

Universidad Nacional
de San Martín



Desarrollo y evaluación del modelado *in silico* para la producción heteróloga de cannabinoides minoritarios

Tesis presentada para cumplir con los requisitos finales para la
obtención del título de Licenciado en Biotecnología

Alumno: Franco D'Onofrio

Directora: Romina Lasry Testa

Co-Directora: Vanina Estrada

Agradecimientos

A todos, por la paciencia.

Nota de Confidencialidad

Este proyecto está enmarcado en las tareas de I+D de la empresa start-up Calice Biotech SAU, en vista de esto ciertos procesos de las tecnologías aquí generadas no serán revelados en detalle para no comprometer el carácter novedoso del trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 - CANNABIS

1.1.1 - CARACTERÍSTICAS

1.1.2 - GENÓMICA Y PROTEÓMICA

1.2 - CANNABINOIDES

1.2.1 – SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

1.2.2 – SÍNTESIS DE CANNABINOIDES

1.2.3 – CANNABINOIDES MAYORITARIOS Y MINORITARIOS

1.2.4 – OTROS METABOLITOS DE CANNABIS SP.

1.3 – PRODUCCIÓN HETERÓLOGA

1.3.1 - DIFICULTADES DEL CULTIVO DE CANNABIS SP.

1.3.2 – UTILIDAD Y LIMITACIONES DE LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA

1.3.3 – PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE CANNABINOIDES

1.3.4 – UTILIDAD DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN PRODUCCIÓN HETERÓLOGA

1.3.4.1 – PRODUCCIÓN DE GERANIL DIFOSFATO EN S. CEREVISIAE

1.3.4.2 – PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN S. CEREVISIAE

1.4 – BIOLOGÍA DE SISTEMAS

1.4.1 - MODELOS A ESCALA GENÓMICA

1.4.2 – GEMs PARA S. CEREVISIAE

1.4.3 - ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJO

1.4.4 – ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJO DINÁMICO

2 - OBJETIVOS

3 - MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 - ELECCIÓN DE BASES DE DATOS Y GEM

3.2 - ELECCIÓN DE HERRAMIENTAS

3.3 - DATOS EXPERIMENTALES

3.4 - DISEÑO

3.5 - VALIDACIÓN DE YEAST8

3.5.1 - FBA

3.5.2 - DFBA

3.6 - MODELADO DE LA PRODUCCIÓN DE CANNABINOIDES CON SXC09

3.6.1 - FBA

3.6.2 - DFBA

4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 - CONSTRUCCIÓN DE SXC09

4.1.1 - INTRODUCCIÓN DE METABOLITOS Y REACCIONES

4.1.2 - EVALUACIONES DE CALIDAD

4.2 - VALIDACIÓN DE YEAST8 COMO HERRAMIENTA PREDICTIVA

4.2.1 - FBA

4.2.2 - DFBA

4.2.2.1 - ESTIMACIÓN DE LA DURACIÓN DE LA FASE LAG

4.2.2.2 - VALIDACION

4.3 - PREDICCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CBGA CON SXC09

4.4 - EFECTO DEL KNOCK-OUT DE GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO FERMENTATIVO

5 - CONCLUSIONES

6 - BIBLIOGRAFÍA

7 - LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

El Cannabis (*Cannabis sp.*) es un cultivo multipropósito utilizado hace milenios por los seres humanos. Esta planta debe su popularidad en buena parte a su capacidad de producir compuestos con efectos psicoactivos, por los cuales es utilizada como droga recreativa. A pesar de su prohibición durante la mayoría del siglo XX bajo el pretexto de proteger la salud pública, en años recientes ha surgido un creciente interés en su producción a escala industrial dada la evidencia científica sobre la utilidad de muchos de sus productos como medicamentos. Entre estos se destaca un grupo de compuestos conocidos como cannabinoides, que incluye compuestos bien caracterizados como el cannabidiol y el tetrahidrocannabinol, así como cannabinoides minoritarios producidos en cantidades escasas y con posibles usos medicinales prometedores, pero escasamente estudiados.

Debido a su historial de ilegalidad, *Cannabis sp.* no vio los beneficios que las técnicas modernas de biología molecular aportaron al mejoramiento de otros cultivos para su uso a escala industrial. Asimismo, las características propias de la planta, como su dimorfismo sexual, la asociación entre su ciclo reproductivo y metabolismo secundario, y la escasa producción de ciertos compuestos de interés, la convierten en un cultivo potencialmente laborioso e ineficiente a escala industrial.

La producción heteróloga de compuestos de origen vegetal en organismos aptos para cultivo en biorreactores es una alternativa útil para hacer factible su producción a gran escala. El desarrollo de cepas heterólogas es un paso potencialmente costoso en tiempo, trabajo y dinero. Distintas herramientas y técnicas bioinformáticas son útiles para facilitar el diseño de estas cepas y reducir el costo y tiempo de su desarrollo. Una de estas herramientas son los modelos a escala genómica o GEMs (*GENomic scale Models*), reconstrucciones del metabolismo de un organismo y los genes asociados.

Utilizando Yeast8, el GEM de *Saccharomyces cerevisiae* con mayor cobertura de su metabolismo desarrollado hasta la fecha, se logró construir un modelo de una cepa de levadura que incluye la vía de síntesis de ácido cannabigerólico (CBGA), el precursor de los cannabinoides mayoritarios en *Cannabis sp.* Este modelo incluye 4 genes de *Cannabis sp.* que comprenden 4 reacciones y la síntesis de 3 metabolitos previamente ausentes en *S. cerevisiae*. Utilizando este modelo, se utilizaron técnicas de análisis de flujo incluyendo FBA (*Flux Balance Analysis*) y DFBA (*Dynamic Flux Balance Analysis*) para evaluar la capacidad máxima de producción de CBGA en *S. cerevisiae* y la productividad máxima esperada en un proceso basado en esta cepa.

Los resultados indican una capacidad máxima por encima de 1 g/L para la producción de CBGA con *S. cerevisiae*, superior a los resultados obtenidos en procesos similares hasta la fecha. El modelo desarrollado en este trabajo hace uso de la mayor cantidad de datos disponibles en la literatura para la realización de predicciones precisas de resultados experimentales. Siendo apto para la predicción de la posibilidad de producir cannabinoides en cepas heterólogas de *S. cerevisiae*, este modelo sienta las bases para el desarrollo de herramientas predictivas más

precisas y para el diseño de cepas heterólogas que ofrezcan una mayor productividad, evitando recurrir a técnicas de laboratorio que requieran múltiples experimentos en paralelo y reduciendo en gran medida los costos de investigación y desarrollo.

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 - CANNABIS

Cannabis es un género de plantas con una larga historia de uso por parte de los seres humanos. Sus aplicaciones incluyen la producción de fibras textiles, semillas para la producción de aceite y proteínas con fines alimenticios e industriales, y la extracción de un gran número de compuestos de interés farmacológico (Zhang *et al.*, 2018; Lopez, 2021). Dichos compuestos se encuentran concentrados mayormente en sus inflorescencias (Barcaccia *et al.*, 2020), e incluyen un grupo de sustancias conocidas como cannabinoides, entre los cuales se encuentran compuestos con efectos narcóticos como el tetrahidrocannabinol (THC) y su derivado cannabinol (CBN), por lo cual las flores de *Cannabis* son consumidas como droga psicoactiva y como parte de ritos religiosos (Bonini *et al.*, 2018; Kovalchuk *et al.*, 2020).

Se cree que *Cannabis* se originó en Asia Central, actual China, hace 21 millones de años para terminar de expandirse por Eurasia hace aproximadamente 1,2 millones de años (Kovalchuk *et al.*, 2020). Los primeros indicios de su cultivo datan de hace 10000 años, probablemente para la producción de fibras, y evidencias de su uso medicinal datan de hace 6000 años (Bonini *et al.*, 2018). Por otro lado, evidencias arqueológicas indican que los primeros usos de *Cannabis* como droga recreativa fueron hace 2500 años (Ren *et al.*, 2019) y su introducción en América se da a principios del siglo XIX (Kovalchuk *et al.*, 2020). La prohibición del cultivo de *Cannabis* tiene antecedentes en 1937 en EE.UU, y en 1961 es incluida en la Convención Única de Estupefacientes de Naciones Unidas como sustancia altamente adictiva (lista I) y de escaso valor terapéutico (lista IV) (Lopez, 2021; Bonini *et al.*, 2018). Sin embargo, en la actualidad, es la sustancia controlada más consumida del mundo (UNODC, 2020).

El descubrimiento del sistema endocannabinoide del sistema nervioso y la acumulación de evidencia sobre las propiedades medicinales del *Cannabis* y sus derivados dieron lugar a la tendencia actual en gran parte del mundo hacia la despenalización y/o legalización de este cultivo. En este contexto, el uso medicinal de *Cannabis* fue autorizado en 1993 en Israel y en 1996 en el estado de California. Durante el siglo XXI se sumaron países como Canadá, Reino Unido, Países Bajos y un total de 29 estados de EEUU. Actualmente, el uso autorizado de *Cannabis* con fines medicinales alcanza más de 40 países, siendo el cannabidiol (CBD) el compuesto que atrae la mayor parte del interés de la industria farmacéutica debido a sus posibles usos como analgésico, antiinflamatorio y antioxidante, entre otros (Aliferis & Bernard-Perron, 2020).

Ciertos países o regiones han despenalizado o legalizado el uso recreativo de *Cannabis* incluyendo los Países Bajos (donde es escasamente regulado desde los años '70), 11 estados y ciertos territorios de EEUU, y más recientemente México. En los casos de Canadá y Uruguay se decidió en favor de la legalización completa, incluso cuando esto entra en conflicto con regulaciones internacionales (Janatová *et al.*, 2018; Lopez, 2021).

En Argentina, la ley 27.350 de investigación médica y científica del uso medicinal de la planta de cannabis y sus derivados, aprobada en 2017, habilita el desarrollo de proyectos de investigación respecto a las propiedades terapéuticas del *Cannabis* y sus derivados (Lopez, 2021).

1.1.1 - CARACTERÍSTICAS

El género *Cannabis* consiste de plantas anuales y dioecias (es decir, flores masculinas y femeninas se encuentran en plantas separadas), de polinización anemófila. Plantas monoecias de este género aparecen raramente en la naturaleza, y en cultivos de laboratorio o industriales se puede inducir la producción de polen en plantas femeninas (Clarke & Merlin, 2017; Hurgobin *et al.*, 2021). Las inflorescencias de *Cannabis* contienen estructuras llamadas tricomas que se especializan en la producción y acumulación de cannabinoides y otros compuestos aromáticos como terpenos, formando una resina. Esta resina forma una barrera física, que atrapa insectos que intentan alimentarse de la planta, y sus componentes tienen acción pesticida y antifúngica (Clarke & Merlin, 2017; Conneely *et al.*, 2021; Baron, 2018).

1.1.2 - GENÓMICA Y PROTEÓMICA

Según la clasificación que cuenta con mayor consenso, el género *Cannabis* incluye una sola especie: *Cannabis sativa* (Kovalchuk *et al.*, 2020). Los términos *Cannabis*, *Cannabis sp.* y *Cannabis sativa* suelen utilizarse de forma intercambiable. Ciertos autores han propuesto sistemas de clasificación que incluyen 4 o 7 especies o subespecies interfértiles, cuyas diferencias incluyen distribución geográfica, composición química y variables fenotípicas (Carvalho *et al.*, 2017; Hillig, 2005).

Otro método de clasificación de *Cannabis* se basa en las concentraciones de sus cannabinoides mayoritarios. Estos sistemas de clasificación suelen utilizarse como base para las restricciones legales para el cultivo de *Cannabis*. Por ejemplo, en EEUU y Canadá el límite de THC autorizado en plantas para uso industrial es 0.3%, y en la Unión Europea, 0.2% (Lopez, 2021).

El genoma nuclear de *Cannabis* es diploide, con 9 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales. Su tamaño se estima en 843 Mpb para plantas masculinas (XY) y 818 Mpb para plantas femeninas (XX). El genoma de *Cannabis* es altamente repetitivo, con alrededor de 70% de elementos repetidos. Las variedades *wild-type* presentan un grado elevado de heterocigosis, estimado entre 12,5% y 40,5% (Hurgobin *et al.*, 2021). En cambio, las variedades agrícolas e industriales suelen presentar una diversidad genética menor debido al proceso de domesticación y fijación de caracteres de interés (Gao *et al.*, 2020).

El primer genoma anotado de *Cannabis* (NCBI *Cannabis sativa* Annotation Release 100) fue publicado en 2019 (Jenkins & Orsburn, 2019) y contiene 31172 genes de los cuales 25297 codifican para proteínas. Al mismo tiempo, se publicó la primera versión de un mapeo del proteoma de *Cannabis* (Jenkins & Orsburn, 2020), que hasta la fecha contiene 17269 secuencias proteicas, 13929 de ellas anotadas, e información adicional como 964 proteínas con estructura tridimensional determinada por homología y el mapeo de modificaciones postraduccionales.

1.2 - CANNABINOIDES

Una de las características destacadas de *Cannabis* es su extenso metabolismo secundario (sustancias que cumplen funciones de comunicación y defensa), del cual se identificaron más de 500 productos (Jin *et al.*, 2020; Aliferis & Bernard-Perron, 2020). Entre estos se destacan unos 120 cannabinoides, que se identificaron originalmente en *Cannabis* y recientemente en organismos de otros géneros como *Radula* y *Rhododendron* (Gulck & Moller, 2020). Los cannabinoides son compuestos terpenofenólicos, con un núcleo resorcínico y una cadena lateral alquilada (Gulck & Moller, 2020, Welling *et al.*, 2022).

1.2.1 – SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

En el organismo, los cannabinoides interactúan con los componentes del sistema endocannabinoide (ECS). Este es el conjunto de receptores que interactúan con ligandos conocidos como endocannabinoides, incluyendo la anandamida (N-araquidonoiletanolamina, AEA) y el araquidonoil-glicerol (2-AG) (Alves *et al.*, 2020; Baron, 2018).

El ECS está involucrado en la regulación de múltiples procesos fisiológicos, incluyendo el apetito, ritmo circadiano, inflamación, estrés y respuesta al dolor (Alves *et al.*, 2020). En el sistema inmune influye en la liberación de citoquinas y quimioquinas y en la migración celular (Baron, 2018).

Sus componentes más importantes son los receptores cannabinoides (CBR), que son receptores transmembrana asociados a la proteína G. El primer componente descubierto de este sistema en humanos es el receptor CB1, que está asociado a la proteína G más abundante en el cerebro. Se distribuye mayormente en los sistemas nerviosos central y periférico, y en menor medida en órganos periféricos. El otro componente mayoritario del ECS es el receptor CB2, localizado mayormente en órganos periféricos y células del sistema inmune, y en menor medida en ciertos tipos de neuronas (Baron, 2018).

La extensión total del ECS es aún materia de especulación. Se observó que CBD actúa como antagonista de los receptores huérfanos GPR55 (Ryberg *et al.*, 2007) y GPR18. Se cree que el ECS alcanza también a receptores de las familias TRP (como TRPV, TRPA, y TRPM) y PPAR (Baron, 2018).

1.2.2 – SÍNTESIS DE CANNABINOIDES

En la figura 1 se pueden observar las principales reacciones y enzimas de las vías biosintéticas de los cannabinoides. El precursor de los cannabinoides es el ácido cannabigerólico (CBGA), que es sintetizado en *Cannabis* por la enzima ácido cannabigerólico sintasa (CBGAS, CsPT4), una preniltransferasa aromática transmembrana con localización en plástidos, posiblemente cloroplastos (Welling *et al.*, 2022). Los precursores de esta reacción son el geranil pirofosfato (GPP) y el ácido olivetólico (OA). GPP es un isopreno de 10 carbonos sintetizado en los plástidos de *Cannabis* por la vía del metileritrol-4-fosfato (MEP/DOXP) y por la vía del mevalonato (MVA) en el citosol (Andre *et al.*, 2016).

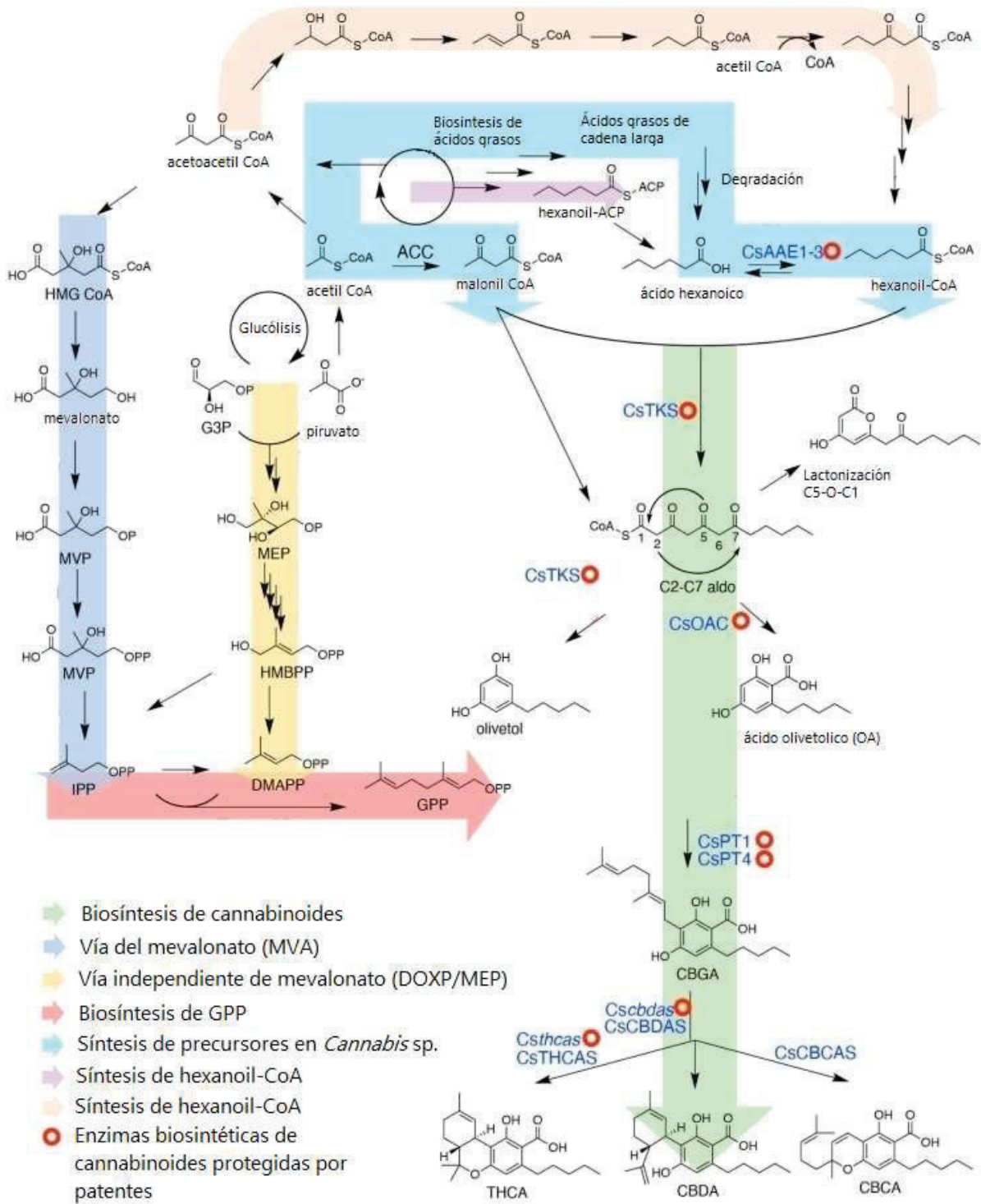


Figura 1 – Vías de síntesis de cannabinoides y sus precursores en *Cannabis sp.* Adaptado de Blatt-Janmaat & Qu (2021).

