UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Diseño *in silico* de una plataforma biológica para la producción de etilenglicol a partir de glicerol crudo mediante herramientas de ingeniería metabólica y principios de la termodinámica

Edgar Alejandro Cano Zapata

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia
2022

Diseño *in silico* de una plataforma biológica para la producción de etilenglicol a partir de glicerol crudo mediante herramientas de ingeniería metabólica y principios de la termodinámica

Edgar Alejandro Cano Zapata

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director (a):

Ph.D. Camilo Alberto Suárez Méndez

Línea de Investigación:

Diseño Racional e Intensificación de Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y flujos reactivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2022

In silico design of a biological platform to produce Ethylene Glycol from crude Glycerol using tools of the metabolic engineering and thermodynamics

Edgar Alejandro Cano Zapata

Thesis or research work presented as a partial requirement for the degree of:

Master in Chemical Engineering

Director:

Ph.D. Camilo Alberto Suárez Méndez

Research line:

Bioprocess Intensification and Rational Design

Research group:

Bioprocess and reactive flows

National University of Colombia

Faculty of Mines, Process and Energy department

Medellín, Colombia

2022

A mis padres y mis hermanas

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Edgar Alejandro Cano

Edgar Alejandro Cano Zapata

Fecha 07/10/2022

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de estos años. A mis padres por su gran dedicación y entrega para que yo llegara hasta este punto de mi vida, y poder convertirme en una persona integra. También agradezco a familiares y amigos que siempre me han acompañado en este proceso de aprendizaje y crecimiento.

A mi director, el profesor Camilo Suárez, por todas las enseñanzas que me ha brindado a lo largo de estos años tanto en la vida académica como en la vida personal.

A los integrantes del grupo BIRD, en especial a Lina, Yesenia y Sebastián, quienes me acompañaron durante este proceso y me brindaron su apoyo, así como yo pude brindarles el mío.

A la Universidad Nacional de Colombia, por acogerme en su institución y brindarme su apoyo para llevar a cabo mis proyectos y mi formación académica.

A todas las personas quienes en algún momento fueron participes de mi vida y brindaron su apoyo para llevar a cabo mis proyectos.

Todo esto es gracias a ustedes.

Resumen

El objetivo del presente estudio es diseñar una plataforma biológica *in silico* para la producción de etilenglicol a partir de glicerol crudo a través de un análisis termodinámico, el cual permitirá establecer la máxima producción teórica que sería posible obtener, y herramientas de la ingeniería metabólica, las cuales permiten evaluar e implementar las diferentes rutas metabólicas y genes heterólogos relacionados para llevar a cabo este proceso.

Inicialmente se construyeron modelos de caja negra que representaran la producción biológica de etilenglicol a partir de las principales fuentes de carbono que se encuentran en el glicerol crudo, glicerol y metanol. Estos modelos se construyeron primero para cada sustrato por separado, considerando diferentes aceptores de electrones incluido el etilenglicol. Debido a que se tiene un interés en realizar este proceso utilizando ambos sustratos al mismo tiempo, se resalta la importancia de implementar una metodología que permita construir modelos de caja negra para múltiples sustratos. Más adelante, se construyeron diferentes modelos metabólicos para tres diferentes microorganismos (*E. coli, S. cerevisiae, P. pastoris*) con el fin de representar la producción de etilenglicol a través de diferentes rutas de biosíntesis (SDP y P1PDP), y las diferentes rutas de asimilación de glicerol y metanol. Estos modelos se utilizaron para estudiar el rendimiento por mol de carbono utilizado y la cantidad de intermediarios energéticos (ATP, NADH, NADPH) generados por mol de etilenglicol producido a partir de diferentes proporciones de glicerol y metanol. Finalmente, se selecciona uno de estos modelos para estudiar el efecto de la velocidad de crecimiento en la síntesis de etilenglicol, y cómo las condiciones intracelulares afectan la viabilidad termodinámica de las rutas de biosíntesis consideradas.

En el presente estudio se observó cómo el etilenglicol no resulta adecuado cómo aceptor de electrones en el catabolismo debido la baja cantidad de energía libre obtenida a partir de cada sustrato. Por lo tanto, se consideró el uso de otros aceptores de electrones y se

plantean otras reacciones catabólicas alternas que permitan la producción de etilenglicol a partir de un consumo parcial de oxígeno para la obtención de energía. Posteriormente, se presenta una propuesta preliminar para la construcción de un modelo de caja negra para un proceso con múltiples sustratos partiendo de una metodología ya propuesta para un único sustrato. En esta se resalta la presencia de nuevos parámetros que consideran el efecto de la presencia de múltiples sustratos en los diferentes procesos celulares. Estos, sin embargo, quedan pendientes por determinar dado a que no se logró establecer una correlación matemática que permitiera calcularlos.

