, por ejemplo, para tratar la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple (Kang et al., 2013).

1.2.2 Síntesis de β -ionona

La extracción de β -ionona a partir de tejidos vegetales es un proceso costoso y complicado, debido a que este compuesto se encuentra en muy baja concentración en las plantas (del orden de ng/kg de peso fresco); además, su síntesis en plantas es altamente dependiente de las condiciones de cultivo y los factores ambientales (Cataldo et al., 2016). Sin embargo, en las últimas décadas, varios trabajos de investigación han permitido incrementar el rendimiento de compuestos naturales en plantas nativas y

cultivos de células vegetales (Chemler & Koffas, 2008; Wu & Chappell, 2008). Así por ejemplo, se ha logrado obtener plantas por ingeniería metabólica capaces de sobreproducir carotenoides (Giuliano et al., 2008) y aceites esenciales (Lange et al., 2011). Lamentablemente, aunque la mayoría de estas plantas sobreproduce terpenoides, otras características se ven afectadas negativamente, como la vitalidad y el crecimiento (Aharoni et al., 2005); y en el caso de los cultivos de células vegetales, éstos resultan poco atractivos debido a su lento crecimiento y baja producción de biomasa.

1.2.2.1 Síntesis química de β -ionona

Actualmente, la β -ionona es producida industrialmente mediante síntesis química a partir de citral y acetona (Chuit & Bachofen, 1902; Tiemann & Krüger, 1893; Tiemann, 1896). Este método, denominado síntesis de Tiemann, es realizado en dos pasos no enzimáticos. En primer lugar, la condensación aldólica de citral con acetona en condiciones alcalinas produce pseudoionona. Una fuente alternativa de pseudoionona es la reacción de Saucy-Marbet, en donde se mezcla (R/S)-dehidrolinalol y metil-isopropil éter en condiciones alcalinas suaves (Saucy & Marbet, 1967). Luego, la ciclación de pseudoionona en β -ionona es catalizada por ácidos inorgánicos (Hibbert & Cannon, 1924) (Figura 1-2). En la reacción de ciclación para la síntesis de β -ionona se producen otros isómeros (α -ionona y γ -ionona) y su abundancia depende del tipo y concentración de los ácidos empleados en el proceso. Así, el uso de ácido sulfúrico concentrado produce principalmente β -ionona, mientras que el de ácido fosfórico permite obtener preferencialmente α -ionona (Royals, 1946); y para obtener γ -ionona, se requiere un ácido de Lewis, como BF_3 (Ohloff & Schade, 1963). La pureza isomérica alcanzada en el proceso de ciclación catalizado por ácidos inorgánicos es mayor al 90% para α -ionona, 96% para β -ionona y 60% para γ -ionona (Cataldo et al., 2016).

A este nivel es necesario recalcar que en la actualidad existe una fuerte demanda de los consumidores por productos e ingredientes naturales en la industria de los alimentos. Esto también afecta a los aromas, donde los consumidores exigen cada vez más el

reemplazo de las sustancias sintéticas por compuestos naturales (Berger, 2009; Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007). De hecho, el valor comercial de β -ionona natural es 10-100 mayor que el valor de su contraparte sintética (Nacke et al., 2012).

Este fenómeno ha promovido la búsqueda de alternativas sustentables y naturales para la bio-producción de β -ionona. En este sentido, la catálisis enzimática y el diseño de factorías celulares por ingeniería metabólica emergen como atractivas opciones biotecnológicas para resolver esta problemática (Cataldo et al., 2016).

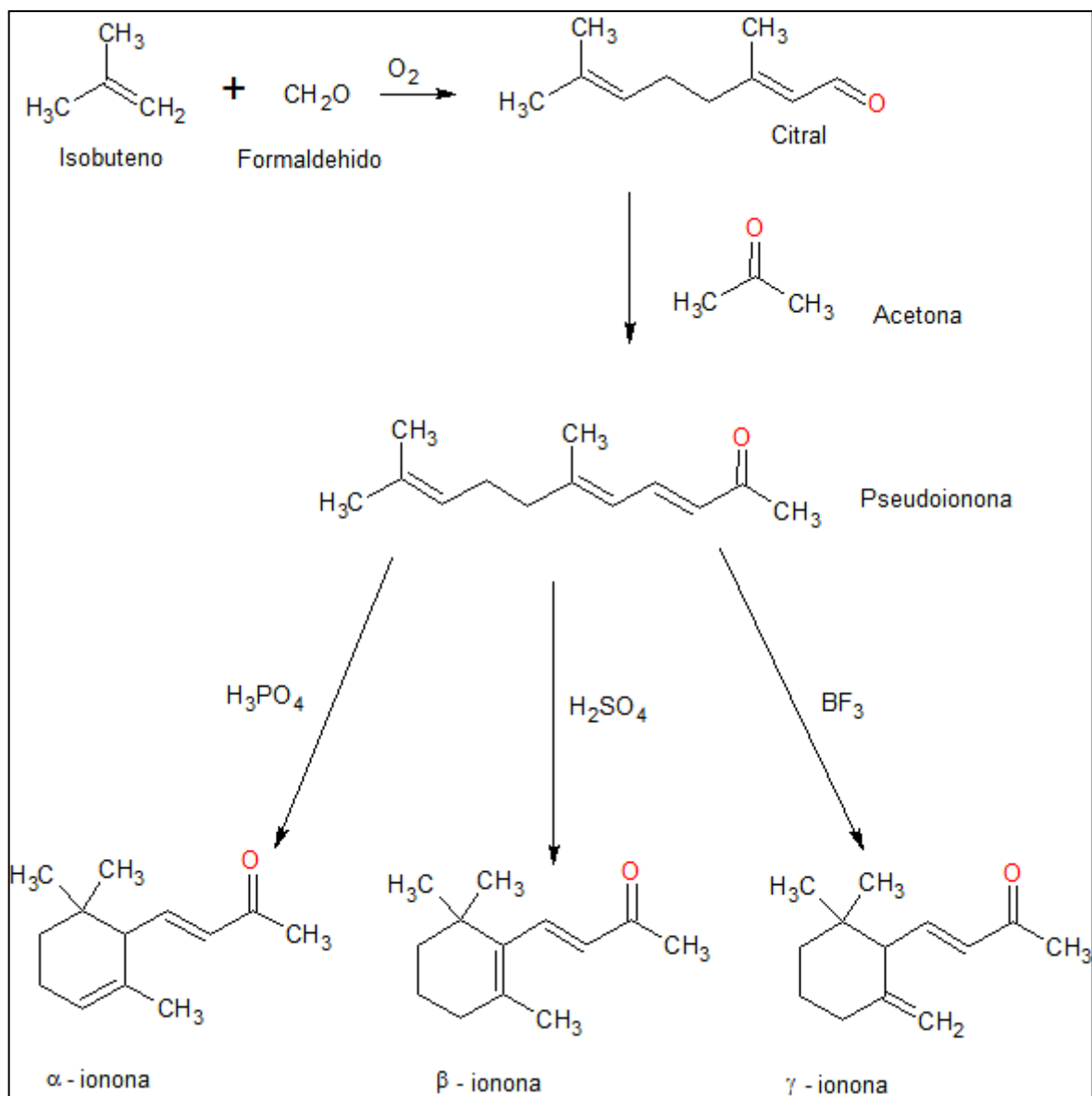


Figura 1-2. Síntesis química de Ionona. La condensación de citral y acetona produce pseudoionona. Luego, la ciclación de pseudoionona permite obtener α-ionona, β-ionona y γ-ionona (Adaptado de Cataldo et al., 2016).

1.2.2.2 Biocatálisis enzimática de β -ionona

En general, la biocatálisis es utilizada para transformaciones simples que requieren pocos pasos enzimáticos. Un ejemplo de esto es el clivaje oxidativo de β -caroteno *in vitro* para producir β -ionona por diferentes enzimas, como: CCDs, lipoxigenasas, xantina oxidasa, fenoloxidasas y peroxidasas (Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007). Las lipoxidasas (LOX) fueron las primeras enzimas descritas capaces de clivar oxidativamente carotenoides para obtener apocarotenoides (Belin et al., 1998). Las reacciones de co-oxidación catalizadas por LOX involucran la generación de radicales peroxilo lipídicos por oxidación de ácidos grasos insaturados y el clivaje oxidativo de carotenoides por los radicales libres. El clivaje de β -caroteno mediado por LOX es altamente inespecífico y genera diversos compuestos volátiles, tales como: β -ionona, β -ciclocitral y una gran variedad de compuestos no volátiles (Wu et al., 1999).

Por otro lado, Bosser & Belin (1994) describieron un método análogo para la co-oxidación del β -caroteno con aldehídos, usando xantina oxidasa (XO). En este caso, los radicales libres corresponden a especies reactivas de oxígeno (ROS). Mediante esta estrategia se obtienen varios compuestos volátiles, entre ellos: β -ionona, epoxi- β -ionona, β -ciclocitral y pseudoionona. Sin embargo, los métodos basados en XO presentan un inconveniente tecnológico por la baja solubilidad del sustrato (β -caroteno) en agua, mientras que las ROS generadas por XO son hidrofílicas y son inactivas en solventes orgánicos. Para mejorar la accesibilidad de las ROS a β -caroteno se han empleado diversos surfactantes que promueven la formación de micelas de β -caroteno dispersas en soluciones acuosas (Waché et al., 2006). Sin embargo, este método tiene bajo rendimiento debido a la degradación de β -ionona por ROS en el medio de reacción. Una mejora del proceso basado en enzimas XO fue el desarrollo de un sistema multifásico para recuperar la β -ionona del medio (Ly et al., 2008). En este sistema, se reduce la degradación del producto mediada por ROS y, por lo tanto, el rendimiento es significativamente mayor.

Otra alternativa para la formación de β -ionona mediante el clivaje enzimático de β -caroteno son las peroxidasas fúngicas. En específico, se ha demostrado que el líquido extracelular del hongo *Lepista irina* es capaz de degradar β -caroteno en varios compuestos volátiles, entre ellos: β -ionona, β -ciclocitral, dihidroactinidiolido y 2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexanona. La enzima clave que cataliza el clivaje oxidativo de β -caroteno fue identificada como una peroxidasa, convirtiéndose en la primera enzima microbiana capaz de degradar carotenoides caracterizada a nivel molecular (Zorn et al., 2003). Recientemente, otros estudios han descrito la formación de β -ionona y otros compuestos volátiles a través de la degradación de β -caroteno por MsP1 y MsP2, dos peroxidasas fúngicas derivadas del basidiomicete *Marasmius scorodonius* (Zelena et al., 2009). Sin embargo, ambas estrategias basadas en peroxidasas fúngicas tienen bajos rendimientos de β -ionona, por lo cual no son competitivas con el método de síntesis químico.

Por otro lado, el descubrimiento de las enzimas CCD ha abierto nuevas posibilidades para la síntesis específica de β -ionona a partir de carotenos. Dentro de esta familia destacan las enzimas CCD1, las que catalizan el clivaje oxidativo de β -caroteno en la posición 9-10 y en la posición 9'-10', lo que permite un rendimiento de dos moléculas de β -ionona por molécula de sustrato y la formación de C-14 aldehído como subproducto (Figura 1-3) (Schwartz et al., 2001; Vogel et al., 2008).

Además, diversos estudios han reportado la producción de β -ionona a partir de β -caroteno mediante las enzimas CCD4 y CCD7. Pero en ambos casos hay antecedentes de que el clivaje de β -caroteno es asimétrico (Auldrige et al., 2006; Bruno et al., 2015; Huang et al., 2009; Schwartz et al., 2004).

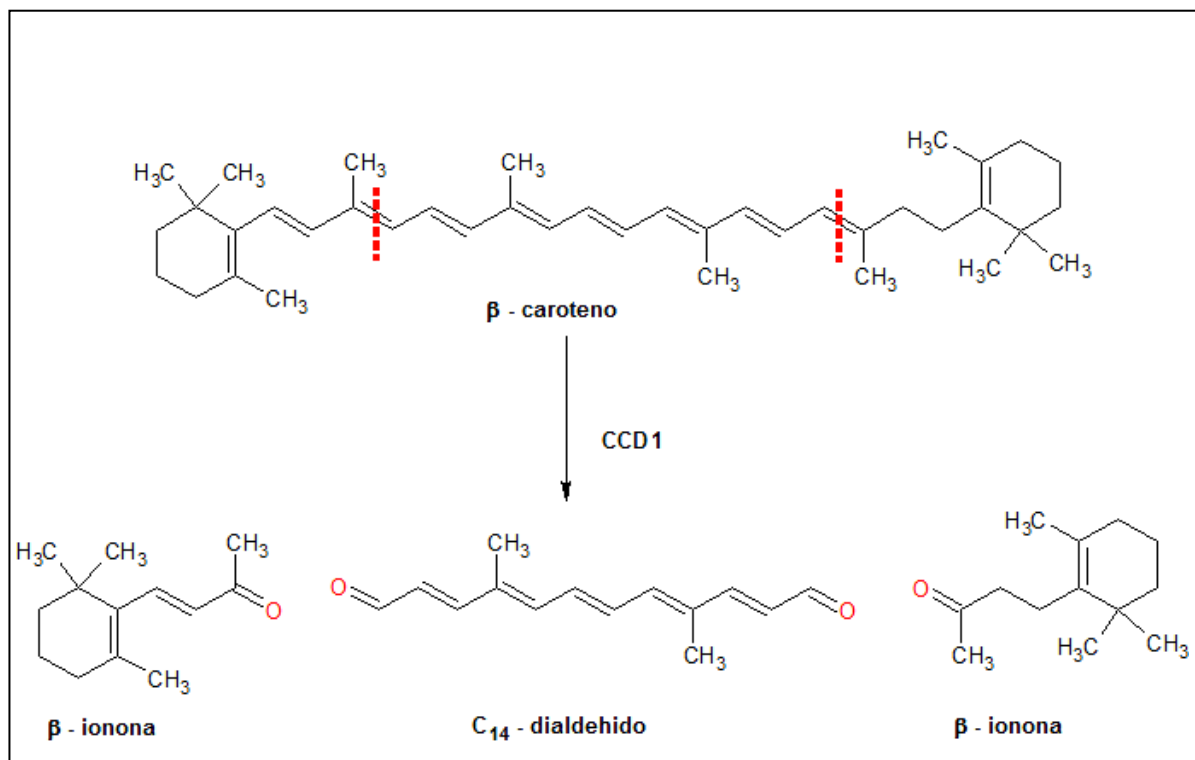


Figura 1-3. Esquema de clivaje simétrico de β -caroteno catalizado por la enzima CCD1. La reacción catalizada por CCD1 permite la formación de dos moléculas de β -ionona y un C_{14} -dialdehído. (Adaptado de Simkin et al., 2004).

Hasta la fecha, sólo se ha reportado el desarrollo de un sistema de biocatálisis para la síntesis de β -ionona mediada por enzimas CCD (Nacke et al., 2012). En este estudio, el clivaje enzimático de una preparación micelar de β -caroteno se llevó a cabo por un lisado celular de *E. coli* que expresa la enzima recombinante CCD1 de *Arabidopsis thaliana*. La reacción se produce en un reactor enzimático acoplado a un sistema de pervaporación organofílico, permitiendo la separación continua e *in situ* de β -ionona. A pesar de que este método alcanza un nivel de conversión de sustrato cercano al 60%, se requiere una mejora del proceso de solubilización del sustrato y estabilización enzimática para que esta plataforma de biocatálisis alcance rendimientos competitivos con la síntesis química.

1.2.2.3 Ingeniería metabólica para la síntesis *de novo* de β -ionona

Una alternativa diferente es la biocatálisis en factorías celulares, que se puede dividir en dos grupos: bioconversión y síntesis *de novo* por ingeniería metabólica. En cuanto a la primera opción, en diversos microorganismos, especialmente en hongos, se ha descrito la capacidad natural de bioconvertir carotenoides en C13-apocarotenoides, incluyendo β -ionona (Rodríguez-Bustamante & Sánchez, 2007). Dentro de las investigaciones realizadas destaca el trabajo de Zorn et al. (2003) donde se evaluó más de 50 cepas de levaduras y hongos filamentosos (conocidos por su capacidad de sintetizar o biotransformar mono-, sesqui-, tri-, o tetraterpenos) para detectar su capacidad de clivar β -caroteno en sustancias odorantes. Aunque la utilización de estos microorganismos para la síntesis natural de aromas derivados de carotenoides pareciera ser atractiva como aplicación industrial, la baja especificidad de las enzimas involucradas y el requerimiento de sustratos de elevado valor (carotenoides), hacen poco viable comercialmente esta alternativa.

La síntesis *de novo* a través de ingeniería metabólica es una estrategia con gran potencial, que contempla la incorporación de nuevas vías metabólicas y la optimización de vías ya existentes en microorganismos para permitir la síntesis de compuestos de interés a partir de intermediarios de las vías metabólicas endógenas. Varios trabajos han utilizado esta estrategia para la síntesis de aromas, entre los cuales debemos mencionar la clonación y expresión de enzimas CCD y genes de la vía de biosíntesis de carotenoides en cepas de *E. coli* (Schwartz et al., 2001; Vogel et al., 2008). De hecho, se han efectuado varios estudios exitosos que utilizan diferentes enzimas CCD derivadas de plantas para sintetizar β -ionona en *E. coli* y en líneas transgénicas de plantas (Rubio et al., 2008; Simkin et al., 2004). Por otro lado, también se han reportado diversos trabajos de ingeniería metabólica para obtener cepas de *S. cerevisiae* productoras de β -caroteno al incorporar genes de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Lange & Steinbüchel, 2011; Li et al., 2013; Maury et al., 2005; Verwaal et al., 2007). De acuerdo a estos antecedentes parece evidente la factibilidad de sintetizar β -ionona mediante ingeniería metabólica en *S. cerevisiae*.

De hecho, dos estudios recientes han reportado la síntesis *de novo* de β -ionona en *S. cerevisiae* (Figura 1-4). Beekwilder et al., 2014 empleó un sistema de expresión policistrónico de *crtYB/crtI/crtE*, correspondiente a los genes de la biosíntesis de β -caroteno de *X. dendrorhous*. Estas enzimas catalizan la síntesis de β -caroteno a partir de farnesil pirofosfato (FPP), un intermediario en la vía de biosíntesis de ergosterol en levaduras. La incorporación del gen CCD1 de frambuesa (*Rubus idaeus*) permitió la generación de la primera cepa de levadura productora de β -ionona a partir de glucosa, que alcanza un rendimiento de 0,22 mg β -ionona / g PSC a las 24 h de cultivo.

Por otro lado, López et al., 2015 construyó una plataforma alternativa para la síntesis de β -ionona a través del uso de constructos episomales e integrativos de la vía de síntesis de carotenoides de la levadura *X. dendrorhous*. Esta estrategia incluye la sobreexpresión de una versión truncada del gen *HMGI*, que codifica la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, que cataliza un paso enzimático clave de la vía del MVA. La síntesis de geranilgeranil pirofosfato (GGPP), precursor de la vía de síntesis de carotenoides, se logró gracias a la sobreexpresión del gen endógeno *BTS1*. Los genes *crtYB* y *crtI* promueven la transformación de GGPP en β -caroteno, mientras que la CCD1 de *Petunia hybrida* cataliza el clivaje oxidativo del β -caroteno obtenido a β -ionona. Además, todas las modificaciones fueron realizadas en una cepa de *S. cerevisiae* sobreproductora de FPP (Scalinati et al., 2012). El título alcanzado por esta cepa fue de 5 mg/L de β -ionona después de 50 h de fermentación batch en biorreactores de 1.5 L (1 mg de β -ionona / g PSC). A pesar de ser la concentración más alta de β -ionona obtenido por fermentación reportada hasta ahora, aún está lejos de la concentración requerida para competir con la síntesis química.

Así, a partir de los antecedentes anteriores se desprende que es necesario avanzar hacia sistemas de producción más eficientes de β -ionona, que cumplan con los requisitos de naturalidad y sustentabilidad que están exigiendo los consumidores. En ese sentido, la síntesis biotecnológica está posicionándose rápidamente como un método de alto potencial, pero requiere la optimización tanto de la vía de biosíntesis como del proceso

de fermentación, separación y purificación de β -ionona para generar una alternativa viable comercialmente. Es por ello que predecir el comportamiento de la plataforma de biosíntesis de β -ionona desarrollada por López et al., 2015 a través de modelos matemáticos - objeto de esta tesis - es una estrategia relevante para aumentar la eficiencia del proceso.

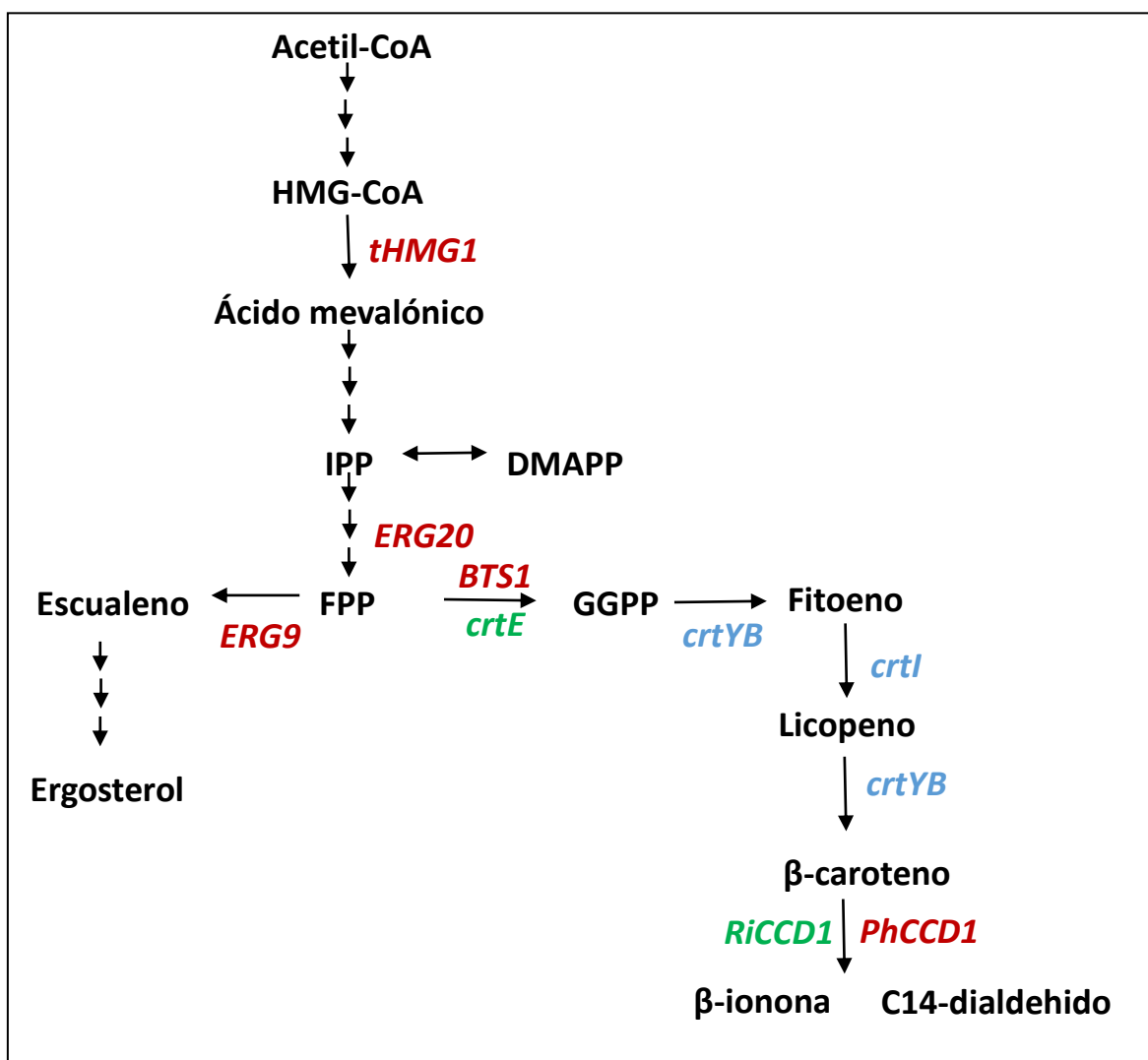


Figura 1-4. Vía de biosíntesis de β -ionona diseñada por ingeniería metabólica en *S. cerevisiae*. Se muestran los genes expresados en la estrategia de Beekwilder et al., 2014 (verde), López et al., 2015 (rojo) y los compartidos en ambas (azul).

1.3 Modelamiento

La industria biotecnológica ha realizado progresos considerables para la producción de compuestos químicos en los últimos 30 años, debido a la mejora de las tecnologías disponibles. En paralelo, se ha empleado modelación computacional para incrementar la tasa de éxito experimental, guiando el desarrollo de hipótesis y el diseño de nuevas pruebas experimentales. Existe gran variedad de enfoques que han sido utilizados para la formulación de modelos matemáticos de redes metabólicas, entre los cuales destacan los modelos cinéticos, cibernéticos, estocásticos, teoría de sistemas bioquímicos y modelos basados en restricciones (Reed & Palsson, 2003). Sin embargo, los trabajos en modelación metabólica se han focalizado predominantemente en modelos basados en restricciones - o modelos estequiométricos - y los modelos cinéticos (Varner & Ramkrishna, 1999).

En los modelos estequiométricos, el sistema metabólico se describe como un sistema lineal de ecuaciones e inecuaciones con los flujos metabólicos como variables (Maarleveld et al., 2013). Una de las principales desventajas de estos modelos es que no permiten predecir cuantitativamente en qué medida ciertas actividades enzimáticas se deben modificar para conseguir un efecto deseado, como un aumento en la tasa de producción específica de un producto. Esto se explica porque estos modelos no contienen información cinética y, por lo tanto, sólo son válidos para la condición de estado de equilibrio estacionario particular para los que fueron construidos. Esta limitación se ha superado parcialmente a través de modelos híbridos, que suelen incorporar restricciones adicionales, como la capacidad enzimática, información termodinámica asociada con la direccionalidad de las reacciones, y bucles bioquímicos (Price et al., 2003).

1.3.1 Modelos Cinéticos de Redes Metabólicas

Los modelos cinéticos describen cuantitativamente la dinámica de las concentraciones de metabolitos y de las velocidades de reacción de las rutas bioquímicas implicadas en la red. Estos modelos están basados en la estructura de la red, es decir, consideran la estequiometría de las reacciones y las cinéticas e información regulatoria; para este último punto, se incluye la expresión cinética correspondiente a cada reacción, teniendo en cuenta la presencia de inhibidores y activadores de las enzimas (Wiechert & Noack, 2011).

En los modelos cinéticos, los sistemas metabólicos se describen mediante sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias. Así, para cada metabolito se formula una ecuación diferencial que define su variación en el tiempo. Estas se construyen sumando los flujos que producen cada metabolito y restando los flujos que lo consumen sobre la base de la estequiometría de las reacciones definidas en la red metabólica. Así, en estos modelos, el flujo de una reacción es función de la concentración de aquellos metabolitos que participan o regulan la reacción. La función matemática, que expresa cómo depende el flujo de una reacción concreta de las concentraciones de metabolitos, se denomina ecuación cinética (Figura 1-5). En las reacciones enzimáticas, las ecuaciones cinéticas suelen reflejar la cantidad total de enzima, la afinidad de esta por los sustratos y su grado de inhibición o activación. De esta forma, la resolución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales permite predecir cómo evolucionan las concentraciones de metabolitos, y por extensión, los flujos (Foguet & Cascante, 2015).

Dada su estructura dinámica, los modelos cinéticos son ideales para estudiar cómo se distribuyen los flujos metabólicos en un sistema biológico a través del tiempo. Además, permiten realizar experimentos *in silico* donde es posible evaluar el efecto de modificaciones en los niveles de ciertos componentes de la red sobre la distribución de flujos metabólicos (Weaver et al., 2015).

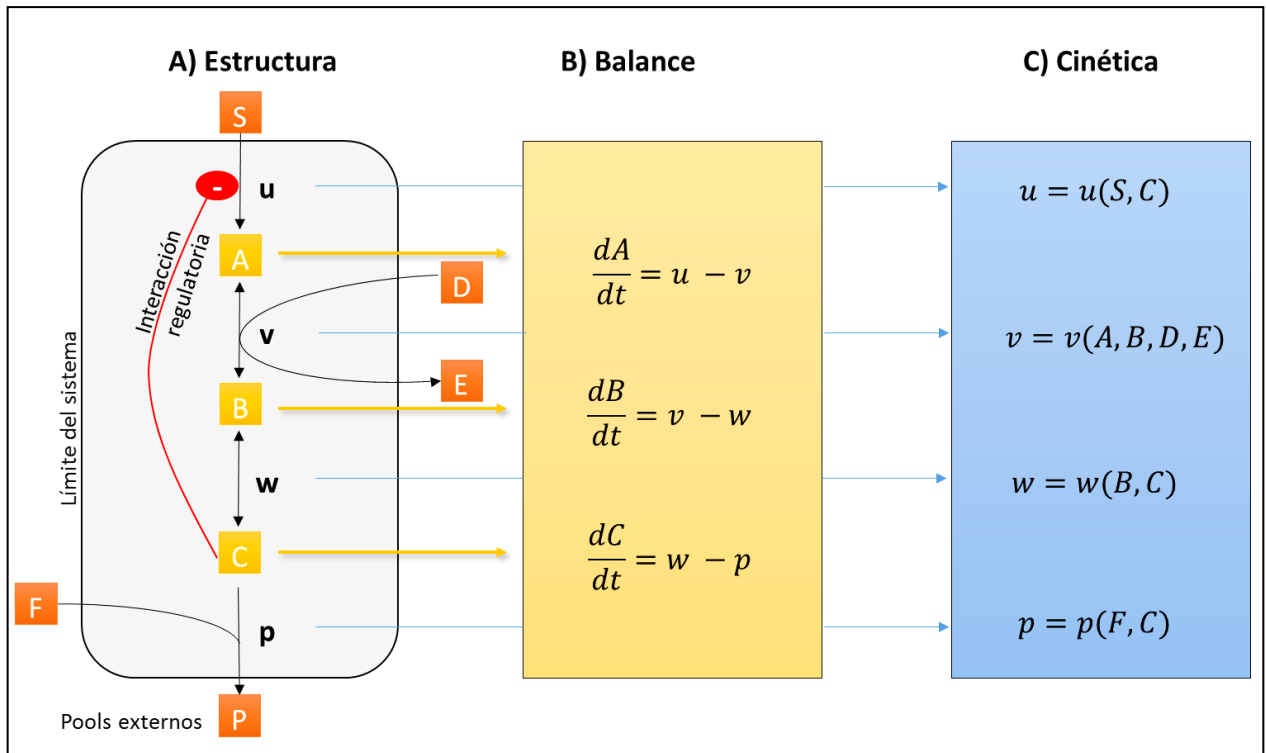


Figura 1-5. Principio general de modelamiento cinético. A) Representación esquemática de la estructura de la red con las interacciones regulatorias, B) Formulación matemática de las ecuaciones de balance para cada nodo interno, C) Términos de cinética de reacción asignados para cada paso enzimático. La dinámica de los nodos externos (pools de metabolitos externos a los límites del sistema) no se explica por el modelo, de esta forma, se mantienen en valores constantes o son controlados a nivel experimental. Adaptado de Wiechert & Noack, 2011.

Uno de los conceptos más relevantes en los modelos cinéticos es la cinética enzimática, que describe mediante una ley de velocidad matemática la dependencia de las velocidades de reacción a la concentración de los sustratos, productos y efectores en cada paso enzimático. Una ley de velocidad cinética enzimática es una función que depende de las concentraciones de los reactantes y los parámetros que especifican la rapidez de la reacción. Un ejemplo de esto es la ecuación de Michaelis - Menten reversible para el tercer paso enzimático de la vía ilustrada en la Figura 1-5.

$$v_w = \frac{\frac{V_f}{K_B} \cdot \left([B] - \frac{[C]}{K_{eq}} \right)}{1 + \frac{[B]}{K_B} + \frac{[C]}{K_C}} \quad (1)$$

Donde [B] y [C] corresponden a las concentraciones de los metabolitos B y C, V_f es la velocidad límite (actividad máxima) de la enzima w en la dirección directa de la reacción, K_{eq} es la constante de equilibrio de la reacción, y K_B y K_C son las constantes de Michaelis-Menten para B y C, respectivamente (Imperial & Centelles, 2014).

La cinética enzimática es un área muy amplia, por lo cual se han desarrollado diversas investigaciones con el fin de definir ecuaciones cinéticas que representen de forma exacta el comportamiento de las enzimas en los sistemas biológicos. Dentro de la literatura destacan los trabajos de Cornish-Bowden, 2004 y Segel, 1993 que resumen con gran detalle los avances en esta temática. Recientemente, sin embargo, el desarrollo de la biología computacional ha desplazado el énfasis desde los estudios de los mecanismos cinéticos de las enzimas hacia la cinética de enzimas para modelamiento (Rohwer, 2012). Esto significa que, en lugar de proporcionar información sobre el mecanismo enzimático en forma detallada, las leyes de velocidad deben capturar el detalle esencial de una reacción (incluyendo propiedades cinéticas y termodinámicas) para describir su comportamiento (en términos de sustrato, producto, y efectores) de manera adecuada en los modelos. Al mismo tiempo, algunos autores indican una nueva tendencia que promueve el uso de ecuaciones de velocidad genéricas (Liebermeister &

Klipp, 2006; Rohwer et al., 2006; 2007), las que pueden en algunos casos describir el comportamiento general de las reacciones con mayor precisión que las ecuaciones mecanísticas detalladas, pero con menor número de parámetros. Por ejemplo, para la segunda reacción de la Figura 5 ($A + D \rightleftharpoons B + E$), donde participa una enzima no-cooperativa que muestra una cinética normal hiperbólica tipo Michaelis-Menten, la ecuación de velocidad está dada por:

$$v_v = \frac{\frac{V_f}{K_A \cdot K_D} \cdot \left([A] \cdot [D] - \frac{[B] \cdot [E]}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{[B]}{K_B} + \frac{[A]}{K_A} \right) \cdot \left(1 + \frac{[D]}{K_D} + \frac{[E]}{K_E} \right)} \quad (2)$$

Donde V_f y K_{eq} fueron definidos anteriormente, $[A]$, $[B]$, $[D]$ y $[E]$ y K_A , K_B , K_D y K_E las concentraciones y las constantes de Michaelis-Menten para A, B, D y E, respectivamente.

En cambio, las ecuaciones mecanísticas para la misma reacción establecen diferentes leyes de velocidad, dependiendo del mecanismo enzimático (ordenado – aleatorio – ping-pong), y además contienen parámetros adicionales, tales como constantes de inhibición para los diferentes sustratos y productos (Rohwer, 2012). Por lo tanto, en la formulación de las ecuaciones de velocidad de un modelo cinético se deben considerar diferentes aspectos con el fin de obtener el modelo más representativo del sistema estudiado.