OA es sintetizado en el citosol, partiendo de sus precursores: ácido hexanoico y malonil-CoA. La vía de producción de ácido hexanoico en *Cannabis* no ha sido elucidada aún, pero se cree que puede originarse en la terminación temprana de la síntesis de ácidos grasos y de la degradación de ácidos grasos por la vía de la lipoxigenasa (LOX). El ácido hexanoico es convertido en hexanoil-CoA por una enzima activante de acil graso (CsAAE1) y luego en 3,5,7-trioxododecanoil-

CoA con consumo de 3 moléculas de malonil-CoA por la enzima tetracétido sintasa (CsTKS, también denominada ácido olivetólico sintasa u OLS). Finalmente, la enzima ácido olivetólico ciclasa (CsOAC) genera OA a partir de 3,5,7-trioxododecanoil-CoA (figura 1) (Aliferis & Bernard-Perron, 2020).

Los cannabinoides son sintetizados en su forma ácida (de 22 carbonos, C₂₂), y pueden descarboxilarse de forma espontánea por exposición al calor o radiación solar, entre otros. La descarboxilación modifica la afinidad de estos compuestos por los distintos receptores de ECS y sus efectos sobre el organismo.

1.2.3 – CANNABINOIDES MAYORITARIOS Y MINORITARIOS

Los componentes mayoritarios en la resina de *Cannabis* son los previamente mencionados Δ^9 -THC y CBD. Los términos tetrahidrocannabinol y THC suelen utilizarse de forma intercambiable con Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) o el enantiómero activo (–)-trans- Δ^9 -tetrahidrocannabinol. Este es el mayor componente psicoactivo de *Cannabis*. El cannabidiol o CBD es su mayor componente no psicoactivo y el componente mayoritario en cultivos de cáñamo. También se encontraron en *Cannabis sp.* otros compuestos de la familia de los cannabinoides en cantidades escasas, que suelen denominarse cannabinoides minoritarios. Estos componentes también han demostrado propiedades farmacológicas prometedoras y patrones particulares de afinidad por receptores del ECS. Si bien la información disponible sobre el posible uso farmacológico de estas sustancias es limitada, la capacidad demostrada hasta el momento de los cannabinoides mayoritarios y sus características de seguridad sirven de indicadores del potencial de los cannabinoides minoritarios para el tratamiento de enfermedades. Estos compuestos incluyen el cannabigerol (CBG), la forma descarboxilada del ácido cananbigerólico (CBGA) el cual es el precursor de los cannabinoides mayoritarios. El CBGA se encuentra mayormente en cultivares de cáñamo con baja producción de THC Otro cannabinoide minoritario destacable es el cannabicromeno (CBC), que es el derivado descarboxilado de CBCA y uno de los tres compuestos derivados de CBGA obtenidos por síntesis enzimática en *Cannabis sp.* (junto con CBDA y THCA) por acción de la enzima ácido cannabicroménico sintasa (CBCAS) (Gulck & Moller, 2020).

Parte de la diversidad en los cannabinoides identificados se explica por modificaciones espontáneas de estos productos, por exposición a calor, radiación ultravioleta u oxígeno (Gulck & Moller, 2020). Algunos de estos compuestos fueron inferidos en análisis por cromatografía de gases (GC) pero no aislados (Hanus *et al.*, 2016). De muchos de ellos se desconoce si están presentes en *Cannabis* o son generados durante la preparación de muestras o almacenamiento (Degenhardt, Stehle & Kayser, 2017). Las enzimas que sintetizan cannabinoides y sus precursores tienen la capacidad de aceptar compuestos distintos de los habituales dando lugar a ciertos grupos de cannabinoides minoritarios. En *Cannabis sp.* se identificó el grupo conocido como varinoides, variantes de los cannabinoides mayoritarios cuya cadena lateral alquilada

consiste de un grupo propílico en lugar de un n-pentilo (Gulck & Moller, 2020). Su síntesis depende de la capacidad de CsTKS de utilizar butanoil-CoA en lugar de hexanoil-CoA produciendo ácido divarinico, el precursor de los varinoides (Degenhardt, Stehle & Kayser, 2017). THC y CBD son utilizados en la actualidad tanto en formulaciones individuales como en combinación, y pueden ser de origen sintético o extraídos de *Cannabis*. Ambos tienen efectos antioxidantes, antiinflamatorios y analgésicos, y existe evidencia de su utilidad en el tratamiento de múltiples desórdenes neurológicos como epilepsia, esclerosis múltiple, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y trastornos de ansiedad entre otros. CBD se destaca por su capacidad analgésica y su efecto sobre epilepsias refractarias infantiles. THC es utilizado solo o en combinación con CBD en el tratamiento de náuseas y anorexia asociadas a VIH o quimioterapia en pacientes oncológicos (Baron, 2018). Ciertos cannabinoides minoritarios tienen propiedades prometedoras como medicamentos para una amplia gama de condiciones. El CBG tiene potencial como analgésico, antidepresivo, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas como Huntington, glaucoma y psoriasis, y tiene actividad antibiótica contra hongos y bacterias, en particular en infecciones resistentes a antibióticos (Baron, 2018). El CBC tiene potencial como analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano contra hongos y bacterias, y citotóxico para células cancerosas (Baron, 2018), pero hasta a la fecha no se realizaron estudios clínicos en humanos para demostrar su utilidad (Gulck & Moller, 2020). Existen estudios que indican la utilidad de varinoides como CBDV para el tratamiento de condiciones como epilepsia y como paliativo en trastornos del espectro autista (Alves *et al.*, 2020). A los posibles usos terapéuticos ya descritos de los cannabinoides se le suma el potencial antitumoral y anticanceroso de algunos de estos compuestos. Entre los resultados compilados por Tomko *et al.* (2020) se incluyen resultados positivos en modelos *in vitro* e *in vivo* de múltiples tipos de tumores cerebrales, cáncer de mama, leucemia y ciertos tipos de cánceres de pulmón, entre otros. Estos incluyen pruebas clínicas exitosas (en forma de un aumento significativo de la supervivencia de pacientes) del uso de CBD y THC en combinación con temozolomida en el tratamiento de glioblastoma multiforme. Se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* que indican la posible utilidad de cannabinoides minoritarios como CBN, CBC, CBG y CBDV como agentes antitumorales. La evidencia disponible en la actualidad indica que los cannabinoides tienen características de seguridad muy favorables. En el caso de CBD, estudios en animales y humanos indican que es tolerado en dosis tan altas como 1500 mg por día (Cassano *et al.*, 2020). El THC, además de ser el compuesto psicoactivo mayoritario, está asociado a la mayoría de los riesgos de salud del consumo de *Cannabis*, incluyendo adicción y desarrollo de trastornos psicóticos. El CBD no está asociado a estos efectos y serviría para reducir los efectos más drásticos del THC (Freeman *et al.*, 2020).

1.2.4 – OTROS METABOLITOS DE *CANNABIS SP.*

Las flores de *Cannabis* contienen otros grupos de compuestos de interés farmacológico. Un aspecto poco entendido de sus efectos fisiológicos es lo que se conoce como efecto *entourage*, que se refiere a la variabilidad entre los efectos de distintas cepas de *Cannabis* que se cree estaría asociado a la sinergia entre cannabinoides y otros compuestos (Booth & Bohlmann, 2019; Ben-Shabat *et al.*, 1998).

Los terpenos son derivados de isoprenoides de gran diversidad estructural. Son sintetizados por enzimas de la familia terpeno sintasas (TPS), que codifican para un gran número de enzimas distintas, lo cual produce la diversidad de terpenos que pueden encontrarse en una planta y la diferencia entre cultivares. Sus precursores son isoprenos, incluyendo geranyl pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) y geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), y según su precursor pueden clasificarse como monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos respectivamente (Jin *et al.*, 2020). Ciertos terpenos interactúan con receptores asociados al ECS, como β -cariofileno que tiene afinidad por el receptor CB2 (Baron, 2018).

Los flavonoides son compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes en plantas y tienen potencial como antiinflamatorios y en el tratamiento de enfermedades crónicas y neurodegenerativas (Baron, 2018). Alrededor de 20 flavonoides fueron identificados en *Cannabis*, entre ellos el grupo de las cannflavinas que son exclusivos de esta especie (Bautista, Yu & Tian, 2021).

1.3 – PRODUCCIÓN HETERÓLOGA

1.3.1 - DIFICULTADES DEL CULTIVO DE *CANNABIS SP.*

El cultivo de *Cannabis* es atractivo para la industria farmacéutica por el número de posibles fármacos que es capaz de sintetizar, y ciertos cultivares son capaces de acumular grandes cantidades, superando el 20% del peso seco de las flores (Blatt-Janmaat & Qu, 2021). Aun así, existen dificultades en el aprovechamiento de este cultivo a escala industrial, en particular en la producción de sus componentes minoritarios.

Las concentraciones de cannabinoides y otros posibles fármacos son máximas en flores femeninas maduras previo a su polinización. Por ende, la eliminación de plantas masculinas es necesaria para maximizar el número de plantas femeninas en un cultivo y evitar su polinización (ElSohly *et al.*, 2017). Una alternativa es el uso de variedades de semillas feminizadas, es decir que siempre dan lugar a plantas femeninas. Es posible obtener semillas feminizadas induciendo la aparición de flores masculinas en plantas femeninas, sometiendo la planta a estrés. Es también un proceso útil para programas de mejoramiento genético basados en autocruza de plantas (Hurgobin *et al.*, 2021), pero costoso en tiempo y dinero (Hesami *et al.*, 2021).

En cultivos en exteriores la polinización es difícil de evitar, dado que el polen es dispersado por el viento. Factores ambientales como temperatura, luz y plagas afectan a la producción final de

cannabinoides y otros metabolitos secundarios (Carvalho *et al.*, 2017; Hesami *et al.*, 2020). La suma de estos factores hace el cultivo de *Cannabis* difícil de estandarizar.

El cultivo en invernaderos o *indoor* permite el control total de las condiciones del medio, como intensidad de luz y fotoperiodo, temperatura, humedad y concentración de CO₂. Con control adecuado del fotoperiodo pueden obtenerse 3 ó 4 cultivos por año, frente al único obtenible con cultivos en exteriores (EISOhly *et al.*, 2017). Requieren también de riego artificial y son altamente automatizables. Si bien esta forma de cultivo facilita la estandarización del producto, es un proceso costoso y requiere un gran gasto de energía eléctrica (Lim *et al.*, 2021). El cultivo en interiores resulta también en una producción reducida de biomasa (EISOhly *et al.*, 2017).

En el caso de los cannabinoides minoritarios, su extracción de *Cannabis* no es rentable debido a las bajas concentraciones en planta y pérdidas en el proceso de extracción (Carvalho *et al.*, 2017). La síntesis química de cannabinoides no es en general económicamente rentable ya que estos procesos son costosos, complejos y su rendimiento bajo. Para sustancias quirales como THC suele ser necesario diseñar un proceso estereoselectivo lo cual añade a su dificultad (Carvalho *et al.*, 2017; Schafroth & Carreira, 2017).

1.3.2 – UTILIDAD Y LIMITACIONES DE LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA

Una alternativa moderna para la producción de compuestos de origen vegetal difíciles de cultivar o sintetizar es la producción heteróloga, consistente en el uso de microorganismos modificados genéticamente para expresar enzimas de vías de síntesis originadas en otras especies.

El diseño de estos procesos depende en primer lugar de la disponibilidad de información suficiente para reconstruir una vía de síntesis para un compuesto de interés. Luego, es necesario disponer de información sobre las enzimas involucradas en esta vía y los genes que las codifican. La expresión de estos genes puede estar ligada a factores ambientales lo cual dificulta su descubrimiento. El desarrollo de métodos computacionales para la predicción de secuencias codificantes para genes y de genomas anotados para nuevas especies contribuyen a la aceleración en el diseño de cepas heterólogas (Wurtzel & Kutchan, 2016).

La vía de síntesis de interés debe expresarse en un microorganismo apto para cultivo en biorreactores. Organismos modelo como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae* son utilizados con frecuencia (Carvalho *et al.*, 2017; Wurtzel & Kutchan, 2016). Según las necesidades del bioproceso de interés, otros microorganismos pueden ser óptimos.

1.3.3 – PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE CANNABINOIDES

Existen ejemplos exitosos de producción heteróloga de cannabinoides incluyendo CBGA, CBDA y THCA, que incluyen procesos basados en *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Komagataella phaffii*, *Candida viswanathii*, y procesos libres de células. No se reportaron procesos de síntesis heteróloga *de novo* de CBGA o sus derivados en cantidades significativas (Blatt-Janmaat & Qu, 2021).

Dada la alta producción de cannabinoides mayoritarios en *Cannabis sp.* y la existencia de procesos ya desarrollados para su cultivo a escala industrial, el incentivo para desarrollar cepas productoras de THCA y CBDA es menor en comparación con otras sustancias. Existe sin embargo un interés en producir análogos de estos compuestos producidos en cantidades escasas en *Cannabis*, como es el caso del CBC o los varinoides. Entre los otros grupos de compuestos de valor farmacológico producidos por *Cannabis*, los flavonoides son un posible grupo de interés en particular aquellos producidos exclusivamente en esta especie o los que no sean producidos por otras especies fáciles de producir a gran escala. La mayoría de los terpenos producidos en *Cannabis* se encuentran en otras especies vegetales (Baron, 2018). Dada la existencia de procesos industriales ya desarrollados para su extracción, el incentivo para desarrollar la producción heteróloga de terpenos es en general escaso.

1.3.4 – UTILIDAD DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN PRODUCCIÓN HETERÓLOGA

Saccharomyces cerevisiae es una de las opciones preferidas en el diseño de cepas heterólogas debido a la gran cantidad de información disponible sobre este organismo, la disponibilidad de herramientas de biología molecular para su manipulación y su adaptabilidad a condiciones industriales. Otra característica favorable es su capacidad de utilizar distintas fuentes de carbono para procesos fermentativos, en algunos casos requiriendo la introducción de vías heterólogas para el procesamiento de carbohidratos complejos y polímeros como la celulosa. *S. cerevisiae* es un organismo adecuado para la expresión de proteínas originarias de otros organismos eucariotas por su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales, ausente en organismos procariontes como *E. coli* (Hong & Nielsen, 2012; Blatt-Janmaat & Qu, 2021). Los organismos procariontes son también poco adecuados para la expresión correcta de enzimas integrales de membrana, como CBGAS.

Al diseñar cepas heterólogas se debe considerar la capacidad del microorganismo elegido para sintetizar los precursores del producto de interés, así como la posibilidad de modificar su metabolismo y aumentar la producción de estos precursores. Tanto la síntesis de GPP como la de ácido hexanoico tienen como precursor acetil-CoA, por lo cual la optimización de una vía de síntesis puede limitar a la otra (Carvalho *et al.*, 2017; Hong & Nielsen, 2012).

En ciertos procesos hasta ahora desarrollados de síntesis heterológica de cannabinoides, sus precursores son incluidos en el medio de cultivo. Uno de los precursores agregados con mayor frecuencia es el ácido hexanoico, por ser de bajo costo en comparación a otros precursores (isopentenil pirofosfato o ácido olivetólico por ejemplo) (Blatt-Janmaat & Qu, 2021).

1.3.4.1 – PRODUCCIÓN DE GERANIL DIFOSFATO EN *S. CEREVISIAE*

GPP es sintetizado en *S. cerevisiae* a través de la vía MVA en el citosol y mitocondrias como intermediario en la síntesis de farnesil pirofosfato (FPP) por la enzima farnesil difosfato sintasa (FPPS, ERG20). *S. cerevisiae* no expresa una GPP sintasa específica (Carvalho *et al.*, 2017).

La sobreproducción de isoprenos para la síntesis heteróloga de terpenoides en *S. cerevisiae* fue estudiada de forma extensiva. Un ejemplo exitoso es la síntesis semisintética de artemisinina (Hong & Nielsen, 2012; Paddon & Keasling, 2014), cuyo desarrollo incluyó la introducción de una vía heteróloga de síntesis de ácido artemisínico así como modificaciones para incrementar la viabilidad celular y la concentración obtenida del producto. Otros desarrollos exploraron la posibilidad de incrementar la producción de GPP, como modificaciones a ERG20 que eliminen su capacidad de síntesis de FPP (Carvalho *et al.*, 2017).

1.3.4.2 – PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN *S. CEREVISIAE*

La optimización de *S. cerevisiae* para la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) o media (MCFA), entre ellos ácido hexanoico, es otro requerimiento para la obtención de cantidades adecuadas de cannabinoides. El metabolismo de ácidos grasos de *S. cerevisiae* está especializado en la producción de ácidos grasos de cadena larga (mayormente C16 y C18), si bien ciertas cepas producen cantidades más elevadas de otros ácidos grasos (Carvalho *et al.*, 2017). La ingeniería metabólica para la producción de SCFA y MCFA presenta más desarrollo en otros microorganismos como *Kluyveromyces marxianus*. Un desarrollo relevante reportado es la síntesis de butanol (con butiril-CoA, precursor en la síntesis de varinoides, como intermediario) en levaduras a través de la introducción de una vía de síntesis de *Clostridium acetobutylicum* (Hong & Nielsen, 2012).

1.4 – BIOLOGÍA DE SISTEMAS

El diseño exitoso de cepas heterólogas requiere del funcionamiento correcto de la vía introducida en el organismo seleccionado. Las redes metabólicas son complejas y presentan un alto grado de interconexión entre reacciones. Un pequeño número de metabolitos precursores (ATP, NADH, entre otros) puede participar de un gran número de reacciones pertenecientes al metabolismo primario. La alteración del metabolismo por la introducción de unas pocas reacciones heterólogas puede introducir grandes perturbaciones y afectar la homeostasis del organismo. A pesar del descubrimiento de un gran número de vías canónicas, quedan elementos de estas sin dilucidar. Otro obstáculo es la falta de información sobre vías del metabolismo secundario, altamente diverso entre especies y compuesto de una gran cantidad de metabolitos con potencial como fármacos, pesticidas y otros (Nielsen, 2017).

La biología de sistemas hace uso de herramientas computacionales, modelos matemáticos y mediciones experimentales para realizar predicciones sobre el funcionamiento del metabolismo de

organismos. Sus objetivos incluyen el diseño de modelos que incorporen la totalidad de una red metabólica y la obtención de resultados cuantitativos (Nielsen, 2017).

La ingeniería de sistemas metabólicos es una disciplina que integra técnicas de la biología de sistemas (incluyendo análisis de múltiples ómicas y modelos metabólicos a escala genómica), biología sintética (incluyendo múltiples herramientas para el control de expresión de genes) e ingeniería evolutiva (como evolución adaptativa en laboratorio). Su propósito es asistir en el diseño de bioprocesos y cepas modificadas considerando el contexto del proceso industrial completo, incluyendo la etapa de cultivo y sus pasos aguas arriba y abajo (Lasry, 2020; Lee & Kim, 2015).