Por otra parte, se observó a partir del análisis de los modelos metabólicos cómo el modelo para *E. coli* proporciona el mejor escenario para la obtención de etilenglicol dado el mayor rendimiento obtenido y a la cantidad de intermediarios energéticos generados durante el proceso. Para este modelo, se encontró cómo la producción de etilenglicol se da principalmente a bajas velocidades de crecimiento de la biomasa, demostrando que ambos procesos compiten directamente por el flujo de carbono que entra al metabolismo. Finalmente, se encontró que algunas reacciones dentro de las rutas de síntesis de etilenglicol son sensibles a las variaciones de concentración intracelulares, lo que provocaría la generación de cuellos de botella en el proceso disminuyendo el rendimiento en la producción de etilenglicol.

Mediante estos análisis se pudo validar que la producción biológica de etilenglicol es posible a partir de las principales fuentes de carbono del glicerol crudo. Para llevar a cabo este proceso, se deben cumplir determinadas condiciones a nivel del metabolismo para dirigir el flujo de carbono hacia el producto de interés y hacer el factible el proceso. Sin embargo, es necesario seguir realizando estudios posteriores para determinar a profundidad las modificaciones a nivel genético que permitan acoplar la producción de biomasa con la síntesis de etilenglicol, implementar otras rutas de síntesis alternas, y finalizar la construcción del modelo de caja negra para múltiples sustratos para evaluar con más detalle que tiene la presencia de cada uno de estos en los diferentes procesos celulares de interés.

Palabras clave: Análisis de balance de flujos, etilenglicol, glicerol, metanol, modelo metabólico, termodinámica.

Abstract

This study aims at designing an *in silico* biological platform to produce ethylene glycol from crude glycerol through a thermodynamic analysis to determine the maximum theoretical yield, and the use of metabolic engineering approaches to assess and implementing different metabolic pathways and the associated heterologous genes to carry out this process.

Initially, black-box models were constructed to represent the biological production of ethylene glycol from primary carbon sources present in crude glycerol, glycerol, and methanol. These models were first built separately for each substrate while considering different electron acceptors including ethylene glycol. The significance of establishing a methodology that permits the construction of black box models for multiple substrates is highlighted because there is an interest in carrying out this procedure using both substrates at the same time. To depict the formation of ethylene glycol through several biosynthetic routes (SDP and P1PDP), as well as the various routes of glycerol and methanol assimilation, several metabolic models were created for three distinct microorganisms (*E. coli, S. cerevisiae, and P. pastoris*). Here, a study was performed by using these models to estimate the yield per mole of carbon consumed and the quantity of energy intermediates (ATP, NADH, and NADPH) generated per mole of produced ethylene glycol under different glycerol to methanol ratios. Finally, one of these models is chosen to investigate the impact of growth rate on the production of ethylene glycol. Likewise, the impact of intracellular conditions on the thermodynamic feasibility was assessed for the biosynthetic pathways under consideration.

In the present study, it was observed how ethylene glycol is not suitable as an electron acceptor for catabolism due to the low amount of free energy obtained. Therefore, the use of alternative electron acceptors was considered, and alternative catabolic reactions allowing the production of ethylene glycol from a partial consumption of oxygen for energy production are proposed. Following that, a preliminary proposal is suggested for the construction of a black-box model for a process using multiple substrates based on a sound methodology already proposed for a single substrate. Emphasis is made on the use of new

parameters considering the effect of each substrate on the different cellular processes. However, these parameters have yet to be determined because a mathematical correlation to calculate them could not yet be developed here.

The analysis of the metabolic models, on the other hand, revealed that the model for *E. coli* provides the best scenario for obtaining ethylene glycol due to a higher yield obtained and the amount of energy intermediates generated during the process. It was found that ethylene glycol production occurred primarily at low biomass growth rates in this model, demonstrating that both processes compete directly for the carbon flow into the metabolism. Finally, it was found that some reactions within the pathways for ethylene glycol synthesis are sensitive to intracellular concentration variations, resulting in the development of bottlenecks in the process as well as a reduction in the ethylene glycol production yield.

These analyses showed that biological production of ethylene glycol is possible from the main carbon sources derived from crude glycerol. Certain conditions must be met at the metabolic level to redirect the carbon flow to the product of interest, and to make the process feasible. However, more research is still needed to determine in depth the required genetic modifications to couple biomass production with ethylene glycol synthesis, to implement other alternative synthesis routes, and to complete the construction of the black-box model for multiple substrates in order to evaluate in greater detail the effects of each of these substrates on the various cellular processes of interest.

Keywords: Flux Balance Analysis, ethylene glycol, glycerol, methanol, metabolic model, thermodynamics.

Contenido

Pág.