La simulación de vías metabólicas mediante modelos cinéticos ha crecido significativamente en las últimas dos décadas; de hecho, se han implementado modelos de vías metabólicas de varios organismos (Pfau et al., 2011; Schallau & Junker, 2010). Es importante destacar que los modelos construidos no sólo se limitan al metabolismo central, sino que se han extendido al metabolismo secundario, metabolismo de xenobióticos, así como a redes de regulación génica (Rohwer, 2012; Saa & Nielsen, 2016). La Tabla 1-1 presenta un resumen de los modelos cinéticos que han sido publicados recientemente, desde la última revisión realizada por Rios-Esteva & Lange, 2007.

Tabla 1-1. Revisión de Modelos cinéticos publicados recientemente.

Vía metabólica	Organismo	EDO	Referencia
Biosíntesis de xiamenmicina	<i>S. lividans</i> (bacteria)	86	(Xu et al., 2016)
Metabolismo de esfingolípidos	<i>S. cerevisiae</i> (levadura)	70	(Savoglidis et al., 2016)
Ciclo de metionina	<i>H. sapiens</i> (animal)	5	(Saa & Nielsen, 2016)
Biosíntesis de amorfadieno	<i>E. coli</i> (bacteria)	7	(Weaver et al., 2015)
Metabolismo Central *	<i>E. coli</i> (bacteria)	30	(Mannan et al., 2015)
Metabolismo de eritrocitos	<i>H. sapiens</i> (animal)	76	(Bordbar et al., 2015)
Metabolismo Central *	<i>E. coli</i> (bacteria)	93	(Khodayari et al., 2014)
Glicólisis	<i>S. cerevisiae</i> (levadura)	20	(Smallbone et al., 2013)
Metabolismo Central *	<i>E. coli</i> (bacteria)	90	(Chakrabarti et al., 2013)
Biosíntesis de etanol	<i>S. lycopersicum</i> (planta)	6	(Van de Poel et al., 2014)
Metabolismo de glucosa	<i>H. sapiens</i> (animal)	49	(König et al., 2012)
Biosíntesis de aceites esenciales	<i>M. piperita</i> (planta)	46	(Rios-Esteba et al., 2010)
Vía de compuestos benzenoides	<i>P. hybrida</i> (planta)	90	(Colón et al., 2010)
Metabolismo de ácidos grasos	<i>H. sapiens</i> (animal)	85	(Dean et al., 2010)
Metabolismo del aspartato	<i>A. thaliana</i> (planta)	7	(Curien et al., 2009)
Vía de flavonoides	<i>A. thaliana</i> (planta)	7	(Olsen et al., 2009)
Biosíntesis de aceites esenciales	<i>M. piperita</i> (planta)	26	(Rios-Esteba et al., 2008)

EDO: Número de ecuaciones diferenciales ordinarias empleadas en el modelo.

* Incluye: glicólisis/gluconeogénesis, vía de las pentosas fosfato, ciclo del TCA, metabolismo principal del piruvato y reacciones anapleróticas.

1.3.2 Formulación de Modelos Cinéticos

La construcción de un modelo cinético requiere cinco elementos clave: estequiometría, datos de cinética enzimática, datos termodinámicos, datos de actividad enzimática máxima y otros parámetros de modelación.

En primer lugar, la estequiometría define el número y la naturaleza de todos los reactantes y productos que participan en una reacción bioquímica específica; y describe como las reacciones están conectadas entre sí. Hoy en día, este punto no es difícil de abordar pues se ha podido caracterizar completamente el metabolismo y se encuentran disponibles redes metabólicas a escala genómica de un número creciente de organismos (Palsson, 2006).

Por su parte, los datos de cinética enzimática incluyen las leyes de velocidad de las enzimas y las constantes asociadas (Michaelis- Menten, inhibición, activación, y otras). La búsqueda de información a partir de literatura es una tarea ardua que requiere un esfuerzo y tiempo considerables. Sin embargo, en la actualidad existen bases de datos disponibles en internet como BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.org>; Schomburg et al., 2004) o SABIO-RK (<http://sabio.villa-bosch.de>; Krebs et al., 2007), entre otras que facilitan en gran medida este proceso. En el caso que los datos cinéticos para una enzima en particular de un determinado organismo no se encuentren disponibles, se debe recurrir a datos de especies cercanamente relacionadas.

Idealmente, los parámetros cinéticos deberían ser determinados en condiciones que asemejen la situación *in vivo*. Sin embargo, históricamente, los ensayos cinéticos no se han realizado de esta forma; de hecho, los mecanismos enzimáticos en general han sido investigados en condiciones óptimas de actividad enzimática en términos de pH y fuerza iónica, entre otros. Para facilitar la estandarización y la integración de los datos, Van Eunen et al. (2010) desarrolló un set de condiciones estándares para medir actividad enzimática y realizar ensayos cinéticos en levaduras. Para ello, se requirió la determinación del pH citosólico y las concentraciones de calcio, sodio, potasio, fósforo,

azufre, y magnesio. Esta información, en conjunto con datos de literatura, fue utilizada para formular una solución tampón (*buffer*) similar a las condiciones *in vivo*, experimentalmente factible (Rohwer, 2012). Además, bajo el auspicio del Instituto Beilstein en Alemania, se creó la Comisión STRENDa (<http://www.beilstein-institut.de/en/projects/strenda>) que promueve el desarrollo de una plataforma de búsqueda y almacenamiento de datos enzimáticos funcionales de libre acceso, en línea. Con este fin, la Comisión fomenta un sistema estandarizado de reporte de datos enzimáticos, que busca facilitar a la comunidad científica la interpretación, evaluación y reproducción de los análisis de enzimología.

En relación a los datos termodinámicos, cabe destacar que, en principio, todas las reacciones catalizadas por enzimas son reversibles, y el grado de reversibilidad debe ser explicitado adecuadamente en los modelos cinéticos. Afortunadamente, se han realizado grandes avances en términos de recolectar los datos de constantes de equilibrio (o de las constantes de energía libre de Gibbs estándar de las reacciones) en base de datos de termodinámica de reacciones catalizadas por enzimas (http://xpdn.nist.gov/enzyme_thermodynamics; Goldberg et al., 2004) y en el cálculo de los cambios de energía libre estándar para reacciones bioquímicas (Alberty, 2006).

En cuanto a los datos de actividad enzimática máxima, la velocidad máxima es incorporada en las leyes de velocidad de cinética enzimática directamente o como un producto de la concentración enzimática y la constante de velocidad catalítica (k_{cat}). Dado que la expresión de los genes (y, como consecuencia, el nivel de enzimas) depende de las condiciones fisiológicas, estos datos tienen que ser medidos directamente en la muestra biológica para la cual el modelo se va a construir, y rara vez son transferibles de un laboratorio a otro. Más aún, los niveles de actividad enzimática son tejido y organismo específicos (Rohwer, 2012). Cabe mencionar que, durante la última década, se ha desarrollado aplicaciones para medir múltiples actividades enzimáticas a gran escala con una plataforma robótica (Gibon et al., 2004), obteniéndose una correcta correlación ($R^2 = 0.592$) entre los niveles de proteína estimados a partir de las

actividades enzimáticas determinadas experimentalmente y los valores de k_{cat} publicados, por un lado; y los resultados de proteómica cuantitativa, utilizando el índice de abundancia de proteínas emPAI, por el otro (Piques et al., 2009). Por lo tanto, hoy en día es posible obtener experimentalmente estos datos en sistemas biológicos, aunque su desarrollo es de alto costo.

Finalmente, también se debe considerar otros parámetros de modelación, tales como la concentración de metabolitos externos - que son incorporados como parámetros fijos en el modelo - y la concentración inicial de todas las variables del modelo. Estos datos pueden ser obtenidos de experimentos de metabolómica, ensayos directos y, en algunos casos, a partir de la literatura.

Una vez que están disponibles todos estos datos, se puede construir el modelo cinético y luego integrar el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs) para obtener la evolución temporal de la concentración de los metabolitos en estudio.

A continuación, para evaluar la calidad del modelo, éste debe ser validado:

- En primer lugar, es necesario comprobar la consistencia interna del modelo; por ejemplo, asegurándose de que no hay reacciones que puedan generar un flujo de estado estacionario cuando los metabolitos externos no están presentes.
- Luego, los resultados de la simulación deben ser comparados con un set de datos independiente de los que fueron usados para la construcción del modelo. Por ejemplo, los datos de validación pueden incluir mediciones de flujos o concentraciones de metabolitos en una muestra biológica del organismo en estudio, bajo un estado fisiológico diferente.

Esta estrategia para la construcción de modelos, denominada *bottom-up*, no es siempre factible, debido a que la cantidad de datos disponibles puede ser insuficiente para determinar todos los parámetros del modelo (Rohwer, 2012). En ese caso, los

parámetros del modelo pueden ser estimados mediante una aproximación *top-down*, en la cual se ajustan estos valores iterativamente en una rutina de optimización hasta que los resultados de simulación (flujos o concentraciones) coinciden con los valores determinados experimentalmente, usando una métrica particular (Ashyraliyev et al., 2009; Cedersund & Roll, 2009).

1.3.3 Estimación de Parámetros

El problema de optimización para la calibración del modelo cinético está dado por:

$$\frac{d\mathbf{x}}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{x}, \mathbf{u}, \boldsymbol{\theta}, t); \quad (3)$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{g}(\mathbf{x}, \mathbf{u}, \boldsymbol{\theta}, t) \quad (4)$$

Donde $\mathbf{x} \in X \subset R^{n_x}$ son las n_x variables de estado

$\mathbf{y} \in Y \subset R^{n_{obs} \times n_s}$ son las n_{obs} variables observadas con n_s mediciones cada una

$\mathbf{u} \in U \subset R^{n_u}$ son las n_u variables de entrada

$\boldsymbol{\theta} \in U \subset R^{n_\theta}$ son los n_θ parámetros a estimar

El valor de las variables de salida del modelo para un vector de parámetros específico $\hat{\boldsymbol{\theta}}$ que se obtiene por integración numérica de la ecuación (3) considerando la función de las variables observadas de la ecuación (4), es denotado por:

$$y_{ij} = g_{ij}(x, u, \hat{\boldsymbol{\theta}}, t) \quad (5)$$

Donde el subíndice i indica el número de experimentos realizados y el subíndice j el número de mediciones para cada variable en cada experimento.

Por su parte, el vector de discrepancias entre los valores del modelo y los datos experimentales está dado por:

$$e(\hat{\boldsymbol{\theta}}) = |y_{ij}(\hat{\boldsymbol{\theta}}) - \tilde{y}_{ij}| \quad (6)$$

Para resolver el problema, se asume que la ecuación (3) es una descripción matemática suficientemente precisa del fenómeno biológico, lo que implica que todo el

conocimiento bioquímico acerca del proceso está incorporado de forma adecuada en la función vectorial $\mathbf{f}$. Por lo tanto, la única incertidumbre de la ecuación (3) es el vector de parámetros desconocidos θ (Rohwer, 2012).

En la mayoría de los casos, la métrica empleada para resolver los problemas de optimización está dada por la siguiente función objetivo o función de costo:

$$J(\theta) = \sum_{i=1}^{n_{\text{exp}}} \sum_{j=1}^{n_{\text{obs},i}} (\mathbf{y}_{ij}(\theta) - \mathbf{y}_{ij})^T \mathbf{Q}_{ij} (\mathbf{y}_{ij}(\theta) - \mathbf{y}_{ij}) \quad (7)$$

Donde $n_{\text{obs},i}$ es el número de variables observadas en el experimento i

n_{exp} es el número de experimentos

$n_{\text{si}j}$ es el número de mediciones de cada variable en cada experimento

$\mathbf{y}_{ij} \in \mathcal{Y} \subset \mathbb{R}^{n_{\text{si}j}}$ son los vectores de mediciones de cada variable en cada experimento

$\mathbf{y}_{ij} \in \mathcal{Y} \subset \mathbb{R}^{n_{\text{si}j}}$ son las predicciones correspondientes del modelo

$\mathbf{Q}_{ij} \in \Omega \subset \mathbb{R}^{n_{\text{si}j} \times n_{\text{si}j}}$ es la matriz de pesos, simétrica y semi-definida no - negativa

Métodos de Optimización

Para encontrar el mínimo de la función objetivo se pueden emplear métodos de optimización local, global o híbridos. Los métodos de búsqueda local generalmente convergen de forma rápida a un mínimo; pero, como su nombre sugiere, este resultado podría ser un mínimo local y, lamentablemente, estos métodos no poseen una forma para escapar de esta solución y encontrar el mínimo verdadero o global. Por otro lado, estos métodos entregan la mejor solución posible en las inmediaciones del punto inicial, por lo que tienen una fuerte dependencia del punto de arranque del algoritmo. En cambio, las técnicas de optimización global son independientes de la naturaleza del espacio de soluciones y, a diferencia de las técnicas de búsqueda local, son capaces de atravesar un espacio de búsqueda con múltiples mínimos o máximos locales, y alcanzar una solución global al problema, entendiendo como tal la mejor solución posible o una solución en las inmediaciones de la región que contiene a la solución óptima.

Optimización global

Los métodos de optimización global (GO) pueden ser clasificados como estrategias determinísticas (Esposito & Floudas, 2000; Fogel et al., 1997; Grossmann, 1996; Reiner & Tuy, 1990) o estocásticas (Ali et al., 1997; Boender & Romeijn, 1995; Törn et al., 1999). Los métodos estocásticos de optimización global se basan en aproximaciones probabilísticas. Dado que emplean elementos aleatorios, estos métodos tienen un débil sustento teórico de convergencia a la solución global. En cambio, los métodos determinísticos se caracterizan porque pueden entregar un nivel de seguridad que el óptimo global será localizado. Sin embargo, cabe señalar que, si bien los métodos determinísticos pueden garantizar el óptimo global para ciertos problemas GO, ningún algoritmo puede resolver los problemas generales GO con certeza absoluta en tiempo finito (Boender & Romeijn, 1995). De hecho, pese a que varios métodos determinísticos (por ejemplo, el algoritmo de ramificación y acotación) tienen propiedades de convergencia teóricas sólidas, los esfuerzos computacionales asociados se incrementan muy rápidamente (a menudo de forma exponencial) con el tamaño del problema. En contraste, la mayoría de los métodos estocásticos puede localizar con relativa eficiencia la vecindad de la solución global, pero con el costo de que la optimalidad global no puede ser garantizada. Pese a lo anterior, en la práctica, los resultados obtenidos con estos métodos son satisfactorios y requieren un tiempo computacional acotado. Además, los métodos estocásticos son, en general, más simples de implementar y usar, y no requieren la transformación del problema original, que puede ser tratado como una caja negra (Moles et al., 2003).

Existen diferentes métodos estocásticos para optimización global, entre los cuales los más destacados son los siguientes: métodos estocásticos adaptativos, métodos de *clustering*, algoritmos evolutivos o *simulated annealing*, entre otros métodos metaheurísticos, tales como Taboo Search (TS), Optimización de colonia de hormigas (ACO) y métodos de enjambre de partículas. Dentro de ellos destacan los algoritmos evolutivos (AE), también conocidos como métodos estocásticos basados en poblaciones. Estos métodos están inspirados en la evolución biológica (Fogel, 2005). Las soluciones

potenciales (vectores de parámetros) corresponden a los individuos de una población. Para obtener nuevas soluciones (una nueva generación), los individuos en la población son sustituidos usando los mecanismos que impulsan la evolución biológica: reproducción, selección natural, mutación, recombinación y sobrevivencia del más apto (Darwin, 1859). Estos métodos se caracterizan porque, en general, presentan un buen desempeño para todo tipo de problemas y son adecuados para solucionar problemas con un amplio espacio de búsqueda. Los factores críticos para escapar de óptimos locales y para la rapidez de la convergencia son los operadores de recombinación y selección, respectivamente.

Por su parte, los algoritmos evolutivos usualmente se clasifican en tres grupos: Algoritmos Genéticos (AG; Goldberg, 1989; Holland, 1992; Michalewicz, 1996), Programación evolutiva (EP; Fogel et al., 1966), y Estrategias de Evolución (ES; Beyer & Schwefel, 2002; Schwefel, 1995). Diversos estudios sobre métodos estocásticos indican que las estrategias de evolución modernas presentan varias ventajas sobre los algoritmos genéticos y el *Simulated annealing*, principalmente mejor ratio eficiencia/robustez, escalabilidad, inherente naturaleza paralela y mecanismo de *self-tuning* para la búsqueda de parámetros (Rodríguez-Fernandez et al., 2006). Los resultados obtenidos indican que los algoritmos estocásticos DE (Evolución diferencial; Storn & Price, 1997) y SRES (Estrategia evolutiva de ranking estocástico; Runarsson & Yao, 2000) son los más competitivos. Sin embargo, el principal problema que presentan estos métodos es que requieren demasiadas evaluaciones de la función objetivo (Moles et al., 2003).

Optimización local

Los métodos locales pueden ser clasificados en métodos de búsqueda directa (Hooke & Jeeves, 1961; Lagarias et al., 1998; Nelder & Mead, 1965), métodos basados en gradientes (Conn et al., 2000) y métodos basados en gradientes para problemas de mínimos cuadrados (Bus et al., 1975; Madsen et al., 2004). El término métodos de búsqueda directa se emplea generalmente para describir a todos los métodos que

encuentran un mínimo local sin el uso de derivadas. Los métodos de búsqueda directa seleccionan un número finito de posibilidades en cada paso y chequean si alguna de estas es mejor que la solución actual. Dentro de esta categoría los métodos más usados son el método de Hooke–Jeeves y el método Simplex de Nelder–Mead.

A diferencia de los métodos descritos anteriormente, los métodos basados en gradientes no sólo requieren el valor de la función objetivo, sino que también el valor de su primera derivada respecto a los parámetros. Estos métodos no son tan sencillos de implementar como los métodos de búsqueda directa, pero en general su uso es preferible. Dentro de ellos, los algoritmos fundamentales son los de pendiente máxima (Steepest descent), el método de Newton y el método de la región de confianza (Trust region method).

Por otro lado, si la función a minimizar es una suma de cuadrados (como en el caso de resolver un problema de mínimo cuadrados), el método de Newton es frecuentemente reemplazado por el algoritmo de Gauss-Newton, en el cual el hessiano no es empleado. Otro método para resolver este tipo de problemas es el método de Levenberg-Marquart, que puede ser descrito como una combinación del método Gauss-Newton y el método de pendiente máxima.

En general, los métodos de búsqueda directa son aplicables, pero son menos eficientes, especialmente para problemas de alta dimensionalidad. Si es posible (es decir, si el problema es suave), se recomienda usar el método de Newton o el de región de confianza y, para un ajuste de mínimos cuadrados, el método de Levenberg-Marquardt. Pero si la función objetivo es discontinua o tiene una derivada discontinua (por ejemplo, porque el modelo matemático contiene funciones escalonadas, valores absolutos, etc.) los métodos basados en gradiente no pueden aplicarse. El método de Hooke-Jeeves o, en general, los métodos de búsqueda directa son confiables pero lentos. El método simplex de Nelder-Mead es, en la mayoría de los casos, eficiente, pero puede fallar impredeciblemente (Ashyraliyev et al., 2009).

En conclusión, los métodos de optimización global exploran de forma exhaustiva el espacio de soluciones, pero sin aprovechar las características del espacio de búsqueda como ocurre al operar por ejemplo con gradientes en los métodos de búsqueda local, ralentizando así la convergencia. En cambio, los métodos locales son mucho más rápidos en encontrar el mínimo en las inmediaciones de la región que rodea a la solución óptima. De esta forma, la aplicación secuencial de ambas aproximaciones podría ser una estrategia para combinar lo mejor de cada una de ellas.

Métodos híbridos

Los métodos híbridos usan un método de búsqueda global para identificar regiones prometedoras del espacio de búsqueda que son luego exploradas por un optimizador local. En este sentido, Rodríguez-Fernandez et al., 2006 desarrollaron una estrategia que combina optimización global y local en un método híbrido con el fin de aumentar la velocidad de los métodos de optimización global estocásticos y, simultáneamente, mantener su robustez. Este método es una nueva aproximación metaheurística basada en búsqueda dispersa combinada con varios métodos de búsqueda local. Otra ventaja de este método es que elimina la delicada tarea de decidir dónde establecer el punto de cambio desde el método global al local.

La búsqueda dispersa (denominada en inglés Scatter Search y abreviada como SS) es un método basado en poblaciones que fue introducido por Glover, 1977 como un heurístico para programación entera, pero desde entonces se ha extendido a otro tipo de problemas (Laguna & Marti, 2003; 2005). Neumaier et al., 2005 compararon recientemente diferentes optimizadores de métodos de búsqueda global sobre un set de 1000 problemas GO con restricciones, obtenidos de literatura. Los autores concluyeron que el mejor método estocástico es SS y, además, es el mejor método para resolver problemas de caja negra. Por otro lado, para problemas con un gran número de variables de decisión, este optimizador también ha probado ser el más confiable (Rodríguez-Fernández, Egea et al., 2006).

La búsqueda dispersa, cuando la búsqueda local es activada, puede ser definida como un método híbrido que combina búsqueda global con una fase de intensificación (búsqueda local). Este algoritmo usa diferentes heurísticas para seleccionar eficientemente puntos iniciales convenientes para la búsqueda local, basado en filtros de distancia, calidad y términos de memoria. Esto permite que el usuario no tenga que preocuparse de detener la búsqueda global e iniciar el solucionador local, ya que el algoritmo lleva a cabo este proceso automáticamente. Finalmente, cabe mencionar que el procedimiento de búsqueda dispersa trabaja sobre un conjunto pequeño de soluciones, denominado conjunto de referencia, combinando sus soluciones para crear otras nuevas. A continuación se describe los cinco elementos esenciales del método, así como el funcionamiento de estos elementos dentro del esquema básico de SS, de acuerdo a Casado & Martí, 2007 (Figura 1-6):

1. **Método generador de soluciones diversas.** Este método genera un conjunto de soluciones diversas que, en principio, no tienen que ser necesariamente factibles.
2. **Método de mejora de soluciones.** Esta herramienta se emplea para obtener soluciones de mayor calidad que las de partida, aunque, en el caso que aparezcan soluciones no factibles, su función consistirá primeramente en obtener una solución factible y luego intentar mejorarla. Se aplica tanto al conjunto de soluciones diversas como a aquellas soluciones que se obtienen tras la aplicación del método de combinación a las del conjunto de referencia. Habitualmente, como método de mejora, se usa un procedimiento de búsqueda local.
3. **Método de actualización del Conjunto de referencia (Refset).** De entre el conjunto de soluciones diversas generado con el método anterior y una vez aplicado el método de mejora, se selecciona el conjunto de referencia, formado por un número pequeño de soluciones, b (alrededor de $b=10$).
4. **Método generador de subconjuntos.** A través de este método se generan subconjuntos de soluciones del conjunto de referencia. Las soluciones de cada uno de estos subconjuntos se combinarán entre sí posteriormente.

- 5. Método de combinación.** Con este método se combinan entre sí las soluciones de cada subconjunto obtenido con el método generador de subconjuntos ya descrito.

El algoritmo de SS diseñado por Rodríguez-Fernández et al. (2006) presenta además algunas herramientas útiles para incrementar su rendimiento en la resolución de problemas de estimación de parámetros. Dentro de ellas, cabe destacar:

- Distribución logarítmica para generar soluciones de prueba iniciales.
- Mecanismos para impedir las zonas planas y escapar de las soluciones locales.
- Método de combinación de soluciones para explorar en mayor profundidad el espacio solución.
- Además, cuando todas las combinaciones de soluciones elite han sido hechas, el algoritmo puede detenerse o continuar mediante la regeneración del set de soluciones elite con un método basado en direcciones de búsqueda ortogonal.
- Por último, se pueden emplear varios optimizadores locales, tales como: fmincon (The MathWorks Inc.), SOLNP (Ye, 1987), SNOPT (Gill et al., 2002), y métodos directos, como Nomad (Abramson, 2002) y otros optimizadores especialmente diseñados para los problemas de estimación de parámetros como N2FB/DN2FB (Dennis et al., 1993).

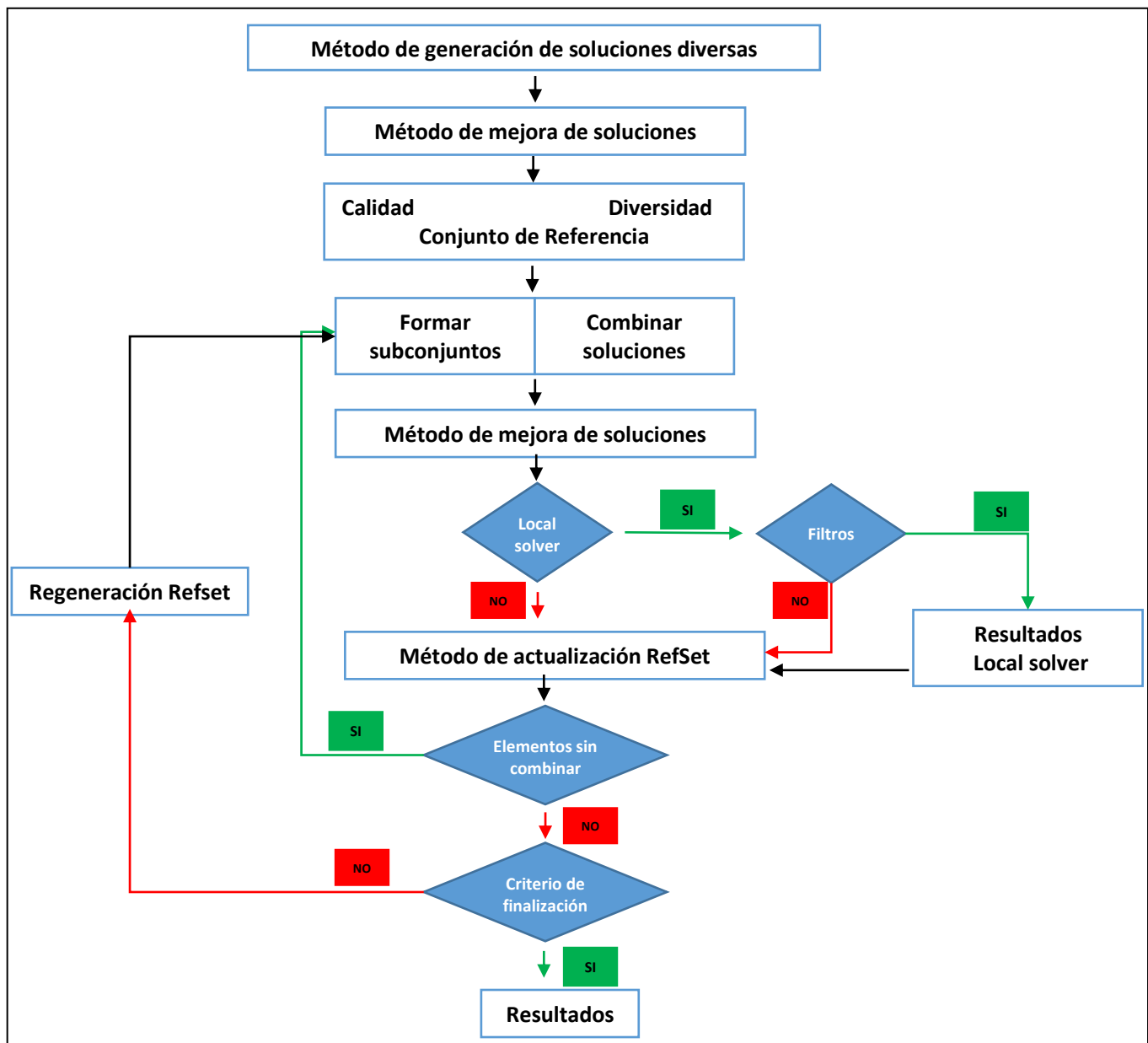


Figura 1-6. Diagrama del algoritmo de búsqueda dispersa. Adaptado de Rodríguez-Fernández et al., 2006.

1.3.4 Análisis de pre/post-Regresión

Los modelos cinéticos con ecuaciones de velocidad no lineales tienen, en general, múltiples conjuntos de parámetros que cumplen los criterios de minimización, siendo algunos sólo óptimos locales. Más aún, luego de obtener una parametrización aceptable del modelo mediante un procedimiento de estimación de parámetros, esto no significa que todos los parámetros obtenidos sean confiables. En efecto, es necesario efectuar un análisis de regresión *a posteriori* para evaluar que tan bien ha sido determinado el vector de parámetros a partir de un set de datos experimentales, posiblemente limitado y ruidoso (Ashyraliyev et al., 2009). Sin embargo, hay algunos autores que señalan que, muchas veces, no se requiere obtener el valor preciso de un parámetro para establecer conclusiones biológicas (Ashyraliyev et al., 2008).

Los procedimientos necesarios para probar la calidad de la estimación de parámetros, llamados diagnósticos de pre/post-regresión, abarcan varios métodos:

Sensibilidad paramétrica:

El análisis de sensibilidad de los parámetros define en qué medida las variables de estado del modelo son afectadas por las variaciones en los valores de los parámetros. Los coeficientes de sensibilidad paramétrica y los coeficientes de sensibilidad normalizados se definen, respectivamente como:

$$G_{ij} = \frac{\partial x_i}{\partial \theta_j} \quad (8)$$

$$\bar{G}_{ij} = \frac{\theta_j}{x_i} \frac{\partial x_i}{\partial \theta_j} \quad (9)$$

Donde $\mathbf{x} = [x_1, x_2, \dots, x_n]$ son las variables de estado

$\boldsymbol{\theta} = [\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_m]$ son los parámetros del modelo

Los parámetros no sensibles son aquellos que no influyen en las variables de estado. En los modelos dinámicos, la sensibilidad varía con el tiempo y por lo tanto los parámetros pueden ser no sensibles en ciertos intervalos de tiempo y sensibles en otros.

Significancia paramétrica:

El análisis de significancia permite determinar la confiabilidad de la estimación de los parámetros (intervalo de confianza). Para ello se calcula una aproximación de la matriz de covarianza como (Dochain & Vanrolleghem, 2001; Goodwin & Payne, 1977; Munack, 2001; Petersen, 2000):

$$C_j(\theta) = \frac{J(\theta)}{N-n_\theta} \left[\sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial y_i}{\partial \theta}(\theta) \right)^T Q^{-1} \left(\frac{\partial y_i}{\partial \theta}(\theta) \right) \right] \quad (10)$$

Donde $\frac{J(\theta)}{N-n_\theta}$ corresponde a una aproximación no sesgada de la varianza residual σ^2
 $\left(\frac{\partial y_i}{\partial \theta}(\theta) \right)$ corresponde a las funciones de sensibilidad para los parámetros evaluados.
 Q corresponde a la matriz de covarianza de error de las mediciones

Bajo el supuesto que el ruido de las mediciones tiene distribución gausseana con media igual a cero y no es correlacionado (la matriz de covarianza de error de mediciones es una matriz diagonal), la aproximación de la matriz de covarianza de la ecuación (10) equivale a la inversa de la matriz de información de Fisher (FIM) (Dochain & Vanrolleghem, 2001; Munack, 2001; Petersen, 2000), que es definida como:

$$FIM(\theta) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial y_i}{\partial \theta}(\theta) \right)^T Q^{-2} \left(\frac{\partial y_i}{\partial \theta}(\theta) \right) \quad (11)$$

Por lo tanto, FIM es una aproximación a la inversa de la matriz de covarianza del error de estimación de los parámetros, y a partir de ello se obtiene una aproximación de los elipsoides de confianza:

$$\left\{ \theta : (\theta - \hat{\theta})^T C_j^{-1} (\theta - \hat{\theta})^T \leq n_{\theta} F_{n_{\theta}, N-n_{\theta}}^{1-\alpha} \right\} \quad (12)$$

Por ende, los intervalos de confianza de los parámetros $\delta_i | i=1, \dots, n_{\theta}$ son obtenidos de la siguiente forma:

$$\delta_i = \pm t_{N-n_{\theta}}^{1-(\alpha/2)} \sqrt{C_{ii}} \quad (13)$$

Donde C_{ii} puede ser aproximado como C_j y $t_{N-n_{\theta}}^{1-(\alpha/2)}$ es la distribución t de *Student* de dos colas para el nivel de confianza α y los grados de libertad $N-n_{\theta}$.

Identificabilidad paramétrica:

En el análisis de identificabilidad se calcula la matriz de correlación de los parámetros del modelo para lograr determinar si los parámetros ajustados son localmente identificables para un intervalo de tiempo dado. La matriz de correlación, cuyos elementos son los coeficientes de correlación aproximada entre los parámetros i y j , está definida por:

$$R_{ij} = \frac{C_{ij}}{\sqrt{C_{ii}C_{jj}}} , \quad i \neq j \quad (14)$$

$$R_{ij} = 1 , \quad i = j \quad (15)$$

En general, coeficientes de correlación (R_{ij}) mayores a 0,95 indican una alta correlación. En estos casos los parámetros no pueden ser determinados de manera única al ajustar el modelo con los datos experimentales.

Luego, si los diagnósticos de post-regresión no son satisfactorios, el modelo tiene que ser modificado y/o los datos experimentales deben repetirse o complementarse con

nuevos datos en un proceso iterativo hasta la obtención de un modelo robusto y confiable. A su vez, los métodos de diagnóstico pueden entregar valiosas recomendaciones para la modificación de montajes experimentales con el fin de aumentar el contenido de información de los datos.

1.3.5 Análisis de control metabólico

El análisis del control metabólico, desarrollado en los trabajos de Kacser y Burns (1973), y en forma independiente por Heinrich y Rapoport (1974), proporciona un marco teórico para estudiar cuantitativamente los mecanismos de control y regulación de los sistemas metabólicos. De hecho, se ha convertido en una gran herramienta para estudiar la distribución del control del flujo en los pasos enzimáticos y diseñar estrategias para manipular vías metabólicas.

Los postulados de este análisis se pueden resumir en las siguientes generalizaciones (Kacser & Porteous, 1987; Meléndez-hevia et al., 1987):

- El control del flujo se distribuye en todos los componentes enzimáticos de la vía.
- Varias enzimas pueden ejercer control significativo del flujo.
- La distribución del control puede variar con el cambio del estado metabólico de la célula o por cambios en las condiciones del experimento.

Esta teoría define el coeficiente de control del flujo, C_J , para medir la sensibilidad del flujo a un cambio en la concentración de una enzima. De esta forma, el coeficiente de control de flujo se define como la fracción de cambio en el flujo, J , con respecto a la fracción de cambio en la concentración de la enzima, $[E]$ (Cornish-Bowden, 2004; Kacser & Porteous, 1987):

$$C_J = \frac{\frac{\delta J}{J}}{\frac{\delta [E]}{[E]}} = \frac{\delta \ln J}{\delta \ln [E]} \quad (16)$$

El control del flujo puede ser compartido cuantitativamente por todas las enzimas de la vía. Estudios rigurosos de varios sistemas metabólicos muestran que la suma de los coeficientes de control de flujo de las enzimas participantes en una vía es igual a 1 (teorema aditivo del control metabólico, [Cornish-Bowden, 2004; Kacser & Porteous, 1987]).