1.4.1 - MODELOS A ESCALA GENÓMICA

Los modelos matemáticos del metabolismo pueden clasificarse según la cantidad y tipo de información que utilizan en dos categorías: modelos cinéticos y modelos estequiométricos, también conocidos como modelos de escala genómica (*Genomic scale Models* o *GEMs*). Los GEMs son el tipo de modelo más útil y representativo para modelar el metabolismo a escala genómica, ya que incluyen información de todos los genes, enzimas, reacciones y metabolitos del microorganismo considerado. Para construir un GEM se requiere que su genoma se encuentre completamente secuenciado y anotado, e incluye las asociaciones Gen-Proteína-Reacción (GPR) del mismo. Esto implica que cada reacción trae aparejada la información del gen o genes que codifican para las enzimas que la llevan a cabo. A través de los mapeos GPR se puede considerar también la existencia de isoenzimas (en el caso de una reacción que pueda estar asociada a dos enzimas), complejos multiproteicos (donde dos genes son necesarios para la reacción) o enzimas multifuncionales (capaces de realizar más de una reacción) (figura 2). Además, incluyen información del compartimiento celular en el que cada reacción se lleva a cabo (Maranas & Zomorrodí, 2016).

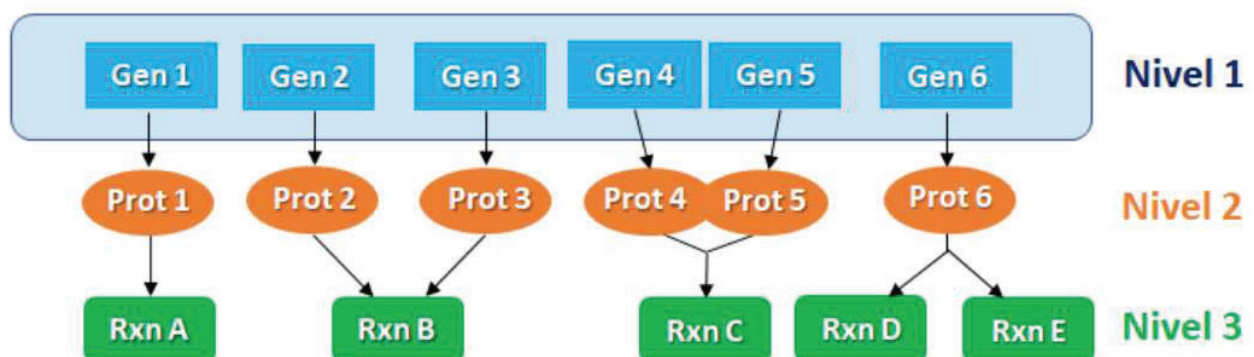


Figura 2 – Ejemplos de posibles relaciones GPR (Lasry, 2020).

Los GEM brindan la posibilidad de obtener un modelo funcional con cantidades relativamente bajas de información biológica, a expensas de la posibilidad de incluir información sobre perfiles de concentración de metabolitos o efectos regulatorios y cinéticos (Nielsen, 2017; Maranas & Zomorodi, 2016). Sin embargo, tienen aplicaciones muy importantes en la ingeniería de microorganismos.

El conjunto de las reacciones en un GEM puede expresarse matemáticamente en la forma de una matriz estequiométrica S , donde cada elemento representa el coeficiente estequiométrico de un metabolito determinado en una reacción (positivo si es un producto, negativo si es un reactivo). Los metabolitos que participan en reacciones que se encuentran en diferentes compartimentos celulares deben intercambiarse entre dichos compartimientos, y aparecerán en múltiples filas de la matriz S . Se debe incluir a esta matriz una reacción *ad-hoc* para la síntesis de biomasa, que modela su producción de biomasa en función de la síntesis de precursores.

1.4.2 – GEMs PARA *S. CEREVISIAE*

Los primeros GEMs fueron construidos por Bernhard Palsson y colaboradores para organismos procariontes incluyendo *E. coli* y *Haemophilus influenzae* (Nielsen, 2017). El primer GEM para un organismo eucariota fue iFF708 para *S. cerevisiae*, publicado en 2003 (Forster *et al.*, 2003). Este modelo fue la base de modelos posteriores que buscaron corregir sus deficiencias y mejorar su capacidad predictiva. Por ejemplo, iND750 (Duarte, Herrgard & Palsson, 2004) expandió el número de compartimientos de 3 a 8, iLL672 (Kuepfer, Sauer & Blank, 2015) incluyó mejores predicciones de esencialidad de genes, e iIN800 (Nookaew *et al.*, 2008) incluyó una mejor descripción del metabolismo de lípidos. iMM904 (Mo, Palson & Herrgard, 2009), derivado de iND750, incorporó información de metabolómica y permitió mejores predicciones sobre genes esenciales.

En 2010 se publicó la primera versión de un GEM consenso, Yeast4, que se construyó combinando la información en iMM904, iLL672 e iIN800 (Sanchez & Nielsen, 2015). Desde entonces, este modelo ha pasado por múltiples instancias de curado e incluye mejoras en la predicción del metabolismo de lípidos y en condiciones anaeróbicas, aumenta su cobertura y añade información de múltiples ómicas de bases de datos como UniProt, BioCyc y KEGG (Sanchez & Nielsen, 2015; Lu *et al.*, 2019). Su versión más reciente, Yeast8 (versión 8.6.2), incluye 4063 reacciones, 1160 genes y 1348 metabolitos ordenados en 14 compartimentos. Este modelo está disponible libremente en GitHub (<https://github.com/>) y se mantiene permanentemente actualizado por la comunidad (Lu *et al.*, 2019).

1.4.3 - ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJO

Los GEM pueden utilizarse para la predicción del funcionamiento del metabolismo que permiten calcular los flujos de metabolitos va través de las reacciones en el GEM. Deben incorporarse restricciones a los flujos, que incluyen datos de reversibilidad de enzimas, límites superiores o inferiores conocidos, datos de captación de nutrientes, que una vez incluidos definen un modelo

basado en restricciones. Existen diversos métodos para analizar este tipo de modelos y obtener los flujos v , que se agrupan en lo que se conoce como métodos COBRA (COBRA: COntstraint-Based Analysis and Reconstruction). Uno de ellos es el análisis de balance de flujo (FBA, *Flux Balance Analysis*), planteado originalmente por Savinell y Palsson (1992), que continúa siendo el más utilizado para el análisis de estos modelos en diferentes condiciones. Para explicarlo, consideraremos un ejemplo sencillo de una célula hipotética (figura 3) con 3 metabolitos y 7 flujos v a determinar. Planteamos los balances de masa dinámicos para cada uno de los metabolitos, obteniendo un sistema de ecuaciones diferenciales. A partir de estos balances, podemos obtener la matriz estequiométrica S .

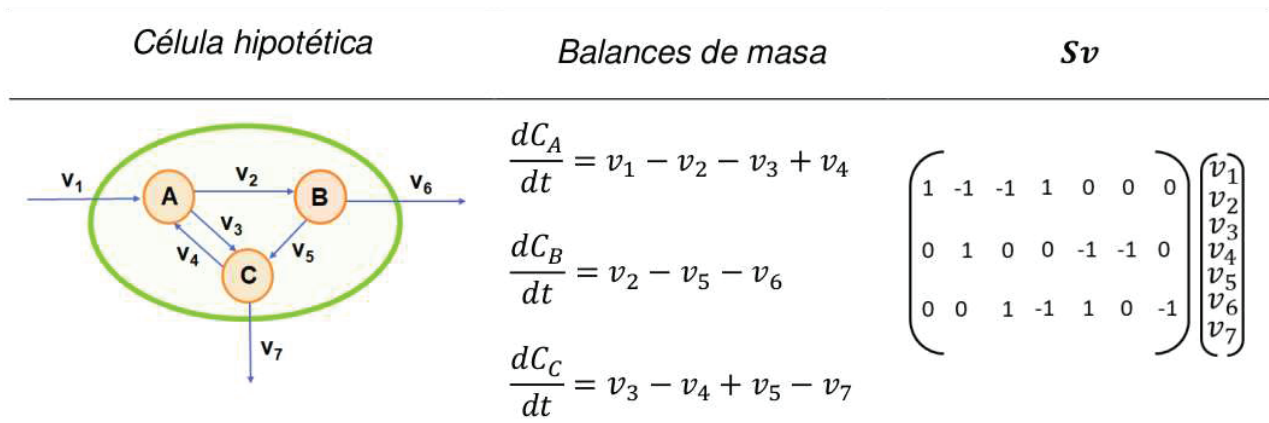


Figura 3 – Ejemplo de una red metabólica, sus balances de masa correspondientes y su matriz estequiométrica (Lasry, 2020).

Generalizando, para un modelo con n metabolitos y m reacciones, los balances de masa quedarán definidos en forma matricial como:

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

donde S es la matriz estequiométrica en el GEM de n metabolitos por m reacciones, v es un vector de largo m con los flujos para cada reacción (también denominados velocidades de reacción), y C es un vector con las concentraciones de los n metabolitos.

Dado que los tiempos en los que transcurren las reacciones intracelulares son mucho más cortos (milisegundos) que las velocidades de crecimiento de los organismos (horas), se puede asumir un estado cuasi estacionario. De esta forma, la ecuación 1 deriva en un sistema de ecuaciones lineales homogéneo:

$$S \cdot v = 0 \quad (2)$$

Generalmente, el número de reacciones es mayor que el de metabolitos ($m > n$), por lo cual este sistema no tiene una solución única sino infinitas soluciones en un espacio determinado. Para reducir este espacio de infinitas soluciones se agregan las restricciones antes mencionadas, como límites superiores e inferior a los flujos:

$$\alpha_m \leq v_m \leq \beta_m \quad (3)$$

Esto permite también modelar la reversibilidad de una reacción, según se permitan valores de α_m menores a 0. En la práctica, si se desconoce el valor límite de un flujo se impone como límite un valor alto extremo como por ejemplo $1000 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (el límite inferior es un valor alto negativo si la reacción es reversible).

Estas restricciones por sí solas aun no resultan suficientes para obtener un estado definido de la red, es por esto que se elige una función del metabolismo o combinación lineal de ellas como función objetivo a maximizar, quedando de esta forma definido un problema de programación lineal (LP: *Linear programming Problem*) resoluble mediante un algoritmo adecuado como lo es el algoritmo Simplex. La formulación resultante es la siguiente:

$$\begin{aligned} & \max v_{\text{biomasa}} \\ & \text{s.t.} \\ & \sum_{m \in M} S_{nm} v_m = 0 \quad \forall n \in N \\ & v_m^L \leq v_m \leq v_m^U \quad \forall m \in M \\ & v_m \in R \end{aligned}$$

donde v_m^L y v_m^U son los límites máximos y mínimos respectivamente para cada flujo v_m en la red metabólica.

1.4.4 – ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJO DINÁMICO

Debido a que el FBA asume estado estacionario, no es posible con esta herramienta modelar lo que ocurre en biorreactores operados de manera batch o fed-batch. Esto motivó el desarrollo de herramientas computacionales que permiten incorporar el estudio de la dinámica temporal de las principales variables del cultivo a los flujos metabólicos de FBA. Uno de estos métodos es FBA dinámico o DFBA (*Dynamic Flux Balance Analysis*), el cual permite predecir la evolución en el tiempo de sistemas similares a bioprocesos industriales, incluyendo las concentraciones de metabolitos y biomasa en el medio. Este método permite también la inclusión de constantes cinéticas de captación de sustratos y tasas de secreción de productos en los casos que estén suficientemente caracterizadas.

DFBA combina la resolución del modelo estequiométrico con un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) que modelan el crecimiento y la producción o consumo de metabolitos extracelulares de forma dinámica. Se plantea un periodo de tiempo en el que transcurre el proceso simulado que es dividido en intervalos y la simulación es resuelta de forma iterativa, donde los resultados de cada intervalo son utilizados como condiciones iniciales para el siguiente. Los flujos calculados mediante FBA son utilizados como constantes para la resolución del sistema de ODEs integrando en un intervalo Δt de tiempo, para calcular las concentraciones en el medio de las variables cinéticas al final de cada intervalo. Las concentraciones extracelulares se acoplan con los flujos de entrada y salida de metabolitos en el GEM, que se modelan de acuerdo a ecuaciones cinéticas de Monod. El sistema está también sujeto a restricciones adicionales para lograr un modelo realista. Estas incluyen límites a las tasas de intercambio de metabolitos, concentraciones extracelulares y flujos mayores a 0 (figura 4) (Øyås & Stelling, 2018).

Diversos algoritmos han sido desarrollados para la resolución de los escenarios planteados, incluyendo casos de programación lineal (LP) o no-lineal (NLP: *Non-Linear Programming*,) (Mahadevan, Edwards & Doyle, 2002; Hjersted & Henson, 2006). Nuevos algoritmos fueron desarrollados con el objetivo de mejorar la eficiencia y escalabilidad de estas simulaciones (Mahadevan, Edwards & Doyle, 2002).

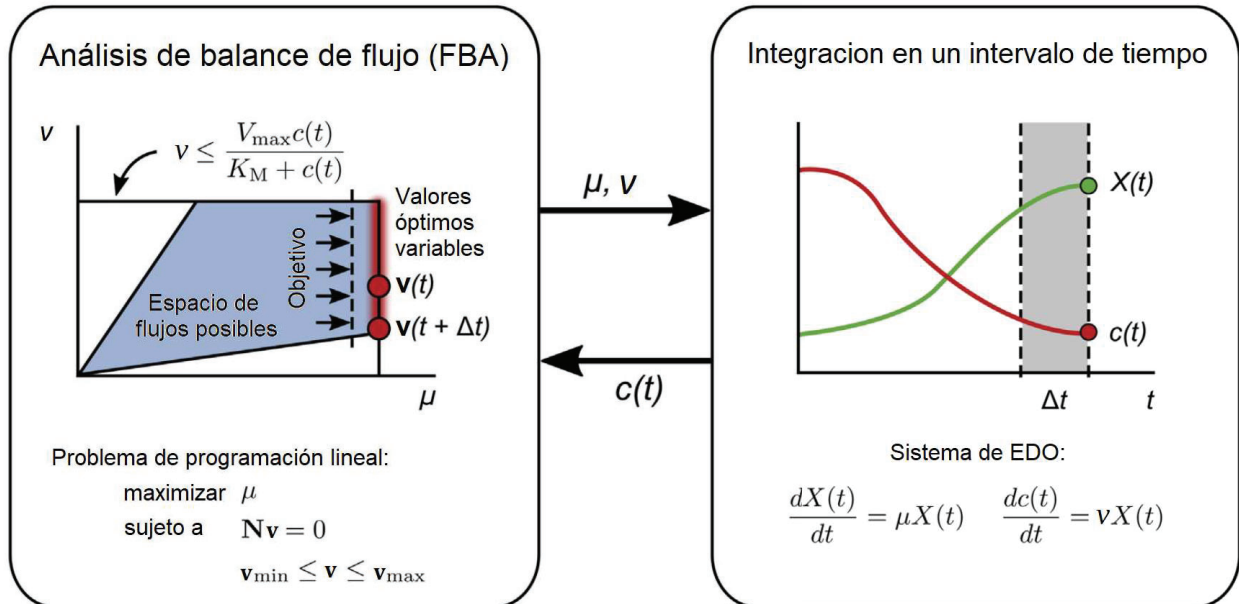


Figura 4 – Diagrama de un proceso de análisis dinámico de balance de flujo (DFBA). Adaptado de Øyås & Stelling, 2018.

2 - OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la producción heteróloga *in silico* de cannabinoides minoritarios en *S. cerevisiae*, por medio de un modelo matemático a escala genómica del metabolismo que permita el diseño de cepas industriales.

Objetivos Específicos

- Relevar modelos metabólicos existentes en bibliografía de *S. cerevisiae*.
- Desarrollar un GEM para una cepa de *S. cerevisiae* que incluya una vía de síntesis de CBGA.
- Estudiar la distribución de flujos metabólicos de esta cepa heteróloga mediante FBA.
- Estudiar la capacidad de producción de CBGA en esta cepa heteróloga mediante DFBA.

3 - MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 - ELECCIÓN DE BASES DE DATOS Y GEM

Como GEM de *S. cerevisiae* de base se utilizó Yeast8 en su versión 8.5, que se encuentra disponible libremente en Github. Para la reconstrucción de la vía de síntesis de CBGA se utilizó la información disponible en las bases de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - Kanehisa & Goto, 1999) y MetaCyc (Caspi *et al.*, 2017) y en la literatura relevante (Carvalho *et al.*, 2017; Aliferis & Bernard-Perron, 2020). Estos datos incluyen la fórmula de cada reacción, enzimas involucradas y el número EC (*Enzyme Commission numbers*) de la reacción. La información respecto a los genes asociados a cada reacción fue extraída de la base de datos GenBank (Benson *et al.*, 2013).

3.2 - ELECCIÓN DE HERRAMIENTAS

Para la manipulación de GEMs y realización de simulaciones de modelado metabólico basadas en restricciones se seleccionaron herramientas basadas en el lenguaje de programación Python (python.org) por su facilidad de uso, libre disponibilidad y compatibilidad con otras herramientas de programación.

La biblioteca de funciones COBRApy (Ebrahim *et al.*, 2013) se utilizó para la ejecución de simulaciones mediante FBA y el desarrollo de GEMs. COBRApy deriva de COBRA Toolbox, desarrollado para MATLAB y es una de las herramientas más utilizadas en modelado metabólico. Para la realización de simulaciones por dFBA se utilizó la biblioteca 'dfba' para Python (Tourigny, Muriel & Beber, 2020), que hace uso de las funciones en COBRApy para el modelado del metabolismo y medio de cultivo del microorganismo, e incluye herramientas para el modelado de la evolución temporal del cultivo. 'dfba' hace uso de bibliotecas de código abierto para Python para la resolución de modelos basados en DFBA.

COBRApy dispone de herramientas para evaluar la calidad de GEMs en función de sus balances de carga y masa y de la conectividad de los metabolitos dentro de la red metabólica. Se utilizó MEMOTE (Lieven *et al.*, 2020), una herramienta automatizada para la realización de estas evaluaciones, para el análisis rápido y simultáneo de parámetros de calidad de los GEM utilizados en este trabajo.

3.3 - DATOS EXPERIMENTALES

Para incluir restricciones a los flujos de ingreso de nutrientes y validar los resultados obtenidos, se utilizaron datos experimentales obtenidos por Rodrigues *et al.* (2021). En este trabajo, los autores realizaron cultivos de distintas cepas de *S. cerevisiae* con distintas fuentes de carbono y energía

para calcular parámetros de crecimiento y consumo de nutrientes. Estas cepas incluyeron UFMG-CM-Y259, una cepa silvestre hallada en Brasil; JP1, utilizada para la producción de etanol en la industria de biocombustibles; y CEN.PK113-7D, comúnmente utilizada en estudios de la fisiología de *S. cerevisiae*, incluyendo una réplica en cada condición. Los datos obtenidos de cultivos con glucosa como sustrato fueron promediados y utilizados para el diseño y validación de simulaciones.