1. Marco teórico 5
1.1 Antecedentes 5
1.1.1 Diseño racional de bioprocesos 5
1.1.2 Análisis termodinámico y estimación de parámetros para el modelo de caja negra 6
1.1.3 Crecimiento microbiano en múltiples sustratos 13
1.1.4 Fermentación aerobia. 17
1.1.5 Ingeniería Metabólica: Principios y Generalidades 18
1.1.6 Producción biológica de etilenglicol 22
1.2 Objetivos 25
1.2.1 Objetivo general 25
1.2.2 Objetivos específicos 25
1.3 Planteamiento del problema 26
1.4 Hipótesis 26

2. Metodología 27
2.1 Estimación de la estequiometría del proceso a través del modelo de caja negra 27
2.2 Construcción y selección de un modelo metabólico para la producción de etilenglicol 28
2.3 Análisis termodinámico de rutas metabólicas 31
2.3.1 Rango de valores para las energías libre de Gibbs 31
2.3.2 Distribución óptima de concentraciones 32

3. Resultados y discusión 35
3.1 Modelos de caja negra 36
3.1.1 Producción biológica de etilenglicol a partir de glicerol 36
3.1.2 Producción biológica de etilenglicol a partir de metanol 38
3.1.3 Propuesta de reacciones catabólicas alternas 41
3.2 Propuesta preliminar de modelo de caja negra para fermentaciones con múltiples sustratos 48
3.2.1 Análisis termodinámico de las reacciones catabólicas para múltiples sustratos 48
3.2.2 Análisis termodinámico para la producción de biomasa utilizando múltiples sustratos 49
3.2.3 Síntesis de producto no catabólico en un proceso con múltiples sustratos 51
3.2.4 Mantenimiento celular en procesos con múltiples sustratos 53
3.2.5 Consideraciones generales para los parámetros $\boldsymbol{\alpha i}$, $\boldsymbol{\beta i}$ y $\boldsymbol{\varphi i}$ 54

3.2.6 Modelo de caja negra para el proceso de producción de etilenglicol a partir de glicerol y metanol. 56
3.3 Reconstrucción y análisis de los modelos metabólicos 57
3.3.1 Rutas metabólicas para el consumo de glicerol 58
3.3.2 Rutas metabólicas para el consumo de metanol 59
3.3.3 Rutas de biosíntesis de etilenglicol 61
3.3.4 Análisis de los modelos metabólicos construidos 64
3.3.5 Análisis de los intermediarios energéticos generados 69
3.3.6 Efecto de la velocidad de crecimiento en la producción de etilenglicol 73
3.4 Análisis termodinámico del proceso 74
3.4.1 Análisis termodinámico de las rutas metabólicas seleccionadas para la producción de etilenglicol. 74
3.4.2 Distribución óptima de concentraciones 77

4. Conclusiones y recomendaciones 83
4.1 Conclusiones 83
4.2 Recomendaciones 89

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Espacio de soluciones del análisis de balance de flujos. Izquierda: Restricciones incompletas. Derecha: Restricciones suficientes. 21
Figura 1-2: Ruta metabólica para la producción de etilenglicol a partir de la xilosa. 23
Figura 1-3: Ruta metabólica para la producción de etilenglicol utilizando L-serina como intermediario. 24
Figura 2-1: Direccionalidad de las reacciones consideradas en el modelo metabólico de acuerdo a su valor del cambio en la energía libre de Gibbs..... 30
Figura 3-1: Variación del coeficiente estequiométrico del etilenglicol con respecto al coeficiente estequiométrico del oxígeno para la reacción de semi-oxidación de glicerol. 42
Figura 3-2: Variación de la energía libre de Gibbs liberada en la reacción de semi-oxidación de glicerol con respecto al coeficiente estequiométrico del oxígeno. 43
Figura 3-3: Coeficientes estequiométricos estimados de la reacción de proceso seleccionada como funciones de la velocidad de crecimiento. 45
Figura 3-4: Variación del coeficiente estequiométrico del etilenglicol con respecto al coeficiente estequiométrico del oxígeno para la reacción de semi-oxidación de metanol. 46
Figura 3-5: Variación de la energía libre de Gibbs liberada en la reacción de semi-oxidación de metanol con respecto al coeficiente estequiométrico del oxígeno..... 47
Figura 3-6: Rutas metabólicas seleccionadas para el consumo de glicerol. Arriba: Ruta oxidativa. Abajo: Ruta reductiva. 59
Figura 3-7: Rutas metabólicas seleccionadas para el consumo de metanol. Izquierda: Ruta dependiente de metanol deshidrogenasa y ciclo RuMP. Derecha: Ruta dependiente de alcohol oxidasa y ciclo DHA. 61
Figura 3-8: Rutas metabólicas seleccionadas para la producción biológica de etilenglicol. A: Ruta dependiente de serina. B: Ruta dependiente de pentosas 1-fosfato. 64
Figura 3-9: Rendimientos obtenidos por mol de carbono consumido para la producción de etilenglicol utilizando la ruta dependiente de serina. Arriba: iML1515 (*E. coli*). Medio: iND750 (*S. cerevisiae*). Abajo: iMT1026 (*P. pastoris*). 67
Figura 3-10: Rendimientos obtenidos por mol de carbono consumido para la producción de etilenglicol utilizando la ruta dependiente de pentosas 1-fosfato. Arriba: iML1515 (*E. coli*). Medio: iND750 (*S. cerevisiae*). Abajo: iMT1026 (*P. pastoris*). 68
Figura 3-11: Rendimiento en la generación de los intermediarios principales por mol de etilenglicol generado para los diferentes escenarios estudiados para cada modelo