2. DESARROLLO DE UN MODELO METABÓLICO CINÉTICO PARA OPTIMIZAR LA SÍNTESIS DE BETA-IONONA EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

2.1 Introducción

Entre el sinnúmero de compuestos aromáticos que hoy se comercializan, la β -ionona destaca como una prominente molécula, naturalmente presente en muchas flores (violetas) y frutos (frambuesas, duraznos y damascos) (López et al., 2015). La β -ionona es actualmente sintetizada a partir de citral y acetona, a través de un proceso químico conocido desde hace más de un siglo (Chuit & Bachofen, 1902; Tiemann & Krüger, 1893; Tiemann, 1896). Sin embargo, en los últimos años, el incremento de la demanda de los consumidores por ingredientes y productos naturales en los alimentos ha promovido el reemplazo del sistema de producción químico por uno natural (Cataldo et al., 2016). Dentro de los esfuerzos realizados en esta dirección cabe destacar la construcción de una plataforma eficiente para la producción de β -ionona mediante la expresión de genes carotenogénicos de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* y el gen *CCDI* de *Petunia hybrida* en *S. cerevisiae* (López et al., 2015). Sin embargo, se requiere optimizar la vía biosintética y las condiciones de fermentación, afín de incrementar en forma sustancial la concentración final y la productividad volumétrica de la biosíntesis, con el objetivo de consolidar un proceso económicamente competitivo respecto de la síntesis química.

El modelamiento matemático ha sido empleado desde hace varias décadas como estrategia para incrementar la tasa de éxito del trabajo experimental, permitiendo disminuir significativamente los ensayos experimentales y seleccionar aquellos experimentos que tienen mayor probabilidad de lograr el resultado deseado. Dentro del campo de la biología computacional, los modelos metabólicos a escala genómica han sido ampliamente utilizados debido a su simplicidad, robustez y cobertura (Sánchez & Nielsen, 2015). Estos modelos se caracterizan por entregar información acerca de la

distribución de los flujos de carbono en el metabolismo. Además, pueden ser analizados como un problema de programación lineal (PL) donde se resuelve una función objetivo con relevancia biológica, como la maximización de la tasa de crecimiento, bajo el supuesto de estado pseudo-estacionario (Sánchez et al., 2014). Sin embargo, una de las principales limitaciones de estos modelos es que no consideran la concentración de las enzimas involucradas como una variable explícita, generando una desconexión con los experimentos, pues el cambio de los niveles de expresión es una de las estrategias más empleadas en ingeniería genética (Picotti et al., 2009; Weaver et al., 2015).

En oposición a los modelos estequiométricos, los modelos cinéticos (MC) resuelven los cambios metabólicos de acuerdo a los cambios en las velocidades de reacción. De esta forma, los MC incorporan la concentración de las enzimas y metabolitos, y así predicen la evolución temporal de la concentración de sustratos, intermediarios y productos. Además, permiten realizar experimentos *in silico* para evaluar el desempeño del sistema biológico en estudio, tales como cambios en el nivel de expresión de ciertas enzimas y su impacto en la distribución de flujos de la vía. Pese a lo anterior, los modelos cinéticos son difíciles de implementar debido a la poca información disponible de parámetros cinéticos (constantes de velocidad y concentración de enzimas, entre otros) para la mayoría de los sistemas biológicos (Weaver et al., 2015). Además, incluso cuando las constantes cinéticas han sido caracterizadas *in vitro*, no se puede asegurar la idoneidad de estos valores *in vivo* (García-Contreras et al., 2012; Laue & Demeler, 2011; Van Eunen et al., 2010).

Recientemente, se han llevado a cabo diversos trabajos de modelación cinética de vías metabólicas, lo que ha permitido aumentar la comprensión de los fenómenos biológicos asociados, y el diseño de nuevas rutas para incrementar el flujo por vías ya existentes con interesantes aplicaciones biotecnológicas (Rios-Estepa et al., 2008; Saa & Nielsen, 2016; Smallbone et al., 2013; Weaver et al., 2015).

En este trabajo, construimos un modelo de 55 ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) de la vía de síntesis heteróloga de β -ionona en *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de la vía del mevalonato, incluyendo la vía de síntesis de esteroides y de carotenoides (Figura 2-1). La parametrización del modelo fue realizada usando 92 parámetros cinéticos enzimáticos obtenidos de literatura y la concentración de proteínas fue fijada de acuerdo a los antecedentes de Weaver et al., 2015, Martínez-Moya et al., 2015 y Currie et al., 2014. Usando acetil-CoA como sustrato inicial, desconectamos la vía del metabolismo central, permitiéndonos examinar la producción de β -ionona en profundidad y en forma independiente de los problemas que pueden ocasionarse por otros factores fisiológicos, tales como las complicaciones inherentes que resultan de la inserción de las vías del metabolismo central y las regulaciones asociadas; además de los efectos que esto puede ocasionar en los resultados de simulación de las vías heterólogas, que podrían complicar el análisis y llevar a conclusiones erróneas (Rios-Esteva et al., 2010; Weaver et al., 2015).

A continuación, presentamos la calibración del modelo de fermentación batch de una cepa de *S. cerevisiae* productora de β -ionona con el fin de estimar los parámetros cinéticos más relevantes del sistema biológico no reportados en la literatura. El algoritmo de optimización usado está basado en un método de búsqueda dispersa implementado en MATLAB, el cual ha mostrado resultados promisorios para la solución de problemas de optimización combinatorial y no lineal (Rodríguez-Fernández et al., 2006). Luego de la obtención de los parámetros calibrados del modelo, se efectuó un diagnóstico de post-regresión para evaluar posibles problemas paramétricos del modelo a nivel de sensibilidad, identificabilidad y significancia. Finalmente, realizamos un análisis de control metabólico para identificar las etapas limitantes en la biosíntesis de β -ionona. De esta forma, identificamos que la concentración de las enzimas CrtYB, ERG9 y CCD1 es fundamental para la optimización de esta vía. Además, estos análisis revelaron que las constantes cinéticas K_{cat_crtYB} y K_{m_ccd1} son factores claves para asegurar la biosíntesis eficiente de β -ionona.

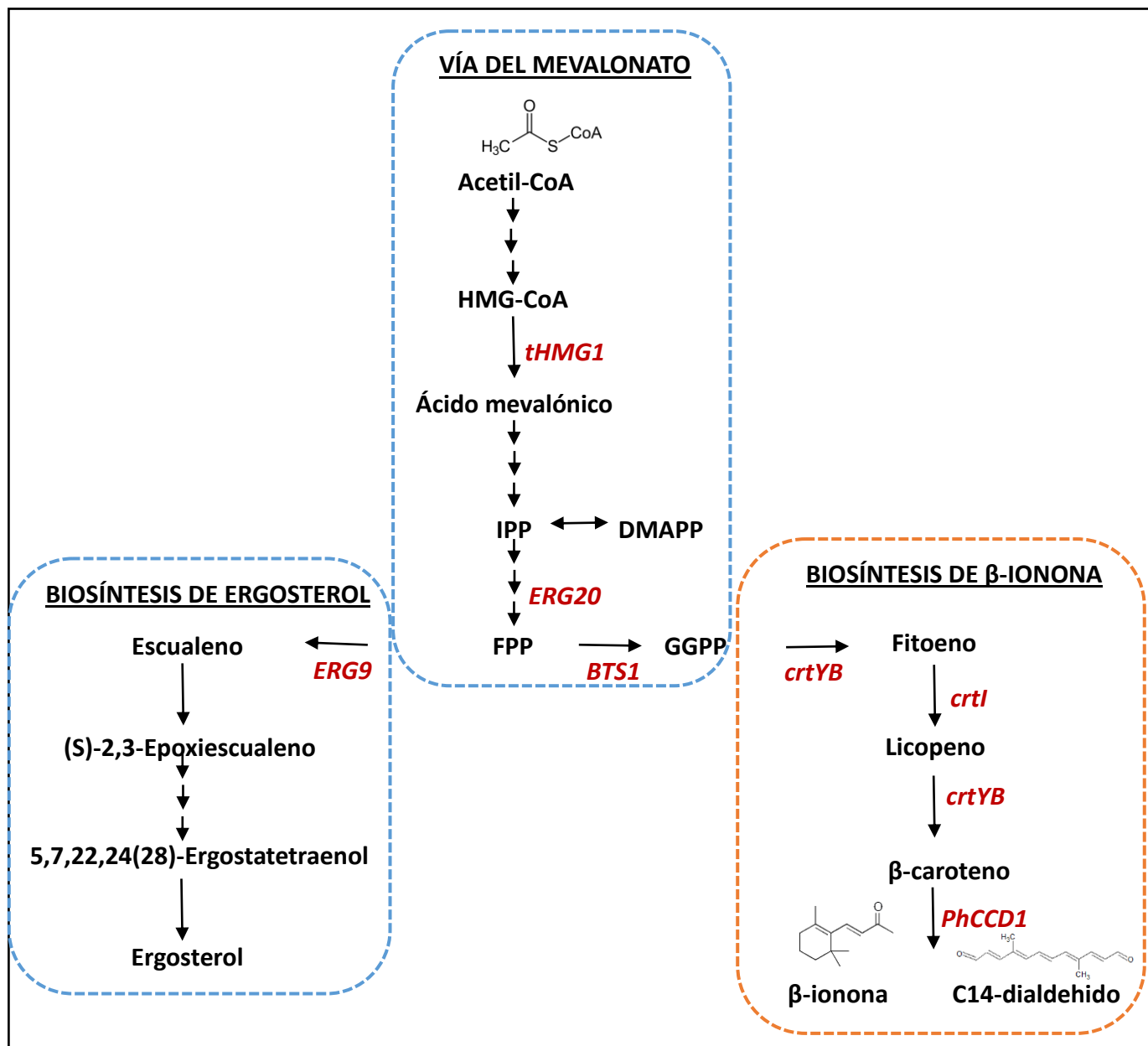


Figura 2-1. Plataforma para la producción de β- ionona en *S. cerevisiae*. Los cuadros azules representan las vías nativas, y el cuadro naranja representa la vía heteróloga expresada en la levadura. Los genes en rojo representan las modificaciones de la cepa construida por (Scalinati et al., 2012) y (López et al., 2015). El gen *tHMG1* codifica una HMG-CoA reductasa trunca, el gen *ERG20* que codifica una FPP sintasa y el gen *BTS1* que codifica una geranilgeranil difosfato sintasa fueron sobreexpresados y el promotor del gen *ERG9* que codifica una escualeno sintasa fue reemplazado por el promotor *HXT1*. Además, los genes heterólogos *crtYB* (codifica una fitoeno sintasa/licopeno ciclasa), *crtI* (codifica una fitoeno desaturasa) y *PhCCD1* (codifica una dioxigenasa que cliva carotenoides) fueron integrados y expresados episomalmente.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Cepas, mantención y medios de cultivo

Todos los cultivos fueron realizados con la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*, construida y descrita por López et al., 2015. Esta cepa tiene un *background* CEN.PK SCIGS22 con modificaciones en el genoma para la sobreproducción de FPP (Scalcinati et al., 2012). Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas para la producción de β -ionona se describen en la Tabla 2-1. La cepa SCIGS22a presenta una versión truncada del gen *HMG1* (*tHMG1*) que codifica para la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa sin región transmembranar. La cepa JLS02 deriva de la cepa SCIGS22a y contiene los genes *BTS1*, *crtYB*, *crtI* y *CCD1*. Por último, la cepa JLS07 fue obtenida por transformación de la cepa JLS02 con el plásmido pEJL08 de alto número de copias que contiene el gen *URA3* de *S. cerevisiae* como marcador de selección y los genes *crtYB* y *PhCCD1* bajo el control del promotor fuerte constitutivo *GPD* (López et al., 2015).

Tabla 2-1.- Lista de cepas de *S. cerevisiae* usadas para la producción de β -ionona.

Cepa	Genotipo	Plásmido	Referencia
SCIGS22	<i>MATa MAL2-8c SUC2 ura3-52</i> <i>lpp1Δ::loxP</i> <i>dpp1Δ::loxP PERG9Δ::loxP-PHXT1</i> <i>gdh1Δ::loxP PTEF1-ERG20 PPGK1-</i> <i>GDH2</i>	ninguno	(Scalcinati et al., 2012)
SCIGS22a	SCIG22 + <i>PTEF1-tHMG1</i>	ninguno	(López et al., 2015)
JLS02	SCIG22a + <i>PTEF1-BTS1 PPGK1-crtYB</i> <i>PTEF1-</i> <i>crtI PPGK1-PhCCD1</i>	ninguno	(López et al., 2015)
JLS07	JLS02	P426 <i>PGPD-</i> <i>crtYB</i> <i>PGPD-</i> <i>PhCCD1</i>	(López et al., 2015)

Los experimentos de cultivo celular se realizaron en medio mínimo sintético dextrosa (SCD) que contiene: 20 g/L de glucosa, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,7 g/L de Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos (BD Difco™ YNB; BD & Co, Sparks, MD, USA) y 0,77 g/L de mezcla de suplemento completo sin uracilo (CSM-URA; Sunrise Science Products Inc., San Diego, CA, USA). Luego de la esterilización del medio durante 20 min a 121 °C, se agregó una solución concentrada de vitaminas esterilizada por filtración (30 mm x 0.22 µm syringe-filter; Tecnología y Ciencia, Santiago, Chile), preparada de acuerdo a Van Hoek et al., 1998. Por último, se adicionó 10% dodecano (vol/vol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) al medio de cultivo para la recuperación *in situ* de β -ionona.

Las cepas de levadura son mantenidas como una suspensión en 25% de glicerol estéril (vol/vol) y almacenadas en crioviales a -80 °C.

2.2.2 Modelamiento

Se construyó un modelo de 55 ecuaciones diferenciales ordinarias en MATLAB R2016b usando 94 parámetros cinéticos obtenidos a partir de la base de datos BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info/>) y estudios previos, los cuales se detallan en las Tablas A-1 y A-2. Las concentraciones enzimáticas fueron fijadas de forma arbitraria (Tabla A-3), de acuerdo a Weaver et al., 2015, excepto para las enzimas BTS1, CrtYB y CrtI para las cuales se empleó los antecedentes de Martinez-Moya et al., 2015 y para las enzimas ERG9, ERG1, ERG7, ERG11, ERG24, ERG25, ERG26, ERG6, ERG2, ERG5 y ERG4 para las cuales se empleó los datos de Currie et al., 2014. La concentración inicial de los metabolitos del modelo fue fijada basándose en una extensa revisión bibliográfica y en nuestros resultados experimentales (Tabla A-4). La concentración de acetil-CoA se fijó en 0.5 µM (constante), de acuerdo al promedio de los datos experimentales de LC-MS durante el periodo considerado en el modelo.

El método de Jaqaman & Danuser (2006) se utilizó para el análisis de sensibilidad del modelo y la determinación de los parámetros más sensibles para la producción de GGPP, β -caroteno, β -ionona, escualeno y ergosterol. De esta forma, seleccionamos 18 parámetros cinéticos del sistema biológico no reportados en la literatura para la estimación. A continuación, empleamos el toolbox SSm GO para optimización global en MATLAB (<http://www.iim.csic.es/~gingproc/ssmGO.html>) para calibrar el modelo. El método de optimización global utilizado fue el algoritmo de búsqueda dispersa eSS descrito en Egea et al. (2009; 2010), que es una versión mejorada del método SSm (Egea et al., 2006). SSm (Scatter Search for MATLAB) es un algoritmo de optimización global metaheurístico para problemas de programación no lineal que ha sido empleado exitosamente en el área de bioprocesos (Balsa-Canto et al., 2007; Sacher et al., 2011; Sriram et al., 2012); entrega una solución cercana al óptimo global, utilizando métodos de diversificación e intensificación y un conjunto de referencia de soluciones de alta calidad (Egea et al., 2006). El algoritmo eSS, por su parte, utiliza parametrización del vector de control (CVP) y está orientado a problemas con ruido y discontinuidades (Egea et al., 2009).

Los parámetros fueron estimados por minimización de la suma de los errores cuadráticos entre los resultados de simulación y los datos experimentales. Cada uno de los términos de error de la ecuación fue dividido por el máximo valor experimental. Así, la siguiente función de mínimos cuadrados fue minimizada:

$$\text{Min} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} \left(\frac{X_{i,j}^{\text{modelo}} - X_{i,j}^{\text{exp}}}{X_i^{\text{max exp}}} \right)^2$$

Donde $X_{i,j}$ corresponde a las j mediciones de la variable i , m es el número de variables medidas, n_i es el número de mediciones realizadas y $X_i^{\text{max exp}}$ es el máximo valor experimental para la variable i .

Posteriormente, para validar el modelo se utilizaron herramientas de diagnóstico de post-regresión, las cuales consideran análisis de sensibilidad, identificabilidad y significancia de los parámetros del modelo. Finalmente, se realizó un análisis de control metabólico (ACM) con el fin de evaluar el rol de actividades enzimáticas individuales en el control de la vía metabólica en estudio.

2.2.3 Cultivos batch en bioreactor

Los cultivos *batch* fueron efectuados en un bioreactor bench top de 2,5 L BioFlo IIC (New Brunswick Scientific). Esta unidad estaba equipada con un sensor de temperatura (Pt100; 20 – 60 °C) y un electrodo de pH Tophit CPS471D (Endress Hauser, Suiza) con un rango de medición de pH de 2–12. Ambos parámetros fueron controlados vía control PID para mantenerlos dentro de los valores deseados. Además, incluía entradas para líquidos, tales como soluciones de control de pH y antiespumante, puerto de entrada y salida para la corriente de aire, y válvula para la toma de muestras. Las entradas de las soluciones ácida y básica para el control de pH y de antiespumante se conectaron con mangueras flexibles de 2,4 mm de diámetro (Masterflex Norprene; Cole-Parmer, Vernon Hills, USA) y el flujo de entrada de los líquidos fue realizado a través de bombas peristálticas 210U y 102FD/R (Watson Marlow, USA). El sistema de agitación consistió en dos turbinas Rushton conectadas a un eje de rotación ajustado al volumen de reacción ($V = 1,5$ L). Además, se insertó una placa deflectora dentro del reactor. El flujo de entrada de aire fue controlado mediante un medidor de flujo másico (FMA-A2407-SS; OMEGA Engineering Inc., Stamford, USA) y esterilizado por filtración, previo a la entrada al reactor, mediante un filtro profundo de 0,2 μm (Midisart 2000 PTFE; Sartorius AG, Göttingen, Alemania).

El pre-cultivo fue preparado en 3 mL de medio SCD sin uracilo e inoculado con una alícuota de levadura almacenada a -80 °C. Luego, 50 mL de medio contenidos en matraces de 250 mL fueron inoculados con una alícuota del pre-cultivo a una densidad óptica inicial a 600 nm (DO_{600}) de 0,1. Luego de una noche de crecimiento a 30 °C y

180 rpm de agitación en un incubador de agitación horizontal, el fermentador con 1450 mL de medio SCD sin uracilo fue inoculado con 50 mL del cultivo crecido en matraces a una DO_{600} inicial de 0,1. Durante la fermentación, las condiciones de operación fueron 20 °C, 600 rpm de agitación y un flujo de aire de 1 L/min (Cárcamo et al., 2014). Además, el pH fue controlado usando una solución de hidróxido de amonio 20% (vol/vol) y una solución de ácido fosfórico 20% (vol/vol) para mantener automáticamente el pH en 5,0. Por último, la espuma se controló manualmente utilizando silicona 10% (vol/vol), como antiespumante. La fermentación se desarrolló durante 72 h y las muestras fueron colectadas cada 4 h para mediciones de metabolitos y parámetros cinéticos. Cada experimento fue realizado en duplicado. Glucosa y etanol fueron medidos por HPLC como se describe en Sánchez et al., 2014.

2.2.4 Análisis Químico

2.2.4.1 Carotenoides

Los carotenoides se extrajeron desde el pellet celular, obtenido a partir de muestras de 50 mL de caldo muestreados en diferentes momentos del crecimiento de la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*, basándose en el protocolo descrito por An et al., 1989. El pellet celular se lavó con 10 mL de agua destilada, se centrifugó y resuspendió en 1,5 mL de agua destilada, luego de lo cual se agregó 0,5 mL de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y se agitó en molidor de células (mini bead beater-16, Bio Spec Products, Bartlesville, OK, USA) por 1 min. Para extraer los pigmentos, se agregó 1 mL de acetona y 18 µL de una solución 0,1 g/L de apo-β-carotenal (Sigma-Aldrich), empleado como estándar interno. Se agitó nuevamente en el molidor de células por 1 min y se centrifugó por 5 min a 6.000 rpm para recuperar la fase superior en otro tubo. Este procedimiento se repitió hasta que los restos celulares quedaron de color blanco. A continuación, se midió el volumen recuperado de acetona y se agregó la quinta parte de éter de petróleo. La mezcla se agitó en Vortex (VX100; Labnet international Inc., Woodbridge, USA) durante 5 min, se separaron las fases por centrifugación a 6.000 rpm y 4 °C por 5 min y se recuperó la fase superior con los pigmentos. Luego de repetir el

proceso de extracción con éter de petróleo, se agregó 1 mL de agua al tubo acetona-éter de petróleo, se agitó en Vortex durante 5 min, se separaron las fases por centrifugación a 6.000 rpm por 5 min y se recuperó la fase superior (éter de petróleo) con los pigmentos. La solución recuperada se evaporó y el extracto se utilizó para la medición del contenido de carotenoides por HPLC, en duplicado.

Los compuestos fueron analizados en un HPLC Merck Hitachi (LaChrom®), compuesto por una bomba cuaternaria modelo L-7100, un desgasificador modelo L7612, un auto-muestreador modelo L-7250 y un horno modelo L-7350 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Previo al análisis, las muestras fueron suspendidas en 600 μ L de acetona y se preparó una curva de calibración estándar con concentraciones conocidas de β -caroteno (0,2 - 15 mg/L). A continuación, 30 μ L de solución fueron inyectados en una columna Lichrospher RP18 100 (125 x 4 mm; Merk), con una solución de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5, vol/vol) como eluyente, a un flujo de 1 mL/min a 40 °C y en condiciones isocráticas. A la salida de la columna, los carotenoides fueron detectados con un detector de arreglo de diodos UV/VIS (Merck-Hitachi LaChrom L-7450A). Finalmente, cada metabolito fue cuantificado utilizando el software D7000 Multi HSM Manager (Merck-Hitachi), normalizando cada área en el cromatograma por el área correspondiente del estándar interno y usando una curva de calibración con los estándares de HPLC.

2.2.4.2 Esteroles

La extracción de esteroles intracelulares se realizó a partir del pellet celular obtenido de muestras de 10 mL de cultivo tomadas en distintos tiempos de crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* JLS07, según los protocolos de Shang et al., 2006, y Cheng et al., 2010. En resumen, al pellet celular se le añadió 16 mL de una solución de etanol 60% (vol/vol) conteniendo 4 g de KOH y 8 μ L de una solución de colesterol a una concentración de 1 g/L (usado como estándar interno; Sigma-Aldrich). Luego de mezclarse, se dejó a 80 ± 2 °C en baño María durante 2 h. Los esteroles no saponificables fueron extraídos con 10

mL de éter de petróleo. La solución recuperada se evaporó mediante corriente de nitrógeno y el extracto se utilizó para la cuantificación de esteroides por HPLC, en duplicado.

El análisis de HPLC fue realizado en el equipo Merck/Hitachi (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) descrito anteriormente. Para la medición, las muestras fueron suspendidas en 400 μ L de acetona y se preparó una curva de calibración con concentraciones conocidas de escualeno, epoxi-escualeno y ergosterol. A continuación, 30 μ L de cada solución fueron inyectados para su análisis. Los compuestos de interés se separaron en una columna Lichrospher RP18 100 (125 x 4 mm; Merck), eluida con una solución de metanol: agua (97:3, vol/vol), con un flujo de 1 mL/min a 40 °C, en condiciones isocráticas. Un detector con arreglo de diodos UV/VIS (Merck-Hitachi LaChrome L-7450A) fue empleado para detectar los esteroides. Finalmente, cada metabolito fue cuantificado utilizando el software D7000 Multi HSM Manager (Merck-Hitachi) normalizando cada área en el cromatograma por el área correspondiente del estándar interno y usando una curva de calibración con los estándares de HPLC en un rango de (0,2 - 100 mg/L).

2.2.4.3 β -ionona

Para el análisis de β -ionona, una muestra de 5 mL de medio de cultivo fue colectada desde el reactor y centrifugada a 6.000 rpm y 4 °C por 5 min. Posteriormente, sólo la fase orgánica de la muestra – del dodecano – fue almacenada a -20 °C para su posterior medición. Antes del análisis, la fase orgánica fue secada sobre sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, se añadió a la muestra 10% (vol/vol) de 4-isopropil-3-metilfenol (4IP3MP; Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) como estándar interno para calcular la concentración de β -ionona con una curva de calibración en un rango de (0,1 - 50 mg/L).

El análisis de β -ionona fue efectuado por cromatografía de gases (GC) (HP 6890 Series GC System, Hewlett Packard, Palo Alto, USA), acoplado a un detector de ionización de

llama (FID) mantenido a 250 °C con un flujo de gas H₂ a 40 psi y de aire a 45 psi. Además, el sistema estaba equipado con un inyector sin división con control EPC (100 psi EPC S/SL; Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) funcionando a 250 °C y 25,39 psi. El programa del horno fue el siguiente: 80 °C por 1 min; luego, la temperatura se aumentó en forma gradual a razón de 10 °C/min hasta 120 °C; y finalmente se aumentó 3 °C/min hasta alcanzar 240 °C. Se empleó una columna capilar DB-FFAP (60 m x 0,25 mm de diámetro interno; 0,25 µm de espesor de película; Agilent Technologies) bajo un flujo constante de 1,2 mL/min y 45 psi de He como gas portador. Además, se obtuvieron los espectros de masas utilizando un cromatógrafo de gases HP6890A, conectado a un espectrómetro de masas HP 5975 C en el modo de impacto electrónico (EI) en 70 eV. El equipo se controló con el software HP ChemStation GC (Agilent Technologies) y los cromatogramas se analizaron con el software MSD ChemStation mejorada (Agilent Technologies). Por último, 1 µL de la muestra preparada fue inyectado en el equipo GC-FID usando una jeringa de vidrio de 10 µL (Hamilton Co., Reno, USA).

2.2.4.4 Metabolitos intermediarios de la vía del Mevalonato

Luego de coleccionar una muestra de 5 mL de medio de cultivo desde el reactor, ésta fue centrifugada a 10.000 rpm por 5 min a 4 °C y lavada dos veces con 100 mM de NH₄HCO₃ frío, pH 7.8. El pellet fue resuspendido en 1 mL de 2-propanol, 100 mM de NH₄HCO₃ (Henneman et al., 2008).

A cada homogeneizado, se le adicionó 15 µL de una solución 1 mg/L de timolftaleína fosfato como estándar interno y se sonicó en hielo 2 veces por 15 min. Luego, cada muestra se agitó en vórtex durante 5 min y a continuación se adicionaron 3 mL de acetonitrilo para desproteinización. Las muestras resultantes fueron incubadas en hielo por 10 min y luego centrifugadas a 14.000 rpm y 4 °C por 10 min. Finalmente, el sobrenadante fue transferido a un tubo de vidrio y secado mediante corriente de

nitrógeno a 30 °C. El residuo obtenido fue resuspendido en 500 µL de agua miliQ y analizado de forma inmediata o almacenado a -80 °C, hasta su análisis.

La separación, identificación y cuantificación de los isoprenoides fue realizada en un sistema UHPLC Dionex modelo Ultimate-3000 que consiste en una bomba cuaternaria, un inyector automático con control de temperatura y un compartimiento termorregulado para columna (Dionex Corp., Sunnyvale, USA), acoplado a un espectrómetro de masas Exactive plus (Thermo Fisher Scientific, San José, CA). El sistema UHPLC es controlado por el Software Xcalibur 2.13 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). La separación cromatográfica fue realizada en una columna Purospher RP18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Merck). El método utilizado es una modificación de Lu et al., 2010 a un flujo de 400 µL/min. La fase móvil A fue agua con bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 10 mM y 0,05% de trietilamina; y la fase móvil B, acetonitrilo con 0,1% de trietilamina. El gradiente de operación fue: 0 min, 30% B; 2 min, 60% B; 6 min, 95% B; 12 min 30% B; 15 min 30% B. Otros parámetros del sistema fueron temperatura del inyector automático 4 °C, volumen de inyección 20 µL y temperatura de columna de 40 °C. El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo, dado que trietilamina suprime los iones positivos. La optimización del detector (*tuning*) fue realizada por la infusión directa de estándares de DMAPP (m/z 244,99; Sigma-Aldrich), GPP (m/z 313,05; Sigma-Aldrich), FPP (m/z 381,12; Sigma-Aldrich), acetyl-CoA (m/z 808,12; Sigma-Aldrich), MVA (m/z 147,07; Sigma-Aldrich), GGPP (m/z 449,19; Sigma-Aldrich), y timolftaleína fosfato (m/z 509,17; Sigma-Aldrich), cada uno a 0,5 µg/mL. Los parámetros de operación optimizados fueron: flujo de gas envolvente, 48 (unidades arbitrarias); flujo de gas auxiliar, 11 (unidades arbitrarias); flujo de gas de barrido, 2 (unidades arbitrarias); voltaje de pulverización, 3,5 kV; temperatura del capilar, 300 °C; voltaje del capilar, -50 V; voltaje del lente tubular, 50 V.

2.3 Resultados

2.3.1 Calibración del Modelo

2.3.1.1 Estimación de Parámetros

El procedimiento de calibración del modelo fue efectuado de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. Los valores de los parámetros estimados, con sus unidades de medida, límites inferior (LI), superior (LS) y punto inicial de búsqueda para la optimización se resumen en la Tabla 2-2. Los LI y LS para Km_{ccd1a} , Km_{erg3b} , Km_{erg9c} , Km_{erg27a} , Km_{erg4b} , Kd_{crtYBa} y Kd_{erg9b} fueron seleccionados de acuerdo a los límites teóricos descritos en literatura (Berg et al., 2002); así como los LS de K_s , Y_{xg} y Y_{xe} (Badotti et al., 2008; Paalme et al., 1997; Pham et al., 1999). El resto de los LI y LS fueron seleccionados para asegurar que el algoritmo tuviera un adecuado espacio de búsqueda.

Tabla 2-2.- Resumen de Estimación de Parámetros de *S. cerevisiae* JLS07.

Símbolo	Nombre	Unidad	LI*	Valor	LS**	Valor
				Inicial		Final
K_{cat_erg9}	Constante catalítica enzima ERG9	h^{-1}	3,6	1908	$3,6 \cdot 10^5$	1055,4
K_{cat_crtYBb}	Constante catalítica enzima CrtYB	h^{-1}	3,6	3600	$3,6 \cdot 10^5$	3,6
K_{cat_erg1}	Constante catalítica enzima ERG1	h^{-1}	3,6	19,8	$3,6 \cdot 10^5$	9,5
K_{m_ccd1a}	Cte. Michaelis-Menten CCD1- β -caroteno	μM	10^{-1}	15,2	$1 \cdot 10^5$	7,8
K_{m_erg3b}	Cte. Michaelis-Menten ERG3-NADPH	μM	10^{-1}	35,7	$1 \cdot 10^5$	352
K_{m_erg9c}	Cte. Michaelis-Menten ERG9-Pre-Escualeno	μM	10^{-1}	7,7	$1 \cdot 10^5$	0,2
K_{m_erg27a}	Cte. Michaelis-Menten ERG27-metil-zimosterona	μM	10^{-1}	236	$1 \cdot 10^5$	1
K_{m_erg4b}	Cte. Michaelis-Menten ERG4-Ergostatetraenol	μM	10^{-1}	10,8	$1 \cdot 10^5$	418,9
K_{d_crtYBa}	Constante de disociación CrtYBa- GGPP	μM	10^{-1}	20	$1 \cdot 10^5$	64,2
K_{d_erg9b}	Constante de disociación ERG9- NADPH	μM	10^{-1}	1000	$1 \cdot 10^5$	3,7
Erg27	Concentración Enzima ERG27	μM	10^{-4}	0,03	1	0,0047
Erg3	Concentración Enzima ERG3	μM	10^{-4}	0,03	1	0,0038
Ccd1a	Concentración Enzima CCD1 $t < 20$ h	μM	10^{-4}	0,01	1	0,0094
Ccd1b	Concentración Enzima CCD1 $t > 20$ h	μM	10^{-4}	0,18	1	0,0001
K_s	Constante de saturación media	g/L	10^{-2}	0,12	0,5	0,0243
Y_{xg}	Rendimiento de biomasa/glucosa	g/g	10^{-2}	0,2	0,5	0,0990
Y_{xe}	Rendimiento de biomasa/producto	g/g	10^{-2}	0,21	0,7	0,2859
d	Tasa de muerte celular	h^{-1}	10^{-4}	$2 \cdot 10^{-4}$	0,1	0,0007

*LI = Límite inferior; ** LS = Límite superior

Los valores iniciales de los parámetros K_{cat_erg9} , K_{cat_crtYBb} , K_{cat_erg1} , K_{m_ccd1a} , K_{m_erg3b} , K_{m_erg9c} , K_{m_erg27a} , K_{m_erg4b} , K_s , Y_{xg} y Y_{xe} fueron seleccionados de literatura (Tabla A-1 y A-5). Por último, el resto de los valores iniciales fueron definidos para lograr una simulación factible.

2.3.1.2 Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* JLS07 en bioreactores

La Figura 2-2 ilustra la evolución de glucosa, etanol e intermediarios (escualeno, 2,3-epoxi-escualeno, ergosterol y β -caroteno) de la síntesis de β -ionona durante el crecimiento de *S. cerevisiae* JLS07 en bioreactor; el intervalo de confianza correspondiente de los datos experimentales (IC: 95%); y la cinética resultante de la modelación para cada uno de estos compuestos. Cabe destacar que el modelo reprodujo satisfactoriamente la dinámica biológica registrada mediante análisis experimental, considerando un intervalo de confianza (IC:95%).

En el caso la de biomasa, ésta cae dentro del intervalo de confianza del 95% de las mediciones experimentales (Figura 2-2A). Además, se puede identificar dos *plateaux*, correspondientes a la etapa de agotamiento de glucosa (25-30 h) y de etanol (mayor a 55 h), respectivamente. El consumo de glucosa presenta una leve desviación fuera del intervalo de confianza entre las 24-30 h de fermentación, posiblemente por limitaciones experimentales o del modelo (Figura 2-2B). Por su parte, el consumo de etanol comienza alrededor de las 30 h de fermentación. El etanol permanece dentro de los límites del intervalo de confianza a partir de las 10 h de cultivo (Figura 2-2C).