Para el modelado de las ecuaciones dinámicas en simulaciones por DFBA, se utilizaron las constantes cinéticas compiladas por Hanly y Henson (2010) para el crecimiento de *S. cerevisiae* en condiciones aeróbicas con glucosa como fuente de carbono y energía.

Tabla 1 - Datos experimentales utilizados en este trabajo.

Parámetro	Valor	Fuente
q_s (tasa específica de consumo de glucosa)	12,3 mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹	Rodrigues <i>et al.</i> , 2021. Promedio de los datos para 3 cepas de <i>S. cerevisiae</i> .
q_o (tasa específica de consumo de oxígeno)	2,4 mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹	
K_g (constante de saturación de glucosa)	0,8 g L ⁻¹	Hanly & Henson, 2010.
$v_{g,max}$ (velocidad máxima de captación de glucosa)	22,4 mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹	
$v_{o,max}$ (velocidad máxima de captación de oxígeno)	2,5 mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹	

3.4 - DISEÑO

La síntesis de cannabinoides en *Cannabis* involucra distintos compartimentos subcelulares. En el caso de la síntesis de cannabigerolato, aún no se ha determinado en qué compartimento ocurre ni se ha dilucidado el mecanismo de transporte de los intermediarios necesarios en la síntesis de cannabinoides, que podría involucrar proteínas de transporte desconocidas y transporte vesicular en el contexto de los tricomas secretorios de *Cannabis* (Gülck & Møller, 2020). Dada la falta de estos datos, se decidió incluir la vía de síntesis completa en el citosol.

Los precursores de la síntesis de CBGA, y en consecuencia de sus derivados, son malonil-CoA, hexanoil-CoA y geranil pirofosfato (GPP). Para determinar el número mínimo de reacciones que deben agregarse al modelo de *S. cerevisiae* para reconstruir una vía completa de síntesis de CBGA, se exploraron las reacciones en Yeast8 en busca de las vías de síntesis de sus precursores (tabla 2).

Tabla 2 – Reacciones de síntesis de los precursores de la vía de síntesis de cannabinoides presentes en Yeast8

Precursor	Vía de síntesis y/o transporte			
	ID de reacción	Número EC	Reacción	Compartimento celular
Hexanoato	r_2233	3.1.2.2	H ₂ O[p] + hexanoil-CoA[p] => coenzima A[p] + 5 H+[p] + hexanoato[p]	Peroxisomas
	r_2230	-	hexanoato[c] <=> hexanoato[p]	Citosol / Peroxisomas
GPP	r_0355	2.5.1.1; 2.5.1.10	isopentenil difosfato[c] + prenil difosfato(3-)[c]=> difosfato[c] + geranil difosfato[c]	Citosol
Malonil-CoA	r_0109	6.3.4.14	acetil-CoA[c] + ATP[c] + bicarbonato[c] => ADP[c] + H+[c] + malonil-CoA[c] + fosfato[c]	Citosol

Yeast8 incluye la síntesis de isoprenoides en citosol, incluyendo GPP, a través de la vía del mevalonato y de malonil-CoA por acción de la enzima acetil-CoA carboxilasa citosólica. Yeast8 incluye dos vías de transporte de hexanoato hacia el citosol: un transportador desde el medio extracelular codificado por el gen YNL065W y una vía de transporte desde peroxisomas sin genes asociados anotados en Yeast8. En peroxisomas, el hexanoato es sintetizado partiendo de hexanoil-CoA por una tioesterasa inespecífica. *Cannabis* sp. contiene una enzima activante de acil graso expresada en tricomas, CsAAE1, con especificidad por hexanoato (Stout *et al.*, 2012). Se incluyó esta reacción en el modelo para asegurar la producción de hexanoil-CoA en el citosol.

El diseño del GEM para una cepa de *S. cerevisiae* productora de CBGA se realizó mediante las herramientas disponibles en COBRAPy mediante la inclusión de reacciones y metabolitos en Yeast8. En adelante se denominará a este GEM como SXC09. En las tablas 3 y 4, se puede ver el detalle de los metabolitos y reacciones agregados a Yeast8, respectivamente.

Tabla 3 – Metabolitos de *Cannabis* sp. introducidos en Yeast8

ID del metabolito	Nombre	Fórmula	Carga	Compartimento
sn_001	Hexanoil-CoA	C ₂₇ H ₄₂ N ₇ O ₁₇ P ₃ S	0	Citosol
sn_002	3,5,7-trioxododecanoil-CoA	C ₃₃ H ₄₈ N ₇ O ₂₀ P ₃ S	0	Citosol
sn_003	Olivetolato	C ₁₂ H ₁₅ O ₄	-1	Citosol
rn_003	Cannabigerolato	C ₂₂ H ₃₁ O ₄	-1	Citosol

Tabla 4 – Reacciones de síntesis de cannabinoides introducidas en Yeast8

ID de Reacción	Nombre	Ecuación	Número EC	Genes asociados (GenBank ID)
rn_001	Hexanoil-CoA sintasa	hexanoato + ATP + coenzima A => hexanoil-CoA + AMP + difosfato	6.2.1.2	JN717233.1
rn_002	3,5,7-trioxododecanoil-CoA sintasa (o ácido olivetólico sintasa)	hexanoil-CoA + 3 malonil-CoA + 3 H+ => 3,5,7-trioxododecanoil-CoA + 3 CO ₂ + 3 coenzima A	2.3.1.206	AB164375.1
rn_003	Ácido olivetólico ciclasa	3,5,7-trioxododecanoil-CoA => CoA + 2,4- dihidroxi-6-pentilbenzoato	4.4.1.26	JN679224.1
rn_004	Geranil-pirofosfato-ácido olivetólico geraniltransferasa	2,4-dihidroxi-6-pentilbenzoato + geranil difosfato => cannabigerolato + difosfato	2.5.1.102	BK010648.1
rn_sec	Secreción de cannabigerolato	cannabigerolato =>	-	-

3.5 - VALIDACIÓN DE YEAST8

Para validar el modelo de base utilizado para el desarrollo de SXC09, Yeast8, y las restricciones impuestas al modelo, se realizaron simulaciones mediante FBA y DFBA incluyendo los datos experimentales disponibles en la literatura relevante. En ambos casos, los resultados se contrastaron con los obtenidos por Rodrigues *et al.* (2021) para el crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* en medio de cultivo con glucosa.

3.5.1 - FBA

Para las simulaciones mediante FBA se utilizó Yeast8. Se incluyeron como restricciones cotas máximas de ingreso de glucosa y oxígeno, cuyos valores se fijaron en el promedio de los datos experimentales obtenidos por Rodrigues *et al.* (2021) (tabla 1). Estos valores se fijaron a través de las funciones en COBRAPy para modelado del medio de cultivo. Como función objetivo se seleccionó la maximización de la tasa de crecimiento.

Las tasas de crecimiento y producción de CO₂, rendimiento de la producción de etanol y cociente respiratorio se compararon con datos experimentales de la misma fuente. El cociente respiratorio (RQ) se calculó con el cociente entre CO₂ generado y O₂ consumido. El Y_{P/S} para etanol se calculó con el cociente entre etanol generado y glucosa consumida en unidades de masa.

3.5.2 - DFBA

Para las simulaciones mediante DFBA, el modelo interno en base a FBA se construyó de la misma manera que en la simulación por FBA utilizando Yeast8. Se modeló un proceso en batch donde biomasa, glucosa como fuente de carbono y energía, amonio como fuente de nitrógeno, y etanol como producto se modelaron como variables cinéticas. Las tasas de producción o consumo para biomasa y el resto de los metabolitos controlados se modelaron según:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4)$$

$$\frac{dM_i}{dt} = v_i X \quad (5)$$

donde X es la concentración de biomasa, M_i es la concentración de un metabolito determinado, μ es la tasa de crecimiento, y v_i es la tasa de producción o consumo de un metabolito determinado. Los valores de la tasa de crecimiento μ y las tasas v_i para cada metabolito fueron asociadas a su reacción de intercambio correspondiente en Yeast8.

Las tasas de captación de glucosa y amonio en función de su concentración en el medio se modelaron según:

$$v_i = v_{i,max} \frac{M_i}{K_i + M_i} \quad (6)$$

donde $v_{i,max}$ es la tasa máxima de intercambio de un metabolito determinado y K_i es su constante de saturación.

Los valores de K_i y $v_{i,max}$ para la captación de glucosa y oxígeno utilizados fueron los provistos por Hanly y Henson (2010) (tabla 1).

No se encontraron datos adecuados para el modelado de la captación de amonio en la literatura disponible. Por este motivo, la tasa de captación de amonio se modeló utilizando un valor de K_i arbitrariamente bajo y un valor de $v_{i,max}$ arbitrariamente alto. Esta decisión parte de asumir que la tasa de crecimiento calculada en la simulación estará limitada por la tasa de captación de glucosa. La concentración de oxígeno se asumió constante y bajo control automatizado en un biorreactor. Los datos de cultivos en batch obtenidos por Rodrigues *et al.* (2021) fueron utilizados para contrastar los resultados obtenidos por DFBA. Ya que se modeló el crecimiento de *S. cerevisiae* solo en su etapa exponencial, los valores experimentales correspondientes a esta fase se determinaron por regresión lineal sobre los datos en escala semilogarítmica. Las concentraciones iniciales utilizadas para glucosa y biomasa correspondieron al promedio de los valores experimentales para el tiempo considerado como inicio de la fase exponencial. La concentración inicial de amonio utilizada fue 554,4 mM de amonio (equivalente a 10 g/L). En todos los casos

excepto biomasa, las concentraciones iniciales fueron introducidas en unidades de milimol por litro (mM). En el caso de la concentración de biomasa, la concentración inicial fue introducida en unidades de gramos por litro (g/L), ya que el modelo intracelular está formulado para producir un g de biomasa, mientras que los flujos intracelulares de las demás reacciones se encuentran en mmol. Los resultados se reportan en unidades de gramos por litro (g/L) en caso de ser necesario. Las cotas superiores para la captación de glucosa y oxígeno se fijaron en $12,3 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $2,4 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente, en concordancia con las restricciones utilizadas en simulaciones mediante FBA.

El tiempo máximo de cultivo para cada simulación fue de 20 horas. Ya que DFBA incluye como condición la existencia de concentraciones no negativas para cada metabolito modelado en el medio, el tiempo total de cada simulación se eligió de forma que sea suficiente para agotar la concentración inicial de sustrato, considerando que la simulación se detendría antes del tiempo máximo. El horizonte de tiempo se dividió en intervalos de 0,05 h. Se modeló solamente la fase exponencial del cultivo.

3.6 - MODELADO DE LA PRODUCCIÓN DE CANNABINOIDES CON SXC09

3.6.1 - FBA

Utilizando SXC09 como modelo, se realizaron simulaciones mediante FBA incluyendo las mismas restricciones del paso de validación de Yeast8, es decir, cotas máximas de ingreso de glucosa y oxígeno (tabla 1). Se consideraron dos casos por separado para la función objetivo: maximización de la tasa de crecimiento y maximización de la producción de CBGA.

Para evaluar la relación entre la producción de CBGA y el crecimiento del microorganismo, se realizaron simulaciones maximizando la producción de CBGA como función objetivo y fijando la tasa de crecimiento en distintos valores entre 0 h^{-1} (máxima producción teórica de CBGA) y la tasa máxima de crecimiento obtenida previamente, con el objetivo de obtener el *trade-off* entre la producción de CBGA y el crecimiento.

3.6.2 - DFBA

Se llevaron a cabo simulaciones mediante DFBA con SXC09 como modelo de la cepa heteróloga. Se estudió un proceso en batch *in silico* donde se incluyeron balances de masa de las concentraciones de biomasa, glucosa, amonio, CBGA y etanol para modelar su comportamiento a lo largo del tiempo de cultivo. Para el modelado de las tasas de captación de nutrientes, se utilizaron los datos provistos por Hanly y Henson (2010) para parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* (tabla 1). La concentración de oxígeno se asumió constante y bajo control automatizado en un biorreactor. La tasa de captación de amonio se modeló de la misma forma que en el paso de validación.

La producción de CBGA se modeló como un proceso en batch donde el crecimiento se limitó por falta de amonio. Se realizaron simulaciones divididas en dos etapas, maximizando crecimiento en la primera y producción de CBGA en la segunda. Para la simulación en la primera etapa, se incluyó una restricción a la tasa mínima de captación de amonio en un valor arbitrariamente bajo, dado que no se encontraron datos. La duración e intervalo de cada etapa fueron de 20 h y 0,05 h, al igual que en el caso de las simulaciones realizadas con Yeast8.

Las concentraciones iniciales elegidas fueron 20 g/L de glucosa y 0,25 g/L de biomasa. Se ensayaron distintas concentraciones iniciales limitantes de amonio, ya que tampoco se contaba con datos respecto a condiciones óptimas en este caso. Los resultados fueron evaluados en función de su productividad, y la concentración máxima de CBGA obtenible se evaluó en el punto en que la productividad fue máxima.

Finalmente, se realizaron simulaciones que incluyeron el *knock-out* de genes involucrados en el metabolismo del etanol, para evaluar su efecto sobre la producción de CBGA. El *knock-out* de genes se incluyó en el modelo a través de las herramientas de COBRApy.

4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 - CONSTRUCCIÓN DE SXC09

4.1.1 - INTRODUCCIÓN DE METABOLITOS Y REACCIONES

Utilizando las bases de datos de KEGG y GenBank, se compilaron los datos relevantes para la reconstrucción de una vía de síntesis para CBGA en *S. cerevisiae* (Carvalho *et al.*, 2017; Aliferis & Bernard-Perron, 2020). Estos datos incluyen la ecuación, enzimas involucradas, número EC y genes asociados de cada reacción (tabla 4), además de la información necesaria para modelar los metabolitos previamente ausentes en Yeast8 (tabla 3).

Se introdujeron 4 nuevas reacciones en Yeast8, provenientes de *Cannabis sp.*, mediante las funciones disponibles en COBRApy. La enzima CsAAE1 produce hexanoil-CoA con hexanoato como sustrato y consumo de ATP. El siguiente paso, llevado a cabo por la enzima CsTKS, es la síntesis de 3,5,7-trioxododecanoil-CoA con hexanoil-CoA y tres moléculas de malonil-CoA como sustrato. Distintos subproductos de la biosíntesis de cannabinoides fueron detectados *in vitro*, cuya producción implica un descenso en la productividad de CBGA y sus derivados. Estos subproductos no fueron identificados *in vivo* en *Cannabis sp.* (Gagne *et al.*, 2012), por ende, se excluyeron sus reacciones de síntesis de SXC09. Los dos pasos finales son la síntesis de olivetolato con 3,5,7-trioxododecanoil-CoA como sustrato y liberación de CoA, y la síntesis de CBGA consumiendo olivetolato y GPP. Las modificaciones realizadas pueden verse representadas en la figura 5.

Debido a que se asume estado estacionario, las simulaciones basadas en FBA requieren que la sumatoria de las tasas de producción y consumo de cada metabolito que no sea un nutriente o un producto extracelular sean iguales a 0, es decir, que no exista acumulación de ningún metabolito (ecuación 2). Se sabe que en *Cannabis* el CBGA es secretado al espacio extracelular de los tricomas junto a las enzimas que sintetizan sus derivados, pero el mecanismo de secreción es aún desconocido. Por lo tanto, se incluyó en SXC09 una reacción de salida de CBGA del citosol para garantizar el balance de masa, sin genes asociados, con fines de modelado.

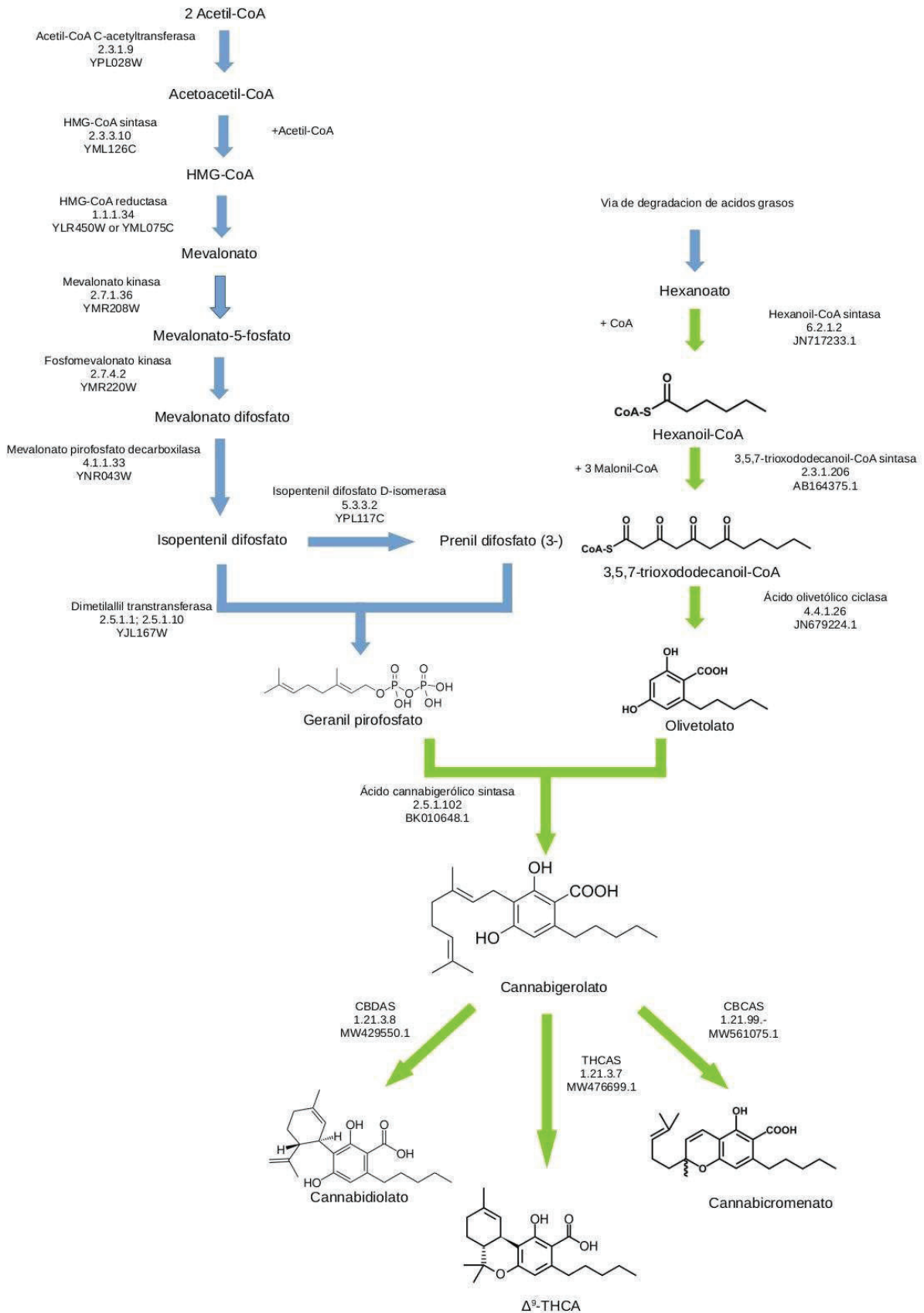


Figura 5 – Vía de síntesis heteróloga para CBGA y sus derivados modelada en *S. cerevisiae*. En azul, reacciones presentes en levaduras; en verde, reacciones originarias de *Cannabis sp.*

4.1.2 - EVALUACIONES DE CALIDAD

La comparación de distintos parámetros de Yeast8 y SXC09, obtenida en MEMOTE, se encuentra en la figura 6. Ambos presentan conectividad completa de sus metabolitos (es decir, no contienen metabolitos que no participen de ninguna reacción) y parámetros similares de balances de carga y masa.

Consistency

Compared Models	yeast-GEM.xml	SXC09.xml	
Stoichiometric Consistency	0.0%	0.0%	x3 ↓
Mass Balance	93.8%	93.8%	↓
Charge Balance	98.5%	98.4%	↓
Metabolite Connectivity	100.0%	100.0%	↓
Unbounded Flux In Default Medium	0.0%	0.0%	↓

Figura 6 – Parámetros de calidad de SXC09 en comparación con Yeast8, obtenidos mediante MEMOTE.

4.2 - VALIDACIÓN DE YEAST8 COMO HERRAMIENTA PREDICTIVA

4.2.1 - FBA

Los datos obtenidos por Rodrigues *et al.* (2021) para las tasas de consumo de glucosa y oxígeno fueron promediados y los resultados fueron introducidos al modelo como límites superiores para el intercambio de sustrato y oxígeno con el medio. Estas condiciones se utilizaron para realizar FBA. Los resultados obtenidos para la tasa de crecimiento, producción de CO₂, cociente respiratorio y rendimiento de la producción de etanol se detallan en la tabla 5. Considerando los valores experimentales disponibles en la literatura, se observa que las predicciones obtenidas por FBA se encuentran dentro del rango esperado para *S. cerevisiae*.

Tabla 5 - Valores utilizados y resultados para parámetros de crecimiento calculados mediante FBA, en comparación con resultados experimentales.

Parámetro	CEN.PK113-7D (Rodrigues <i>et al.</i> , 2021)	UFMG-CM-Y259 (Rodrigues <i>et al.</i> , 2021)	JP1 (Rodrigues <i>et al.</i> , 2021)	Yeast8 (FBA, este trabajo)
Parámetros introducidos en la simulación por FBA				
q_s (mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹)	-13,22 ± 0,23	-11,96 ± 0,43	-11,67 ± 0,45	-12,3
q_{O_2} (mmol gPS ⁻¹ h ⁻¹)	-2,45 ± 0,14	-2,63 ± 0,31	-2,12 ± 0,09	-2,4
Parámetros calculados por la simulación por FBA				
μ_M (h ⁻¹)	0,31 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,314
RQ (mmol CO ₂ /mmol O ₂)	9,66 ± 0,66	8,01 ± 1,12	9,31 ± 0,25	9,167
$Y_{P/S}$ (g _{etanol} /g _{glucosa})	0,41 ± 0,01	0,40 ± 0,03	0,42 ± 0,00	0,397

4.2.2 - DFBA

Debido a que el modelo desarrollado en este trabajo comprende la etapa de crecimiento exponencial del cultivo, no se deben tener en cuenta datos de la fase lag de crecimiento. Por lo tanto, previo a la realización de DFBA, se analizó qué datos experimentales debían tenerse en cuenta.

4.2.2.1 - ESTIMACIÓN DE LA DURACIÓN DE LA FASE LAG

Ante la ausencia de datos precisos respecto a la duración de la fase lag en el crecimiento de *S. cerevisiae*, se utilizó regresión lineal sobre los datos del logaritmo de la concentración de biomasa en los datos utilizados en función del tiempo, buscando puntos en el tiempo donde estos datos se ajusten adecuadamente a una ecuación lineal según su coeficiente de determinación (R^2) (figura 7).

Esta estimación resultó en una duración de fase lag de 5 h para la cepa CEN.PK113-7D y de 4h para las cepas JP1 y UFMG-CM-Y259. La duración de la fase lag de un cultivo puede variar entre cepas de *S. cerevisiae* y según las condiciones del medio de cultivo y del inóculo. La información experimental disponible no incluye estimaciones de la duración de las etapas de cada cultivo.

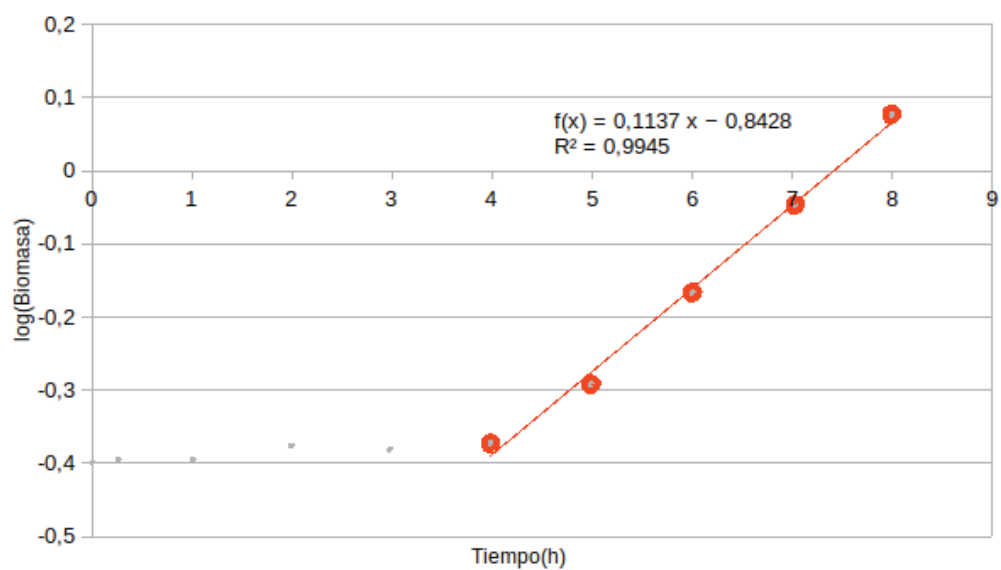
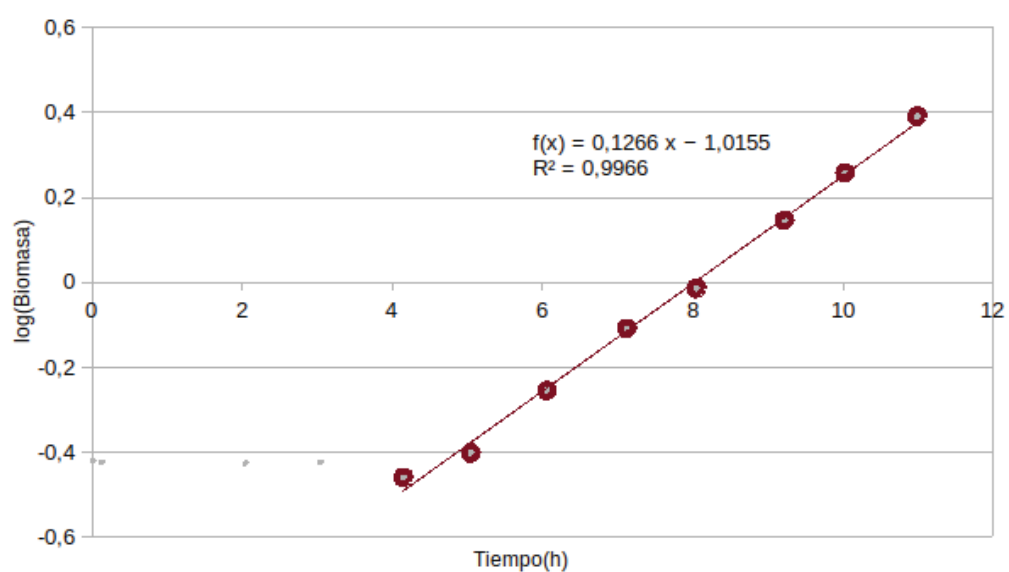
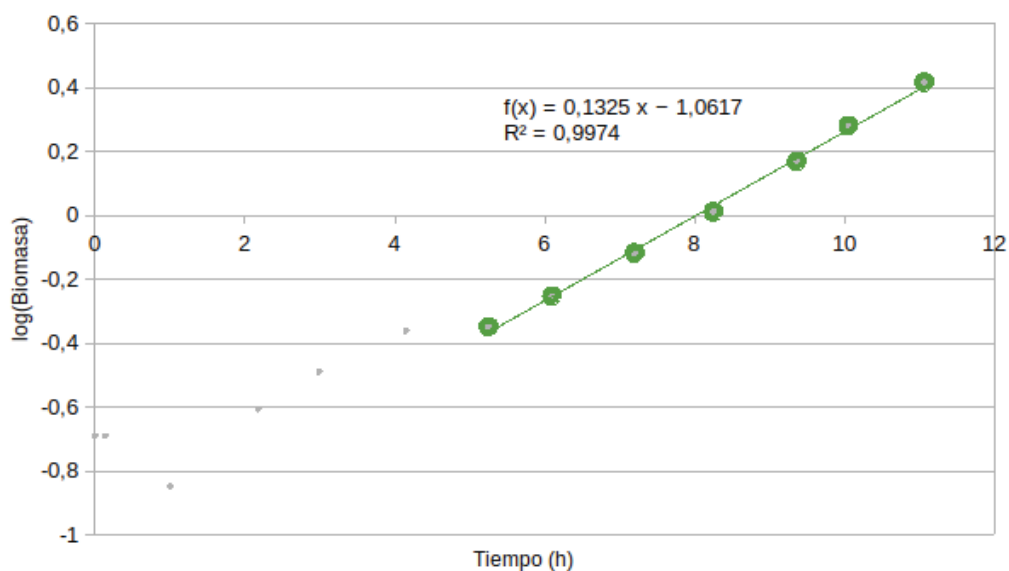


Figura 7 – Estimación de la fase de crecimiento exponencial de distintas cepas de *S. cerevisiae*. En orden descendente, CEN.PK113-7D, JP1 y UFMG-CM-Y259.

4.2.2.2 - VALIDACIÓN

Para el paso de validación se omitieron los valores de los datos experimentales correspondientes a la fase lag, considerándose para el primer punto ($t=0$) el promedio de los valores experimentales obtenidos por Rodrigues *et al.* (2021), a partir de las 5h de cada cultivo. Se promediaron los valores de concentración de biomasa, glucosa y etanol para utilizar como concentraciones iniciales en el modelado del medio de cultivo. Los valores resultantes fueron 0,452 g/L para biomasa, 89,9 mM para glucosa, y 9,26 mM para etanol. La concentración inicial de amonio modelada fue 554,4 mM. En los casos donde fue necesario, los resultados fueron convertidos a unidades de g/L para su comparación con información experimental.

Los datos del metabolismo de JP1 demuestran las mayores desviaciones en todos los casos respecto a los resultados obtenidos por DFBA. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta simulación se ajustan de forma adecuada a todos los conjuntos de datos experimentales sin grandes desviaciones (figuras 8, 9 y 10). La duración total del proceso modelado por DFBA fue de poco más de 6 horas, resultando en una concentración final de biomasa de 2,79 g/L y una concentración de etanol de 6,36 g/L. En estas condiciones, la glucosa en el medio se consume completamente.

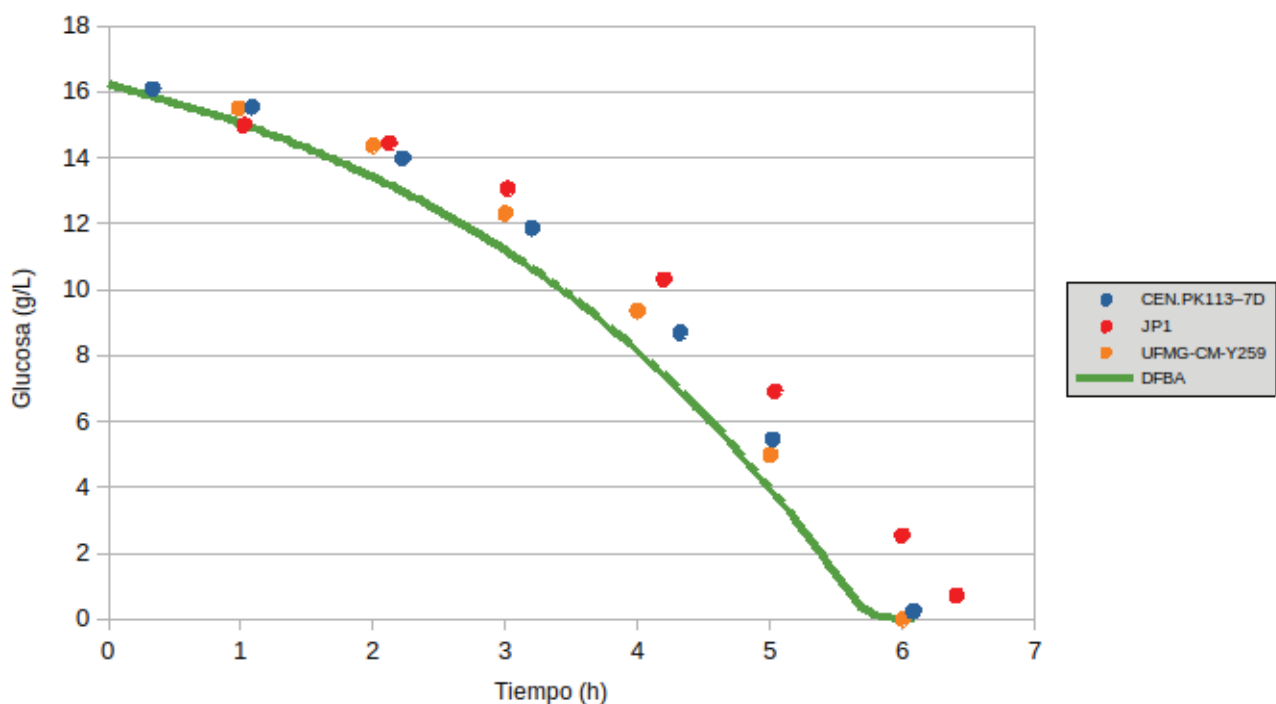


Figura 8 – consumo de glucosa en una simulación por DFBA del crecimiento de *S. cerevisiae* en función del tiempo, contrastado con datos experimentales.

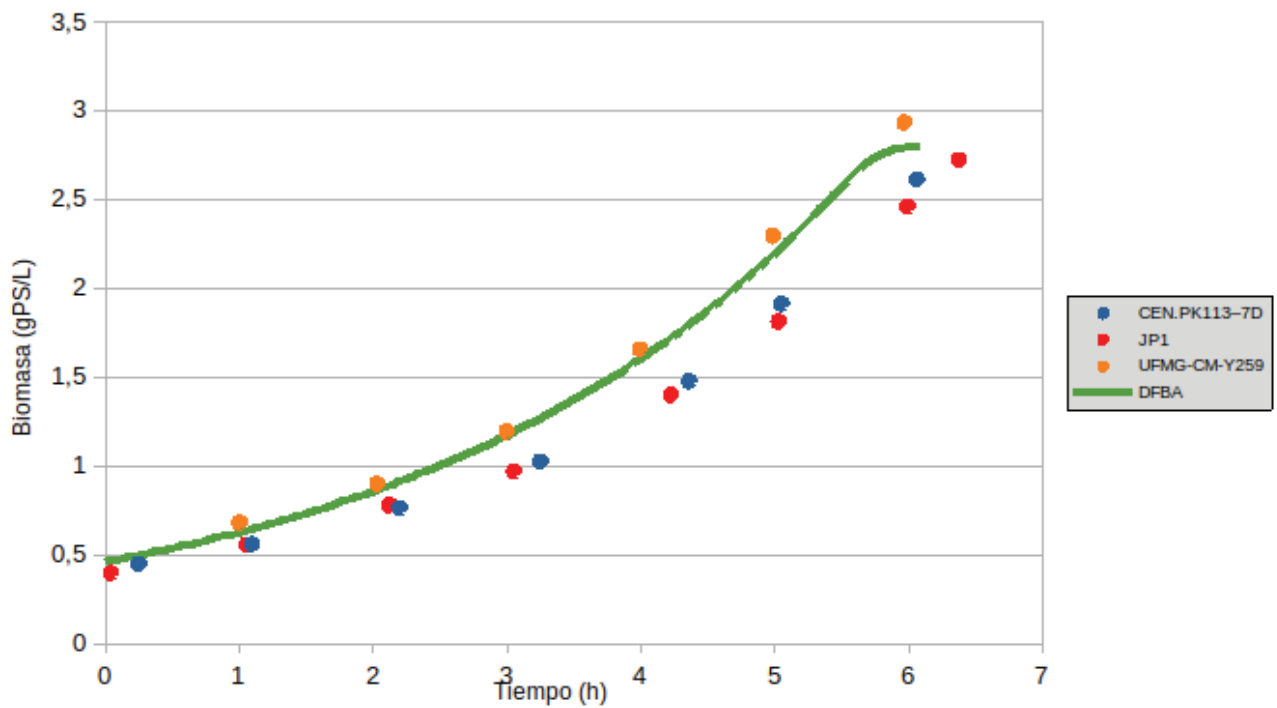


Figura 9 – crecimiento de *S. cerevisiae* simulado por DFBA en función del tiempo, contrastado con datos experimentales.

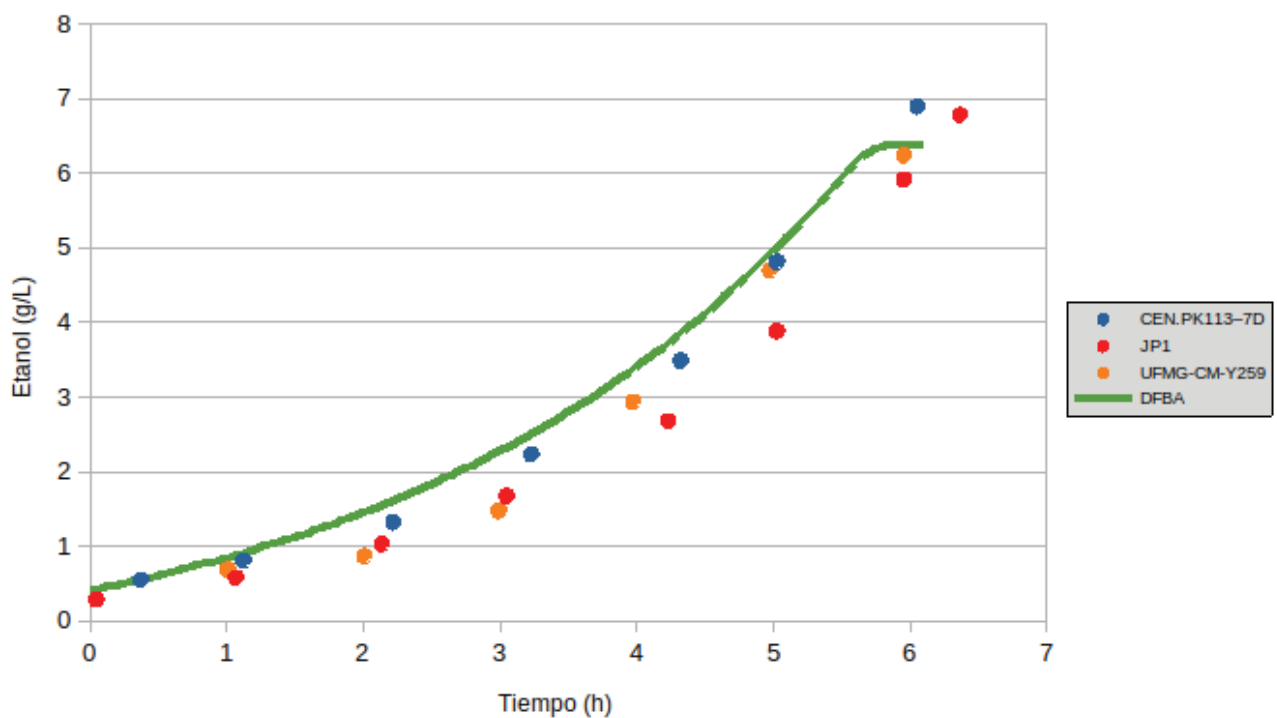


Figura 10 – producción de etanol en una simulación por DFBA del crecimiento de *S. cerevisiae* en función del tiempo, contrastado con datos experimentales.