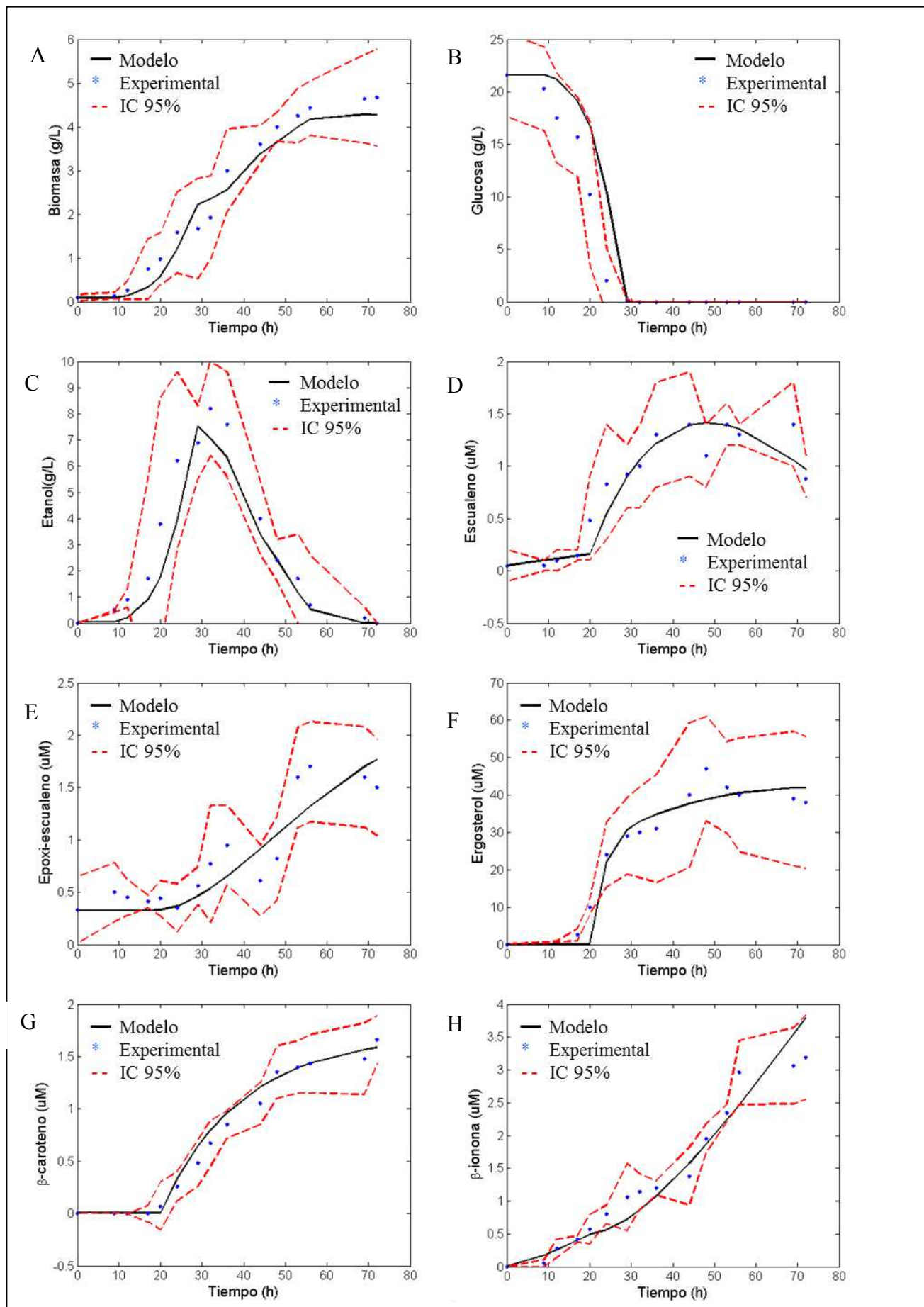


Figura 2-2. Comparación entre predicciones del modelo (línea sólida) y datos experimentales (*) del cultivo batch de *S. cerevisiae* JLS07 crecida en bioreactor de 1,5 L. (A) Biomasa (g/L); (B) Glucosa (g/L). (C) Etanol (g/L); (D) Escualeno (μM); (E) 2,3-Epoxi-escualeno (μM); (F) Ergosterol (μM); (G) β-caroteno (μM). (H) β-ionona (μM). Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes. Las líneas rojas representan un intervalo de confianza de 95% de las mediciones experimentales.

El escualeno se acumula a partir de las 20 h de cultivo, y alcanza el estado estacionario alrededor de las 50 h (Figura 2-2D). A su vez, el 2,3-epoxi-escualeno se acumula a partir de las 30 h de cultivo y permanece también dentro del intervalo de confianza del 95% de los datos durante toda la fermentación (Figura 2-2E). Por otro lado, la Figura 2-2F ilustra la significativa acumulación de ergosterol entre 20-25 h de cultivo - periodo en el cual se agota la glucosa – hasta las 30 h de fermentación, tiempo a partir del cual disminuye la acumulación de ergosterol. El ergosterol permanece dentro de los límites del intervalo de confianza del 95% durante toda la fermentación.

La síntesis de β -caroteno se inicia al momento en que el cultivo presenta carencia en glucosa (Figura 2-2G). Por último, la producción de β -ionona comienza luego de 10 h de fermentación, pero se acumula principalmente a partir de las 30 h de cultivo, concomitantemente con el consumo de etanol (Figura 2-2H).

2.3.2 Análisis Pre/Post regresión

2.3.2.1 Identificabilidad

Se evaluó si existían problemas de identificabilidad de diferentes combinaciones de parámetros estimados, considerando como valor límite un coeficiente de correlación Pearson de 0,95 (Figura A-1). Los parámetros correlacionados se pueden agrupar en 2 grupos. Un primer grupo, conformado por los parámetros asociados a la formación de β -ionona (K_{m_ccd1a} y $CCD1b$); un segundo grupo, que incluye los parámetros relacionados con la vía de síntesis de escualeno (K_{d_erg9b} y K_{cat_erg9}).

2.3.2.2 Sensibilidad

El análisis de sensibilidad relativa (Figura 2-3) indica que los parámetros K_{m_erg27a} , y K_{m_erg4b} tienen una baja sensibilidad frente a las diferentes variables de estado, pero se encuentran dentro del rango aceptable de sensibilidad relativa ($> 0,01$). Por el contrario, los parámetros K_{m_erg9c} , K_{d_crtYBa} , K_{d_erg9b} , y $CCD1a$ no impactan las variables de estado del modelo.

2.3.2.3 Significancia

Finalmente, la mayoría de los parámetros tienen niveles de significancia menores a 2, por lo que no son significativamente diferentes de cero. Los parámetros estimados que resultaron significativos con un nivel de confianza de 95% fueron K_{cat_crtYBb} , K_s , Y_{xg} , Y_{xe} y d (Tabla A-7).

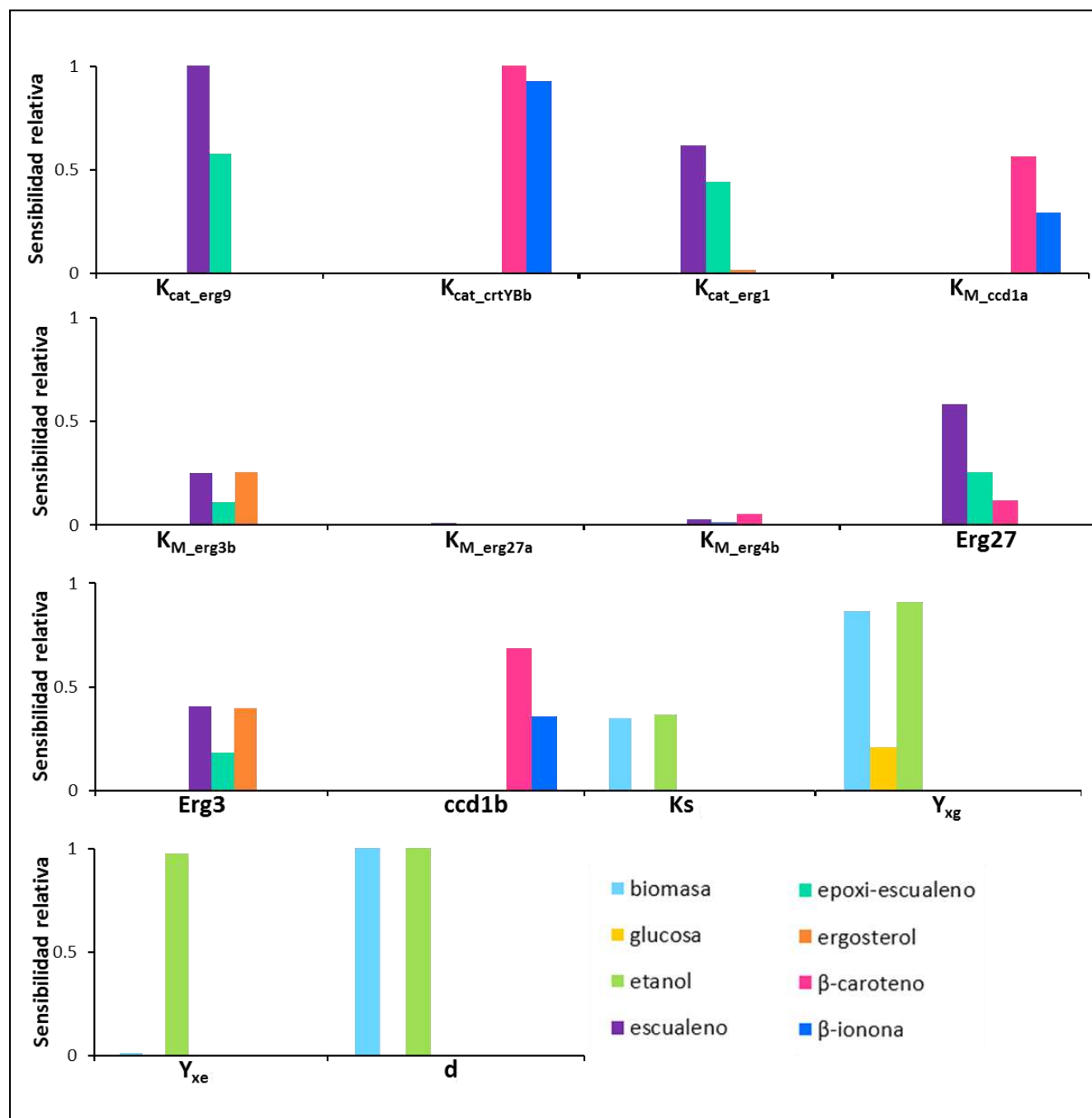


Figura 2-3. Análisis de Sensibilidad Relativa. Para cada parámetro las barras representan el impacto en una variable de estado específica. De izquierda a derecha las barras corresponden a biomasa, glucosa, etanol, escualeno, 2,3-epoxi-escualeno, ergosterol, β -caroteno y β -ionona

2.3.3 Identificación de etapas limitantes en la biosíntesis de β -ionona

Los resultados de simulación de la cepa JLS07 de *S. cerevisiae* indican que ciertos metabolitos se acumulan durante la fermentación: vía del mevalonato (HMG-CoA, IPP y DMAPP), biosíntesis de esteroides (pre-escualeno, escualeno, 2,3-epoxiescualeno, 4 α -formil-4 β -metil-zimosterol, 3-ceto-4 α -metil-zimosterol, 5 α -colest-8,24-dien-3 β -ona, episterol y ergosterol) y biosíntesis de β -ionona (GGPP, licopeno, β -caroteno y β -ionona).

De lo anterior, se desprende que ciertos pasos enzimáticos de las rutas biosintéticas descritas podrían corresponder a etapas limitantes en la producción de β -ionona en esta factoría celular, e.g.: HMGR, ERG20, ERG9, ERG1, ERG7, ERG25, ERG27, ERG3, CrtYB y CCD1 (Figura 2-4). Cabe destacar que la enzima ERG20 cataliza dos reacciones consecutivas en la vía del mevalonato, la formación de GPP y FPP; sin embargo, los resultados indican que sólo la primera reacción – la actividad GGP sintasa, identificada como ERG20a en el modelo – es una etapa limitante de la vía. Asimismo, los resultados reportados de las enzimas ERG25 y ERG27, que catalizan varias reacciones de la biosíntesis de ergosterol, indican que sólo las reacciones de formación de 4 α -carboxi-4 β -metil-zimosterol y 4 α -metil-zimosterol corresponderían a etapas limitantes de esta vía. En el caso de la enzima bifuncional CrtYB (fitoeno sintasa/licopeno ciclasa), la cual cataliza la formación de fitoeno y β -caroteno, ambas reacciones fueron detectadas como posibles etapas limitantes de la vía de biosíntesis de β -ionona.

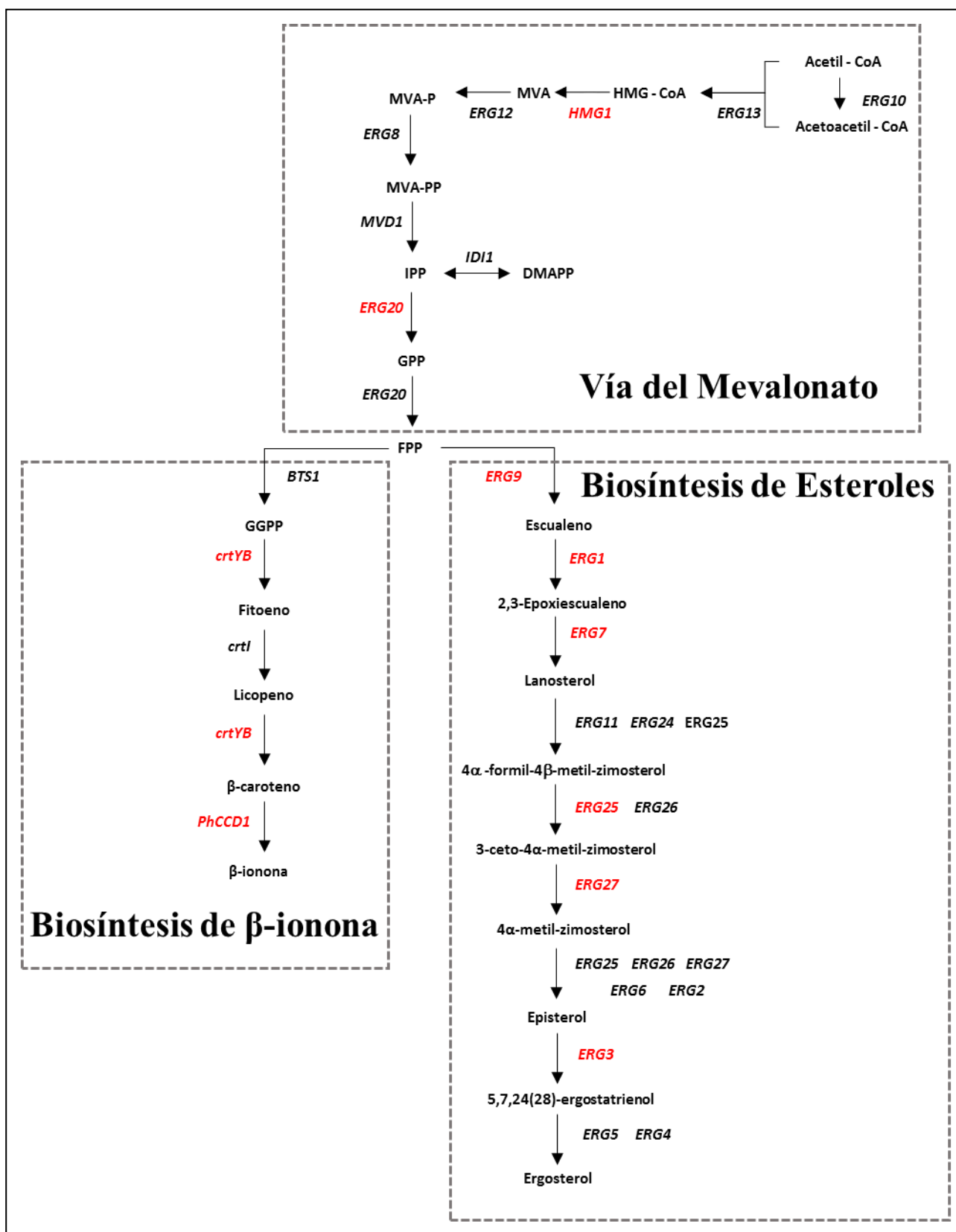


Figura 2-4. Identificación de etapas limitantes en la Vía del Mevalonato, biosíntesis de β -ionona y esteroides de *S. cerevisiae* JLS07. En color rojo se muestran los genes que codifican las enzimas de las etapas limitantes de las rutas enzimáticas descritas.

A continuación, se realizó un análisis de control metabólico (ACM) con el fin de evaluar el rol de actividades enzimáticas individuales en el control de la vía de biosíntesis de β -ionona. La Tabla 2-3 presenta los coeficientes de control de flujo (CCF) para la síntesis de β -ionona y ergosterol, y los coeficientes de control de concentración (CCC) para la síntesis de los intermediarios de las vías metabólicas β -caroteno y escualeno. Este análisis indicó que las enzimas que controlan mayoritariamente la vía de biosíntesis de β -ionona corresponden a CrtYB, CCD1, ERG9, ERG1 y ERG3. Cabe destacar que los cambios más relevantes observados fueron la modulación de las concentraciones de β -caroteno, β -ionona, escualeno y ergosterol, debido a cambios en los niveles de las enzimas CCD1, CrtYB y ERG9, respectivamente.

En efecto, los cambios en la concentración de la enzima dioxigenasa de clivaje de carotenoides (CCD1) afectan significativamente la concentración de β -caroteno (CCC=-0,96) y, en menor medida, el flujo de síntesis de β -ionona (CCF=0,23). Asimismo, la concentración de la enzima bifuncional fitoeno sintasa/licopeno ciclasa (CrtYB) controla mayoritariamente la concentración de β -caroteno (CCC=0,93) y el flujo de síntesis de β -ionona (CCF=0,79). En relación a lo último, cabe destacar que este resultado se debe principalmente a la actividad enzimática licopeno ciclasa de CrtYB, que cataliza la formación de β -caroteno, siendo insignificante en el caso de la actividad fitoeno sintasa de la misma enzima.

Por su parte, la concentración de la enzima escualeno sintasa (ERG9) controla mayoritariamente la concentración de escualeno (CCC=0,97). Sin embargo, este análisis reveló que otras enzimas también participan en el control de la concentración de escualeno, tales como ERG1 (CCC=-0,57), ERG25 (CCC=-0,15) y ERG3 (CCC=-0,33).

Finalmente, cabe destacar que los cambios en la concentración de la enzima C5 esterol desaturasa (ERG3) afectan significativamente el flujo de síntesis de ergosterol (CCF=0,58). Asimismo, pero en menor medida, las enzimas ERG27 (CCF=0,25) y ERG25 (CCF=0,12) controlan el flujo de la vía de síntesis de esteroides.

Tabla 2-3.- Análisis de Control Metabólico. Control de la síntesis de β -ionona, β -caroteno, escualeno y ergosterol en *S. cerevisiae* JLS07.

Enzima	$C_{E_i}^{J_{\beta-ionona}}$	$C_{E_i}^{J_{ergosterol}}$	$C_{E_i}^{\beta-caroteno}$	$C_{E_i}^{escualeno}$
ERG10	<0,01	<0,01	<0,01	0,03
ERG13	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
HMGR	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
ERG12	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
ERG8	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
MVD1	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
IDI1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ERG20	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
BTS1	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
CrtYB	0,79	<-0,01	0,93	<0,01
CrtI	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CCD1	0,23	<0,01	-0,96	<0,01
ERG9	<0,01	<0,01	<0,01	0,97
ERG1	<0,01	0,05	<0,01	-0,57
ERG7	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
ERG11	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
ERG24	<0,01	<0,01	<0,01	-0,05
ERG25	<0,01	0,12	<0,01	-0,15
ERG26	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
ERG27	<0,01	0,25	<0,01	<0,01
ERG6	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
ERG2	<0,01	<0,01	<0,01	<-0,01
ERG3	<0,01	0,58	<0,01	-0,33
ERG5	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ERG4	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

$C_{E_i}^{J_{\beta-ionona}}$, coeficiente de control de la enzima E_i sobre la síntesis de β -ionona;

$C_{E_i}^{J_{ergosterol}}$, coeficiente de control de la enzima E_i sobre la síntesis de ergosterol;

$C_{E_i}^{\beta-caroteno}$, coeficiente de control de la enzima E_i sobre la concentración de β -caroteno;

$C_{E_i}^{escualeno}$, coeficiente de control de la enzima E_i sobre la concentración de escualeno.

Una enzima con control de flujo negativo indica que está ubicada en una ramificación, desviando el flujo principal; una enzima con control de concentración negativo indica que el aumento en su actividad disminuye la concentración del metabolito.

Posteriormente, analizamos el impacto de la variación de los parámetros cinéticos de las enzimas del modelo en la concentración de isoprenoides de la vía de biosíntesis de β -ionona. Los parámetros enzimáticos que poseen mayor control sobre la biosíntesis de β -ionona son la constante catalítica de la actividad enzimática licopeno ciclasa de CrtYB (K_{cat_crtYBb}) y la constante de Michaelis-Menten de la enzima CCD1 para β -caroteno (K_{m_ccd1a}). Específicamente, la variación del parámetro K_{cat_crtYBb} afecta principalmente la concentración de β -caroteno (CCC=0,92) y β -ionona (CCC=0,94). Asimismo, la variación de la constante cinética K_{m_ccd1a} afecta la concentración de β -caroteno (CCC=0,66) y β -ionona (CCC=-0,49).

Los resultados obtenidos mediante el análisis de control metabólico nos permiten proponer que para incrementar la concentración de β -ionona se debería modificar los niveles de CrtYB, CCD1 y ERG9, enzimas responsables de controlar el flujo de esta vía. Asimismo, se propone modificar los parámetros cinéticos K_{cat_crtYBb} y K_{m_ccd1a} con el fin de incrementar la velocidad de síntesis de β -ionona, así como su concentración final. De esta forma, la Figura 2-5 ilustra el potencial efecto de estas modificaciones en la vía de biosíntesis de β -ionona, en específico, se simularon los perfiles de isoprenoides de esta vía al incrementar o disminuir en un 50% los niveles de CrtYB, CCD1, ERG9, K_{cat_crtYBb} o K_{m_ccd1a} en el modelo. Estas modificaciones de los parámetros de modelación predijeron cambios relativamente menores del rendimiento total de la vía (<14%), pero a su vez permitieron confirmar correlaciones importantes de actividades enzimáticas específicas con la composición de isoprenoides en esta vía. En efecto, los resultados indican que la concentración y los parámetros cinéticos de las enzimas CrtYB y CCD1 son relevantes en la modulación de la concentración de β -caroteno y β -ionona. Asimismo, la concentración de la enzima ERG9 modularía la concentración de escualeno. De acuerdo a las simulaciones, en conjunto estas modificaciones (CrtYBb, CCD1 y K_{cat_crtYBb} se incrementaron en un 50%, y ERG9 y K_{m_ccd1a} se redujeron en un 50%) están asociadas a cambios en las concentraciones de escualeno (-53%), β -caroteno (-29%), y β -ionona (+172%), y no afectan la concentración final de ergosterol producido.

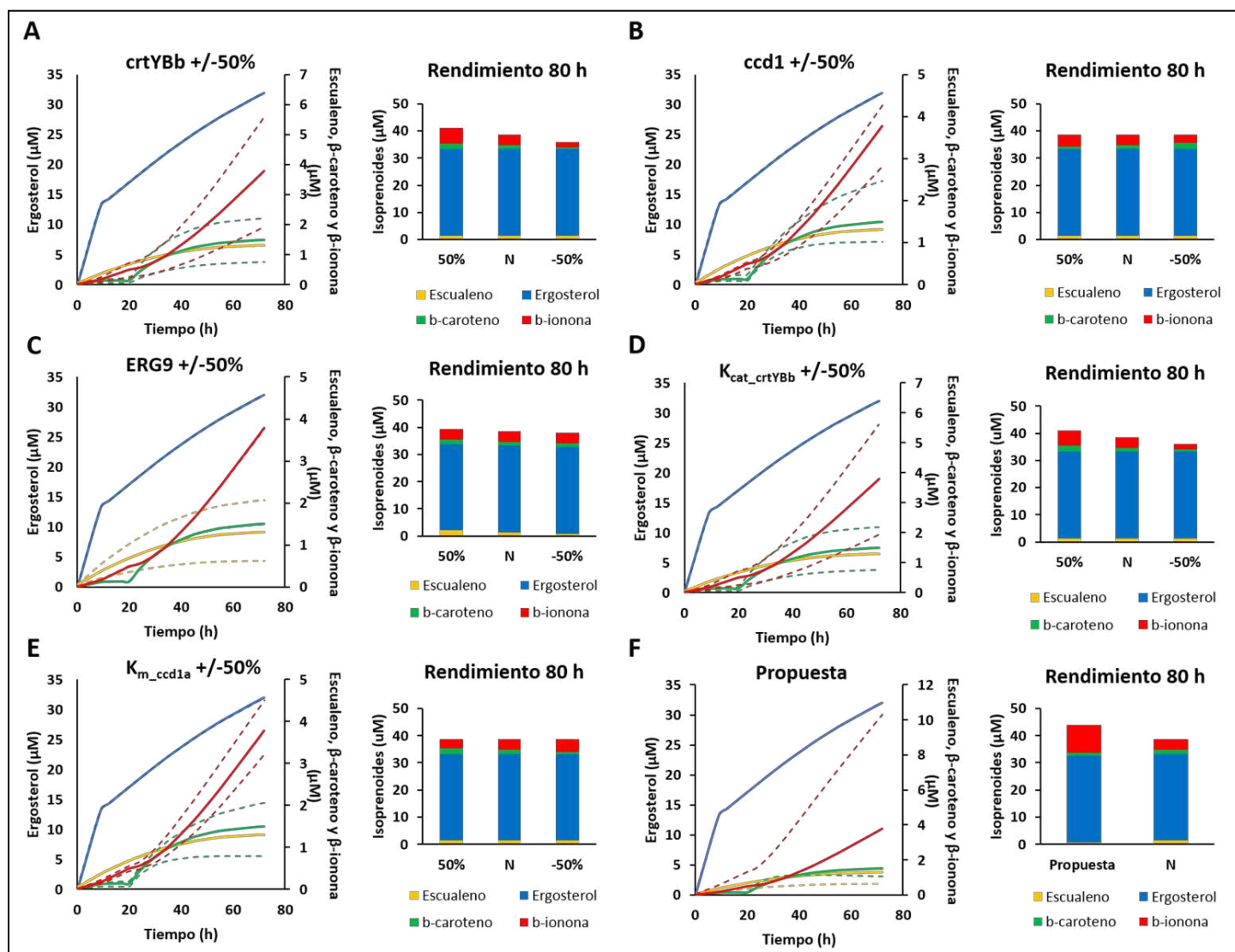


Figura 2-5. Análisis de Perturbación de la biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae*. Los siguientes colores fueron empleados para indicar los perfiles de isoprenoides: escualeno, amarillo; ergosterol, azul; β -caroteno, verde; β -ionona, rojo. (A – C) El impacto de cambios en la abundancia de proteínas claves ($\pm 50\%$ respecto al valor basal) es indicado por líneas segmentadas para la enzima licopeno ciclasa/ fitoeno sintasa (A), dioxigenasa de clivaje de carotenoides (B) y escualeno sintasa (C). (D-E) El potencial impacto de la variación de las constantes catalíticas más relevantes ($\pm 50\%$ respecto al valor basal) es indicado por líneas segmentadas para la constante catalítica de la enzima licopeno ciclasa/ fitoeno sintasa (D) y la constante de Michaelis-Menten de la dioxigenasa de clivaje de carotenoides (E). F, Simulación de los potenciales efectos de diferentes modificaciones en *S. cerevisiae* (+50% *CrtYBb*, *CCD1* y K_{cat_crtYBb} , y -50% *ERG9* y K_m_ccd1a). Los gráficos de barra a la derecha de cada panel indican la concentración de escualeno, ergosterol, β -caroteno y β -ionona después de 80 h de fermentación *batch*. N, concentración de isoprenoides bajo condiciones control.

2.4 Discusión

2.4.1 Simulaciones

La dinámica de crecimiento de la cepa JLS07 en cultivo batch aeróbico confirma los resultados de López et al., 2015 (Figura 2-2). Luego de una fase inicial de crecimiento asociada al consumo de glucosa, ocurre una fase de consumo del etanol producido como consecuencia del efecto Crabtree en *S. cerevisiae*. Además, este trabajo presentó la dinámica de producción de β -caroteno, β -ionona, escualeno, 2,3-epoxi-escualeno y ergosterol; lo que da cuenta de la preponderancia de la formación de esteroides por sobre carotenoides en esta factoría celular. Asimismo, la acumulación de β -caroteno en la fase estacionaria de crecimiento indica que la actividad enzimática de CCD1 que cataliza la formación de β -ionona podría ser deficiente. En conjunto, estos antecedentes confirman las posibilidades de optimizar el nivel de producción de β -ionona mediante el desarrollo de estrategias de ingeniería genética.

Finalmente, cabe destacar que en la mayoría de los experimentos, los ajustes realizados por el modelo matemático concuerdan bien con los datos experimentales, ya que las cinéticas del modelo se encuentran la mayoría del tiempo dentro de los intervalos de confianza (IC:95%) de las mediciones (Gelmi et al., 2002).

2.4.2 Análisis Pre/Post regresión

El análisis de identificabilidad permitió detectar problemas de identificabilidad en los parámetros asociados a la formación de β -ionona, K_{m_ccd1a} y CCD1b. A partir de ello se infiere que sólo se requiere emplear uno de ellos para la calibración. En consecuencia, convendría recopilar información experimental de la enzima CCD1 en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*. Por otro lado, los parámetros relacionados con la formación de escualeno que presentaron problemas de identificabilidad fueron K_{cat_erg9} y K_d_erg9b . En este caso sería útil obtener información experimental de la enzima ERG9, pues no se encuentran antecedentes disponibles en literatura para fijar a priori estos parámetros.

Por su parte, el análisis de sensibilidad reveló que los parámetros más importantes para la biosíntesis de β -ionona fueron las constantes enzimáticas K_{cat_crtYBb} y K_{m_ccd1a} y la concentración enzimática de CCD1. Estos parámetros afectaron principalmente la simulación de los perfiles de β -caroteno y β -ionona. Por otro lado, el parámetro K_{d_erg9b} , mostró ser insensible para la mayoría de las variables de estado, y dado que está correlacionado con K_{cat_erg9} , sólo este último debería preferirse para los estudios de calibración posteriores. Por su parte, los parámetros K_{d_crtYBa} y $CCD1a$ también resultaron prácticamente insensibles a la mayoría de las variables de estado, por lo que se recomienda para la recalibración del modelo fijar estos parámetros de acuerdo a la literatura o ensayos experimentales.

Las pruebas de significancia dependen del número de parámetros estimados, a diferencia de los análisis de identificabilidad y sensibilidad. Por lo que es razonable encontrar problemas de significancia en modelos de gran envergadura. Es así como el análisis de significancia reveló varios problemas de esta índole en el modelo cinético construido. Sin embargo, después de fijar un grupo de parámetros del modelo, usando otros criterios como sensibilidad e identificabilidad, se debería lograr reducir los problemas de significancia obteniendo un modelo sin inconsistencias paramétricas. Otra alternativa para mejorar la identificabilidad del modelo es incluir en próximos estudios las relaciones de Haldane, que permiten incorporar restricciones termodinámicas para dar lugar a cinéticas reales. En específico, la relación de Haldane establece que los parámetros cinéticos (velocidad máxima y constante de Michaelis Menten) de una enzima, vienen constreñidos por el valor de la constante de equilibrio, K_{eq} , de la reacción catalizada (Cleland, 1982). Esta información se puede obtener de varias fuentes, como, por ejemplo: <http://equilibrator.weizmann.ac.il/>.

2.4.3 Identificación de etapas limitantes en la biosíntesis de β -ionona

El modelo cinético desarrollado consiste en tres módulos, los cuales describen la vía del mevalonato (MVA), biosíntesis de esteroides y β -ionona, respectivamente. A partir del análisis de los resultados del modelo fueron predichas varias posibles etapas limitantes en la biosíntesis de β -ionona.

En primer lugar, diversos estudios han demostrado que la vía del MVA se encuentra fuertemente regulada, siendo su principal punto de regulación la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), la que está regulada a nivel transcripcional, post-traducciona y de su degradación (Miziorko, 2011). Sin embargo, es preciso señalar que la cepa JLS07 de *S. cerevisiae* presenta una versión truncada del gen *HMGR* (*tHMGI*) que codifica una forma soluble citosólica de la proteína eliminando la regulación negativa endógena en esta factoría celular (Scalcinati et al., 2012); pese a lo anterior, las predicciones del modelo detectan un “cuello de botella” en este punto, debido a la acumulación de HMG-CoA. Esto resulta interesante dado que diferentes trabajos han concluido que la enzima HMGR, efectivamente, cataliza la reacción limitante en la vía del MVA que corresponde a la conversión de HMG-CoA a MVA mediante dos reacciones de reducción (Parks & Casey, 1995).

Por otro lado, los análisis también detectaron la acumulación de IPP y DMAPP en esta factoría celular, indicando que la enzima geranil pirofosfato sintasa (ERG20) que cataliza la formación de GPP, también actuaría como etapa limitante en la vía del MVA. Este resultado es interesante porque el gen *ERG20* fue sobreexpresado en la cepa JLS07 con el fin de incrementar la síntesis de FPP (Scalcinati et al., 2012); sin embargo, los resultados de simulación aún predicen un “cuello de botella” en este punto. Al respecto, cabe mencionar el trabajo de Zhao et al. (2016), donde se evaluó el potencial de diferentes GPP sintasas para incrementar la producción de geraniol en *S. cerevisiae*, monoterpene sintetizado a partir de GPP. Este trabajo mostró que la sobreexpresión del

gen *ERG20* endógeno logró incrementar significativamente la producción de geraniol, siendo aún mejor el rendimiento al sobreexpresar en forma conjunta otros genes de la vía del mevalonato, como *HMGR* e *IDII*. Además, varios estudios han demostrado que la expresión de variantes de *ERG20* que tiene mayor actividad GPP sintasa incrementan los títulos alcanzados de diferentes monoterpenos (Fischer et al., 2011; Ignea et al., 2014; Liu et al., 2013). Sin embargo, el efecto de la regulación de la concentración de GPP aún no se ha investigado extensamente en *S. cerevisiae*. En conjunto, estas observaciones sugieren que las enzimas HMGR y ERG20 corresponden a etapas limitantes de la vía del mevalonato, por lo que estarían restringiendo la formación de β -ionona en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*.

Por su parte, los resultados de simulación también revelaron la acumulación de pre-escualeno, indicando que la enzima escualeno sintasa (ERG9) que cataliza la formación de escualeno a partir de FPP, actuaría como etapa limitante en la biosíntesis de esteroides en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*. Cabe destacar que esta cepa presenta regulación negativa del gen *ERG9* para la sobreproducción de FPP (Scalcinati et al., 2012), por ende la acumulación de pre-escualeno da cuenta de la reducción de la velocidad de reacción en el segundo paso enzimático catalizado por ERG9, i.e. la transformación de pre-escualeno en escualeno mediante la oxidación de NADPH en NADP.

Los análisis también permitieron demostrar la acumulación de escualeno en esta factoría celular, indicando que la enzima escualeno monooxigenasa (ERG1) que cataliza la formación de 2,3-epoxiescualeno, también actuaría como etapa limitante en la biosíntesis de esteroides en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*. De forma similar, Veen et al., 2003, reportaron que la sobreexpresión del gen *ERG1* en *S. cerevisiae* induce una disminución significativa de la concentración de escualeno, su sustrato directo, así como un incremento sustancial de lanosterol, y un aumento limitado en los esteroides, río abajo. Esto sugiere que es este paso enzimático el que limita la transformación de escualeno en otros esteroides de la vía. En conjunto, estos antecedentes sugieren que las enzimas ERG9 y ERG1 corresponden efectivamente a etapas limitantes de la biosíntesis de esteroides en

levaduras, por lo que el control de estas actividades enzimáticas favorecería la biosíntesis de β -ionona en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*.

Asimismo, los resultados de simulación revelaron una leve acumulación de varios intermediarios de la vía de biosíntesis de esteroides en *S. cerevisiae*, entre ellos: 2,3-epoxiesqualeno, 4α -formil- 4β -metil-zimosterol, 3-ceto- 4α -metil-zimosterol, 5α -colesta-8,24-dien- 3β -ona y episterol. Por lo tanto, otros posibles pasos enzimáticos limitantes de esta vía son ERG7, ERG25, ERG27 y ERG3. Pese a que estos pasos enzimáticos no han sido descritos previamente como etapas limitantes, cabe destacar que varios autores han mostrado que estas enzimas corresponden a importantes puntos de regulación de la vía de biosíntesis de ergosterol en levaduras (Arthington-Skaggs et al., 1996; Blosser et al., 2014; Darnet et al., 2001; Layer et al., 2013).

Por último, las simulaciones permitieron identificar acumulación de licopeno y β -caroteno en esta factoría celular, sugiriendo que los pasos enzimáticos catalizados por CrtYB y CCD1 son etapas limitantes de la biosíntesis de β -ionona. De forma similar a estos resultados, el trabajo de López et al. (2015) mostró que el incremento de la expresión génica de *CCD1* y *crtYB* en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*, logró un significativo aumento en el contenido de carotenoides totales y β -ionona en esta factoría celular, a diferencia de lo ocurrido con la co-expresión de los genes *crtYB* y *crtI* que tuvieron un efecto más leve en la biosíntesis de β -ionona. En conjunto, estos antecedentes indican que las enzimas CrtYB y CCD1 corresponden efectivamente a etapas limitantes de la biosíntesis de β -ionona en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae*.

Es por esto que, para evaluar los potenciales efectos de la variación de la concentración enzimática en los perfiles de metabolitos, se realizó un análisis de control metabólico en el modelo. Este análisis indicó que las enzimas CrtYB, CCD1, ERG9, ERG1 y ERG3 poseen un control significativo sobre la composición de isoprenoides en la vía de biosíntesis de β -ionona. A continuación, se realizó un análisis de perturbación para evaluar el rol de actividades enzimáticas individuales en la composición de isoprenoides

de la vía de biosíntesis de β -ionona. En específico, los cambios más relevantes en relación al rendimiento de β -caroteno, β -ionona, escualeno y ergosterol se observaron al modificar la concentración de las enzimas CrtYB, CCD1 y ERG9, respectivamente. Además, se observaron cambios significativos en los perfiles de β -caroteno y β -ionona debido a cambios en las constantes enzimáticas K_{cat_crtYB} y K_{m_ccd1} .

En primer lugar, este análisis mostró la importancia de la enzima bifuncional CrtYB en la síntesis de β -ionona. En específico, se observa que el incremento de la actividad enzimática licopeno ciclasa de la enzima CrtYB aumenta drásticamente la concentración de β -caroteno, y al mismo tiempo la de β -ionona. Estos resultados se condicen con el trabajo realizado por López et al. (2015), donde el aumento del nivel de expresión génica de *crtYB* en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae* promovió un significativo incremento en el contenido de carotenoides totales y β -ionona en relación a la cepa parental, a diferencia del incremento en la expresión del gen carotenogénico *crtI* que incluso disminuyó la producción de estos compuestos. Por otro lado, los resultados de simulación indican que otro factor clave para la síntesis de β -ionona es la constante catalítica de la enzima CrtYB. De lo anterior se deduce que el incremento en la eficiencia de la actividad enzimática de CrtYB mediante ingeniería de proteínas permitiría optimizar la síntesis de β -ionona reduciendo la concentración final de sus precursores.

En relación a los datos experimentales, la acumulación de β -caroteno en la cepa JLS07 de *S. cerevisiae* sugiere que el gen *PhCCD1* podría estar siendo expresado de forma subóptima o que la enzima presenta una baja eficiencia catalítica. Este fenómeno se refleja en los resultados del análisis de control metabólico, que muestran que CCD1 afecta significativamente la concentración de β -caroteno y el flujo de síntesis de β -ionona. En específico, este análisis reveló que el incremento del nivel de la enzima CCD1 disminuye drásticamente la concentración de β -caroteno, aumentando la concentración de β -ionona. Este razonamiento se apoya en un estudio previo de cepas productoras de β -ionona de *S. cerevisiae* en el cual se determinó la existencia de una

correlación entre los niveles de expresión génica de *CCD1* y el rendimiento de β -ionona alcanzado (López et al., 2015). Además, de acuerdo a las simulaciones el efecto positivo para la biosíntesis de β -ionona del nivel de *CCD1* se produce mayoritariamente en la fase estacionaria de crecimiento de la levadura, siendo prácticamente nulo antes de las 20 h de fermentación, momento donde ocurre el agotamiento del sustrato inicial de la vía (glucosa). Es por eso que una posible estrategia para optimizar la producción de β -ionona podría ser el uso de un promotor inducible de *CCD1*, que facilitara el crecimiento celular y la acumulación de β -caroteno al inicio de la fermentación, antes de la inducción de la biosíntesis de β -ionona.

Por otro lado, la baja eficiencia catalítica de la enzima *CCD1* podría explicarse por el clivaje inespecífico de enlaces dobles de diferentes sustratos. En organismos que acumulan carotenoides se ha detectado este fenómeno, por ejemplo, la enzima *CCD1* de maíz no cliva de forma exclusiva enlaces dobles 9,10 – 9', 10' de carotenoides, sino que también corta enlaces 5,6 – 5',6' (Vogel et al., 2008), lo cual indicaría que *CCD1* no produciría exclusivamente β -ionona. Una alternativa para mejorar la actividad enzimática es la expresión de enzimas *CCD1* provenientes de otros organismos o el uso de otras enzimas de la misma familia, como *CCD4* o *CCD7*, que también producen β -ionona a partir de β -caroteno. De hecho, existen antecedentes en la literatura que indican que las enzimas *CCD4* son más activas que las *CCD1* para la producción de β -ionona. Por ejemplo, las enzimas de *CCD4a* y *CCD4b* de *Crocus sativus* expresadas en cepas de *E. coli* diseñadas para la acumulación de β -caroteno, fueron hasta 15 veces más activas comparadas con las enzimas *CCD1* de la misma planta (Rubio et al., 2008).

Asimismo, el análisis de control metabólico reveló la importancia de la constante cinética de Michaelis- Menten de la enzima *CCD1* por su sustrato β -caroteno en la biosíntesis de β -ionona. Por lo que una alternativa para mejorar su actividad enzimática sería aumentar la afinidad de unión de la enzima por el sustrato mediante modelación e ingeniería de proteínas, modificando el sitio activo de la enzima, la región de unión del sustrato y/o el canal de salida de los productos. Otra opción interesante es la

construcción de proteínas fusión que reduzcan el acceso de la enzima a otros sustratos, en este caso sería conveniente acoplar la actividad enzimática de CrtYB y CCD1, que catalizan las últimas reacciones de la vía de síntesis de β -ionona.

Por último, también se detectó que la concentración de la enzima ERG9 afecta significativamente la biosíntesis de esteroides, debido al control que ejerce sobre la concentración de escualeno. La disminución del nivel de esta enzima reduce drásticamente la concentración de escualeno, precursor de la vía de síntesis de ergosterol; por lo que permite dirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de β -ionona. Este antecedente es interesante, pues la cepa JLS07 precisamente presenta el gen *ERG9* regulado de forma negativa, con la finalidad de favorecer la síntesis de carotenoides por sobre los esteroides (Scalcinati et al., 2012). Sin embargo, según las mediciones realizadas la cantidad de esteroides totales es varias órdenes de magnitud superior que los carotenoides totales en esta factoría celular. Por lo tanto, una alternativa que podría emplearse para favorecer la síntesis de β -ionona es reducir el nivel de expresión de *ERG9* hasta un punto óptimo que no limite la producción de ergosterol, compuesto indispensable para la levadura.

En consecuencia, estas observaciones apoyan la hipótesis de que CrtYB, CCD1 y ERG9 corresponden a las principales etapas limitantes en la biosíntesis de β -ionona.

2.5 Conclusión

En este estudio, construimos un modelo cinético de la vía de biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae*, que incluye la vía del mevalonato y la vía de síntesis de ergosterol y carotenoides. Se realizó la calibración del modelo para estimar los parámetros cinéticos más relevantes del sistema biológico. Se obtuvo un buen ajuste entre los módulos diseñados y la dinámica biológica registrada mediante análisis experimental. Además, se hizo un análisis de pre/post regresión para detectar posibles inconsistencias paramétricas a resolver. Finalmente, se realizó un análisis de control metabólico para identificar los factores claves para la optimización de la vía de biosíntesis de β -ionona en esta factoría celular.

De esta forma, el modelo sugiere la realización de diferentes modificaciones metabólicas para optimizar la biosíntesis de β -ionona en la cepa JLS07:

1. *Sobreexpresión de genes de la vía: crtYB y CCD1*. El aumento de la expresión de estos genes mediante la introducción de copias extras podría incrementar la producción de β -ionona sin afectar la biomasa. Otra alternativa es la utilización de promotores inducibles para *CCD1* que promuevan la acumulación de β -caroteno al inicio de la fermentación, antes de la inducción de la biosíntesis de β -ionona.
2. *Expresión de CCD4 de C. sativus en vez de PhCCD1*, por presentar una mayor actividad enzimática para la producción de β -ionona.
3. *Incremento de la afinidad de CCD1 por β -caroteno* (disminuir K_{m_ccd1a}) mediante ingeniería de proteínas usando diseño racional y evolución dirigida.
4. *Construcción de proteínas fusión entre genes crtYB y CCD1* que promuevan el clivaje oxidativo de β -caroteno por CCD1.
5. *Ingeniería de proteínas de CrtYB* para aumentar la eficiencia de la actividad enzimática de esta enzima (K_{cat_crtYBb}).

6. *Reducción de la expresión del gen ERG9.* La disminución de ERG9 permitiría reducir la formación de escualeno, precursor de la vía de síntesis de ergosterol; dirigiendo el flujo de carbono hacia la síntesis de β -ionona.

De esta forma, este modelo permitió establecer las bases para la optimización mediante ingeniería genética de la producción de terpenoides de alto valor comercial en esta levadura.

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

La simulación de vías metabólicas mediante modelos cinéticos se ha empleado para estudiar cómo se distribuyen los flujos metabólicos en un sistema biológico a través del tiempo. Sin embargo, estos modelos no solamente describen la estructura de las vías metabólicas, sino que también ayudan a entender sus mecanismos de control. De esta forma, se han convertido en una estrategia promisoría para estudiar el comportamiento de los sistemas biológicos y predecir como los flujos metabólicos pueden ser afectados por una amplia variedad de condiciones metabólicas.

El principal objetivo de esta tesis fue la construcción de un modelo cinético de la vía de biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae* JLS07 que permitiera integrar el conocimiento disponible de esta factoría celular para optimizar la producción de β -ionona. Cabe destacar que una de las principales ventajas del desarrollo de un modelo metabólico cinético es la facilidad para realizar análisis experimentales *in silico* que permiten evaluar el potencial efecto de modificaciones en el nivel de enzimas sobre la composición y rendimiento de metabolitos de interés. De esta forma, los estudios realizados revelaron que CrtYB, CCD1 y ERG9 corresponden a las principales etapas limitantes en la biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae* JLS07. A partir de lo anterior, se propusieron diferentes modificaciones para la optimización de la cepa JLS07, tales como: sobreexpresión de genes *crtYB* y *CCD1*, ingeniería de proteínas de CrtYB y CCD1, modulación de expresión de *ERG9*, entre otros. Así, las modificaciones genéticas propuestas mediante este trabajo de la vía de síntesis de terpenoides proveen una alternativa para el diseño de una nueva plataforma para la síntesis *de novo* de β -ionona, que podría alcanzar mejores rendimientos que las estrategias biotecnológicas actuales.

Por otro lado, la principal limitación de los modelos cinéticos radica en la dificultad de construir y parametrizar leyes cinéticas para las distintas reacciones. Esto limita la aplicación de los modelos cinéticos a redes metabólicas de reducidas dimensiones en las

que el número de reacciones es relativamente bajo. Sin embargo, una alternativa es utilizar estos modelos cinéticos como módulos que pueden integrarse para formar redes metabólicas complejas. Lo que permitiría el modelamiento cinético de nuevos sistemas biológicos y el diseño de alternativas para la optimización mediante ingeniería genética de vías metabólicas de interés biotecnológico.

Perspectivas

La utilización de modelos cinéticos para estudiar la distribución de flujos metabólicos en los sistemas biológicos ha crecido en el último tiempo, sin embargo, la dificultad de contar con datos cinéticos para todas las reacciones sigue siendo una limitante para la formulación de los modelos. En este trabajo, el diagnóstico de post-regresión detectó problemas paramétricos relacionados a la estructura del modelo y la falta de información cinética de ciertos pasos catalíticos. En específico, el análisis indicó que es necesario estudiar la cinética de las enzimas crtYB, CCD1 y ERG9 de forma experimental con el fin de recopilar antecedentes para mejorar la modelación de las vías metabólicas involucradas.

Asimismo, a nivel experimental es fundamental la implementación de las estrategias de ingeniería genética propuestas para la optimización de la biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae* JLS07. Dentro de ellas, podemos destacar la modelación e ingeniería de proteínas de CCD1 para aumentar la afinidad enzimática por β -caroteno, y CrtYB con el fin de incrementar su eficiencia catalítica, ambas ya están en desarrollo a nivel de laboratorio. Además, modular los niveles de expresión de *crtYB*, *CCD1* y *ERG9*, que codifican las enzimas claves para la biosíntesis de β -ionona en esta factoría celular. Por último, se plantea la posibilidad de expresar diferentes variantes de la familia CCD que se ha reportado poseen mayor actividad enzimática, tales como: *CCD4* de *C. sativus*.

Como proyección de este trabajo, se plantea desarrollar un procedimiento de recalibración basado en las sugerencias planteadas en el análisis debido a la detección de

algunos problemas de sensibilidad, identificabilidad y significancia en el modelo; con el fin de mejorar la robustez y capacidad predictiva del mismo. Dentro de las modificaciones se propone fijar, de acuerdo a información experimental o literatura, los siguientes parámetros: K_{d_erg9b} , K_{d_crtYBa} , CCD1a y CCD1b.

Debido a la acotada duración de esta tesis no fue posible recabar más información a nivel empírico para validar el modelo con datos experimentales diferentes a los usados en la construcción del mismo; por lo que sería relevante en el futuro realizar nuevos ensayos que permitieran llevar a cabo un proceso exhaustivo de validación del modelo. Además, con el fin de aumentar las aplicaciones a otras condiciones de cultivo de *S. cerevisiae*, el modelo podría también ser calibrado empleando datos de fermentación utilizando otras fuentes de carbono y estrategias de alimentación, tales como: una fase de crecimiento batch con glucosa, seguida por una fase de alimentación con etanol. Finalmente, sería deseable calibrar el modelo con datos derivados de las cepas productoras de β -ionona diseñadas a través de este trabajo, con el fin de comprender y cuantificar los efectos metabólicos asociados a su producción.

REFERENCIAS

Abramson, M. A. (2002). *Pattern search algorithms for mixed variable general constrained optimization problems*. Tesis PhD, Depto. de Matemática Computacional y Aplicada, Rice University, Houston, Texas.

Aharoni, A., Jongsma, M. a., & Bouwmeester, H. J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci.*, 10(12), 594–602. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.005>

Alberty, R. A. (2006). *Biochemical Thermodynamics: Applications of Mathernatica*. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.

Ali, M. M., Storey, C., & Torn, A. (1997). Application of Stochastic Global Optimization Algorithms to Practical Problems. *J. Optim. Theory Appl.*, 95(3), 545–563. <http://doi.org/10.1023/A:1022617804737>

An, G. H., Schuman, D. B., & Johnson, E. A. (1989). Isolation of Phaffia rhodozyma Mutants with Increased Astaxanthin Content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(1), 116–24. Recuperado de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Ansari, M., & Emami, S. (2016). β -Ionone and its analogs as promising anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 123, 141–154. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.037>

Arthington-Skaggs, B. A., Crowell, D. N., Yang, H., Sturley, S. L., & Bard, M. (1996). Positive and negative regulation of a sterol biosynthetic gene (ERG3) in the post-squalene portion of the yeast ergosterol pathway. *FEBS Lett.*, 392, 161–165. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00807-1](http://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00807-1)

Ashyraliyev, M., Fomekong-Nanfack, Y., Kaandorp, J. a., & Blom, J. G. (2009). Systems biology: Parameter estimation for biochemical models. *FEBS J.*, 276(4), 886–902. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06844.x>

Ashyraliyev, M., Jaeger, J., & Blom, J. G. (2008). Parameter estimation and determinability analysis applied to Drosophila gap gene circuits. *BMC Syst. Biol.*, 2, 83. <http://doi.org/10.1186/1752-0509-2-83>

Asokkumar, S., Naveenkumar, C., Raghunandhakumar, S., Kamaraj, S., Anandakumar, P., Jagan, S., & Devaki, T. (2012). Antiproliferative and antioxidant potential of beta-ionone against benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Mol. Cell. Biochem.*, 363(1-2), 335–345. <http://doi.org/10.1007/s11010-011-1186-6>

Auldridge, M. E., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2006). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9(3), 315–321. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.005>

Badotti, F., Dário, M. G., Alves, S. L., Cordioli, M. L. a, Miletto, L. C., de Araujo, P. S., & Stambuk, B. U. (2008). Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.*, 7, 4. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-7-4>

Baldermann, S., Kato, M., Fleischmann, P., & Watanabe, N. (2012). Biosynthesis of alpha-and betha-ionone, prominent scent compounds, in flowers of *osmanthus fragrans*. *Acta Biochim. Pol.*, 59(1), 79–81.

Baldwin, E. a., Scott, J. W., Shewmaker, C. K., & Schuch, W. (2000). Flavor trivia and tomato aroma: Biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35(6), 1013–1022.

Balliano, G., Viola, F., Ceruti, M., & Cattel, L. (1992). Characterization and partial purification of squalene-2,3-oxide cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 293(1), 122–129. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90374-6](http://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90374-6)

- Balsa-Canto, E., Rodriguez-Fernandez, M., & Banga, J. R. (2007). Optimal design of dynamic experiments for improved estimation of kinetic parameters of thermal degradation. *J. Food Eng.*, 82(2), 178–188. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.006>
- Barta, M. L., McWhorter, W. J., Miziorko, H. M., & Geisbrecht, B. V. (2012). Structural basis for nucleotide binding and reaction catalysis in mevalonate diphosphate decarboxylase. *Biochemistry*, 51(28), 5611–5621. <http://doi.org/10.1021/bi300591x>
- Beekwilder, J., van Rossum, H. M., Koopman, F., Sonntag, F., Buchhaupt, M., Schrader, J., ... Daran, J. M. (2014). Polycistronic expression of a β -carotene biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* coupled to β -ionone production. *J. Biotechnol.*, 192, 383–392. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.12.016>
- Belin, J.-M., Dumont, B., & Ropert, F. (1998). Enzymatic process for the preparation of flavours' in particular the ionones and c6 to c10 aldehydes. US N°5705372 A. Francia: Oficina de Patentes de Estados Unidos.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Sección 8.4, The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. In *Biochemistry textbook* (5th ed., p. 1120). New York, USA: Freeman, W. H. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Berger, R. G. (2009). Biotechnology of flavours-the next generation. *Biotechnol Lett*, 31(11), 1651–1659. <http://doi.org/10.1007/s10529-009-0083-5>
- Beyer, H.-G., & Schwefel, H.-P. (2002). Evolution strategies – A comprehensive introduction. *Nat. Comput.*, 1, 3 – 52. <http://doi.org/10.1023/A:1015059928466>
- Beytia, E., Qureshi, A. A., & Porter, J. W. (1973). Squalene Synthetase. *J. Biol. Chem.*, 248(5), 1856–1867.

- Billheimer, J. T., Alcorn, M., & Gaylor, J. L. (1981). Solubilization and partial purification of a microsomal 3-ketosteroid reductase of cholesterol biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 211(1), 430–438. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90474-4](http://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90474-4)
- Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A. H., & Waard, A. de. (2010). Mevalonic Acid Pyrophosphate and Isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.*, 234(10), 2595–2604.
- Blosser, S. J., Merriman, B., Grahl, N., Chung, D., & Cramer, R. a. (2014). Two C4-sterol methyl oxidases (Erg25) catalyse ergosterol intermediate demethylation and impact environmental stress adaptation in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, 160, 2492–2506. <http://doi.org/10.1099/mic.0.080440-0>
- Boender, C. G. E., & Romeijn, H. E. (1995). *Stochastic methods. In Handbook of global optimization.* (R. Horst & P. M. Pardalos, Eds.). Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Aca.
- Bordbar, A., McCloskey, D., Zielinski, D. C., Sonnenschein, N., Jamshidi, N., & Palsson, B. O. (2015). Personalized Whole-Cell Kinetic Models of Metabolism for Discovery in Genomics and Pharmacodynamics. *Cell Systems*, 1(4), 283–292. <http://doi.org/10.1016/j.cels.2015.10.003>
- Bosser, A., & Belin, J. M. (1994). Synthesis of β -Ionone in an aldehyde/ xanthine oxidase/ β -carotene system involving free radical formation. *Biotechnol. Prog.*, 10(2), 129–133. <http://doi.org/10.1021/bp00026a001>
- Bruno, M., Beyer, P., & Al-Babili, S. (2015). The potato carotenoid cleavage dioxygenase 4 catalyzes a single cleavage of β -ionone ring-containing carotenes and non-epoxidated xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.*, 572, 126–133. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.011>
- Burdock, G. (2009). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients.* (G. Burdock, Ed.) (6th ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.

Burt, S. (2004). Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223–253. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

Bus, J. C. P., Domselaar, B. van, & Kok., J. (1975). *Nonlinear Least Squares Estimation*. Amsterdam, Países Bajos: Report NW 17/75, Stichting Mathematisch Centrum.

Cárcamo, M., Saa, P. A., Torres, J., Torres, S., Mandujano, P., Correa, J. R. P., & Agosin, E. (2014). Effective Dissolved Oxygen Control Strategy for High-Cell-Density Cultures. *IEEE Lat. Am. Trans.*, 12(3), 389–394. <http://doi.org/10.1109/TLA.2014.6827863>

Casado, S., & Martí, R. (2007). Principios de la Búsqueda Dispersa. *Revista Electrónica de Comunicaciones Y Trabajos de ASEPUMA*, 3, 97–114.

Cataldo, V. F., López, J., Cárcamo, M., & Agosin, E. (2016). Chemical vs. biotechnological synthesis of C13-apocarotenoids: current methods, applications and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(13), 5703–5718. <http://doi.org/10.1007/s00253-016-7583-8>

Cedersund, G., & Roll, J. (2009). Systems biology: Model based evaluation and comparison of potential explanations for given biological data. *FEBS J.*, 276(4), 903–922. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06845.x>

Chakrabarti, A., Miskovic, L., Soh, K. C., & Hatzimanikatis, V. (2013). Towards kinetic modeling of genome-scale metabolic networks without sacrificing stoichiometric, thermodynamic and physiological constraints. *Biotechnol. J.*, 8(9), 1043–1057. <http://doi.org/10.1002/biot.201300091>

Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., & Saunders, C. (1995). Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step

for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? *Plant Physiol.*, 109(4), 1337–1343.
<http://doi.org/10.1104/pp.109.4.1337>

Chemler, J. a., & Koffas, M. A. (2008). Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19(6), 597–605.
<http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.10.011>

Cheng, B., Yuan, Q. P., Sun, X. X., & Li, W. J. (2010). Enhanced production of coenzyme Q10 by overexpressing HMG-CoA reductase and induction with arachidonic acid in *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160(2), 523–531.
<http://doi.org/10.1007/s12010-008-8386-x>

Chu, X., & Li, D. (2003). Expression, purification, and characterization of His20 mutants of rat mevalonate kinase. *Protein Expr. Purif.*, 32(1), 75–82.
[http://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00221-3](http://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00221-3)

Chuit, P., & Bachofen, F. (1902). Process of making alpha-ionone. US N°702126 A. Estados Unidos: Oficina de Patentes de Estados Unidos.

Cleland, W. W. (1982). An analysis of haldane relationships. *Methods Enzymol.*, 87, 366–369. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(82\)87022-5](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(82)87022-5)

Colón, A. M., Sengupta, N., Rhodes, D., Dudareva, N., & Morgan, J. (2010). A kinetic model describes metabolic response to perturbations and distribution of flux control in the benzenoid network of *Petunia hybrida*. *Plant J.*, 62(1), 64–76.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04127.x>

Conn, A. R., Gould, N. I. M., & Toint, P. L. (2000). *Trust-region methods*. Filadelfia, USA: Number 1 in MPS/SIAM Ser. Optim. SIAM.

Cornish-Bowden, A. (2004). *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (3rd ed.). Londres, Inglaterra: Portland Press.

Curien, G., Bastien, O., Robert-Genthon, M., Cornish-Bowden, A., Cárdenas, M. L., & Dumas, R. (2009). Understanding the regulation of aspartate metabolism using a model based on measured kinetic parameters. *Mol. Syst. Biol.*, 5(271), 1–14. <http://doi.org/10.1038/msb.2009.29>

Currie, E., Guo, X., Christiano, R., Chitraju, C., Kory, N., Harrison, K., ... Farese, R. V. (2014). High confidence proteomic analysis of yeast LDs identifies additional droplet proteins and reveals connections to dolichol synthesis and sterol acetylation. *J. Lipid Res.*, 55, 1465–1477. <http://doi.org/10.1194/jlr.M050229>

Darnet, S., Bard, M., & Rahier, A. (2001). Functional identification of sterol-4 α -methyl oxidase cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by complementation of a yeast *erg25* mutant lacking sterol-4 α -methyl oxidation. *FEBS Letters*, 508(1), 39–43. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03002-2](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03002-2)

Darnet, S., & Rahier, A. (2003). Enzymological properties of sterol-C4-methyl-oxidase of yeast sterol biosynthesis. *BBA-Mol. Cell Biol. L.*, 1633(2), 106–117. [http://doi.org/10.1016/S1388-1981\(03\)00093-3](http://doi.org/10.1016/S1388-1981(03)00093-3)

Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or, the preservation of favoured races in the struggle for life*. Londres, Inglaterra: J. Murray.

Davis, J. T., Moore, R. N., Imperiali, B., Pratt, a J., Kobayashi, K., Masamune, S., ... Tomita, K. (1987). Biosynthetic thiolase from *zoogloea ramigera*. I. Preliminary characterization and analysis of proton transfer reaction. *J. Biol. Chem.*, 262(1), 82–9. Recuperado de <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/262/1/82>

De Launoit, Y., Zhao, H. F., Belanger, A., Labrie, F., & Simard, J. (1992). Expression of liver-specific member of the 3 betha-hydroxysteroid dehydrogenase family, an isoform possessing an almost exclusive 3-ketosteroid reductase activity. *J. Biol. Chem.*, 267(7), 4513–4517.

- Dean, J. T., Rizk, M. L., Tan, Y., Dipple, K. M., & Liao, J. C. (2010). Ensemble modeling of hepatic fatty acid metabolism with a synthetic glyoxylate shunt. *Biophys. J.*, 98(8), 1385–1395. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4308>
- Dennis, J. E., Gay, D. M., & Welsch, R. E. (1993). Algorithm 573, NLZSOL – An Adaptive Nonlinear Least-Squares Algorithm. *ACM Trans. Math. Softw.*, 7, 369–383. <http://doi.org/10.1145/355958.355965>
- Disch, A., & Rohmer, M. (1998). On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 168(2), 201–208. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00442-X](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00442-X)
- Dochain, D., & Vanrolleghem, P. a. (2001). *Dynamical Modelling and Estimation in Wastewater Treatment Processes*. Londres, Inglaterra: IWA Publishing.
- Egea, J. A., Balsa-Canto, E., García, M.-S. G., & Banga, J. R. (2009). Dynamic optimization of nonlinear processes with an enhanced scatter search method. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48(9), 4388–4401. Recuperado de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie801717t>
- Egea, J. A., Martí, R., & Banga, J. R. (2010). An evolutionary method for complex process optimization. *Comput. Oper. Res.*, 37(2), 315–324. <http://doi.org/10.1016/j.cor.2009.05.003>
- Egea, J. A., Rodríguez-Fernández, M., Banga, J. R., & Martí, R. (2006). Scatter search for chemical and bio-process optimization. *J. Global Optim.*, 37(3), 481–503. <http://doi.org/10.1007/s10898-006-9075-3>
- Esposito, W. R., & Floudas, C. A. (2000). Global optimization for parameter estimation of differential-algebraic systems. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39, 1291–1310. <http://doi.org/10.2478/s11696-009-0017-7>

Fischer, M. J. C., Meyer, S., Claudel, P., Bergdoll, M., & Karst, F. (2011). Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, 108(8), 1883–1892. <http://doi.org/10.1002/bit.23129>

Fogel, D. B. (2005). *Evolutionary Computation: Toward a New Philosophy of Machine Intelligence*. *Evolutionary Computation: Toward a New Philosophy of Machine Intelligence*. New York, USA: Wiley-IEEE Press.

Fogel, L. J., Owens, A. J., & Walsh, M. J. (1966). *Artificial intelligence through simulated evolution*. New York, USA: John Wiley & Sons.

Fogel, L.J., Owens, A.J., and Walsh, M. J. (1997). Global optimization in action - Continuous and Lipschitz optimization: Algorithms, implementations and applications. *J. Oper. Res. Soc.*, 48(4), 449–450.

Foguett, C., & Cascante, M. (2015). Modelización de flujos metabólicos: la era de la fluxómica. *SEBBM*, pp. 17–20.

Fraser, P. D., Schuch, W., & Bramley, P. M. (2000). Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts--partial purification and biochemical properties. *Planta*, 211(3), 361–369.

Frick, S., Nagel, R., Schmidt, A., Bodemann, R. R., Rahfeld, P., Pauls, G., ... Burse, A. (2013). Metal ions control product specificity of isoprenyl diphosphate synthases in the insect terpenoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(11), 4194–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1221489110>

Friesen, J. a, & Rodwell, V. W. (2004). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol.*, 5(11), 248. <http://doi.org/10.1186/gb-2004-5-11-248>

Gachotte, D., Barbuch, R., Gaylor, J., Nickel, E., & Bard, M. (1998). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4

decarboxylase) involved in sterol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(23), 13794–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13794>

Garcia, D. E., & Keasling, J. D. (2014). Kinetics of phosphomevalonate kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 9(1), 16–20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087112>

García-Contreras, R., Vos, P., Westerhoff, H. V., & Boogerd, F. C. (2012). Why in vivo may not equal in vitro - New effectors revealed by measurement of enzymatic activities under the same in vivo-like assay conditions. *FEBS J.*, 279, 4145–4159. <http://doi.org/10.1111/febs.12007>

Gelmi, C., Pérez-Correa, R., & Agosin, E. (2002). Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA 3 production in solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 37, 1033–1040. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00314-4](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00314-4)

Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature*, 3(7), 408–414. <http://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>

Gholamhose, a., Shahouzehi, B., & Sharifi-Fa, F. (2010). Inhibitory Activity of Some Plant Methanol Extracts on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme a Reductase. *Int. J. Pharm.*, 6(5), 705–711. <http://doi.org/10.3923/ijp.2010.705.711>

Gibon, Y., Blaesing, O. E., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M., Hendriks, J. H. M., ... Stitt, M. (2004). A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*, 16, 3304–3325. <http://doi.org/10.1105/tpc.104.025973>

Gilbert, H. F., & Stewart, M. D. (1981). Inactivation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase from yeast by coenzyme A disulfide. *J. Biol. Chem.*, 256(4), 1782–1785.

- Gill, P. E., Murray, W., & Saunders, M. a. (2002). SNOPT: An SQP Algorithm for Large-Scale Constrained Optimization. *SIAM J. Optim.*, 12(4), 979–1006. <http://doi.org/10.1137/S1052623499350013>
- Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P., & Taylor, M. a. (2008). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol.*, 26(3), 139–145. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.003>
- Glover, F. (1977). Heuristics for Integer Programming Using Surrogate Constraints. *Decis. Sci.*, 8(1), 156–166. <http://doi.org/10.1111/j.1540-5915.1977.tb01074.x>
- Goldberg, D. E. (1989). *Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning*. Londres, Inglaterra: Addison Wesley Longman.
- Goldberg, R. N., Tewari, Y. B., & Bhat, T. N. (2004). Thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions - A database for quantitative biochemistry. *Bioinformatics*, 20(16), 2874–2877. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth314>
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343, 425–430.
- Goodwin, G. C., & Payne, R. L. (1977). *Dynamic System Identification, Experimental Design and Data Analysis*. New York, USA: Academic Press.
- Grossmann, I. E. (1996). *Global Optimization in Engineering Design*. Dordrecht, Países Bajos.: Kluwer Academic Publishers.
- Guichard, E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Rev. Int.*, 18(1), 49–70. <http://doi.org/10.1081/fri-120003417>

- Hausmann, a, & Sandmann, G. (2000). A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to beta-carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.*, 30(2), 147–153. <http://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1212>
- Heinrich, R., & Rapoport, T. A. (1974). A Linear Steady-State Treatment of Enzymatic Chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.*, 42, 89–95.
- Henneman, L., Cruchten, A. G. Van, Denis, S. W., Amolins, M. W., Placzek, A. T., Gibbs, R. a, ... Waterham, H. R. (2008). Detection of non-sterol isoprenoids by HPLC-MS/MS. *Anal. Biochem.*, 383(1), 18–24. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2008.08.023>.Detection
- Herdendorf, T. J., & Mizioro, H. M. (2007). Functional evaluation of conserved basic residues in human phosphomevalonate kinase. *Biochemistry*, 46(42), 11780–8. <http://doi.org/10.1021/bi701408t>
- Hibbert, H., & Cannon, L. T. (1924). Condensation of citral with ketones and synthesis of some new ionones. *J. Am. Chem. Soc.*, 46(1), 119–130. <http://doi.org/10.1021/ja01666a017>
- Hiser, L., Bassono, M. E., & Rine, J. (1994). ERG10 from *Saccharomyces cerevisiae* Encodes Acetoacetyl-CoA Thiolase*. *J. Biol. Chem.*, 269(50), 31383–31389.
- Holland, J. H. (1992). *Adaptation in Natural and Artificial Systems: An Introductory Analysis with Applications to Biology, Control, and Artificial Intelligence* (Vol. 69). MA, USA: MIT Press Cambridge.
- Hooke, R., & Jeeves, T. A. (1961). Direct Search Solution of Numerical and Statistical Problems. *J. Assoc. Comput.*, 8, 212–229. <http://doi.org/10.1145/321062.321069>
- Horst, R., & Tuy, H. (1990). *Global Optimization: Deterministic Approaches*. Berlin, Alemania: Springer-Verlag.