4.3 - PREDICCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CBGA CON SXC09

Una vez que se contó con el modelo validado, se procedió a analizar el comportamiento del mismo por medio de FBA.

En primer lugar, se buscó predecir la tasa de crecimiento máxima seleccionando la maximización de la producción de biomasa como objetivo. En este caso, la tasa de crecimiento resultante fue de $0,314 \text{ h}^{-1}$. En estas condiciones, las tasas en las reacciones en la vía de síntesis heteróloga fueron nulas.

En segundo lugar, se buscó predecir la capacidad máxima de producción de cannabinoides de SXC09 repitiendo la simulación anterior con la maximización de la secreción de CBGA como objetivo. La tasa máxima de producción de CBGA obtenida fue $0,498 \text{ mmol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En estas condiciones la tasa de crecimiento fue nula.

Habiendo comprobado que no hay producción de CBGA cuando hay producción máxima de biomasa y viceversa, se realizaron simulaciones por FBA maximizando la producción de CBGA para distintos valores de crecimiento fijos. Los valores de crecimiento considerados fueron 0, 0,04, 0,08, 0,12, 0,16, 0,2, 0,24, 0,28 y $0,314 \text{ h}^{-1}$.

En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos para el *trade-off* entre crecimiento y producción de CBGA para la cepa de *S. cerevisiae* productora de CBGA del modelo SXC09. Se observa que hay puntos donde el crecimiento no es nulo y no hay producción de CBGA, lo cual indica que ambas variables son independientes, es decir, no están acopladas. Se dice que dos componentes de una red metabólica están acoplados cuando la producción de un componente sólo es posible a través de una vía de síntesis en la que se genera el otro.

La producción de CBGA desacoplada del crecimiento implica que su síntesis junto al aumento de la biomasa en el cultivo no está garantizada. En base a este resultado, se decidió modelar la producción de CBGA a través de la limitación del crecimiento de la cepa heteróloga por limitación de nutrientes, en este caso el amonio como fuente de nitrógeno.

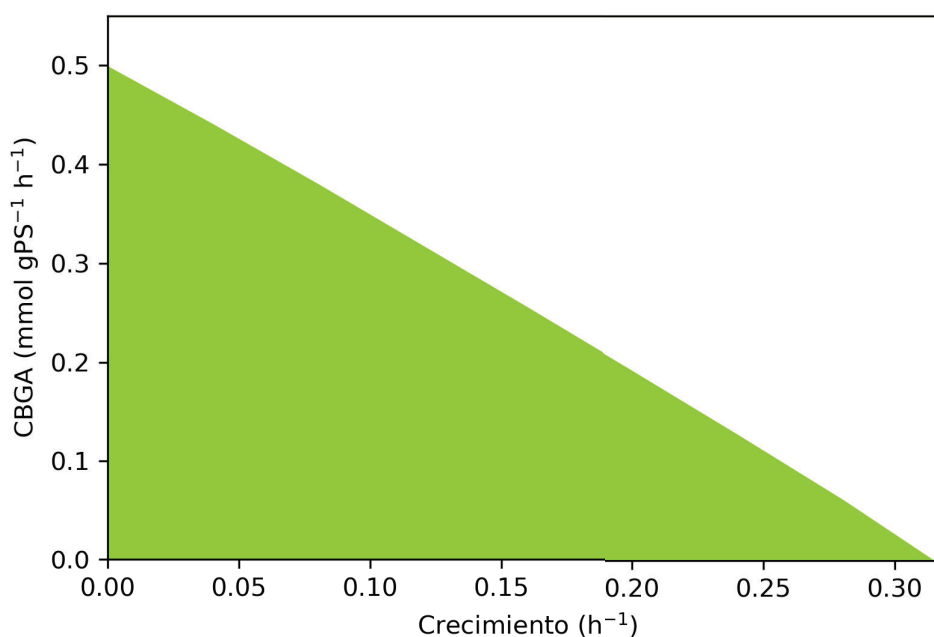


Figura 11 -Trade-off entre crecimiento y producción de CBGA para SXC09.

Para predecir el funcionamiento de SXC09 en un proceso industrial para la producción de CBGA, se realizaron simulaciones por DFBA. Se realizó un análisis de productividad en función de la concentración inicial de amonio, con el objetivo de encontrar condiciones óptimas para el resto de los pasos de evaluación del bioproceso. Se realizaron simulaciones con concentraciones iniciales entre 18,04 y 360,8 mg/L, alternando el objetivo entre crecimiento y producción de CBGA al agotarse el amonio en el medio de cultivo. Se incluyó una concentración inicial de glucosa de 20 g/L y de 0,25 g/L para biomasa.

Dado que *S. cerevisiae* produce etanol en presencia de oxígeno y altas concentraciones de glucosa, se incluyó al etanol entre las variantes cinéticas.

El valor de productividad máxima de CBGA fue de 0,283 mM h⁻¹ y se obtuvo con una concentración inicial de amonio de 6 mM. La concentración final de CBGA en esta simulación fue de 1,178 g/L. La concentración final de biomasa obtenida fue de 1,081 g/L. La productividad de CBGA en función de la concentración inicial de amonio se muestra en la figura 12.

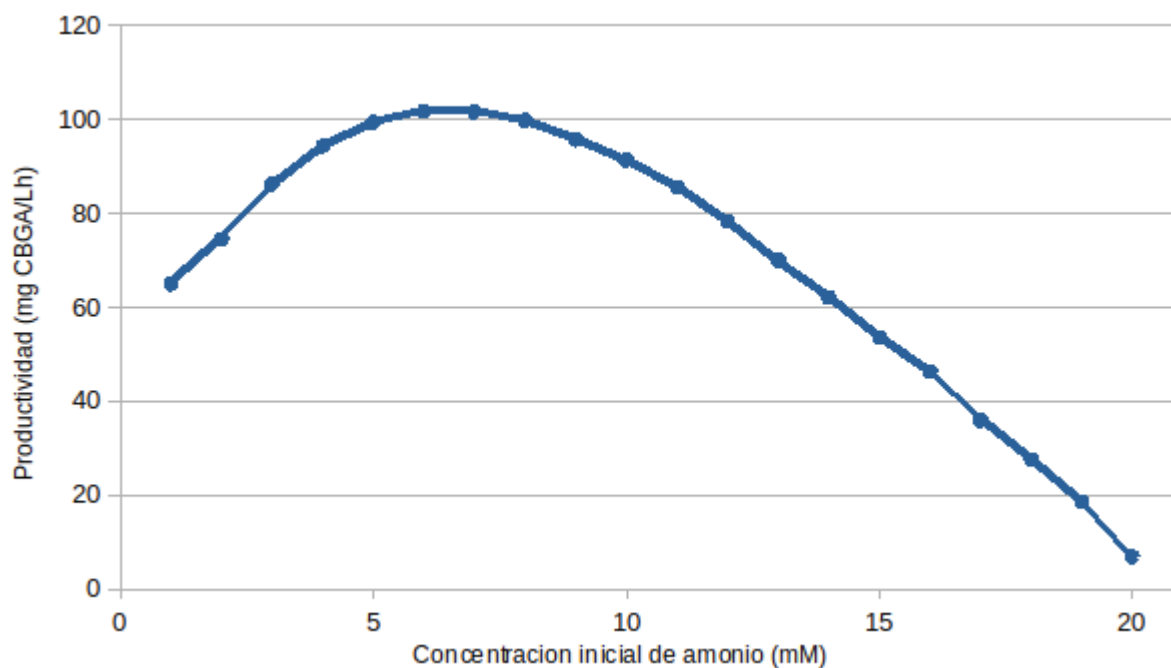


Figura 12 - Productividad de CBGA en función de la concentración inicial de amonio.

Utilizando una concentración inicial de amonio de 108,2 mg L⁻¹, correspondiente al valor que resulta en la mayor productividad, las concentraciones de biomasa y metabolitos en función del tiempo se reportan en la figura 13. Se obtiene una concentración final de CBGA de 1,178 g/L. La etapa de crecimiento exponencial tiene una duración de 4,7 h, en la cual se observa la producción de biomasa sin producción de CBGA y el consumo de la totalidad del amonio en el medio de cultivo. La siguiente etapa tiene una duración de 6,9 h, resultando en un total de 11,6 h para el proceso. En esta etapa se genera CBGA sin crecimiento hasta consumirse completamente la glucosa en el medio. Se observa producción de etanol a lo largo de todo el proceso.

En la figura 14 se reportan los flujos de los distintos componentes relevantes del bioproceso en función del tiempo. Los límites superiores del ingreso de amonio no pudieron ser modelados mediante las herramientas de COBRAPy o dfba por no contar con los parámetros necesarios para el modelado de la captación de amonio según la ecuación de Monod. Este parámetro se modeló utilizando un valor de K_i arbitrariamente bajo y un valor de $v_{i,max}$ arbitrariamente alto, de la misma forma que en el paso de validación de la capacidad predictiva de Yeast8. El valor de captación máximo obtenido para el amonio fue $2,247 \text{ mM h}^{-1}$. El valor de crecimiento máximo obtenido fue $0,314 \text{ h}^{-1}$, en concordancia con los resultados obtenidos mediante FBA. La tasa de producción máxima de CBGA fue de $0,498 \text{ mM h}^{-1}$. La tasa de producción máxima de etanol es de $19,1 \text{ mM h}^{-1}$ durante la fase de crecimiento, que se reduce a $16,3 \text{ mM h}^{-1}$ durante la fase de producción de CBGA.

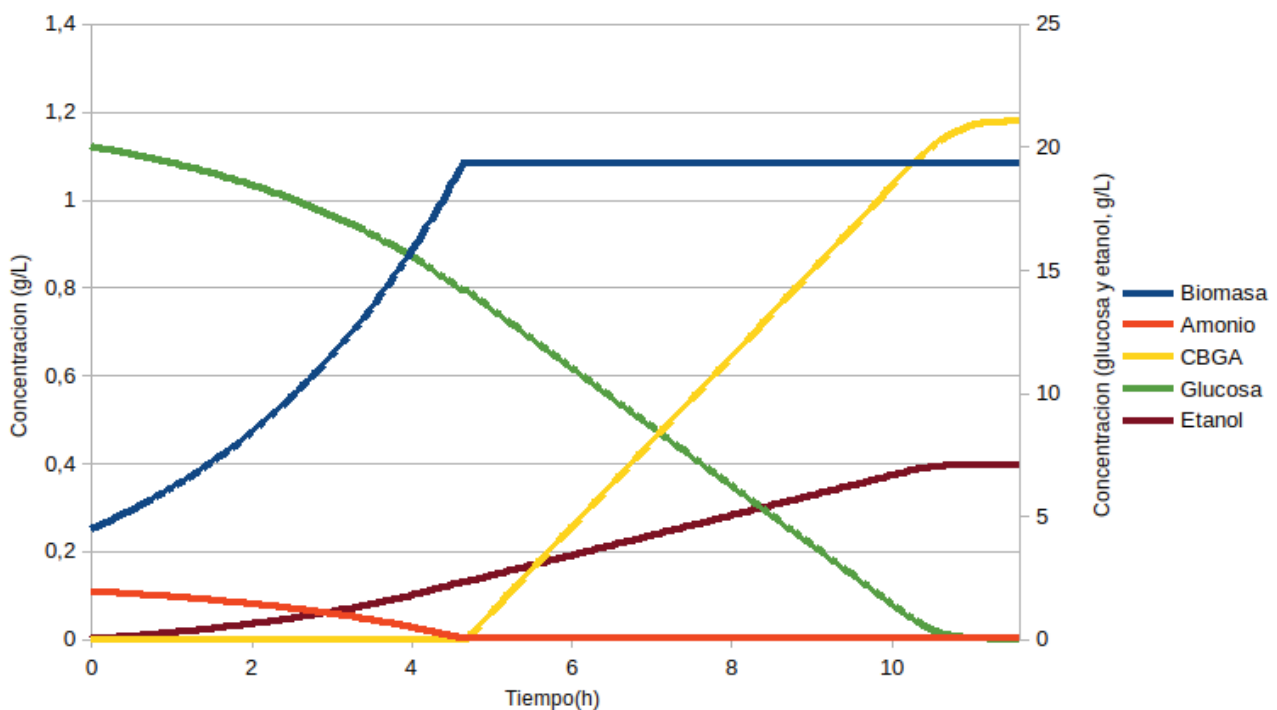


Figura 13 - Concentración de componentes del medio de cultivo en el tiempo. Las concentraciones de glucosa y etanol corresponden al eje secundario.

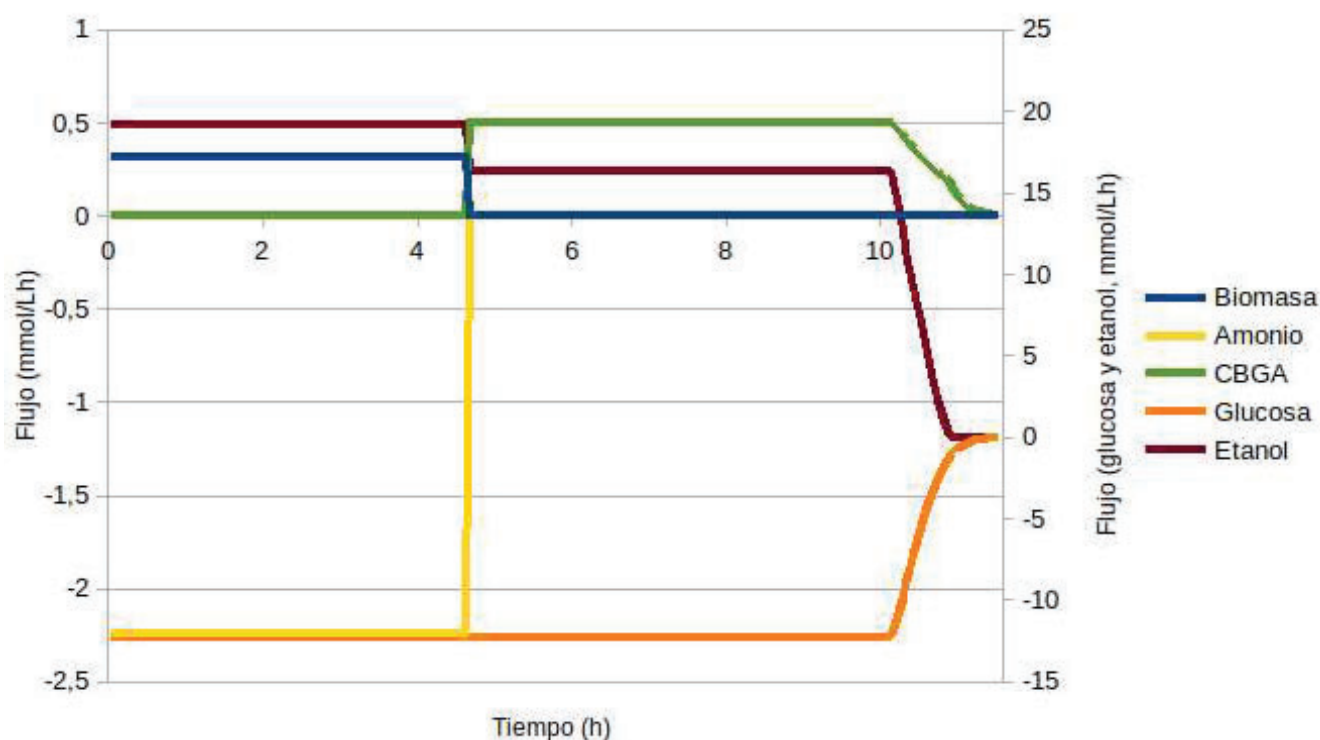


Figura 14 - Tasas de consumo o producción de componentes del medio de cultivo en el tiempo. Las concentraciones de glucosa y etanol corresponden al eje secundario.

La concentración final de CBGA obtenida en este modelo excede al obtenido en cepas heterólogas de *S. cerevisiae* productoras de CBGA reportadas en la literatura (tabla 6). A diferencia de los resultados compilados por Blatt-Janmaat & Qu (2021), en el proceso modelado en este trabajo no se incluyeron precursores de la síntesis de CBGA (en particular ácido hexanóico o ácido olivetólico) en la composición inicial del medio de cultivo.

Tabla 6 - Predicciones de producción de CBGA en un bioproceso, comparado con resultados disponibles en la literatura.

Descripción del proceso	Concentración final de CBGA (g/L)	Fuente
Simulación por DFBA de SXC09	1,178	Este trabajo
Síntesis de CBGA con ácido olivetólico como sustrato	0,096	Szamecz <i>et al.</i> , 2019 Patente WO 2019071000
Síntesis de CBGA con ácido hexanóico como sustrato	0,034	Szamecz <i>et al.</i> , 2019 Patente WO 2019071000
Síntesis de CBGA con ácido olivetólico como sustrato	0,216	Keasling <i>et al.</i> , 2020 Patente US 10563211B2
Síntesis de CBGA con ácido hexanóico como sustrato	0,073	Keasling <i>et al.</i> , 2020 Patente US 10563211B2
Síntesis de CBGA con ácido olivetólico como sustrato	0,001	Gluck <i>et al.</i> , 2020

4.4 - EFECTO DEL *KNOCK-OUT* DE GENES ASOCIADOS AL METABOLISMO FERMENTATIVO

Tanto la evidencia experimental como los resultados de este trabajo indican que la producción de etanol consume gran parte del flujo de carbono. Las simulaciones de SXC09 realizadas mediante DFBA indican también que el inicio de la producción de CBGA viene acompañado de una reducción en la tasa de producción de etanol (figura 14). Debido a esta interferencia entre la producción de etanol y la síntesis heteróloga de CBGA, se decidió estudiar el efecto de alteraciones en el metabolismo del etanol sobre la producción de CBGA. Para esto, se realizaron dos simulaciones mediante DFBA con las mismas características que la simulación anterior, pero incluyendo el *knock-out* de los genes codificantes para las enzimas piruvato descarboxilasa o alcohol deshidrogenasa respectivamente.

Los genes asociados a cada reacción fueron determinados según su aparición en las relaciones GPR en Yeast8. Se identificaron 4 reacciones correspondientes a piruvato descarboxilasa asociadas a los mismos genes (tabla 7). Para la simulación del *knock-out* de alcohol deshidrogenasa se identificaron 3 reacciones que involucran al metabolismo del etanol codificadas por 5 genes. Se omitieron reacciones y genes correspondientes a las deshidrogenasas específicas para glicerol y alcoholes aromáticos (tabla 7).

Tabla 7 - Genes alterados en simulaciones que incluyeron *knock-outs*.

Nombre	Reacción	Genes
Piruvato descarboxilasa		
Piruvato descarboxilasa	$H^+[c] + \text{piruvato}[c] \Rightarrow \text{acetaldehído}[c] + CO_2[c]$	YGR087C ó YLR044C ó YLR134W
Piruvate descarboxilasa (formadora de acetoína)	$\text{acetaldehído}[c] + H^+[c] + \text{piruvato}[c] \Rightarrow (R)\text{-acetoína}[c] + CO_2[c]$	
Piruvato descarboxilasa (formadora de aldehído)	$2\text{-oxobutanoato}[c] + H^+[c] \Rightarrow CO_2[c] + \text{propanal}[c]$	
Piruvato descarboxilasa (hidroxi-fenil)	$3\text{-(4-hidroxifenil)piruvato}[c] + H^+[c] \Rightarrow CO_2[c] + (4\text{-hidroxifenil)acetaldehído}[c]$	
Alcohol deshidrogenasa		
Alcohol deshidrogenasa (etanol a acetaldehído)	$\text{etanol}[c] + NAD[c] \Rightarrow \text{acetaldehído}[c] + H^+[c] + NADH[c]$	YMR303C
Alcohol deshidrogenasa (acetaldehído to etanol)	$\text{acetaldehído}[c] + H^+[c] + NADH[c] \Rightarrow \text{etanol}[c] + NAD[c]$	YBR145W ó YOL086C
Alcohol deshidrogenasa mitocondrial	$\text{acetaldehído}[m] + H^+[m] + NADH[m] \Rightarrow \text{etanol}[m] + NAD[m]$	YGL256W ó YMR083W

En ambas condiciones las tasas de crecimiento fueron superiores a 0. En las simulaciones donde se silenciaron los genes para la piruvato descarboxilasa se observa una fase de crecimiento más

corta que en las simulaciones previas, de 1,85 h frente a 4,7 h en las simulaciones sin *knock-out*. A esto se le suma un consumo acelerado del amonio en el medio de cultivo. En estas condiciones la glucosa en el medio de cultivo no llega a ser consumida en el tiempo fijado como límite. Con el fin de comparar la productividad en ambos casos, se utilizaron los datos de esta simulación hasta las 11,6 h, igual a la duración de la simulación sin la inclusión de *knock-outs*. Las concentraciones finales de biomasa y CBGA resultantes fueron 0,326 g/L y 0,187 g/L respectivamente (figura 15). Las tasas máximas de crecimiento y producción de CBGA también son menores, 0,147 h⁻¹ y 0,163 mmol L⁻¹ h⁻¹ respectivamente. La productividad de CBGA para la cepa que incluyó *knock-outs* de los genes de piruvato descarboxilasa es de 16,15 mg L⁻¹ h⁻¹ (figura 16).

En el caso en que se incluyó el *knock-out* de los genes codificantes para la alcohol deshidrogenasa, la glucosa incluida en el medio de cultivo se consumió por completo en un tiempo similar al obtenido en la simulación sin *knock-outs*. Las concentraciones finales de biomasa y CBGA obtenidas fueron 1,08 g/L y 1,18 g/L respectivamente (figura 17). Las tasas máximas de crecimiento y producción de CBGA fueron 0,25 h⁻¹ y 0,42 mmol L⁻¹ h⁻¹. La productividad de CBGA resultante fue 74,34 mg L⁻¹ h⁻¹ (figura 18). En estas condiciones se observa una fase de crecimiento más larga (5,85 h frente a 4,75 h en el caso sin *knock-outs*) y un tiempo total del proceso más largo (12,1 h frente a 11,6 h en el caso sin *knock-outs*).

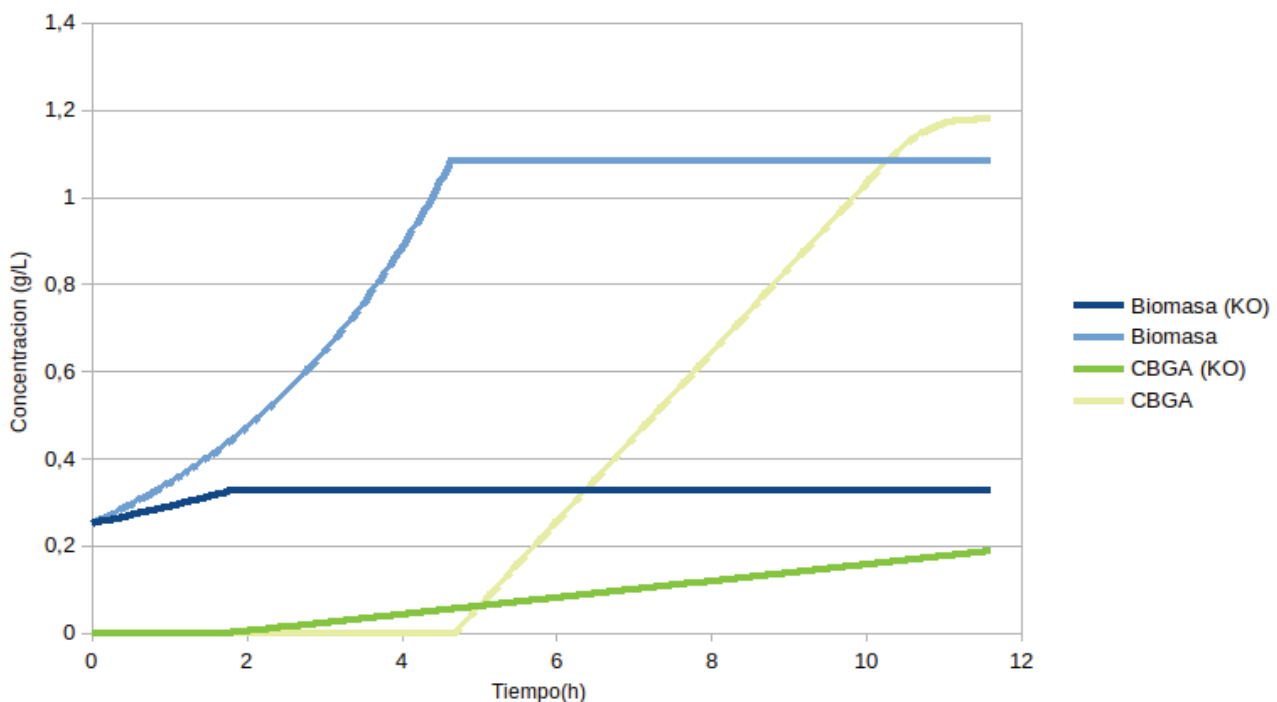


Figura 15 - Concentraciones de biomasa y CBGA del medio de cultivo en el tiempo, en simulaciones que incluyeron el *knock-out* de genes codificantes para piruvato descarboxilasa.

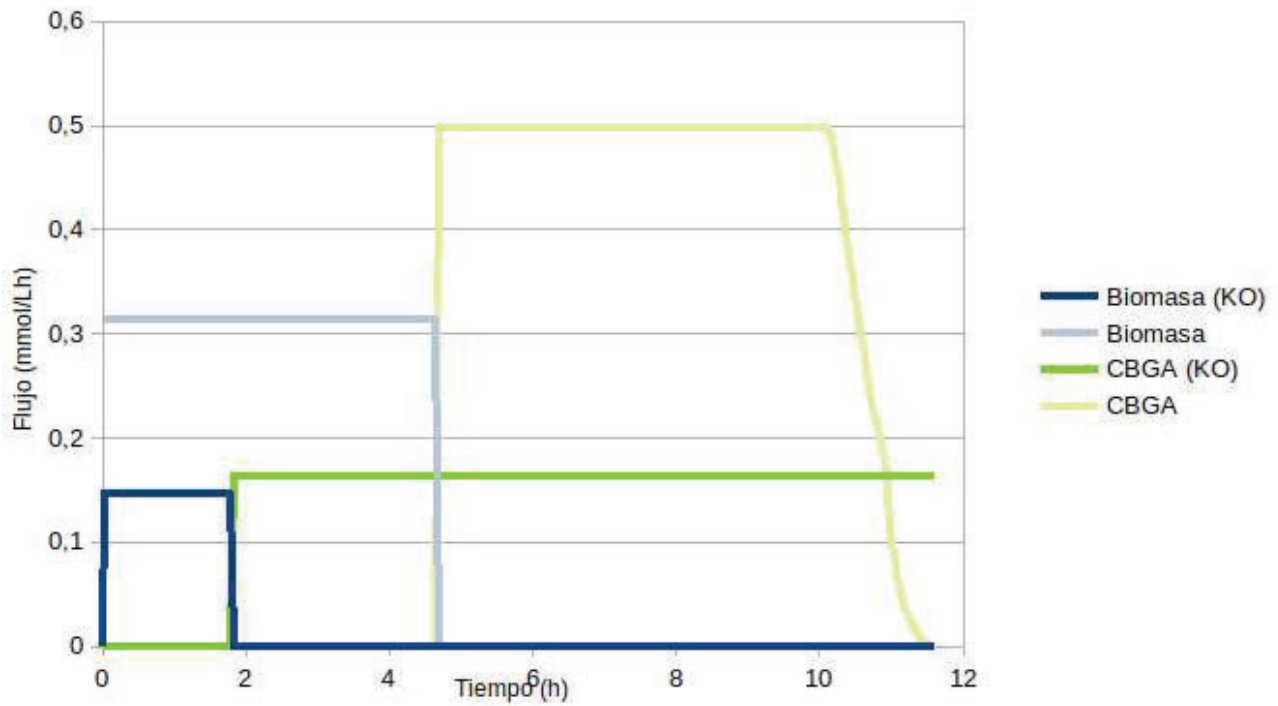


Figura 16 – Flujos de producción de biomasa y CBGA del medio de cultivo en el tiempo, en simulaciones que incluyeron el *knock-out* de genes codificantes para piruvato descarboxilasa.

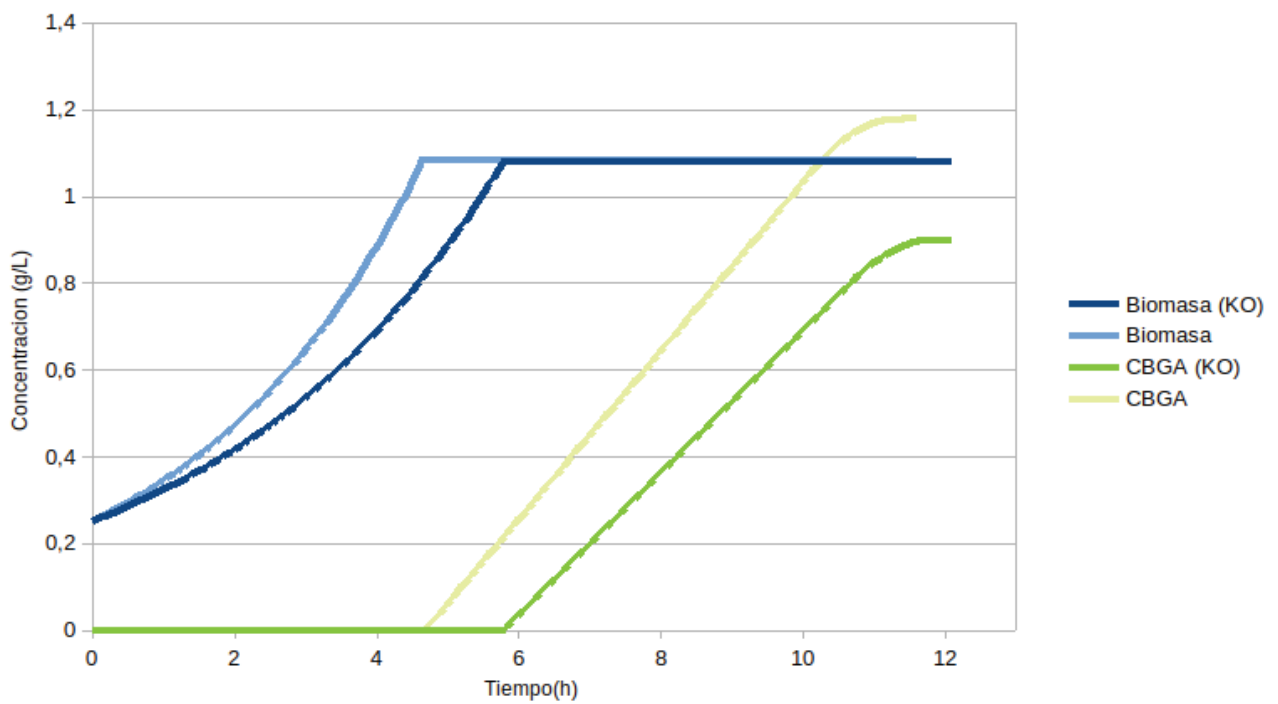


Figura 17 - Concentraciones de biomasa y CBGA del medio de cultivo en el tiempo, en simulaciones que incluyeron el *knock-out* de genes codificantes para alcohol deshidrogenasa.

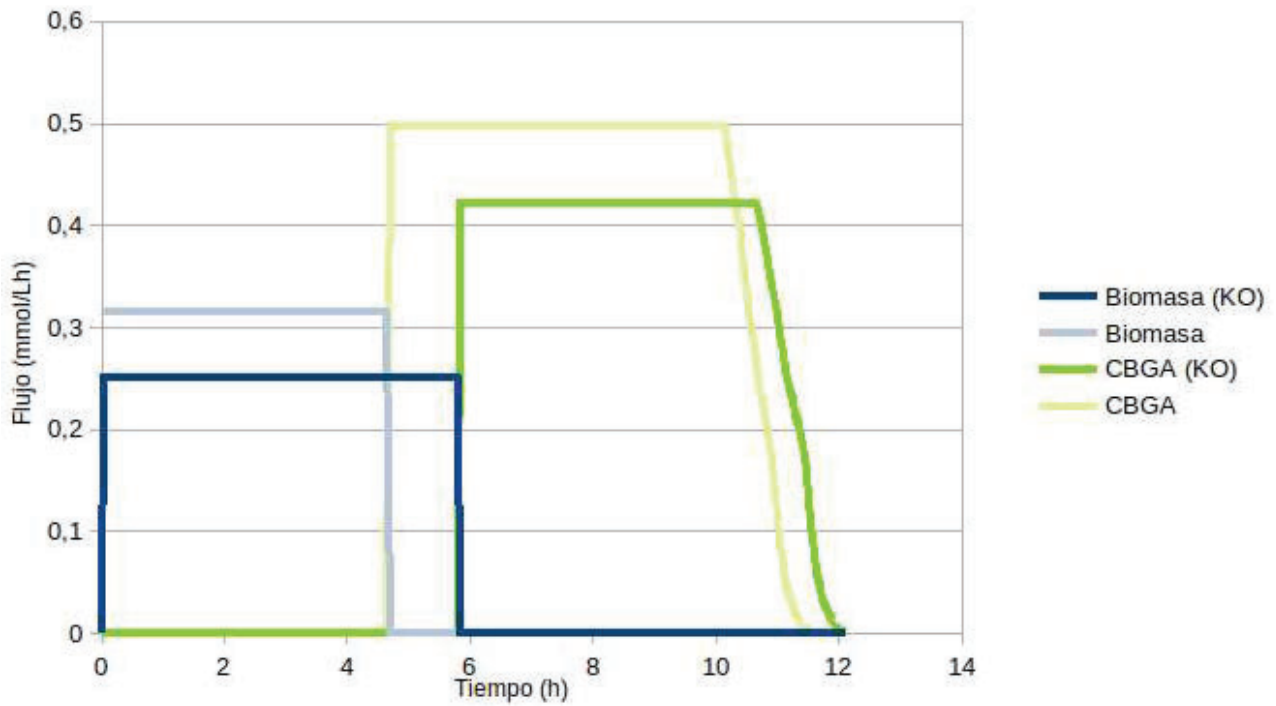


Figura 18 – Flujos de producción de biomasa y CBGA del medio de cultivo en el tiempo, en simulaciones que incluyeron el *knock-out* de genes codificantes para alcohol deshidrogenasa.

Los resultados obtenidos de simulaciones donde se incluyó el *knock-out* de ambos grupos de genes fueron similares a los obtenidos mediante el silenciamiento de los genes de piruvato descarboxilasa. En ambos casos se obtuvo una reducción de la capacidad de producción de biomasa y CBGA así como de la productividad del bioproceso. Esta desviación fue más drástica en el caso que se incluyó el silenciamiento de los genes para piruvato descarboxilasa. Si bien es necesario hacer estudios *in silico* más profundos e *in vivo*, esto podría deberse al balance energético de la célula, ya que la producción de etanol genera ATP y contribuye a la regeneración de NAD.

5 - CONCLUSIONES

En el diseño de un bioproceso basado en la expresión de vías de síntesis heterólogas se deben considerar múltiples elementos del proceso en simultáneo. Dada la cantidad de variables posibles y el costo de la evaluación de los organismos desarrollados, el uso de simulaciones *in silico* ofrece la posibilidad de evaluar una gran cantidad de elementos del bioproceso en simultáneo y agilizar su desarrollo y llegada a la industria. En este trabajo se utilizaron múltiples herramientas computacionales de programación matemática y datos experimentales disponibles en la literatura en busca de obtener modelos precisos para determinar la capacidad de producción de ácido cannabigerólico, el precursor de los cannabinoides mayoritarios, en cepas heterólogas de levaduras.

Saccharomyces cerevisiae es un organismo modelo, altamente caracterizado y fácilmente adaptable para su cultivo en biorreactores y la producción de compuestos químicos de alto valor agregado. Otra ventaja de este microorganismo es la disponibilidad de una gran cantidad de reportes en la literatura sobre cepas modificadas con el fin de reproducir metabolitos que incluyen ácidos grasos de cadena corta e isoprenoides, los precursores de la síntesis de CBGA y sus análogos.

S. cerevisiae cuenta con un modelo a escala genómica (GEM) con una gran cobertura de su metabolismo, Yeast8. Las instancias de evaluación de este modelo demostraron la aptitud del mismo, así como de los métodos de simulación utilizados para la predicción de datos experimentales para su crecimiento y capacidad de producción de etanol.

El desarrollo de un modelo del metabolismo de una cepa heteróloga de *S. cerevisiae*, SXC09, fue facilitado por el grado de desarrollo y curado de Yeast8 y la disponibilidad de información detallada respecto al metabolismo secundario de *Cannabis* sp en bibliografía especializada. El desarrollo de SXC09 requirió de la inclusión de 4 reacciones heterólogas. Las evaluaciones de calidad realizadas con herramientas basadas en COBRApy indicaron parámetros de calidad de SXC09 en concordancia con los de su modelo de base. SXC09 posee conectividad completa de sus metabolitos (es decir, carece de metabolitos que no participen de ninguna reacción) y parámetros similares a Yeast8 y cercanos al 100% de balances de masa y carga correctos.