Huang, C. S., Lyu, S. C., Chen, J. Y., & Hu, M. L. (2012). The anti-metastatic efficacy of β -ionone and the possible mechanisms of action in human hepatocarcinoma SK-Hep-1 cells. *Br. J. Nutr.*, *107*(5), 631–638. <http://doi.org/10.1017/S0007114511003473>

Huang, F. C., Molnár, P., & Schwab, W. (2009). Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *J. Exp. Bot.*, *60*(11), 3011–3022. <http://doi.org/10.1093/jxb/erp137>

Huth, W., Jonas, R., Wunderlich, I., & Liver, O. (1975). On the Mechanism of Ketogenesis and Its Control. *Eur. J. Biochem.*, *59*, 475–489.

Ignea, C., Pontini, M., Maffei, M. E., Makris, A. M., & Kampranis, S. C. (2014). Engineering monoterpene production in yeast using a synthetic dominant negative geranyl diphosphate synthase. *ACS Synth. Biol.*, *3*(5), 298–306. <http://doi.org/10.1021/sb400115e>

Imperial, S., & Centelles, J. J. (2014). Enzyme Kinetic Equations of Irreversible and Reversible Reactions in Metabolism. *J. Biosci. Med.*, *2*, 24–29.

Jabalquinto, a M., & Cardemil, E. (1989). Substrate binding order in mevalonate 5-diphosphate decarboxylase from chicken liver. *Biochim. Biophys. Acta*, *996*(3), 257–259. [http://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90256-2](http://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90256-2)

Jamieson, D. J. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.*, *174*(20), 6678–6681.

Jaqaman, K., & Danuser, G. (2006). Linking data to models : Data regression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *7*(11), 813–819. <http://doi.org/10.1038/nrm2030>

Jayasimha, P., & Nes, W. D. (2008). Photoaffinity labeling and mutational analysis of 24-C-sterol methyltransferase defines the AdoMet binding site. *Lipids*, *43*(8), 681–93. <http://doi.org/10.1007/s11745-008-3198-x>

- Jeong, T. H., Ji, K., & Kim, Y. T. (2013). Overexpression and Characterization of Lycopene Cyclase (CrtY) from Marine Bacterium *Paracoccus haeundaensis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23(2), 144–148. <http://doi.org/10.4014/jmb.1208.08068>
- Kabolizadeh, M., Parhar, B. K., Pourrahmat, M., & Qaiser, Y. (2012). Carbon dioxide production in wild type and PDC1 mutant *Saccharomyces cerevisiae* undergoing the Crabtree effect. Retrieved October 10, 2016, from <http://ojs.library.ubc.ca/index.php/expedition/article/view/184161>
- Kacser, H., & Burns, J. A. (1973). The Control of Flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 27, 65–104.
- Kacser, H., & Porteous, J. W. (1987). Control of metabolism: what do we have to measure? *Trends Biochem. Sci.*, 12, 5–14. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90005-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(87)90005-3)
- Kang, C.-H., Jayasooriya, R. G. P. T., Choi, Y. H., Moon, S.-K., Kim, W.-J., & Kim, G.-Y. (2013). β -Ionone attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators such as NO, PGE2 and TNF- α in BV2 microglial cells via suppression of the NF- κ B and MAPK pathway. *Toxicol. In Vitro.*, 27(2), 782–7. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.012>
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Baldwin, B. C., Corran, A. J., & Kelly, D. E. (1997). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J. Biol. Chem.*, 272(15), 9986–9988. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.15.9986>
- Khodayari, A., Zomorodi, A. R., Liao, J. C., & Maranas, C. D. (2014). A kinetic model of *Escherichia coli* core metabolism satisfying multiple sets of mutant flux data. *Metab. Eng.*, 25, 50–62. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.05.014>

- Kirby, J., & Keasling, J. D. (2009). Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60, 335–355.
<http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091955>
- Kitahama, Y., Nakamura, M., Yoshida, Y., & Aoyama, Y. (2009). The construction and characterization of self-sufficient lanosterol 14-demethylase fusion proteins consisting of yeast CYP51 and its reductase. *Biol. Pharm. Bull.*, 32(4), 558–63.
<http://doi.org/10.1248/bpb.32.558>
- Kittleman, W., Thibodeaux, C. J., Liu, Y., Zhang, H., & Liu, H. (2008). Characterization and Mechanistic Studies of Type II Isopentenyl Diphosphate:Dimethylallyl Diphosphate Isomerase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, 46(28), 8401–8413.
- König, M., Bulik, S., & Holzhütter, H.-G. (2012). Quantifying the Contribution of the Liver to Glucose Homeostasis: A Detailed Kinetic Model of Human Hepatic Glucose Metabolism. *PLoS Comput. Biol.*, 8(6), e1002577.
<http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002577>
- Kornblatt, J. A., & Rudney, H. (1971). of Acetoacetyl Coenzyme A Thiolase in Yeast. *J. Biol. Chem.*, 246(14), 4417–4423.
- Krebs, O., Golebiewski, M., Kania, R., Mir, S., Saric, J., Weidemann, A., ... Rojas, I. (2007). SABIO-RK: A data warehouse for biochemical reactions and their kinetics. *J. Integr. Bioinf.*, 4, 9.
- Krepkiy, D., & Miziorko, H. M. (2004). Identification of active site residues in mevalonate diphosphate decarboxylase: implications for a family of phosphotransferases. *Protein Sci.*, 13(7), 1875–1881.
<http://doi.org/10.1110/ps.04725204>

- Laden, B. P., Tang, Y., & Porter, T. D. (2000). Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 374(2), 381–388. <http://doi.org/10.1006/abbi.1999.1629>
- Lagarias, J. C., Reeds, J. A., Wright, M. H., & Wright, P. E. (1998). Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions. *SIAM J. Optim.*, 9, 112–147. <http://doi.org/10.1137/S1052623496303470>
- Laguna, M., & Marti, R. (2003). *Scatter Search: Methodology and Implementations in C*. New York, USA: Springer Science+Business Media.
- Laguna, M., & Martí, R. (2005). Experimental testing of advanced scatter search designs for global optimization of multimodal functions. *J. Global Optim.*, 33(2), 235–255. <http://doi.org/10.1007/s10898-004-1936-z>
- Lalko, J., Lapczynski, A., Letizia, C. S., & Api, a. M. (2007). Fragrance material review on - β -ionone. *Food Chem. Toxicol.*, 45(11 SUPPL.), S241–S247. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.044>
- Lamb, D. C., Andrew G. S. Warrilow, Venkateswarlu, K., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2001). Activities and kinetic mechanisms of native and soluble NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286(1), 48–54. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5338>
- Lange, B. M., Mahmoud, S. S., Wildung, M. R., Turner, G. W., Davis, E. M., Lange, I., ... Croteau, R. B. (2011). Improving peppermint essential oil yield and composition by metabolic engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(41), 16944–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1111558108>
- Lange, N., & Steinbüchel, A. (2011). β -Carotene production by *Saccharomyces cerevisiae* with regard to plasmid stability and culture media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91(6), 1611–1622. <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3315-2>

- Laue, T., & Demeler, B. (2011). A postreductionist framework for protein biochemistry. *Nat. Chem. Biol.*, 7, 331–334. <http://doi.org/10.1038/nchembio.575>
- Layer, J. V., Barnes, B. M., Yamasaki, Y., Barbuch, R., Li, L., Taramino, S., ... Bard, M. (2013). Characterization of a mutation that results in independence of oxidosqualene cyclase (Erg7) activity from the downstream 3-ketoreductase (Erg27) in the yeast ergosterol biosynthetic pathway. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Biol. Lipids*, 1831(2), 361–369. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.09.012>
- Leffingwell, & Associates. (2015). 2011-2015 Flavor & Fragrance Industry Leaders. Retrieved October 1, 2016, from http://www.leffingwell.com/top_10.htm
- Leiva, K., Werner, N., Sepúlveda, D., Barahona, S., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2015). Identification and functional characterization of the CYP51 gene from the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* that is involved in ergosterol biosynthesis. *BMC Microbiology*, 15(1), 89. <http://doi.org/10.1186/s12866-015-0428-2>
- Lepesheva, G. I., & Waterman, M. R. (2007). Sterol 14 alpha-Demethylase Cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological Kingdoms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1770(3), 467–477. <http://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>.Use
- Li, Q., Sun, Z., Li, J., & Zhang, Y. (2013). Enhancing beta-carotene production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *FEMS Microbiol. Lett.*, 345(2), 94–101. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12187>
- Liebermeister, W., & Klipp, E. (2006). Bringing metabolic networks to life: convenience rate law and thermodynamic constraints. *Theor Biol Med Model.*, 3, 41. <http://doi.org/10.1186/1742-4682-3-41>
- Liu, J., & Nes, W. D. (2009). Steroidal triterpenes: Design of substrate-based inhibitors of ergosterol and sitosterol synthesis. *Molecules*, 14(11), 4690–4706. <http://doi.org/10.3390/molecules14114690>

- Liu, J., Zhang, W., Du, G., Chen, J., & Zhou, J. (2013). Overproduction of geraniol by enhanced precursor supply in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 168(4), 446–451. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.017>
- Liu, J.-R., Sun, X.-R., Dong, H.-W., Sun, C.-H., Sun, W.-G., Chen, B.-Q., ... Yang, B.-F. (2008). β -Ionone suppresses mammary carcinogenesis, proliferative activity and induces apoptosis in the mammary gland of the Sprague-Dawley rat. *Int. J. Cancer*, 122(12), 2689–2698. <http://doi.org/10.1002/ijc.23453>
- Lo, C. H., Chang, Y. H., Wright, J. D., Chen, S. H., Kan, D., Lim, C., & Liang, P. H. (2009). Combined experimental and theoretical study of long-range interactions modulating dimerization and activity of yeast geranylgeranyl diphosphate synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(11), 4051–4062. <http://doi.org/10.1021/ja808699c>
- LoGrasso, P. V., Soltis, D. A., & Boettcher, B. R. (1993). Overexpression, purification, and kinetic Characterization of a Carbonyl-Terminal- Truncated Yeast Squalene Synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 307(1), 193–199.
- Longo, M. A., & Sanromán, M. A. (2006). Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(3), 335–353.
- López, J., Essus, K., Kim, I., Pereira, R., Herzog, J., Siewers, V., ... Agosin, E. (2015). Production of β -ionone by combined expression of carotenogenic and plant CCD1 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.*, 14(1), 84. <http://doi.org/10.1186/s12934-015-0273-x>
- Lu, W., Clasquin, M. F., Melamud, E., Amador-Noguez, D., Caudy, A. a., & Rabinowitz, J. D. (2010). Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 82(8), 3212–3221. <http://doi.org/10.1021/ac902837x>

- Ly, M. H., Hoang, L. C., Belin, J. M., & Waché, Y. (2008). Improved co-oxidation of β -carotene to β -ionone using xanthine oxidase-generated reactive oxygen species in a multiphasic system. *Biotechnol. J.*, 3(2), 220–225. <http://doi.org/10.1002/biot.200700064>
- M'Baya, B., & Karst, F. (1987). In vitro assay of squalene epoxidase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147(2), 556–564. [http://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)90967-3](http://doi.org/10.1016/0006-291X(87)90967-3)
- Maarleveld, T. R., Khandelwal, R. a., Olivier, B. G., Teusink, B., & Bruggeman, F. J. (2013). Basic concepts and principles of stoichiometric modeling of metabolic networks. *Biotechnol. J.*, 8(9), 997–1008. <http://doi.org/10.1002/biot.201200291>
- Madsen, K., Nielsen, H. B., & Tingleff, O. (2004). *Methods for Non-Linear Least Squares Problems*. Dinamarca: IMM DTU.
- Maldonado-Robledo, G., Rodriguez-Bustamante, E., Sanchez-Contreras, A., Rodriguez-Sanoja, R., & Sanchez, S. (2003). Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62(5-6), 484–488. <http://doi.org/10.1007/s00253-003-1315-6>
- Mannan, A. a., Toya, Y., Shimizu, K., McFadden, J., Kierzek, A. M., & Rocco, A. (2015). Integrating kinetic model of *E. coli* with genome scale metabolic fluxes overcomes its open system problem and reveals bistability in central metabolism. *PLoS ONE*, 10(10), 1–36. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0139507>
- Martinez-Moya, P., Watt, S. A., Niehaus, K., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2015). Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.*, 11(1), 131. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-11-131>
- Maury, J., Asadollahi, M. a., Møller, K., Clark, A., & Nielsen, J. (2005). Microbial isoprenoid production: An example of green chemistry through metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 100, 19–51. <http://doi.org/10.1007/b136410>

Meléndez-hevia, E., Riol-Cimas, J. M., & Torres, N. V. (1987). La teoría del control y su aplicación al metabolismo. *Anales de Química*, 83(2), 224–243.

Michalewicz, Z. (1996). *Genetic Algorithms + Data Structures = Evolution Programs* (3rd ed., Vol. 95). Berlín, New York: Springer Verlag.

Middleton, B. (1972). The kinetic mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase from baker's yeast. *Biochem. J.*, 126(1), 35–47. Recuperado de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1178349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Middleton, B. (1974). The kinetic mechanism and properties of the cytoplasmic acetoacetyl-coenzyme A thiolase from rat liver. *Biochem. J.*, 139, 109–121.

Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 505(2), 131–143. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>

Moise, A., Salim, A.-B., & Eleanore, W. (2014). Mechanistic aspects of Carotenoid Biosynthesis. *Chem. Rev.*, 114(1), 164–193. <http://doi.org/10.1021/cr400106y.MECHANISTIC>

Moles, C. G., Moles, C. G., Mendes, P., Mendes, P., Banga, J. R., & Banga, J. R. (2003). Parameter Estimation in Biochemical Pathways: A Comparison of Global Optimization Methods. *Genome Res.*, 2467–2474. <http://doi.org/10.1101/gr.1262503>.

Moore, W. R., & Schatzman, G. L. (1992). Purification of 2,3 - Oxidosqualene Cyclase from Rat Liver. *J. Chem. Inf. Model.*, 267(31), 22003–22006. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Morikawa, T. (2006). Cytochrome P450 CYP710A Encodes the Sterol C-22 Desaturase in Arabidopsis and Tomato. *Plant Cell*, 18(4), 1008–1022. <http://doi.org/10.1105/tpc.105.036012>

Munack, A. (2001). Optimization of Sampling. In H.-J. Rehm & G. Reed (Eds.), *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (2nd ed., pp. 251–264). Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Nacke, C., Hüttmann, S., Etschmann, M. M. W., & Schrader, J. (2012). Enzymatic production and in situ separation of natural β -ionone from β -carotene. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39(12), 1771–1778. <http://doi.org/10.1007/s10295-012-1182-1>

Nagegowda, D. a, Bach, T. J., & Chye, M.-L. (2004). Brassica juncea 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA synthase 1: expression and characterization of recombinant wild-type and mutant enzymes. *Biochem. J.*, 383, 517–527. <http://doi.org/10.1042/BJ20040721>

Neal, W. D., & Parks, L. W. (1977). Sterol 24(28) methylene reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 129(3), 1375–1378.

Nelder, J. A., & Mead, R. (1965). A simplex-method for function minimization. *Comput. J.*, 7, 308–313. <http://doi.org/10.1093/comjnl/7.4.308>.

Nes, W. D., Marshall, J. a., Jia, Z., Jaradat, T. T., Song, Z., & Jayasimha, P. (2002). Active site mapping and substrate channeling in the sterol methyltransferase pathway. *J. Biol. Chem.*, 277(45), 42549–42556. <http://doi.org/10.1074/jbc.M204223200>

Nes, W. D., Zhou, W., Dennis, A. L., Li, H., Jia, Z., Keith, R. a., ... Furlong, S. T. (2002). Purification, characterization and catalytic properties of human sterol 8-isomerase. *Biochem. J.*, 367, 587–599. <http://doi.org/10.1042/BJ20020551>

Neumaier, A., Shcherbina, O., Huyer, W., & Vinkó, T. (2005). A comparison of complete global optimization solvers. *Math. Prog.*, 103(2), 335–356. <http://doi.org/10.1007/s10107-005-0585-4>

Nishimura, T., Saito, T., & Tomita, K. (1978). Purification and Properties of beta-Ketothiolase from *Zoogloea ramigera*. *Arch. Microbiol.*, 116, 21–27.

OECD SIDS. (2004). *β -ionone [(E)-4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)- 3-buten-2-one]* CAS N°: 79-77-6. París, Francia. Recuperado de www.inchem.org/documents/sids/sids/79776.pdf

Ohloff, G., & Schade, G. (1963). Preparation of γ -Ionone from all-trans-pseudoionone. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2(3), 149–150. <http://doi.org/10.1002/anie.196301493>

Oldfield, E., & Lin, F.-Y. (2012). Terpene Biosynthesis: Modularity Rules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51(5), 1124–1137. <http://doi.org/10.1002/anie.201103110>. Terpene

Olsen, K. M., Slimestad, R., Lea, U. S., Brede, C., Løvda, T., Ruoff, P., ... Lillo, C. (2009). Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: Experimental and kinetic model studies. *Plant Cell Environ.*, 32, 286–299. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01920.x>

Ono, T., & Imai, Y. (1985). Squalene epoxidase from rat liver microsomes. *Methods Enzymol.*, 110, 375–80. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3927114>

Paalme, T., Elken, R., Vilu, R., & Korhola, M. (1997). Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat). *Enzyme Microb. Technol.*, 20(3), 174–181. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00114-7](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00114-7)

Paik, Y. K., Billheimer, J. T., Magolda, R. L., & Gaylor, J. L. (1984). Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from lanosterol. *J. Biol. Chem.*, 259(21), 13413–13423.

Pak, V. V., Koo, M., Kim, M. J., Yang, H. J., Yun, L., & Kwon, D. Y. (2007). Modeling an active conformation for linear peptides and design of a competitive inhibitor for HMG-CoA reductase. *J. Mol. Recognit.*, 21(4), 224–32. <http://doi.org/10.1002/jmr.889>

Palsson, B. Ø. (2006). *Systems Biology - properties of reconstructed networks*. New York, USA: Cambridge, University Press.

Parks, L. W., & Casey, W. M. (1995). Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 95–116. <http://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.000523>

Petersen, B. (2000). *Calibration, Identifiability and Optimal Experimental Design of Activated Sludge Models*. Tesis Ph.D. en Ciencias Biológicas Aplicadas, Depto. de Matemáticas aplicadas, Biométricas y Procesos de Control, Universidad de Gent.

Pfau, T., Christian, N., & Ebenhöf, O. (2011). Systems approaches to modelling pathways and networks. *Brief. Funct. Genomics*, 10, 266–279. <http://doi.org/10.1093/bfpg/elr022>

Pham, H. T. B., Larsson, G., & Enfors, S. O. (1999). Modelling of aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a pH-auxostat. *Bioprocess Eng.*, 20(6), 537–544. <http://doi.org/10.1007/s004490050626>

Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L. N., Domon, B., & Aebersold, R. (2009). Full Dynamic Range Proteome Analysis of *S. cerevisiae* by Targeted Proteomics. *Cell*, 138(4), 795–806. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.051>

Pilloff, D., Dabovic, K., Romanowski, M. J., Bonanno, J. B., Doherty, M., Burley, S. K., & Leyh, T. S. (2003). The kinetic mechanism of phosphomevalonate kinase. *J. Biol. Chem.*, 278(7), 4510–4515. <http://doi.org/10.1074/jbc.M210551200>

Piques, M., Schulze, W. X., Höhne, M., Usadel, B., Gibon, Y., Rohwer, J., & Stitt, M. (2009). Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in *Arabidopsis*. *Mol. Syst. Biol.*, 5(314), 314. <http://doi.org/10.1038/msb.2009.68>

Price, N. D., Papin, J. a., Schilling, C. H., & Palsson, B. O. (2003). Genome-scale microbial in silico models: The constraints-based approach. *Trends Biotechnol.*, 21(4), 162–169. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00030-1](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00030-1)

- Radisky, E. S., & Poulter, C. D. (2000). Squalene Synthase : Steady-State , Pre-Steady-State , and Isotope-Trapping Studies †. *Biochemistry*, 39(7), 1748–1760.
- Rahier, A., Pierre, S., Riveill, G., & Karst, F. (2008). Identification of essential amino acid residues in a sterol 8,7-isomerase from *Zea mays* reveals functional homology and diversity with the isomerases of animal and fungal origin. *Biochem. J.*, 414(2), 247–259. <http://doi.org/10.1042/BJ20080292>
- Rahimtula, A. D., & Gaylor, J. L. (1972). Investigation of the Component Reactions of Oxidative Sterol Demethylation. *J. Biol. Chem.*, 247(1), 9–15.
- Reed, J. L., & Palsson, B. Ø. (2003). Thirteen Years of Building Constraint-Based In Silico Models of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 185(9), 2692–2699. <http://doi.org/10.1128/JB.185.9.2692>
- Rios-Esteva, R., & Lange, B. M. (2007). Experimental and mathematical approaches to modeling plant metabolic networks. *Phytochemistry*, 68, 2351–2374. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.021>
- Rios-Esteva, R., Lange, I., Lee, J. M., & Lange, B. M. (2010). Mathematical modeling-guided evaluation of biochemical, developmental, environmental, and genotypic determinants of essential oil composition and yield in peppermint leaves. *Plant Physiol.*, 152(4), 2105–2119. <http://doi.org/10.1104/pp.109.152256>
- Rios-Esteva, R., Turner, G. W., Lee, J. M., Croteau, R. B., & Lange, B. M. (2008). A systems biology approach identifies the biochemical mechanisms regulating monoterpene essential oil composition in peppermint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(8), 2818–2823. <http://doi.org/10.1073/pnas.0712314105>
- Rodríguez-Bustamante, E., & Sánchez, S. (2007). Microbial production of C13-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage. *Crit. Rev. Microbiol.*, 33(3), 211–230. <http://doi.org/10.1080/10408410701473306>

Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2002). Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids . A Metabolic Milestone Achieved through Genomics 1. *Plant Physiol.*, 130, 1079–1089. <http://doi.org/10.1104/pp.007138.ISOPRENOID>

Rodríguez-Fernández, M., Egea, J. a, & Banga, J. R. (2006). Novel metaheuristic for parameter estimation in nonlinear dynamic biological systems. *BMC Bioinformatics*, 7, 483. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-7-483>

Rodríguez-Fernández, M., Mendes, P., & Banga, J. R. (2006). A hybrid approach for efficient and robust parameter estimation in biochemical pathways. *BioSystems*, 83(2-3), 248–265. <http://doi.org/10.1016/j.biosystems.2005.06.016>

Rohwer, J. M. (2012). Kinetic modelling of plant metabolic pathways. *J. Exp. Bot.*, 63(6), 2275–2292. <http://doi.org/10.1093/jxb/ers080>

Rohwer, J. M., Hanekom, A. J., Crous, C., Snoep, J. L., & Hofmeyr, J. H. S. (2006). Evaluation of a simplified generic bi-substrate rate equation for computational systems biology. *IEE Proc.-Syst. Biol.*, 153(5), 338–341. <http://doi.org/10.1049/ip-syb>

Rohwer, J. M., Hanekom, A. J., & Hofmeyr, J. S. (2007). A Universal Rate Equation for Systems Biology. In M. Hicks & C. Kettner (Eds.), *Experimental standard conditions of enzyme characterizations. Proceedings of the 2nd International Beilstein Workshop*. (pp. 175–187). Frankfurt: Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften.

Royals, E. E. (1946). Cyclization of pseudoionone by acidic reagents. *Ind. Eng. Chem.*, 38(5), 546–548. <http://doi.org/10.1021/ie50437a028>

Rubio, A., Rambla, J. L., Santaella, M., Gómez, M. D., Orzaez, D., Granell, A., & Gómez-Gómez, L. (2008). Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in b-ionone release. *J. Biol. Chem.*, 283(36), 24816–24825. <http://doi.org/10.1074/jbc.M804000200>

Runarsson, T. P., & Yao, X. (2000). Stochastic ranking for constrained evolutionary optimization. *IEEE Trans. Evolut. Comput.*, 4(3), 284–294. <http://doi.org/10.1109/4235.873238>

Saa, P. a., & Nielsen, L. K. (2016). Construction of feasible and accurate kinetic models of metabolism: A Bayesian approach. *Scientific Reports*, 6(29635). <http://doi.org/10.1038/srep29635>

Sacher, J., Saa, P., Cárcamo, M., López, J., Gelmi, C. a., & Pérez-Correa, R. (2011). Improved calibration of a solid substrate fermentation model. *Electron. J. Biotechnol.*, 14(5), 1–19. <http://doi.org/10.2225/vol14-issue5-fulltext-7>

Sagami, H., Ishii, K., & Ogura, K. (1985). Geranylgeranylpyrophosphate synthetase of pig liver. *Methods Enzymol.*, 110, 184–188. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)10074-1](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)10074-1)

Sánchez, B. J., & Nielsen, J. (2015). Genome scale models of yeast: Towards standardized evaluation and consistent omic integration. *Integr. Biol.*, 846–858. <http://doi.org/10.1039/C5IB00083A>

Sánchez, B. J., Pérez-Correa, J. R., & Agosin, E. (2014). Construction of robust dynamic genome-scale metabolic model structures of *Saccharomyces cerevisiae* through iterative re-parameterization. *Metab. Eng.*, 25, 159–173. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2014.07.004>

Satoh, T., Horie, M., Watanabe, H., Tsuchiya, Y., & Kamei, T. (1993). Enzymatic properties of squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Pharm. Bull.*, 16(4), 349–52. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8358382>

Saucy, G., & Marbet, R. (1967). Über eine neuartige Synthese von β -Ketoallen durch Reaktion von tertiären Acetylen-carbinolen mit Vinyläthern eine ergiebige methode zur

darstellung des Pseudojonons und verwandter verbindungen. *Helv. Chim. Acta*, 50(4), 1158–1167. <http://doi.org/10.1002/hlca.19670500423>

Savoglidis, G., da Silveira dos Santos, A. X., Riezman, I., Angelino, P., Riezman, H., & Hatzimanikatis, V. (2016). A method for analysis and design of metabolism using metabolomics data and kinetic models: Application on lipidomics using a novel kinetic model of sphingolipid metabolism. *Metab. Eng.*, 37, 46–62. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.04.002>

Scalcinati, G., Partow, S., Siewers, V., Schalk, M., Daviet, L., & Nielsen, J. (2012). Combined metabolic engineering of precursor and co-factor supply to increase alpha-santalene production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* <http://doi.org/10.1186/1475-2859-11-117>

Schallau, K., & Junker, B. H. (2010). Simulating Plant Metabolic Pathways with Enzyme-Kinetic Models. *Plant Physiol.*, 152, 1763–1771. <http://doi.org/10.1104/pp.109.149237>

Schomburg, I., Chang, A., Ebeling, C., Gremse, M., Heldt, C., Huhn, G., & Schomburg, D. (2004). BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res.*, 32, D431–D433. <http://doi.org/10.1093/nar/gkh081>

Schulte, a E., van der Heijden, R., & Verpoorte, R. (2000). Purification and characterization of mevalonate kinase from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Arch. Biochem. Biophys.*, 378(2), 287–298. <http://doi.org/10.1006/abbi.2000.1779>

Schwartz, S. H., Qin, X., & Loewen, M. C. (2004). The Biochemical Characterization of Two Carotenoid Cleavage Enzymes from *Arabidopsis* Indicates That a Carotenoid-derived Compound Inhibits Lateral Branching. *J. Biol. Chem.*, 279(45), 46940–46945. <http://doi.org/10.1074/jbc.M409004200>

Schwartz, S. H., Qin, X., & Zeevaart, J. a D. (2001). Characterization of a Novel Carotenoid Cleavage Dioxygenase from Plants. *J. Biol. Chem.*, 276(27), 25208–25211. <http://doi.org/10.1074/jbc.M102146200>

Schwefel, H.-P. (1995). *Evolution and Optimum Seeking*. New York, USA: Wiley.

Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. New York, USA: John Wiley & Sons.

Shang, F., Wen, S., Wang, X., & Tan, T. (2006). Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 122(3), 285–292. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.020>

Simkin, A. J., Underwood, B. A., Auldrige, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., ... Klee, H. J. (2004). Circadian Regulation of the PhCCD1 Carotenoid Cleavage Dioxygenase Controls Emission of -Ionone, a Fragrance Volatile of Petunia Flowers. *Plant Physiol.*, 136(3), 3504–3514. <http://doi.org/10.1104/pp.104.049718>

Smallbone, K., Messiha, H. L., Carroll, K. M., Winder, C. L., Malys, N., Dunn, W. B., ... Mendes, P. (2013). A model of yeast glycolysis based on a consistent kinetic characterisation of all its enzymes. *FEBS Lett.*, 587(17), 2832–2841. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.043>

Song, L., & Poulter, C. D. (1994). Yeast farnesyl-diphosphate synthase: site-directed mutagenesis of residues in highly conserved prenyltransferase domains I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(8), 3044–3048. <http://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3044>

Sriram, K., Rodriguez-Fernandez, M., & Doyle, F. J. (2012). Modeling cortisol dynamics in the neuro-endocrine axis distinguishes normal, depression, and post-traumatic stress disorder (PTSD) in humans. *PLoS Comput. Biol.*, 8(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002379>

Steckelbroeck, S., Jin, Y., Gopishetty, S., Oyesanmi, B., & Penning, T. M. (2004). Human cytosolic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity: Implications for steroid hormone metabolism and action. *J. Biol. Chem.*, 279(11), 10784–10795. <http://doi.org/10.1074/jbc.M313308200>

Storn, R., & Price, K. (1997). Differential Evolution -- A Simple and Efficient Heuristic for global Optimization over Continuous Spaces. *J. Global Optim.*, 11(4), 341–359. <http://doi.org/10.1023/A:1008202821328>

Street, I. P., & Poulter, C. D. (1990). Isopentenylidiphosphate: Dimethylallyldiphosphate isomerase: Construction of a High-Level Heterologous Expression System for the Gene from *Saccharomyces cerevisiae* and Identification of an Active-Site Nucleophile. *Biochemistry*, 29(32), 7531–7538.

Suh, J. K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M., & Robertus, J. D. (1996). Molecular cloning and kinetic characterization of a flavin-containing monooxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 336(2), 268–274. <http://doi.org/10.1006/abbi.1996.0557>

Szabo, C. M., Matsumura, Y., Fukura, S., Martin, M. B., Sanders, J. M., Sengupta, S., ... Oldfield, E. (2002). Inhibition of geranylgeranyl diphosphate synthase by bisphosphonates and diphosphates: A potential route to new bone antiresorption and antiparasitic agents. *J. Med. Chem.*, 45(11), 2185–2196. <http://doi.org/10.1021/jm010412y>

Tachibana, A., Tanaka, T., Taniguchi, M., & Oi, S. (1993). Potassium-Stimulating Mechanism of Geranylgeranyl Diphosphate Synthase of *Methanobacterium thermoformicum* SF-4. *J. Biochem.*, 114(3), 389–392. Recuperado de <http://jb.oxfordjournals.org.sci-hub.club/content/114/3/389.short>

Taton, M., Benveniste, P., & Rahier, A. (1989). Microsomal $\Delta^8,14$ -sterol Δ^14 -reductase in higher plants. Characterization and inhibition by analogues of a presumptive carbocationic intermediate of the reduction reaction. *Eur. J. Biochem.*, *185*(3), 605–614. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15156.x>

Thulasiram, H. V. (2007). Chimeras of Two Isoprenoid Synthases in Isoprenoid Biosynthesis. *Science*, *73*(2007), 73–76. <http://doi.org/10.1126/science.1137786>

Tiemann, F. (1896). Aromatic ketone and process of making same. US N°556943 A. Estados Unidos: Oficina de Patentes de Estados Unidos.

Tiemann, F., & Krüger, P. (1893). Ueber Veilchenaroma. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, *26*(3), 2675–2708. <http://doi.org/10.1002/cber.18930260373>

Törn, A., Ali, M., & Viitanen, S. (1999). Stochastic Global Optimization : Problem Classes and Solution Techniques. *J. Global Optim.*, *14*, 437–447.

Trikka, F. a, Nikolaidis, A., Athanasakoglou, A., Andreadelli, A., Ignea, C., Kotta, K., ... Makris, A. M. (2015). Iterative carotenogenic screens identify combinations of yeast gene deletions that enhance sclareol production. *Microb. Cell Fact.*, *14*(1), 60. <http://doi.org/10.1186/s12934-015-0246-0>

Trzaskos, J., Kawata, S., & Gaylor, L. (1986). Microsomal Enzymes of Cholesterol Biosynthesis from Lanosterol. *J. Biol. Chem.*, *260*(11), 6609–6617.

Van de Poel, B., Bulens, I., Hertog, M. L. a T. M., Nicolai, B. M., & Geeraerd, A. H. (2014). A transcriptomics-based kinetic model for ethylene biosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit: development, validation and exploration of novel regulatory mechanisms. *New Phytol.*, *202*(3), 952–963. <http://doi.org/10.1111/nph.12685>

Van Eunen, K., Bouwman, J., Daran-Lapujade, P., Postmus, J., Canelas, A. B., Mensonides, F. I. C., ... Bakker, B. M. (2010). Measuring enzyme activities under

standardized in vivo-like conditions for systems biology. *FEBS J.*, 277, 749–760. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07524.x>

Van Hoek, P., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (1998). Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker's Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(11), 4226–4233. Recuperado de <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/64/11/4226>

Varner, J., & Ramkrishna, D. (1999). Mathematical models of metabolic pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(2), 146–150. [http://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)80025-1](http://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80025-1)

Veen, M., Stahl, U., & Lang, C. (2003). Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in. *FEMS Yeast Research*, 4(1), 87–95. [http://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00126-0](http://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00126-0)

Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., & Mossel, M. Van. (2003). Metabolic Engineering of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in the Yeast. *Society*, 69(7), 3728–3738. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3728>

Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J. P., Visser, H., Sandmann, G., Van Den Berg, J. a., & Van Ooyen, A. J. J. (2007). High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(13), 4342–4350. <http://doi.org/10.1128/AEM.02759-06>

Vogel, J. T., Tan, B. C., McCarty, D. R., & Klee, H. J. (2008). The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *J. Biol. Chem.*, 283(17), 11364–11373. <http://doi.org/10.1074/jbc.M710106200>

Waché, Y., Bosser-De Ratuld, A., & Belin, J. M. (2006). Dispersion of β -carotene in processes of production of β -ionone by cooxidation using enzyme-generated reactive

oxygen species. *Process Biochem.*, 41(11), 2337–2341.
<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.010>

Walter, M. H., Floss, D. S., & Strack, D. (2010). Apocarotenoids: Hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta*, 232(1), 1–17.
<http://doi.org/10.1007/s00425-010-1156-3>

Walter, M. H., & Strack, D. (2011). Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat. Prod. Rep.*, 28(4), 663–692.
<http://doi.org/10.1039/C0NP00036A>

Wang, G., Tang, W., & Bidigare, R. R. (2005). Terpenoids as Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. In L. Zhang & A. L. Demain (Eds.), *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine* (pp. 197–227). Totowa: Humana Press.

Weaver, L. J., Sousa, M. M. L., Wang, G., Baidoo, E., Petzold, C. J., & Keasling, J. D. (2015). A kinetic-based approach to understanding heterologous mevalonate pathway function in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 112(1), 111–119.
<http://doi.org/10.1002/bit.25323>

Wiechert, W., & Noack, S. (2011). Mechanistic pathway modeling for industrial biotechnology: Challenging but worthwhile. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22(5), 604–610.
<http://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.001>

Williams, S. P., Fulton, a M., & Brindle, K. M. (1993). Estimation of the intracellular free ADP concentration by ¹⁹F NMR studies of fluorine-labeled yeast phosphoglycerate kinase in vivo. *Biochemistry*, 32(18), 4895–4902.

Wu, S., & Chappell, J. (2008). Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19(2), 145–152.
<http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.007>

- Wu, W. I., Liu, Y., Riedel, B., Wissing, J. B., Fischl, A. S., & Carman, G. M. (1996). Purification and characterization of diacylglycerol pyrophosphate phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 271(4), 1868–1876. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.4.1868>
- Wu, Z., Robinson, D. S., Hughes, R. K., Casey, R., Hardy, D., & West, S. I. (1999). Co-oxidation of β -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *J. Agric. Food Chem.*, 47(12), 4899–4906. <http://doi.org/10.1021/jf9901690>
- Wu, Z., Wouters, J., & Poulter, C. D. (2005). Isopentenyl Diphosphate Isomerase. Mechanism-Based Inhibition by Diene Analogues of Isopentenyl Diphosphate and Dimethylallyl Diphosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(49), 17433–17438. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Xu, M., Chen, Y., Xu, J., Ao, P., & Zhu, X. (2016). Kinetic model of metabolic network for xiamenmycin biosynthetic optimisation. *IET Syst. Biol.*, 10(1), 17–22. <http://doi.org/10.1049/iet-syb.2014.0054>
- Ye, Y. (1987). *Interior algorithms for linear, quadratic and linearly constrained non-linear programming*. Tesis PhD, Dpto. de ESS, Universidad de Stanford.
- Zelena, K., Hardebusch, B., Hülldau, B., Berger, R. G., & Zorn, H. (2009). Generation of norisoprenoid flavors from carotenoids by fungal peroxidases. *J. Agric. Food Chem.*, 57(21), 9951–9955. <http://doi.org/10.1021/jf901438m>
- Zhao, J., Bao, X., Li, C., Shen, Y., & Hou, J. (2016). Improving monoterpene geraniol production through geranyl diphosphate synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(10), 4561–4571. <http://doi.org/10.1007/s00253-016-7375-1>

Zhu, J., Zhang, L., Jin, X., Han, X., Sun, C., & Yan, J. (2010). β -Ionone-induced apoptosis in human osteosarcoma (U2os) cells occurs via a p53-dependent signaling pathway. *Mol. Biol. Rep.*, 37(6), 2653–2663. <http://doi.org/10.1007/s11033-009-9793-y>

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., & Berger, R. G. (2003). Cleavage of beta,beta-carotene to flavor compounds by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62(4), 331–6. <http://doi.org/10.1007/s00253-003-1309-4>

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M., & Berger, R. G. (2003). A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β,β -carotene to flavor compounds. *Biol. Chem.*, 384(7), 1049–1056. <http://doi.org/10.1515/BC.2003.117>

Zweytick, D., Hrastnik, C., & Kohlwein, S. (2000). Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24 (28) reductase, Erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 470, 3–7. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579300012904>

ANEXOS

APÉNDICE A: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla A-1: Constantes enzimáticas empleadas en los estudios de modelación.

Enzima	Organismo	k_{cat} (s^{-1})		Organismo	K_m (mM)		Referencia
ERG10	<i>Z. ramigera</i>	k_{cat}	2,1	<i>Z. ramigera</i>	$K_{m_Acetil-CoA}$	0,33	(Nishimura et al. 1978)
					$K_{m_acetoacetil-CoA}$	0,024	(Davis et al., 1987)
					K_{m_CO2}	0,0085	(Nishimura et al., 1978)
ERG13	<i>B. juncea</i>	k_{cat}	0,415	<i>S. cerevisiae</i>	$K_{m_acetoacetil-CoA}$	0,0004	(Nagegowda et al. 2004)
					$K_{m_Acetil-CoA}$	0,018	(Middleton, 1972)
HMGR	<i>R. norvegicus</i>	k_{cat}	0,023	<i>H. sapiens</i>	$K_{m_HMG-CoA}$	0,6	(Pak et al., 2007)
					K_{m_NADPH}	0,021	(Gholamhose et al. 2010)
ERG12	<i>S. cerevisiae</i>	k_{cat}	38	<i>R. norvegicus</i>	K_{m_MVA}	0,131	(Primak et al., 2011)
					K_{m_ATP}	0,96	(Chu & Li, 2003)
ERG8	<i>S. cerevisiae</i>	k_{cat}	10	<i>S. cerevisiae</i>	K_{m_MVA-P}	0,885	(Garcia & Keasling, 2014)
					K_{m_ATP}	0,098	
				<i>H. sapiens</i>	K_{m_ADP}	0,047	(Herdendorf & Miziorko, 2007)
					K_{m_MVA-PP}	0,041	
MVD1	<i>S. cerevisiae</i>	k_{cat}	4,9	<i>S. cerevisiae</i>	K_{m_MVA-PP}	0,123	(Krepkiy & Miziorko, 2004)
					K_{m_ATP}	0,061	
IDI1	<i>S. aureus</i>	k_{cat}	0,69	<i>S. cerevisiae</i>	K_{m_IPP}	0,043	(Kittleman et al., 2008)
				<i>M. piperita</i>	K_{m_DMAPP}	0,0051	(Street & Poulter, 1990)
							(Rios-Estepa et al., 2010)
ERG20 _a	<i>E. coli</i>	k_{cat}	0,21	<i>S. cerevisiae</i>	K_{m_IPP}	0,0034	(Ku et al., 2005)
				<i>E. coli</i>	K_{m_DMAPP}	0,0293	(Song & Poulter, 1994)
ERG20 _b	<i>E. coli</i>	k_{cat}	0,47	<i>S. cerevisiae</i>	K_{m_GPP}	0,0067	(Ku et al., 2005)
					K_{m_IPP}	0,0034	(Song & Poulter, 1994)
BTS1	<i>S. cerevisiae</i>	k_{cat}	0,530	<i>S. cerevisiae</i>	K_{m_FPP}	0,0032	(Lo et al., 2009)
					K_{m_IPP}	0,0008	(LoGrasso et al., 1993)
CrtYBa	FA	k_{cat}	1	<i>S. lycopersicum</i>	K_{m_GGPP}	22,855	(Fraser et al., 2000) Este estudio

Enzima	Organismo	k _{cat} (s ⁻¹)		Organismo	K _m (mM)		Referencia
CrtI	FA	k _{cat}	1	<i>N. crassa</i>	K _m -Fitoeno	0,030	(Hausmann & Sandmann, 2000)
					K _m -O ₂	0,030	
CrtYBb	FA	k _{cat}	1	<i>P. haeundaensis</i>	K _m -Licopeno	0,0035	(Jeong et al., 2013)
CCD1	FA	k _{cat}	1	<i>A. thaliana</i>	K _m -β-caroteno	0,0152	(Schwartz et al., 2004)
					K _m -O ₂	0,0152	
ERG9_a	<i>S. cerevisiae</i>	k _{cat}	0,53	<i>S. cerevisiae</i>	K _m -FPP	0,0025	(LoGrasso et al., 1993)
ERG9_b	<i>S. cerevisiae</i>	k _{cat}	0,53	<i>S. cerevisiae</i>	K _m -NADPH	35,773	(LoGrasso et al., 1993)
					K _m -Pre-escualeno	0,0077	Este estudio (Beytia et al., 1973)
ERG1_a	<i>R. novergicus</i>	k _{cat}	0,006	<i>S. cerevisiae</i>	K _m -O ₂	0,0043	(Ono & Imai, 1985)
				<i>H. sapiens</i>	K _m -NADPH	0,0014	(M'Baya & Karst, 1987)
							(Laden et al., 2000)
ERG1_b	<i>R. novergicus</i>	k _{cat}	0,006	<i>S. cerevisiae</i>	K _m -HPF	0,0135	(Ono & Imai, 1985)
					K _m -Escualeno	0,0135	(Sato et al., 1993)
ERG7	<i>R. novergicus</i>	k _{cat}	0,001	<i>S. cerevisiae</i>	K _m -IPP	0,035	(Moore & Schatzman, 1992)
							(Balliano et al., 1992)
ERG11_a	<i>S. cerevisiae</i>	k _{cat}	0,008	<i>S. cerevisiae</i>	K _m -Lanosterol	0,005	(Kitahama et al., 2009)
					K _m -NADPH	0,0015	(Lamb et al., 2001)
ERG11_b	<i>S. cerevisiae</i>	k _{cat}	0,008	<i>S. cerevisiae</i>	K _m -14-α-carboxi-Alcohol	0,005	(Kitahama et al., 2009)
					K _m -NADPH	0,0015	(Lamb et al., 2001)
ERG11_c	<i>S. cerevisiae</i>	k _{cat}	0,008	<i>S. cerevisiae</i>	K _m -14-α-carboxi-Aldehido	0,005	(Kitahama et al., 2009)
					K _m -NADPH	0,0015	(Lamb et al., 2001)

Enzima	Organismo	k _{cat} (s ⁻¹)		Organismo	K _m (mM)		Referencia
ERG24	<i>R. norvegicus</i>	k _{cat}	0,0009	<i>Z. mays</i>	Km-4,4-dimetil- 5α-colesta-8,14,24-trien-3β-ol	0,1	(Paik et al., 1984)
					Km-NADPH	0,023	(Taton et al., 1989)
ERG25	<i>S. cerevisiae</i>	k _{cat}	0,0014	<i>S. cerevisiae</i>	Km-4,4-dimetil- 5α-colesta-8,24-dien-3β-ol	0,047	(Darnet & Rahier, 2003)
					Km-4α -hidroximetil-4β-metil-5α-colesta-8,24-dien-3β-ol	0,047	
					Km-4α -formil-4β-metil-5α-colesta-8,24-dien-3β-ol	0,047	
					Km- NADPH	0,015	
ERG26	<i>Rattus sp</i>	k _{cat}	0,2	<i>Rattus sp</i>	Km-4α-carboxi-4β-metil-5α-colesta-8,24-dien-3β-ol	0,007	(Rahimtula & Gaylor, 1972)
					Km-NAD	0,007	
ERG27	<i>H. sapiens</i>	k _{cat}	0,052	<i>R. norvegicus</i>	Km-4α-metil-5α-colesta-7-eno	0,236	(Steckelbroeck et al., 2004)
					Km-NADPH	0,0001	(Billheimer et al., 1981)
							(De Launoit et al., 1992)
ERG6	<i>S. cerevisiae</i>	k _{cat}	0,01	<i>S. cerevisiae</i>	Km- Zimosterol	0,017	(Nes et al., 2002)
					Km-SAM	0,017	(Jayasimha & Nes, 2008)
ERG2	<i>H. sapiens</i>	k _{cat}	0,423	<i>Z. mays</i>	Km-4 α-metil-fecosterol	0,522	(Nes et al., 2002)
							(Rahier et al., 2008)
ERG3	<i>R. norvegicus</i>	k _{cat}	0,1097	<i>R. norvegicus</i>	Km-Episterol	0,036	(Trzaskos et al., 1986)
					Km-NADPH	0,036	

Enzima	Organismo	k _{cat} (s ⁻¹)		Organismo	K _m (mM)		Referencia
ERG5	<i>L. esculentum</i>	k _{cat}	0,167	<i>L. esculentum</i>	Km- β -sitosterol	0,0037	(Morikawa, 2006)
					Km-NADPH	0,0037	(Kelly et al., 1997)
ERG4	<i>S. cerevisiae</i>	k _{cat}	0,0107	<i>S. cerevisiae</i>	Km- _{5,7,22,24-} ergosta-tetra-3 β -ol	0,0108	(Zweytick et al., 2000)
					Km-NADPH	0,0108	(Neal & Parks, 1977)

FA: Fijado arbitrariamente.

Tabla A-2: Constantes de disociación empleadas en los estudios de modelación.

Enzima	Organismo	K _d (mM)		Referencia
ERG10	<i>Z. ramigera</i>	K _d -acetyl-CoA	0,33	(Nishimura et al., 1978)
	<i>B. taurus</i>	K _d -acetoacetyl-CoA	0,0016	(Huth et al., 1975)
	<i>R. novergicus</i>	K _d -CO ₂	0,067	(Middleton, 1974)
ERG12	<i>R. novergicus</i>	K _d -MVA	0,131	(Primak et al., 2011)
ERG8	<i>S. pneumoniae</i>	K _d -MVA-P	0,0077	(Pilloff et al., 2003)
	<i>S. pneumoniae</i>	K _d -ATP	0,137	(Bloch et al., 2010)
	<i>H. sapiens</i>	K _d -MVA-PP	0,041	(Herdendorf & Miziorko, 2007)
MVD1	<i>S. cerevisiae</i>	K _d -MVA-PP	0,123	(Krepkiy & Miziorko, 2004)
ERG20 _a	<i>P. cochleariae</i>	K _d -DMAPP	2,206	(Frick et al., 2013)
ERG20 _b	<i>P. cochleariae</i>	K _d -GPP	0,322	(Frick et al., 2013)
BTS1	<i>S. scrofa</i>	K _d -FPP	0,025	(Sagami et al., 1985)
CrtYB _a	<i>S. lycopersicum</i>	K _d -GGPP	0,01	(Fraser et al., 2000)
CCD1	<i>A. thaliana</i>	K _d - β-caroteno	0,0152	(Schwartz et al., 2004)
ERG9 _b	<i>E. coli</i>	K _d -NADPH	1	(Radisky & Poulter, 2000)
ERG1 _a	<i>S. cerevisiae</i>	K _d -NADPH	0,0053	(Suh, Poulsen et al., 1996)
ERG6 _a	<i>S. cerevisiae</i>	K _d -SAM	0,002	(Nes, Marshall, et al., 2002)

Enzima	Organismo	K _i (mM)		Referencia
IDI1	<i>M. piperita</i>	K _i -GPP	0,096	(Rios-Esteva et al., 2010)

Tabla A-3: Concentración de enzimas empleadas en los estudios de modelación.

Enzima	Concentración (μM) t < 20 h	Concentración (μM) t > 20 h
ERG10	0,060	0,060
ERG13	0,020	0,020
HMGR	0,020	0,020
ERG12	0,020	0,020
ERG8	0,035	0,035
MVD1	0,060	0,060
IDI1	0,020	0,020
ERG20	0,060	0,060
ERG9	0,001	0,020
ERG1	0,003	0,045
ERG7	0,003	0,060
ERG11	0,003	0,060
ERG24	0,003	0,060
ERG25	0,003	0,060
ERG26	0,003	0,060
ERG27*	0,03	0,03
ERG6	0,003	0,060
ERG2	0,003	0,060
ERG3*	0,03	0,03
ERG5	0,003	0,060
ERG4	0,00073	3,650

Enzima	Concentración (μM) $t < 20 \text{ h}$	Concentración (μM) $t > 20 \text{ h}$
BTS1	0,3	1
CrtYB_a	0,07	0,64
CrtI	0,05	1
CrtYB_b	0,01	0,03
CCD1*	0,01	0,18

* Condiciones iniciales para calibración del modelo.

Tabla A-4: Concentración inicial de metabolitos empleados en los estudios de modelación.

Compuesto	Concentración (μM)	Referencia
acetil-CoA	0,5	Este trabajo
acetoacetil-CoA	3	(Middleton, 1972; Nishimura et al., 1978)
3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA	1	(Chappell et al., 1995; Gilbert & Stewart, 1981)
mevalonato	0,1	Este trabajo
mevalonato-5-fosfato	0,2	Fijado arbitrariamente
mevalonato-5-pirofosfato	0,5	Fijado arbitrariamente
isopentenil pirofosfato	0	Este trabajo
dimetilalil pirofosfato	0	Este trabajo
geranil pirofosfato	60	(Frick et al., 2013)
geranilgeranil pirofosfato	0	Este trabajo
fítoeno	10	Fijado arbitrariamente
licopeno	10	Fijado arbitrariamente
β-caroteno	0,01	Este trabajo
β-ionona	0,01	(López et al., 2015)
C14-dialdehído	0,01	Fijado arbitrariamente
farnesil pirofosfato	200	(LoGrasso et al., 1993)
pre-escualeno pirofosfato	8	(Beytia et al., 1973)
escualeno	0,05	Este trabajo
hidroperoxiflavina	5	Fijado arbitrariamente
2,3-epoxiescualeno	0,33	Este trabajo
lanosterol	0,045	(Kitahama et al., 2009)
14-α-carboxi-Alcohol	0,045	(Kitahama et al., 2009)
14-α-carboxi-Aldehído	0,045	(Kitahama et al., 2009)
4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trienol	200	(Taton et al., 1989)

Compuesto	Concentración (μM)	Referencia
4,4-dimetil-zimosterol	60	(Paik et al., 1984)
4α -hidroximetil-4β-metil-5α-colesta-8,24-dien-3β-ol	60	(Paik et al., 1984)
4α -formil-4β-metil-5α-colesta-8,24-dien-3β-ol	60	(Paik et al., 1984)
4α -carboxi-4β-metil-5α-colesta-8,24-dien-3β-ol	37	(Rahimtula & Gaylor, 1972)
3-ceto-4α-metil-zimosterol	50	Fijado arbitrariamente
4α-metil-zimosterol	60	Fijado arbitrariamente
4α-hidroxi-metil-5α- colesta- 8,24-dien-3β-ol	60	Fijado arbitrariamente
4α-formil-5α- colesta- 8,24-dien-3β-ol	60	Fijado arbitrariamente
4α-carboxi-5α- colesta- 8,24-dien-3β-ol	37	Fijado arbitrariamente
5α- colesta- 8,24-dien-3β-ona	50	Fijado arbitrariamente
zimosterol	200	(Nes, Marshall, et al., 2002)
fecosterol	150	(Rahier et al., 2008)
episterol	100	(Trzaskos et al., 1986)
5,7,24- ergostatrienol	10	(Morikawa, 2006)
5,7,22,24-ergostatetraenol	10	(Neal & Parks, 1977; Zweytick et al., 2000)
ergosterol	0	Este trabajo
peróxido de hidrógeno	70	(Jamieson, 1992)
adenosín trifosfato	30	(Schulte et al., 2000)
adenosín difosfato	50	(Williams et al., 1993)
fosfato (PO ₄ ³⁻)	1	(Wu et al., 1996)
coenzima A	25	(Middleton, 1972; Nishimura et al., 1978)
O ₂	437,5	Este trabajo

Compuesto	Concentración (μM)	Referencia
nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida	200	Este trabajo
nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada	10	Este trabajo
S-adenosil- metionina	50	(Nes, Marshall, et al., 2002)
pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$)	1	(Wu et al., 1996)
dióxido de carbono	$1,674 \cdot 10^{-7}$	(Kabolizadeh et al., 2012)
ácido fórmico	1	Fijado arbitrariamente
H^+	25	Fijado arbitrariamente

Tabla A-5: Parámetros asociados al crecimiento empleados en los estudios de modelación.

Símbolo	Nombre	Unidad	Valor	Referencia
$\mu_{\max}$	Tasa máxima de crecimiento	h^{-1}	0,1824	Este trabajo
K_s	Constante de saturación media	g/L	0,12	(Badotti et al., 2008; Paalme et al., 1997; Pham et al., 1999)
Y_{xg}	Rendimiento de biomasa/glucosa	g/g	0,2-0,5	(Badotti et al., 2008; Paalme et al., 1997; Pham et al., 1999)
Y_{xe}	Rendimiento de biomasa/etanol	g/g	0,2-07	(Badotti et al., 2008; Paalme et al., 1997; Pham et al., 1999)
d	Tasa de muerte celular	h^{-1}	0,0002	Este trabajo

Tabla A-6: Mecanismos de reacción de enzimas empleadas en los estudios de modelación.

Enzima	Direccionalidad	Mecanismo	Referencia
ERG10	Reversible	Ping Pong	(Hiser et al., 1994; Kornblatt & Rudney, 1971)
ERG13	Irreversible	Ping Pong	(Middleton, 1972)
HMGR	Irreversible	Ping Pong	(Chappell et al., 1995; Friesen & Rodwell, 2004)
ERG12	Irreversible	Secuencial Ordenado	(Schulte et al., 2000)
ERG8	Reversible	Secuencial aleatorio	(Pilloff et al., 2003)
MVD1	Irreversible	Secuencial ordenado	(Barta et al., 2012; Jabalquinto & Cardemil, 1989)
IDI1	Reversible	Unimolecular	(Wu et al., 2005)
ERG20	Irreversible	Secuencial ordenado	(Song & Poulter, 1994)
ERG9_a	Irreversible	Ping Pong	(Beytia et al., 1973)
ERG9_b	Irreversible	Secuencial ordenado	(Beytia et al., 1973)
ERG1_a	Irreversible	Secuencial ordenado	(Suh et al., 1996)
ERG1_b	Irreversible	Secuencial ordenado	(Suh et al., 1996)
ERG7	Irreversible	Unimolecular	(Moore & Schatzman, 1992)
ERG11	Irreversible	Ping Pong	(Lamb et al., 2001)
ERG24	Irreversible	Ping Pong	(Taton et al., 1989)
ERG25	Irreversible	Ping Pong	(Darnet & Rahier, 2003)
ERG26	Irreversible	Ping Pong*	(Rahimtula & Gaylor, 1972)
ERG27	Irreversible	Ping Pong*	(Gachotte et al., 1998)
ERG6	Irreversible	Aleatorio ordenado	(Liu & Nes, 2009; Nes, Marshall, et al., 2002)
ERG2	Irreversible	Unimolecular	(Rahier et al., 2008)
ERG3	Irreversible	Ping Pong	(Trzaskos et al., 1986)
ERG5	Irreversible	Ping Pong	(Kelly et al., 1997; Morikawa, 2006)
ERG4	Irreversible	Ping Pong*	(Zweytick et al., 2000)
BTS1	Irreversible	Secuencial ordenado	(Szabo et al., 2002; Tachibana et al., 1993)

Enzima	Direccionalidad	Mecanismo	Referencia
CrtYB_a	Irreversible	Secuencial ordenado	(Moise et al., 2015)
CrtI	Irreversible	Ping Pong	(Verdoes et al., 2003)
CrtYB_b	Irreversible	Secuencial ordenado	(Verdoes et al., 2003)
CCD1	Irreversible	Secuencial ordenado	(Vogel et al., 2008)

* Se asumió un mecanismo Ping Pong, pues no hay información al respecto.

Análisis de Identificabilidad

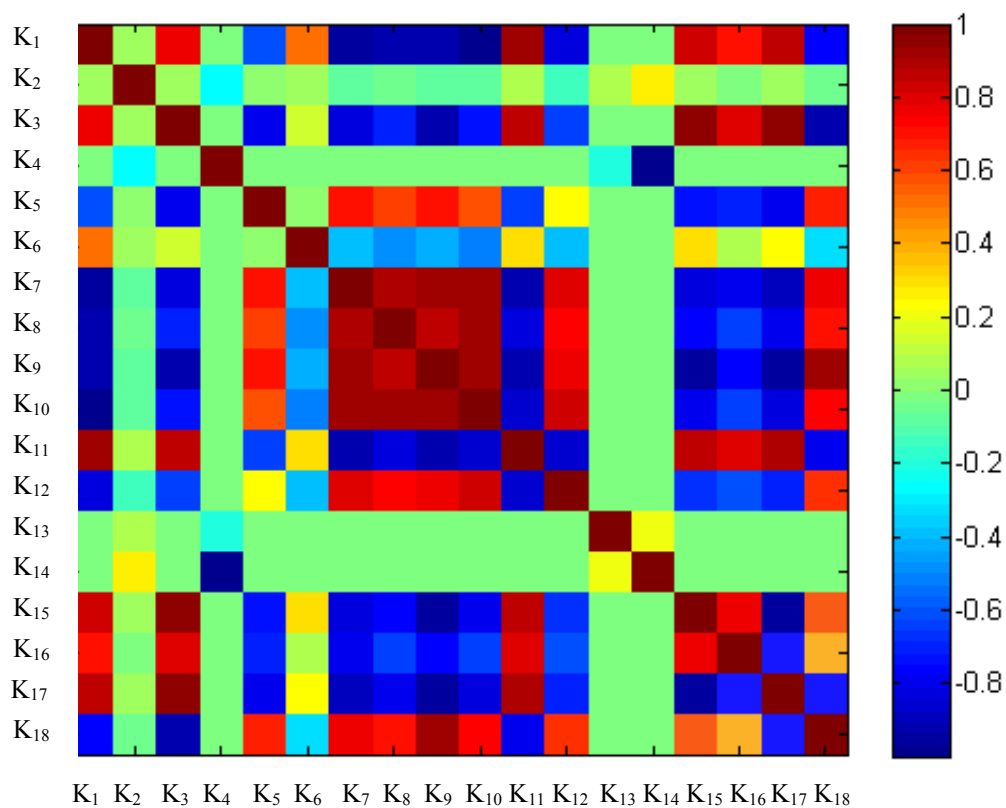


Figura A-1: Representación gráfica de la matriz de correlación. La identificabilidad fue calculada como la correlación entre cada par de parámetros. K(1-18) corresponden a Kcat_erg9, Kcat_crtYBb, Kcat_erg1, Km_ccd1a, Km_erg3b, Km_erg9c, Km_erg27a, Km_erg4b, Kd_crtYBa, Kd_erg9b, ERG27, ERG3, CCD1a, CCD1b, Ks, Y_{xg}, Y_{xe} y d.

Tabla A-7: Análisis de Significancia.

Símbolo	Nombre	Int. Inf.	Int. Sup.	T
K _{cat_erg9}	Constante catalítica enzima ERG9	-1,9*10 ³	4*10 ³	0,7
K _{cat_crtYBb}	Constante catalítica enzima CrtYB	0,8	6,4	2,6
K _{cat_erg1}	Constante catalítica enzima ERG1	-9	2,8*10 ¹	1
K _{m_ccd1a}	Cte. Michaelis-Menten CCD1-β-caroteno	-5,5*10 ²	5,6*10 ²	2,8*10 ⁻²
K _{m_erg3b}	Cte. Michaelis-Menten ERG3-NADPH	-8,1*10 ³	8,8*10 ³	8,3*10 ⁻²
K _{m_erg9c}	Cte. Michaelis-Menten ERG9-Pre-Escualeno	-2,6*10 ²	2,6*10 ²	1,1*10 ⁻³
K _{m_erg27a}	Cte. Michaelis-Menten ERG27-metil-zimosterona	-2*10 ²	2,0*10 ²	1*10 ⁻²
K _{m_erg4b}	Cte. Michaelis-Menten ERG4-Ergostatetraenol	-1,8*10 ³	2,7*10 ³	0,4
K _{d_crtYBa}	Constante de disociación CrtYBa- GGPP	-1,7*10 ⁴	1,7*10 ⁴	7,4*10 ⁻³
K _{d_erg9b}	Constante de disociación ERG9- NADPH	-1,5*10 ³	1,5*10 ³	4,8*10 ⁻³
Erg27	Concentración Enzima ERG27	-2,6*10 ⁻²	3,5*10 ⁻²	0,3
Erg3	Concentración Enzima ERG3	-5,3*10 ⁻²	6,1*10 ⁻²	0,1
Ccd1a	Concentración Enzima CCD1 t<20 h	-1,9	1,9	9,9*10 ⁻³
Ccd1b	Concentración Enzima CCD1 t>20 h	-8,1*10 ⁻³	8,4*10 ⁻³	3,5*10 ⁻²
K _s	Constante de saturación media	2,4*10 ⁻²	2,4*10 ⁻²	1.0*10⁶
Y _{xg}	Rendimiento de biomasa/glucosa	9,9*10 ⁻²	9,9*10 ⁻²	1.0*10⁶
Y _{xe}	Rendimiento de biomasa/producto	2.9*10 ⁻¹	2.9*10 ⁻¹	1.0*10⁶
d	Tasa de muerte celular	7.0*10 ⁻⁴	7.0*10 ⁻⁴	3.1*10⁴

Int. Inf.: intervalos de -95% confianza inferiores

Int. Sup.: intervalos de +95% confianza superiores

T: nivel de significancia, corresponde a la razón $\frac{\theta_i}{\sigma_i}$

Modelo cinético de biosíntesis de β -ionona en *S. cerevisiae*

El modelo cinético abarca las principales reacciones de la vía de síntesis de β -ionona diseñada por ingeniería metabólica en *S. cerevisiae* (López et al., 2015).

Se considera que la variación de un metabolito M en el tiempo es proporcional a la diferencia entre la tasa de formación (reacción anabólica, R_A) y la tasa de recambio (reacción catabólica, R_C) del compuesto. De esta forma, el modelo integra el balance de masa para cada uno de los metabolitos de la vía de biosíntesis de β -ionona en una serie de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs) rígidas, que deben ser resueltas simultáneamente:

$$\frac{dM}{dt} = R_A - R_C$$

La reacción de formación de metabolitos (asumiendo cinética tipo Michaelis-Menten) se define como:

$$R_A = \frac{[E_A] \cdot K_{cat} \cdot [M]}{K_M + [M]}$$

Donde $[E_A]$ corresponde a la concentración enzimática, K_{cat} es la constante catalítica, $[M]$ es la concentración del metabolito en estudio y K_M es la constante de Michaelis-Menten.

APÉNDICE B: ECUACIONES CINÉTICAS

1. Variación AcCoA

$$\frac{d[AcCoA]}{dt} = \frac{\frac{Kcat_{erg10} * Enz_{erg10} * [AcCoA]^2}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}}}{\frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[CO_2]}{Kd_{Co2}} + \frac{Km_{Co2} * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}} + \frac{[AcCoA]^2}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA] * [CO_2]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{Co2}} + \frac{[AcCoA] * [AcAcCoA]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{AcAcCoA}} + \frac{[CO_2] * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}} - \frac{2 * \frac{Kcat_{erg10} * Enz_{erg10} * [CO_2] * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}}{\frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[CO_2]}{Kd_{Co2}} + \frac{Km_{Co2} * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}} + \frac{[AcCoA]^2}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA] * [CO_2]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{Co2}} + \frac{[AcCoA] * [AcAcCoA]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{AcAcCoA}} + \frac{[CO_2] * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}} - \frac{Kcat_{erg13} * Enz_{erg13} * [AcCoA] * [AcAcCoA]}{Km_{AcAcCoA} * [AcCoA] + Km_{AcCoA} * [AcAcCoA] + [AcCoA] * [AcAcCoA]}$$

2. Variación AcACCoA

$$\frac{d[AcAcCoA]}{dt} = \frac{\frac{Kcat_{erg10} * Enz_{erg10} * [AcCoA]^2}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}}}{\frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[CO_2]}{Kd_{Co2}} + \frac{Km_{Co2} * AcAcCoA}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}} + \frac{AcCoA * [AcCoA]}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA] * [CO_2]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{Co2}} + \frac{[AcCoA] * AcAcCoA}{Kd_{AcCoA} * Kd_{AcAcCoA}} + \frac{[CO_2] * AcAcCoA}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}} - \frac{\frac{Kcat_{erg10} * Enz_{erg10} * [CO_2] * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}}{\frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[CO_2]}{Kd_{Co2}} + \frac{Km_{Co2} * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}} + \frac{[AcCoA]^2}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA] * [CO_2]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{Co2}} + \frac{[AcCoA] * [AcAcCoA]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{AcAcCoA}} + \frac{[CO_2] * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}} - \frac{Kcat_{erg13} * Enz_{erg13} * [AcCoA] * [AcAcCoA]}{Km_{AcAcCoA} * [AcCoA] + Km_{AcCoA} * [AcAcCoA] + [AcCoA] * [AcAcCoA]}$$

3. Variación HMG-CoA

$$\frac{d[HMGCoA]}{dt} = \frac{Kcat_{erg13} * Enz_{erg13} * [AcCoA] * [AcAcCoA]}{Km_{AcAcCoA} * [AcCoA] + Km_{AcCoA} * [AcAcCoA] + [AcCoA] * [AcAcCoA]}$$

$$- \frac{Kcat_{hmg2} * Enz_{hmg2} * [HMGCoA] * [NADPH]^2}{Km_{HMGCoA} * Km_{NADPH} * [NADPH] + 2 * Km_{NADPH} * [HMGCoA] * NADPH + Km_{HMGCoA} * [NADPH]^2 + [HMGCoA] * [NADPH]^2}$$

4. Variación MEV

$$\frac{d[MEV]}{dt} = \frac{Kcat_{hmg2} * Enz_{hmg2} * [HMGCoA] * [NADPH]^2}{Km_{HMGCoA} * Km_{NADPH} * [NADPH] + 2 * Km_{NADPH} * [HMGCoA] * [NADPH] + Km_{HMGCoA} * [NADPH]^2 + [HMGCoA] * [NADPH]^2}$$

$$- \frac{Kcat_{erg12} * Enz_{erg12} * [MEV] * [ATP]}{Kd_{MEV} * Km_{ATP} + Km_{MEV} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEV] + [MEV] * [ATP]}$$

5. Variación MEVP

$$\frac{d[MEVP]}{dt} = \frac{Kcat_{erg12} * Enz_{erg12} * [MEV] * [ATP]}{Kd_{MEV} * Km_{ATP} + Km_{MEV} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEV] + [MEV] * [ATP]}$$

$$- \frac{\frac{Kcat_{erg8} * Enz_{erg8} * [MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}}}{(1 + \frac{[MEVP]}{Kd_{MEVP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [ADP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVPP]}{Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [MEVP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP] * [MEVPP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[ADP] * [MEVPP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{ADP}} + \frac{[ATP] * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ATP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}})}$$

$$+ \frac{\frac{Kcat_{erg8} * Enz_{erg8} * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ADP} * Km_{MEVPP}}}{(1 + \frac{[MEVP]}{Kd_{MEVP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [ADP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVPP]}{Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [MEVP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP] * [MEVPP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[ADP] * [MEVPP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{ADP}} + \frac{[ATP] * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ATP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}})}$$

6. Variación MEVPP

$$\frac{d[MEVPP]}{dt} =$$

$$\frac{\frac{Kcat_{erg8} * Enz_{erg8} * [MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}}}{\left(1 + \frac{[MEVP]}{Kd_{MEVP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ADP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVP}} + \frac{[MEVPP]}{Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVP} * [MEVP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP] * [MEVPP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[ADP] * [MEVPP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVP}} + \frac{[MEVP] * [ATP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{ADP}} + \frac{[ATP] * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ATP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}}\right)}$$

$$- \frac{\frac{Kcat_{erg8} * Enz_{erg8} * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ADP} * Km_{MEVPP}}}{\left(1 + \frac{[MEVP]}{Kd_{MEVP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ADP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVP}} + \frac{[MEVPP]}{Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVP} * [MEVP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP] * [MEVPP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[ADP] * [MEVPP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVP}} + \frac{[MEVP] * [ATP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{ADP}} + \frac{[ATP] * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ATP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}}\right)}$$

$$- \frac{kcat_{mvd1} * Enz_{mvd1} * [MEVPP] * [ATP]}{Kd_{MEVPP} * Km_{ATP} + Km_{MEVPP} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEVPP]P + [MEVPP] * [ATP]}$$