Las simulaciones realizadas mediante FBA permitieron determinar la capacidad máxima de producción de CBGA de la cepa modelada en SXC09, así como realizar predicciones sobre el comportamiento de partes de su metabolismo. En particular, se observó el carácter desacoplado de la producción de CBGA con el crecimiento de la cepa heteróloga. En base a esta información, se decidió diseñar simulaciones representativas de un bioproceso para la síntesis de CBGA a través de la limitación del crecimiento del microorganismo por limitación de nutrientes. En desarrollos futuros, SXC09 permitirá evaluar *in silico* la posibilidad de incluir modificaciones adicionales a *S. cerevisiae* que acoplen la producción de cannabinoides al crecimiento, así como

la utilidad de esta estrategia con el fin de maximizar la producción de cannabinoides en un proceso en batch o continuo.

Las simulaciones realizadas mediante DFBA nos permitieron adaptar los resultados obtenidos por FBA a sistemas variables en el tiempo, específicamente a la simulación de un bioproceso batch. Las herramientas informáticas elegidas para este paso permitieron incluir los resultados previos como datos en el diseño de sistemas dinámicos.

Al igual que en el caso de las simulaciones por FBA, DFBA logró predecir de forma adecuada el crecimiento de *S. cerevisiae* en medio de cultivo con glucosa incluyendo su tasa de crecimiento y producción de etanol.

Por otra parte, el bioproceso diseñado en este trabajo y simulado por DFBA resultó en una concentración máxima teórica de alrededor de 1.1 g/L de CBGA en el medio de cultivo. Esta concentración es superior a las obtenidas en *S. cerevisiae* para la producción de CBGA y otros cannabinoides (Blatt-Janmaat & Qu, 2021). Los reportes disponibles no contienen información suficiente sobre las condiciones del medio de cultivo, y en ciertos casos la información está protegida por patentes. Los resultados disponibles en la literatura en general utilizan medios de cultivo que incluyen un precursor de la vía de síntesis de cannabinoides como hexanoato u olivetolato, lo cual no se incluyó en estas simulaciones.

Los resultados numéricos muestran la capacidad del modelo utilizado como base (Yeast8) y del formulado en este trabajo (SXC09) para la cepa heteróloga de predecir el funcionamiento del metabolismo de cepas de *S. cerevisiae wild type* y de la cepa productora de CBGA, respectivamente. Estos resultados son prometedores y permiten inferir la posibilidad de lograr productividades mayores de cannabinoides en levaduras con modificaciones adicionales de su genoma.

El método elegido para lograr la producción de CBGA en estas simulaciones fue la limitación de la disponibilidad de un nutriente esencial para el crecimiento del microorganismo en el medio, con el objetivo de equilibrar el uso de glucosa en el crecimiento del organismo y la producción de CBGA. La medida utilizada para la elección de un valor inicial de concentración de amonio fue la productividad del proceso, por ser un valor relevante para el diseño de un proceso industrial. Estas decisiones de diseño nos permitieron obtener información relevante para el diseño más racional de un bioproceso basado en la cepa modelada en SXC09. Otra posibilidad que proveen los métodos informáticos utilizados es la evaluación *in silico* de los efectos de la supresión de un gen o grupo de genes y sus reacciones asociadas sobre una red metabólica. En este caso, se evaluó el efecto del *knock-out* de genes asociados al metabolismo fermentativo y la producción de etanol. Si bien la síntesis de etanol consume gran parte del flujo de carbono, necesario para la síntesis de CBGA, está también asociada al mantenimiento del balance energético de la célula. Estas modificaciones resultaron en una producción reducida de CBGA en las condiciones ensayadas.

El modelo a escala genómica desarrollado en este trabajo y los pasos de evaluación realizados nos permiten concluir que la producción heteróloga de CBGA es una alternativa viable para la

industria. Dado que la vía de síntesis de CBGA consiste de pocas reacciones, y la síntesis de cada uno de sus derivados requiere de una reacción y una enzima adicional, SXC09 puede fácilmente ser utilizado en el futuro para el modelado de la capacidad productiva de cepas heterólogas productoras de otros cannabinoides minoritarios de interés industrial o farmacológico, mediante modificaciones mínimas al modelo. Las técnicas utilizadas para el desarrollo y evaluación de SXC09 son fácilmente aplicables a otras vías de síntesis para las cuales se disponga de suficiente información.

Los resultados obtenidos servirán de base para un análisis técnico-económico detallado que permitan calcular los costos totales en tiempo y dinero del proceso productivo, considerando elementos que no fueron incluidos en estos modelos como pasos de extracción de los cannabinoides (dado que se espera el CBGA se acumule en la célula), el procesamiento del producto para obtener su forma activa (en particular la descarboxilación de CBGA para obtener CBG), procesos preparativos como la esterilización y limpieza de dispositivos, y el costo de la materia prima entre otros, considerando el valor del producto obtenido y el escalado del proceso (Da Gama Ferreira *et al.*, 2022).

6 - BIBLIOGRAFÍA

Aliferis KA , Bernard-Perron D, 2020. Cannabinomics: Application of Metabolomics in Cannabis (*Cannabis sativa* L.) Research and Development. *Front. Plant Sci.* 11:554. doi: 10.3389/fpls.2020.00554

Alves P, Amaral C, Teixeira N, Correia-da-Silva G, 2020. Cannabis sativa: Much more beyond Δ^9 -tetrahydrocannabinol, *Pharmacological Research* 157.

Andre CM, Hausman JF, Guerriero G, 2016. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules, *Frontiers in Plant Science*, February 2016, Volume 7, Article 19.

Barcaccia G, Palumbo F, Scariolo F, Vannozzi A, Borin M and Bona S, 2020. Potentials and Challenges of Genomics for Breeding Cannabis Cultivars. *Front. Plant Sci.* 11:573299. doi: 10.3389/fpls.2020.573299

Baron EP, 2018. Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science, *Headache* 1140.

Bautista JL, Yu S, Tian L, 2021. Flavonoids in Cannabis sativa: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology, *ACS*, <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.1c00318>.

Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee M, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R, 1998. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity, *European Journal of Pharmacology* 353 (1998). 23–31.

Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW, 2013. GenBank, *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195. Epub 2012 Nov 27.

Blatt-Janmaat K, Yang Qu Y, 2021. The Biochemistry of Phytocannabinoids and Metabolic Engineering of Their Production in Heterologous Systems, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2454. <https://doi.org/10.3390/ijms22052454>.

Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A, 2018. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history, *Journal of Ethnopharmacology* 227 (2018) 300–315.

Booth JK, Bohlmann J, 2019. Terpenes in Cannabis sativa – From plant genome to humans, *Plant Science* 284 (2019) 67–72.

Carvalho A, Hansen EH, Kayser O, Carlsen S, Stehle F, 2017. Designing microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids, *FEMS Yeast Research*, 17.

Caspi R, Billington R, Fulcher CA, Keseler IM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Midford PE, Ong Q, Ong WK, Paley S, Subhraveti P, Karp PD, 2018. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue D1, 4 January 2018, Pages D633–D639, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx935>.

Cassano T, Villani R, Pace L, Carbone A, Bukke VN, Orkisz S, Avolio C, Serviddio G, 2020. From Cannabis sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases, *Front. Pharmacol.* 11:124. doi: 10.3389/fphar.2020.00124.

Chandra S, Lata H, Khan IA, ElSohly MA, 2017. Cannabis sativa L.: Botany and Horticulture, Springer International Publishing AG 2017.

Clarke RC, Merlin MD, 2017. Cannabis Domestication, Breeding History, Present-day Genetic Diversity, and Future Prospects, *Critical Reviews in Plant Sciences*

Conneely LJ, Mauleon R, Mieog J, Barkla BJ, Kretzschmar T, 2021. Characterization of the Cannabis sativa glandular trichome proteome. *PLoS ONE* 16(4): e0242633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242633>

Da Gama Ferreira R, Misailidis N, Petrides D, 2022. Cannabinoids Production via Microbial Fermentation – Process Modeling and Techno-Economic Assessment (TEA) using SuperPro Designer, DOI: 10.13140/RG.2.2.23860.12167.

Degenhardt F, Stehle F, Kayser O, 2017. The Biosynthesis of Cannabinoids, *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00002-8>.

Duarte NC, Herrgård MJ, Palsson BØ, 2004. Reconstruction and Validation of Saccharomyces cerevisiae iND750, a Fully Compartmentalized Genome-Scale Metabolic Model, *Genome Research*.

Ebrahim A, Lerman JA, Palsson BO, Hyduke DR, 2013. COBRApy: COntstraints-Based Reconstruction and Analysis for Python, BMC Systems Biology 2013, 7:74.

ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A, 2017. Phytochemistry of Cannabis sativa L., Phytocannabinoids, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 103, DOI 10.1007/978-3-319-45541-9_1.

Freeman TP, Craft S, Wilson J, Stylianou S, ElSohly M, Di Forti M, Lynskey MT, 2020. Changes in delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) concentrations in cannabis over time: systematic review and meta-analysis, Addiction (2020) <https://doi.org/10.1111/add.15253>.

Forster J, Famili I, Fu P, Palsson BO, Nielsen J, 2003. Genome-Scale Reconstruction of the Saccharomyces cerevisiae Metabolic Network, Genome 13:244–253.

Gao S, Wang B, Xie S, Xu X, Zhang J, Pei L, Yu Y, Yang W, Zhang Y, 2020. A high-quality reference genome of wild Cannabis sativa, Horticulture Research (2020) 7:73 <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0295-3>

Gülck T, Møller BL, 2020. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis, Trends in Plant Science, October 2020, Vol. 25, No. 10 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>.

Hanly TJ, Henson MA, 2010. Dynamic Flux Balance Modeling of Microbial Co-Cultures for Efficient Batch Fermentation of Glucose and Xylose Mixtures, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 108, No. 2, February, 2011.

Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Tagliabatella-Scafati O, Appendino G, 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory, Nat. Prod. Rep., 2016, 33, 1357.

Hesami M, Pepe M, Alizadeh M, Rakei A, Baiton A, Jones AMP, 2020. Recent advances in cannabis biotechnology, Industrial Crops & Products 158.

Hesami M, Baiton A, Alizadeh M, Pepe M, Torkamaneh D, Jones AMP, 2021. Advances and Perspectives in Tissue Culture and Genetic Engineering of Cannabis, Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 5671. <https://doi.org/10.3390/ijms22115671>

Hillig KW, 2005. Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae), Genetic Resources and Crop Evolution 52: 161–180, 2005.

Hjersted JL, Henson MA, 2006. Optimization of Fed-Batch *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Using Dynamic Flux Balance Models, *Biotechnol. Prog.*, 22, 1239–1248.

Hong K, Nielsen J, 2012. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries, *Cell. Mol. Life Sci.* 69:2671–2690.

Hurgobin B, Tamiru-Oli M, Welling MT, Doblin MS, Bacic A, Whelan J, Lewsey MG, 2021. Recent advances in *Cannabis sativa* genomics research, *New Phytologist* (2021) 230: 73–89 doi: 10.1111/nph.17140.

Janatová A, Fraňková A, Tlustoš P, Hamouz K, Božik M, Klouček P, 2018. Yield and cannabinoids contents in different cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes for medical use, *Industrial Crops & Products* 112 (2018) 363–367.

Jenkins C, Orsburn B, 2019. The First Publicly Available Annotated Genome for Cannabis plants, *bioRxiv* 2019.

Jenkins C, Orsburn B, 2020. The Cannabis Proteome Draft Map Project, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 965; doi:10.3390/ijms21030965.

Jin D, Dai D, Xie Z, Chen J, 2020. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes, *Scientific Reports* 10:3309.

Kaneshira M, Goto S, 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Nucleic Acids Research*, Volume 28, Issue 1, 1 January 2000, Pages 27–30, <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.

Kovalchuk I, Pellino M, Rigault P, van Velzen R, Ebersbach J, Ashnest JR, Mau M, Schranz ME, Alcorn J, Laprairie RB, McKay JK, Burbridge C, Schneider D, Vergara D, Kane NC, Sharbel TF, 2020. The Genomics of Cannabis and Its Close Relatives, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 71:20.1–20.27.

Kuepfer L, Sauer U, Blank LM, 2005. Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genome* 15:1421–1430.

Lasry, R. (2022). Desarrollo y aplicación de estrategias de optimización para el diseño óptimo de redes metabólicas y procesos biotecnológicos [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad Nacional del Sur.

Lee SY, Kim HU, 2015. Systems strategies for developing industrial microbial strains, *Nature Biotechnology* 33, 10.

Lieven C, Beber ME, Olivier BG, Bergmann FT, Ataman M, Babaei P, Bartell JA, et al., 2020. MEMOTE for Standardized Genome-Scale Metabolic Model Testing, *Nature Biotechnology*, March. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0446-y>.

Lim KJH, Lim YP, Hartono YD, Go MK, Fan H, Yew WS, 2021. Biosynthesis of Nature-Inspired Unnatural Cannabinoids, *Molecules*, 26, 2914. <https://doi.org/10.3390/molecules26102914>.

López, A, 2021. La cadena de valor del cannabis: situación y tendencias internacionales, y oportunidades para la argentina. Documentos de Trabajo del CCE N° 1, marzo de 2021, Consejo para el Cambio Estructural - Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación.

Lu H, Li F, Sánchez BJ, Zhu Z, Li G, Domezain I, Marcišauskas S, Anton PM, Lappa D, Lieven C, Beber ME, Sonnenschein N, Kerkhoven EJ, Nielsen J, 2019. A consensus *S. cerevisiae* metabolic model Yeast8 and its ecosystem for comprehensively probing cellular metabolism, *Nature Communications* 10:3586.

Mahadevan R, Edwards JS, Doyle FJ, 2002. Dynamic Flux Balance Analysis of Diauxic Growth in *Escherichia coli*, *Biophysical Journal*, Volume 83, 1331–1340.

Maia P, Rocha M, Rocha I, 2016. In Silico Constraint-Based Strain Optimization Methods: the Quest for Optimal Cell Factories, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Volume 80, Number 1.

Maranas CD, Zomorodi AR, 2016. Optimization methods in metabolic networks, John Wiley & Sons Inc.

Mo ML, Palsson BO, Herrgard MJ, 2009. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast, *BMC Systems Biology* 2009, 3:37.

Nielsen J, 2017. Systems Biology of Metabolism, *Annu. Rev. Biochem.* 2017. 86:11.1–11.31.

Nookaew I, Jewett MC, Meechai A, Thammarongtham C, Laoteng K, Cheevadhanarak S, Nielsen J, Bhumiratana S, 2008. The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism, *BMC Systems Biology* 2:71.

Øyås O, Stelling J, 2017. Genome-scale metabolic networks in time and space, *Current Opinion in Systems Biology* 2017, 1–8.

Paddon CJ, Keasling JD, 2014. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development, *Nature Reviews Microbiol.* 12.

Ren M, Tang Z, Wu X, Spengler R, Jiang H, Yang Y, Boivin N, 2019. The origins of cannabis smoking: Chemical residue evidence from the first millennium BCE in the Pamirs *Sci Adv* 5 (6), eaaw1391. DOI: 10.1126/sciadv.aaw1391

Rodrigues CIS, Wahl A, Gombert AK, 2021. Aerobic growth physiology of *Saccharomyces cerevisiae* on sucrose is strain-dependent, *FEMS Yeast Research*, 21, 2021, foab021.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ, 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor, *British Journal of Pharmacology* (2007) 152, 1092–1101.

Sánchez BJ, Nielsen J, 2015. Genome scale models of yeast: towards standardized evaluation and consistent omic integration, *Integr. Biol.*, 2015, 7, 846.

Savinell, JM, Palsson, BO, 1992. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimization. I. Development of mathematical formalism. *J. Theor. Biol.* 154, 421–454.

Schafroth MA, Carreira EM, 2017. Synthesis of Phytocannabinoids, *Phytocannabinoids, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 103, DOI 10.1007/978-3-319-45541-9_2.

Stout JM, Boubakir Z, Ambrose SJ, Purves RW, Page JE, 2012. The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes, *The Plant Journal* 2012 Blackwell Publishing Ltd.

Tomko AM, Whynot EG, Ellis LD, Dupré DJ, 2020. Anti-Cancer Potential of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids Present in Cannabis, *Cancers*, 12, 1985; doi:10.3390/cancers12071985.

Tourigny DS, Muriel JC, Beber ME, 2020. dfba: Software for efficient simulation of dynamic flux-balance analysis models in Python, *Journal of Open Source Software*, 5(52), 2342. <https://doi.org/10.21105/joss.02342>.

United Nations Office on Drugs and Crime, 2020. World Drug Report 2020, United Nations publication.

Welling MT, Deseo MA, Bacic A, Doblin MS, 2022. Biosynthetic origins of unusual cannabimimetic phytocannabinoids in *Cannabis sativa* L: A review, *Phytochemistry*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113282>.

Wurtzel ET, Kutchan TM, 2016. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future, *Science* Vol 353 Issue 6305.

Zhang Q, Chen X, Guo H, Trindade LM, Salentijn EMJ, Guo R, Guo M, Xu Y and Yang M, 2018. Latitudinal Adaptation and Genetic Insights Into the Origins of *Cannabis sativa* L.. *Front. Plant Sci.* 9:1876. doi: 10.3389/fpls.2018.01876

7 - LISTA DE ABREVIATURAS

CB1 - Receptor endocannabinoide 1

CB2 - Receptor endocannabinoide 2

CBC - Cannabicromeno

CBCA - Ácido cannabicroménico

CBD - Cannabidiol

CBDA - Ácido cannabidiólico

CBG - Cannabigerol

CBGA - Ácido cannabigerólico

CBGAS - Ácido cannabigerólico sintasa

CBN - Cannabinol

COBRA - *CO*nstraint-Based Analysis and Reconstruction, análisis y reconstrucción basado en restricciones

CsAAE - Enzima activante de ácido graso de *Cannabis sativa*

CsCBCAS - Ácido cannabicroménico sintasa de *Cannabis sativa*

CsCBDAS - Ácido cannabidiólico sintasa de *Cannabis sativa*

CsOAC - Ácido olivetólico ciclase de *Cannabis sativa*

CsPT - Prenil transferasa de *Cannabis sativa*

CsTHCAS - Ácido tetrahidrocannabinólico sintasa de *Cannabis sativa*

CsTKS - Tetracétido sintasa de *Cannabis sativa*

DFBA - *Dynamic Flux Balance Analysis*, Análisis dinámico de balance de flujo

DOXP/MEP - Vía independiente del mevalonato

ECS - *Endocannabinoid system*, Sistema endocannabinoide

EDO - ecuación diferencial ordinaria

FBA - *Flux Balance Analysis*, Análisis de balance de flujo

FPP - Farnesil difosfato

GEM - *Genomic scale model*, modelo a escala genómica

GGPP - Geranylgeranyl difosfato

GPP - Geranyl difosfato

GPR - Conectividad Gen-Proteína-Reacción

gPS - Gramos de peso seco

MCFA - *Medium chain fatty acid*, Ácido graso de cadena media

MVA - Vía del mevalonato

OA - Ácido olivetólico

OLS - Olivetol sintasa

SCFA - *Short chain fatty acid*, Ácido graso de cadena corta

THC - Tetrahidrocannabinol

THCA - Ácido tetrahidrocannabinólico

Por la presente, certificamos que la copia adjunta corresponde a la última versión de la tesis de grado titulada '**Desarrollo y evaluación del modelado in silico para la producción heteróloga de cannabinoides minoritarios**', defendida el día **12 de mayo de 2023** en la Universidad Nacional de San Martín.

San Martín, 21 de septiembre de 2023,



Franco D'Onofrio



Lasry Testa, Romina