7. Variación IPP

$$\frac{d[IPP]}{dt} = \frac{Kcat_{idi1} * Enz_{idi1} * [DMAPP]}{Km_{DMAPP} + [DMAPP] + \frac{Km_{DMAPP} * [GPP]}{K_i}} - \frac{Kcat_{idi1} * Enz_{idi1} * [IPP]}{Km_{IPP} + [IPP] + \frac{Km_{IPP} * [GPP]}{K_i}}$$

$$- \frac{Kcat_{erg20a} * Enz_{erg20a} * [DMAPP] * [IPP]}{Kd_{DMAPP} * Km_{IPP} + Km_{DMAPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [DMAPP] + [DMAPP] * [IPP]}$$

$$- \frac{Kcat_{erg20b} * Enz_{erg20b} * [GPP] * [IPP]}{Kd_{GPP} * Km_{IPP} + Km_{GPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [GPP] + [GPP] * [IPP]} - \frac{Kcat_{bst1} * Enz_{bst1} * [FPP] * [IPP]}{Kd_{FPP} * Km_{IPP} + Km_{FPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [FPP] + [FPP] * [IPP]}$$

8. Variación DMAPP

$$\frac{d[DMAPP]}{dt} = \frac{Kcat_{idi1} * Enz_{idi1} * [IPP]}{Km_{IPP} + [IPP] + \frac{Km_{IPP} * [GPP]}{K_i}} - \frac{Kcat_{idi1} * Enz_{idi1} * [DMAPP]}{Km_{DMAPP} + [DMAPP] + \frac{Km_{DMAPP} * [GPP]}{K_i}}$$

$$- \frac{Kcat_{erg20a} * Enz_{erg20a} * [DMAPP] * [IPP]}{Kd_{DMAPP} * Km_{IPP} + Km_{DMAPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [DMAPP] + [DMAPP] * [IPP]}$$

9. Variación GPP

$$\frac{d[GPP]}{dt} = \frac{Kcat_{erg20a} * Enz_{erg20a} * [DMAPP] * [IPP]}{Kd_{DMAPP} * Km_{IPP} + Km_{DMAPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [DMAPP] + [DMAPP] * [IPP]} - \frac{Kcat_{erg20b} * Enz_{erg20b} * [GPP] * [IPP]}{Kd_{GPP} * Km_{IPP} + Km_{GPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [GPP] + [GPP] * [IPP]}$$

10. Variación GGPP

$$\frac{d[GGPP]}{dt} = \frac{Kcat_{bst1} * Enz_{bst1} * [FPP] * [IPP]}{Kd_{FPP} * Km_{IPP} + Km_{FPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [FPP] + [FPP] * [IPP]} - 2 * \frac{Kcat_{crtYBa} * Enz_{crtYBa} * [GGPP]^2}{Kd_{GGPP} * Km_{GGPP} + 2 * Km_{GGPP} * [GGPP] + [GGPP]^2}$$

11. Variación Fitoeno

$$\frac{d[Fitoeno]}{dt} = \frac{Kcat_{crtYBa} * Enz_{crtYBa} * [GGPP]^2}{Kd_{GGPP} * Km_{GGPP} + 2 * Km_{GGPP} * [GGPP] + [GGPP]^2} - \frac{kcat_{crtI} * Enz_{crtI} * [Fitoeno] * [O_2]^4}{[O_2]^4 * [Fitoeno] + Km_{Fitoeno} * [O_2]^4 + 4 * Km_{O_2} * [Fitoeno] * [O_2]^3 + Km_{Fitoeno} * Km_{O_2} * [O_2]^3}$$

12. Variación Licopeno

$$\frac{d[Licopeno]}{dt} = \frac{kcat_{crtI} * Enz_{crtI} * [Fitoeno] * [O_2]^4}{[O_2]^4 * [Fitoeno] + Km_{Fitoeno} * [O_2]^4 + 4 * Km_{O_2} * [Fitoeno] * [O_2]^3 + Km_{Fitoeno} * Km_{O_2} * [O_2]^3} - \frac{kcat_{crtYBb} * Enz_{crtYBb} * [Licopeno]}{Km_{licopeno} + [Licopeno]}$$

13. Variación β – caroteno

$$\frac{d[\beta \text{ caroteno}]}{dt} = \frac{kcat_{crtYBb} * Enz_{crtYBb} * [Licopeno]}{Km_{licopeno} + [Licopeno]} - \frac{Kcat_{ccd1} * Enz_{ccd1} * [\beta \text{ caroteno}] * [O_2]}{Kd_{\beta\text{-caroteno}} * Km_{O_2} + Km_{O_2} * [\beta - \text{caroteno}] + Km_{\beta\text{-caroteno}} * [O_2] + [\beta \text{ caroteno}] * [O_2]}$$

14. Variación β – ionona

$$\frac{d[\beta - \text{ionona}]}{dt} = \frac{Kcat_{ccd1} * Enz_{ccd1} * [\beta \text{ caroteno}] * [O_2]}{Kd_{\beta\text{-caroteno}} * Km_{O_2} + Km_{O_2} * [\beta - \text{caroteno}] + Km_{\beta\text{-caroteno}} * [O_2] + [\beta \text{ caroteno}] * [O_2]}$$

15. Variación C14-aldehido

$$\frac{d[C14 - \text{aldehido}]}{dt} = \frac{Kcat_{ccd1} * Enz_{ccd1} * [\beta \text{ caroteno}] * [O_2]}{Kd_{\beta\text{-caroteno}} * Km_{O_2} + Km_{O_2} * [\beta - \text{caroteno}] + Km_{\beta\text{-caroteno}} * [O_2] + [\beta \text{ caroteno}] * [O_2]}$$

16. Variación FPP

$$\frac{d[FPP]}{dt} = \frac{Kcat_{erg20b} * Enz_{erg20b} * [GPP] * [IPP]}{Kd_{GPP} * Km_{IPP} + Km_{GPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [GPP] + [GPP] * [IPP]} - \frac{Kcat_{bst1} * Enz_{bst1} * [FPP] * [IPP]}{Kd_{FPP} * Km_{IPP} + Km_{FPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [FPP] + [FPP] * [IPP]} - 2 * \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9a} * [FPP]^2}{2 * Km_{FPP} * [FPP] + [FPP]^2}$$

17. Variación Pre-escualeno

$$\frac{d[Pre - \text{esc}]}{dt} = \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9a} * [FPP]^2}{2 * Km_{FPP} * [FPP] + [FPP]^2} - \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9b} * [NADPH] * [Pre - \text{esc}]}{Kd_{NADPH} * Km_{Pre-\text{esc}} + Km_{NADPH} * [Pre - \text{esc}] + Km_{Pre-\text{esc}} * [NADPH] + [NADPH] * [Pre - \text{esc}]}$$

18. Variación Escualeno

$$\frac{d[\text{Escualeno}]}{dt} = \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9b} * [NADPH] * [Pre - esc]}{Kd_{NADPH} * Km_{Pre-esc} + Km_{NADPH} * [Pre - esc] + Km_{Pre-esc} * [NADPH] + [NADPH] * [Pre - esc]} - \frac{Kcat_{erg1} * Enz_{erg1b} * [\text{Escualeno}] * [HPF]}{Km_{HPF} * [\text{Escualeno}] + Km_{Escualeno} * [HPF] + [\text{Escualeno}] * [HPF]}$$

19. Variación HPF

$$\frac{d[HPF]}{dt} = \frac{Kcat_{erg1} * Enz_{erg1a} * [NADPH] * [O_2]}{Kd_{NADPH} * Km_{O_2} + Km_{NADPH} * [O_2] + Km_{O_2} * [NADPH] + [NADPH] * [O_2]} - \frac{Kcat_{erg1} * Enz_{erg1b} * [\text{Escualeno}] * [HPF]}{Km_{HPF} * [\text{Escualeno}] + Km_{Escualeno} * [HPF] + [\text{Escualeno}] * [HPF]}$$

20. Variación Epoxi-escualeno

$$\frac{d[\text{Epoxi} - \text{escualeno}]}{dt} = \frac{Kcat_{erg1} * Enz_{erg1b} * [\text{Escualeno}] * [HPF]}{Km_{HPF} * [\text{Escualeno}] + Km_{Escualeno} * [HPF] + [\text{Escualeno}] * [HPF]} - \frac{Kcat_{erg7} * Enz_{erg7} * [\text{Epoxi} - \text{escualeno}]}{Km_{Epoxi-escualeno} + [\text{Epoxi} - \text{escualeno}]}$$

21. Variación Lanosterol

$$\frac{d[\text{Lanosterol}]}{dt} = \frac{Kcat_{erg7} * Enz_{erg7} * [\text{Epoxi} - \text{escualeno}]}{Km_{Epoxi-escualeno} + [\text{Epoxi} - \text{escualeno}]} - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11a} * [\text{Lanosterol}] * [NADPH]}{Km_{Lanosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{Lanosterol}] + [\text{Lanosterol}] * [NADPH]}$$

22. Variación AC-alcohol

$$\frac{d[AC - alcohol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11a} * [\text{Lanosterol}] * [NADPH]}{Km_{Lanosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{Lanosterol}] + [\text{Lanosterol}] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11b} * [Ac - alcohol] * [NADPH]}{Km_{Ac-alcohol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - alcohol] + [Ac - alcohol] * [NADPH]}$$

23. Variación AC-aldehido

$$\frac{d[AC - aldehido]}{dt} = \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11b} * [Ac - alcohol] * [NADPH]}{Km_{Ac-alcohol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - alcohol] + [Ac - alcohol] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11c} * [Ac - aldehido] * [NADPH]}{Km_{Ac-aldehido} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - aldehido] + [Ac - aldehido] * [NADPH]}$$

24. Variación DimetilColestaTrienol

$$\frac{d[DimetilColestaTrienol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11c} * [Ac - aldehido] * [NADPH]}{Km_{Ac-aldehido} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - aldehido] + [Ac - aldehido] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg24} * Enz_{erg24} * [dimetilcolestatrienol] * [NADPH]}{Km_{dimetilcolestatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [dimetilcolestatrienol] + [dimetilcolestatrienol] * [NADPH]}$$

25. Variación DimetilColestaDienol

$$\frac{d[DimetilCoolestadienol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg24} * Enz_{erg24} * [dimetilcolestatrienol] * [NADPH]}{Km_{dimetilcolestatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [dimetilcolestatrienol] + [dimetilcolestatrienol] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [dimetilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{dimetilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [dimetilcolestadienol] + [dimetilcolestadienol] * [NADPH]}$$

26. Variación Metil- Zimosterol -CH₂OH

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Metil} - \text{zimosterol} - \text{CH}_2\text{OH}]}{dt} &= \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [\text{dimetilcolestadienol}] * [NADPH]}{Km_{\text{dimetilcolestadienol}} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{dimetilcolestadienol}] + [\text{dimetilcolestadienol}] * [NADPH]} \\ &- \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [\text{metilzim} - \text{CH}_2\text{OH}] * [NADPH]}{Km_{\text{metilzim}-\text{CH}_2\text{OH}} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{metilzim} - \text{CH}_2\text{OH}] + [\text{metilzim} - \text{CH}_2\text{OH}] * [NADPH]} \end{aligned}$$

27. Variación Metil- Zimosterol -COH

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Metil} - \text{zimosterol} - \text{COH}]}{dt} &= \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [\text{metilzim} - \text{CH}_2\text{OH}] * [NADPH]}{Km_{\text{metilzim}-\text{CH}_2\text{OH}} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{metilzim} - \text{CH}_2\text{OH}] + [\text{metilzim} - \text{CH}_2\text{OH}] * [NADPH]} \\ &- \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [\text{metilzim} - \text{COH}] * [NADPH]}{Km_{\text{metilzim}-\text{COH}} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{metilzim} - \text{COH}] + [\text{metilzim} - \text{COH}] * [NADPH]} \end{aligned}$$

28. Variación Metil- Zimosterol -COOH

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Metil} - \text{zimosterol} - \text{COOH}]}{dt} &= \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [\text{metilzim} - \text{COH}] * [NADPH]}{Km_{\text{metilzim}-\text{COH}} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{metilzim} - \text{COH}] + [\text{metilzim} - \text{COH}] * [NADPH]} \\ &- \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [\text{metilzim} - \text{COOH}] * [NADP]}{Km_{\text{metilzim}-\text{COOH}} * [NADP] + Km_{NADP} * [\text{metilzim} - \text{COOH}] + [\text{CO}_2] * [NADP]} \end{aligned}$$

29. Variación Ceto-metilzimosterol

$$\frac{d[\text{Ceto} - \text{metil} - \text{zimosterol}]}{dt} = \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [\text{metilzim} - \text{COOH}] * [NADP]}{Km_{\text{metilzim}-\text{COOH}} * [NADP] + Km_{NADP} * [\text{metilzim} - \text{COOH}] + [\text{CO}_2] * [NADP]}$$

$$- \frac{Kcat_{erg27} * Enz_{erg27} * [cetometilzimosterol] * [NADPH]}{Km_{cetometilzimosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [cetometilzimosterol] + [cetometilzimosterol] * [NADPH]}$$

30. Variación Metilcolestadienol

$$\frac{d[Metil - colestadienol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg27} * Enz_{erg27} * [cetometilzimosterol] * [NADPH]}{Km_{cetometilzimosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [cetometilzimosterol] + [cetometilzimosterol] * [NADPH]}$$

$$- \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [metilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{metilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [metilcolestadienol] + [metilcolestadienol] * [NADPH]}$$

31. Variación Hidroxi-metilcolestadienol

$$\frac{d[Hidroxi - metilcolestadienol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [metilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{metilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [metilcolestadienol] + [metilcolestadienol] * [NADPH]}$$

$$- \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [hidroxi - metilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{hidroxi-metilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [hidroxi - metilcolestadienol] + [hidroxi - metilcolestadienol] * [NADPH]}$$

32. Variación Formil-colestadienol

$$\frac{d[Formil - colestadienol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [formil - colestadienol] * [NADPH]}{Km_{formil-colestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [formil - colestadienol] + [formil - colestadienol] * [NADPH]}$$

$$+ \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [hidroxi - metilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{hidroxi-metilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [hidroxi - metilcolestadienol] + [hidroxi - metilcolestadienol] * [NADPH]}$$

33. Variación Carboxi-colestadienol

$$\frac{d[Carboxi - colestadienol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [formil - colestadienol] * [NADPH]}{Km_{formil-colestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [formil - colestadienol] + [formil - colestadienol] * [NADPH]}$$

$$- \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [carboxi - colestadienol] * [NADP]}{Km_{carboxi-colestadienol} * [NADP] + Km_{NADP} * [carboxi - colestadienol] + [carboxi - colestadienol] * [NADP]}$$

34. Variación Colestadienona

$$\frac{d[Colestadienona]}{dt} = \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [carboxi - colestadienol] * [NADP]}{Km_{carboxi-colestadienol} * [NADP] + Km_{NADP} * [carboxi - colestadienol] + [carboxi - colestadienol] * [NADP]}$$

$$- \frac{Kcat_{erg27} * Enz_{erg27} * [colestadienona] * [NADPH]}{Km_{colestadienona} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [colestadienona] + [colestadienona] * [NADPH]}$$

35. Variación Zimosterol

$$\frac{d[Zimosterol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg27} * Enz_{erg27} * [colestadienona] * [NADPH]}{Km_{colestadienona} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [colestadienona] + [colestadienona] * [NADPH]}$$

$$- \frac{Kcat_{erg6} * Enz_{erg6} * [zimosterol] * [SAM]}{Kd_{SAM} * Km_{zimosterol} + Km_{zimosterol} * [SAM] + Km_{SAM} * [zimosterol] + [zimosterol] * [SAM]}$$

36. Variación Fecosterol

$$\frac{d[Fecosterol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg6} * Enz_{erg6} * [zimosterol] * [SAM]}{Kd_{SAM} * Km_{zimosterol} + Km_{zimosterol} * [SAM] + Km_{SAM} * [zimosterol] + [zimosterol] * [SAM]} - \frac{Kcat_{erg2} * Enz_{erg2} * [fecosterol]}{Km_{fecosterol} + [fecosterol]}$$

37. Variación Episterol

$$\frac{d[Episterol]}{dt} = \frac{Kcat_{erg2} * Enz_{erg2} * [fecosterol]}{Km_{fecosterol} + [fecosterol]} - \frac{Kcat_{erg3} * Enz_{erg3} * [episterol] * [NADPH]}{Km_{episterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [episterol] + [episterol] * [NADPH]}$$

38. Variación Ergostatrienol

$$\frac{d[\text{Ergostatrienol}]}{dt} = \frac{Kcat_{erg3} * Enz_{erg3} * [episterol] * [NADPH]}{Km_{episterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [episterol] + [episterol] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg5} * Enz_{erg5} * [\text{ergostatrienol}] * [NADPH]}{Km_{ergostatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{ergostatrienol}] + [\text{ergostatrienol}] * [NADPH]}$$

39. Variación Ergostatetraenol

$$\frac{d[\text{Ergostatetraenol}]}{dt} = \frac{Kcat_{erg5} * Enz_{erg5} * [\text{ergostatrienol}] * [NADPH]}{Km_{ergostatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{ergostatrienol}] + [\text{ergostatrienol}] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg4} * Enz_{erg4} * [\text{ergostatetraenol}] * [NADPH]}{Km_{ergostatetraenol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{ergostatetraenol}] + [\text{ergostatetraenol}] * [NADPH]}$$

40. Variación Ergosterol

$$\frac{d[\text{Ergosterol}]}{dt} = \frac{Kcat_{erg4} * Enz_{erg4} * [\text{ergostatetraenol}] * [NADPH]}{Km_{ergostatetraenol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [\text{ergostatetraenol}] + [\text{ergostatetraenol}] * [NADPH]}$$

41. Variación H2O2

$$\frac{d[H2O2]}{dt} = 4 * \frac{kcat_{crtl} * Enz_{crtl} * [Fitoeno] * [O_2]^4}{[O_2]^4 * [Fitoeno] + Km_{Fitoeno} * [O_2]^4 + 4 * Km_{O_2} * [Fitoeno] * [O_2]^3 + Km_{Fitoeno} * Km_{O_2} * [O_2]^3}$$

42. Variación ATP

$$\frac{d[ATP]}{dt} = - \frac{Kcat_{erg12} * Enz_{erg12} * [MEV] * [ATP]}{Kd_{MEV} * Km_{ATP} + Km_{MEV} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEV] + [MEV] * [ATP]} - \frac{kcat_{mvd1} * Enz_{mvd1} * [MEVPP] * [ATP]}{Kd_{MEVPP} * Km_{ATP} + Km_{MEVPP} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEVPP] + [MEVPP] * [ATP]}$$

$$\begin{aligned}
& - \frac{\frac{Kcat_{erg8} * Enz_{erg8} * [MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}}}{\left(1 + \frac{[MEVP]}{Kd_{MEVP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [ADP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVPP]}{Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [MEVP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP] * [MEVPP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[ADP] * [MEVPP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{ADP}} + \frac{[ATP] * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ATP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}}\right)} \\
& + \frac{\frac{Kcat_{erg8} * Enz_{erg8} * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ADP} * Km_{MEVPP}}}{\left(1 + \frac{[MEVP]}{Kd_{MEVP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [ADP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVPP]}{Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [MEVP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP] * [MEVPP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[ADP] * [MEVPP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{ADP}} + \frac{[ATP] * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ATP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}}\right)}
\end{aligned}$$

43. Variación ADP

$$\begin{aligned}
\frac{d[ADP]}{dt} &= \frac{Kcat_{erg12} * Enz_{erg12} * [MEV] * [ATP]}{Kd_{MEV} * Km_{ATP} + Km_{MEV} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEV] + [MEV] * [ATP]} + \frac{kcat_{mvd1} * Enz_{mvd1} * [MEVPP] * [ATP]}{Kd_{MEVPP} * Km_{ATP} + Km_{MEVPP} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEVPP]P + [MEVPP] * [ATP]} \\
& + \frac{\frac{Kcat_{erg8} * Enz_{erg8} * [MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}}}{\left(1 + \frac{[MEVP]}{Kd_{MEVP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [ADP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVPP]}{Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [MEVP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP] * [MEVPP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[ADP] * [MEVPP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{ADP}} + \frac{[ATP] * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ATP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}}\right)} \\
& - \frac{\frac{Kcat_{erg8} * Enz_{erg8} * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ADP} * Km_{MEVPP}}}{\left(1 + \frac{[MEVP]}{Kd_{MEVP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [ADP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVPP]}{Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP}} + \frac{Km_{MEVPP} * [MEVP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{Km_{MEVP} * [ATP] * [MEVPP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[ADP] * [MEVPP]}{Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}} + \frac{[MEVP] * [ATP] * [ADP]}{Kd_{MEVP} * Km_{ATP} * Kd_{ADP}} + \frac{[ATP] * [ADP] * [MEVPP]}{Kd_{ATP} * Km_{ADP} * Kd_{MEVPP}}\right)}
\end{aligned}$$

44. Variación Pi

$$\frac{d[Pi]}{dt} = \frac{kcat_{mvd1} * Enz_{mvd1} * [MEVPP] * [ATP]}{Kd_{MEVPP} * Km_{ATP} + Km_{MEVPP} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEVPP]P + [MEVPP] * [ATP]}$$

45. Variación CoA

$$\begin{aligned}
\frac{d[CoA]}{dt} &= \frac{Kcat_{erg13} * Enz_{erg13} * [AcCoA] * [AcAcCoA]}{Km_{AcAcCoA} * [AcCoA] + Km_{AcCoA} * [AcAcCoA] + [AcCoA] * [AcAcCoA]} \\
& + \frac{\frac{Kcat_{erg10} * Enz_{erg10} * [AcCoA]^2}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}}}{\frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[CO_2]}{Kd_{Co2}} + \frac{Km_{Co2} * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}} + \frac{[AcCoA]^2}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA] * [CO_2]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{Co2}} + \frac{[AcCoA] * [AcAcCoA]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{AcAcCoA}} + \frac{[CO_2] * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& - \frac{\frac{Kcat_{erg10} * Enz_{erg10} * [CO_2] * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}}{\frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA]}{Kd_{AcCoA}} + \frac{[CO_2]}{Kd_{Co2}} + \frac{Km_{Co2} * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}} + \frac{[AcCoA]^2}{Kd_{AcCoA} * Km_{AcCoA}} + \frac{[AcCoA] * [CO_2]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{Co2}} + \frac{[AcCoA] * [AcAcCoA]}{Kd_{AcCoA} * Kd_{AcAcCoA}} + \frac{[CO_2] * [AcAcCoA]}{Kd_{Co2} * Km_{AcAcCoA}}} \\
& + \frac{Kcat_{hmg2} * Enz_{hmg2} * [HMGC oA] * [NADPH]^2}{Km_{HMGC oA} * Km_{NADPH} * [NADPH] + 2 * Km_{NADPH} * [HMGC oA] * [NADPH] + Km_{HMGC oA} * [NADPH]^2 + [HMGC oA] * [NADPH]^2}
\end{aligned}$$

46. Variación NADPH

$$\begin{aligned}
\frac{d[NADPH]}{dt} = & -2 * \frac{Kcat_{hmg2} * Enz_{hmg2} * [HMGC oA] * [NADPH]^2}{Km_{HMGC oA} * Km_{NADPH} * [NADPH] + 2 * Km_{NADPH} * [HMGC oA] * [NADPH] + Km_{HMGC oA} * [NADPH]^2 + [HMGC oA] * [NADPH]^2} \\
& - \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9b} * [NADPH] * [Pre - esc]}{Kd_{NADPH} * Km_{Pre-esc} + Km_{NADPH} * [Pre - esc] + Km_{Pre-esc} * [NADPH] + [NADPH] * [Pre - esc]} \\
& - \frac{Kcat_{erg1} * Enz_{erg1a} * [NADPH] * [O_2]}{Kd_{NADPH} * Km_{O_2} + Km_{NADPH} * [O_2] + Km_{O_2} * [NADPH] + [NADPH] * [O_2]} \\
& - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11a} * [Lanosterol] * [NADPH]}{Km_{Lanosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Lanosterol] + [Lanosterol] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11b} * [Ac - alcohol] * [NADPH]}{Km_{Ac-alcohol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - alcohol] + [Ac - alcohol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11c} * [Ac - aldehido] * [NADPH]}{Km_{Ac-aldehido} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - aldehido] + [Ac - aldehido] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [metilzim - COOH] * [NADP]}{Km_{metilzim-COOH} * [NADP] + Km_{NADP} * [metilzim - COOH] + [CO_2] * [NADP]} \\
& - \frac{Kcat_{erg24} * Enz_{erg24} * [dimetilcolestatrienol] * [NADPH]}{Km_{dimetilcolestatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [dimetilcolestatrienol] + [dimetilcolestatrienol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [dimetilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{dimetilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [dimetilcolestadienol] + [dimetilcolestadienol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [metilzim - CH_2OH] * [NADPH]}{Km_{metilzim-CH_2OH} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [metilzim - CH_2OH] + [metilzim - CH_2OH] * [NADPH]}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& - \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [metilzim - COH] * [NADPH]}{Km_{metilzim-COH} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [metilzim - COH] + [metilzim - COH] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg27} * Enz_{erg27} * [cetometilzimosterol] * [NADPH]}{Km_{cetometilzimosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [cetometilzimosterol] + [cetometilzimosterol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [metilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{metilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [metilcolestadienol] + [metilcolestadienol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [hidroxi - metilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{hidroxi-metilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [hidroxi - metilcolestadienol] + [hidroxi - metilcolestadienol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [formil - colestadienol] * [NADPH]}{Km_{formil-colestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [formil - colestadienol] + [formil - colestadienol] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [carboxi - colestadienol] * [NADP]}{Km_{carboxi-colestadienol} * [NADP] + Km_{NADP} * [carboxi - colestadienol] + [carboxi - colestadienol] * [NADP]} \\
& - \frac{Kcat_{erg27} * Enz_{erg27} * [colestadienona] * [NADPH]}{Km_{colestadienona} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [colestadienona] + [colestadienona] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg3} * Enz_{erg3} * [episterol] * [NADPH]}{Km_{episterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [episterol] + [episterol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg5} * Enz_{erg5} * [ergostatrienol] * [NADPH]}{Km_{ergostatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [ergostatrienol] + [ergostatrienol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg4} * Enz_{erg4} * [ergostatetraenol] * [NADPH]}{Km_{ergostatetraenol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [ergostatetraenol] + [ergostatetraenol] * [NADPH]}
\end{aligned}$$

47. Variación $NADP^+$

$$\begin{aligned}
\frac{d[NADP]}{dt} = & 2 * \frac{Kcat_{hmg2} * Enz_{hmg2} * [HMGCoA] * [NADPH]^2}{Km_{HMGCoA} * Km_{NADPH} * [NADPH] + 2 * Km_{NADPH} * [HMGCoA] * [NADPH] + Km_{HMGCoA} * [NADPH]^2 + [HMGCoA] * [NADPH]^2} \\
& + \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9b} * [NADPH] * [Pre - esc]}{Kd_{NADPH} * Km_{Pre-esc} + Km_{NADPH} * [Pre - esc] + Km_{Pre-esc} * [NADPH] + [NADPH] * [Pre - esc]} \\
& + \frac{Kcat_{erg1} * Enz_{erg1b} * [Escualeno] * [HPF]}{Km_{HPF} * [Escualeno] + Km_{Escualeno} * [HPF] + [Escualeno] * [HPF]} \\
& + \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11a} * [Lanosterol] * [NADPH]}{Km_{Lanosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Lanosterol] + [Lanosterol] * [NADPH]} + \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11b} * [Ac - alcohol] * [NADPH]}{Km_{Ac-alcohol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - alcohol] + [Ac - alcohol] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11c} * [Ac - aldehido] * [NADPH]}{Km_{Ac-aldehido} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - aldehido] + [Ac - aldehido] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [metilzim - COOH] * [NADP]}{Km_{metilzim-COOH} * [NADP] + Km_{NADP} * [metilzim - COOH] + [CO2] * [NADP]} \\
& + \frac{Kcat_{erg24} * Enz_{erg24} * [dimetilcolestatrienol] * [NADPH]}{Km_{dimetilcolestatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [dimetilcolestatrienol] + [dimetilcolestatrienol] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [dimetilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{dimetilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [dimetilcolestadienol] + [dimetilcolestadienol] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [metilzim - CH2OH] * [NADPH]}{Km_{metilzim-CH2OH} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [metilzim - CH2OH] + [metilzim - CH2OH] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [metilzim - COH] * [NADPH]}{Km_{metilzim-COH} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [metilzim - COH] + [metilzim - COH] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg27} * Enz_{erg27} * [cetometilzimosterol] * [NADPH]}{Km_{cetometilzimosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [cetometilzimosterol] + [cetometilzimosterol] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [metilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{metilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [metilcolestadienol] + [metilcolestadienol] * [NADPH]}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& + \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [hidroxi - metilcolestadienol] * [NADPH]}{Km_{hidroxi-metilcolestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [hidroxi - metilcolestadienol] + [hidroxi - metilcolestadienol] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg25} * Enz_{erg25} * [formil - colestadienol] * [NADPH]}{Km_{formil-colestadienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [formil - colestadienol] + [formil - colestadienol] * [NADPH]} \\
& - \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [carboxi - colestadienol] * [NADP]}{Km_{carboxi-colestadienol} * [NADP] + Km_{NADP} * [carboxi - colestadienol] + [carboxi - colestadienol] * [NADP]} \\
& + \frac{Kcat_{erg27} * Enz_{erg27} * [colestadienona] * [NADPH]}{Km_{colestadienona} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [colestadienona] + [colestadienona] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg3} * Enz_{erg3} * [episterol] * [NADPH]}{Km_{episterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [episterol] + [episterol] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg5} * Enz_{erg5} * [ergostatrienol] * [NADPH]}{Km_{ergostatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [ergostatrienol] + [ergostatrienol] * [NADPH]} \\
& + \frac{Kcat_{erg4} * Enz_{erg4} * [ergostatetraenol] * [NADPH]}{Km_{ergostatetraenol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [ergostatetraenol] + [ergostatetraenol] * [NADPH]}
\end{aligned}$$

48. Variación SAM

$$\frac{d[SAM]}{dt} = - \frac{Kcat_{erg6} * Enz_{erg6} * [zimosterol] * [SAM]}{Kd_{SAM} * Km_{zimosterol} + Km_{zimosterol} * [SAM] + Km_{SAM} * [zimosterol] + [zimosterol] * [SAM]}$$

49. Variación PPI

$$\begin{aligned}
\frac{d[PPI]}{dt} = & \frac{Kcat_{erg20a} * Enz_{erg20a} * [DMAPP] * [IPP]}{Kd_{DMAPP} * Km_{IPP} + Km_{DMAPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [DMAPP] + [DMAPP] * [IPP]} + \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9a} * [FPP]^2}{2 * Km_{FPP} * [FPP] + [FPP]^2} \\
& + \frac{Kcat_{erg20b} * Enz_{erg20b} * [GPP] * [IPP]}{Kd_{GPP} * Km_{IPP} + Km_{GPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [GPP] + [GPP] * [IPP]} + \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9b} * [NADPH] * [Pre-esc]}{Kd_{NADPH} * Km_{Pre-esc} + Km_{NADPH} * [Pre-esc] + Km_{Pre-esc} * [NADPH] + [NADPH] * [Pre-esc]}
\end{aligned}$$

$$+ \frac{Kcat_{bst1} * Enz_{bst1} * [FPP] * [IPP]}{Kd_{FPP} * Km_{IPP} + Km_{FPP} * [IPP] + Km_{IPP} * [FPP] + [FPP] * [IPP]} + 2 * \frac{Kcat_{crtYBa} * Enz_{crtYBa} * [GGPP]^2}{Kd_{GGPP} * Km_{GGPP} + 2 * Km_{GGPP} * [GGPP] + [GGPP]^2}$$

50. Variación CO2

$$\begin{aligned} \frac{d[CO_2]}{dt} = & \frac{kcat_{mvd1} * Enz_{mvd1} * [MEVPP] * [ATP]}{Kd_{MEVPP} * Km_{ATP} + Km_{MEVPP} * [ATP] + Km_{ATP} * [MEVPP] + [MEVPP] * [ATP]} \\ & + \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [metilzim - COOH] * [NADP]}{Km_{metilzim-COOH} * [NADP] + Km_{NADP} * [metilzim - COOH] + [CO_2] * [NADP]} \\ & + \frac{Kcat_{erg26} * Enz_{erg26} * [carboxi - colestadienol] * [NADP]}{Km_{carboxi-colestadienol} * [NADP] + Km_{NADP} * [carboxi - colestadienol] + [carboxi - colestadienol] * [NADP]} \end{aligned}$$

51. Variación HCOOH

$$\frac{d[HCOOH]}{dt} = \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11c} * [Ac - aldehido] * [NADPH]}{Km_{Ac-aldehido} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - aldehido] + [Ac - aldehido] * [NADPH]}$$

52. Variación H⁺

$$\begin{aligned} \frac{d[H^+]}{dt} = & -2 * \frac{Kcat_{hmg2} * Enz_{hmg2} * [HMGCoA] * [NADPH]^2}{Km_{HMGCoA} * Km_{NADPH} * [NADPH] + 2 * Km_{NADPH} * [HMGCoA] * [NADPH] + Km_{HMGCoA} * [NADPH]^2 + [HMGCoA] * [NADPH]^2} \\ & - \frac{Kcat_{erg9} * Enz_{erg9b} * [NADPH] * [Pre - esc]}{Kd_{NADPH} * Km_{Pre-esc} + Km_{NADPH} * [Pre - esc] + Km_{Pre-esc} * [NADPH] + [NADPH] * [Pre - esc]} \\ & - \frac{Kcat_{erg1} * Enz_{erg1a} * [NADPH] * [O_2]}{Kd_{NADPH} * Km_{O_2} + Km_{NADPH} * [O_2] + Km_{O_2} * [NADPH] + [NADPH] * [O_2]} \\ & - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11a} * [Lanosterol] * [NADPH]}{Km_{Lanosterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Lanosterol] + [Lanosterol] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11b} * [Ac - alcohol] * [NADPH]}{Km_{Ac-alcohol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - alcohol] + [Ac - alcohol] * [NADPH]} \\ & - \frac{Kcat_{erg11} * Enz_{erg11c} * [Ac - aldehido] * [NADPH]}{Km_{Ac-aldehido} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [Ac - aldehido] + [Ac - aldehido] * [NADPH]} - \frac{Kcat_{erg3} * Enz_{erg3} * [episterol] * [NADPH]}{Km_{episterol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [episterol] + [episterol] * [NADPH]} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& \frac{Kcat_{erg5} * Enz_{erg5} * [ergostatrienol] * [NADPH]}{Km_{ergostatrienol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [ergostatrienol] + [ergostatrienol] * [NADPH]} \\
& \frac{Kcat_{erg4} * Enz_{erg4} * [ergostatetraenol] * [NADPH]}{Km_{ergostatetraenol} * [NADPH] + Km_{NADPH} * [ergostatetraenol] + [ergostatetraenol] * [NADPH]}
\end{aligned}$$