metabólico. Azul: Ruta dependiente de serina. Rojo: Ruta dependiente de pentosas 1-fosfato. 70
Figura 3-12: Efecto de la velocidad de crecimiento en la producción de etilenglicol para el modelo metabólico de *E. coli* a las diferentes condiciones de consumo de glicerol y metanol. 74
Figura 3-13: Resultados del análisis de factibilidad termodinámica para la ruta dependiente de serina y la ruta de pentosas 1-fosfato. Línea azul: Rango de valores de la energía libre de Gibbs. Punto (•): Energía libre de Gibbs estándar de la reacción. 77
Figura 3-14: Resultados obtenidos de la distribución óptima de concentraciones para la producción de etilenglicol a partir de la ruta dependiente de serina. Proporción glicerol – Metanol: 75 - 25. 79
Figura 3-15: Perfiles de la energía libre de Gibbs disipada para la producción de etilenglicol utilizando la ruta dependiente de serina. Línea punteada: Perfil de energía a condiciones fisiológicas. Línea gris: Perfil de energía a condiciones óptima calculadas. Linea roja: Posible reacción limitante. Proporción glicerol – Metanol: 75 - 25. 79
Figura 3-16: Resultados obtenidos de la distribución óptima de concentraciones para la producción de etilenglicol a partir de la ruta dependiente de pentosas 1-fosfato. Proporción glicerol – Metanol: 75 - 25. 81
Figura 3-17: Perfiles de la energía libre de Gibbs disipada para la producción de etilenglicol utilizando la ruta dependiente de pentosas 1-fosfato. Línea punteada: Perfil de energía a condiciones fisiológicas. Línea gris: Perfil de energía a condiciones óptima calculadas. Linea roja: Posible reacción limitante. Proporción glicerol – Metanol: 75 - 25. 81

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Composición del glicerol crudo en diferentes muestras de la industria colombiana. 2
Tabla 2-1: Base de datos utilizadas para la construcción de modelos metabólicos. 29
Tabla 2-2: Características de los modelos metabólicos base para cada microorganismo. 29
Tabla 3-1: Reacciones catabólicas propuestas a partir de un mol de glicerol. 37
Tabla 3-2: Parámetros de la ecuación de Herbert-Pirt para cada escenario utilizando glicerol como fuente de carbono y energía. 38
Tabla 3-3: Reacciones catabólicas propuestas a partir de un mol de metanol. 39
Tabla 3-4: Parámetros de la ecuación de Herbert-Pirt para cada escenario utilizando metanol como fuente de carbono y energía. 41
Tabla 3-5: Velocidades específicas de consumo y producción de los diferentes compuestos involucrados en la reacción de proceso seleccionada. 44
Tabla 3-6: Energía libre de Gibbs de las diferentes reacciones metabólicas consideradas para la producción de etilenglicol. 75
Tabla 3-7: Concentración mínima y máxima para cada uno de los metabolitos considerados en el análisis termodinámico. 76
Tabla A-1: Genes asociados a las reacciones de asimilación de Glicerol y Metanol. 91
Tabla A-2: Genes asociados a las rutas de biosíntesis consideradas para la producción de etilenglicol. 92
Tabla B-1: Flujos extracelulares para el modelo iML1515 utilizando la ruta SDP en cada escenario……97
Tabla B-2: Flujos extracelulares para el modelo iND750 utilizando la ruta SDP en cada escenario……98
Tabla B-3: Flujos extracelulares para el modelo iMT1026 utilizando la ruta SDP en cada escenario……98
Tabla B-4: Flujos extracelulares para el modelo iML1515 utilizando la ruta P1PDP en cada escenario……99
Tabla B-5: Flujos extracelulares para el modelo iND750 utilizando la ruta P1PDP en cada escenario……99

Tabla B-6: Flujos extracelulares para el modelo iMT1026 utilizando la ruta P1PDP en cada escenario……..100

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
a_G	Energía libre de Giggs necesaria para la síntesis de biomasa	$\frac{kJ}{cmol_x}$	Ec. (1.7)
a_S	Cantidad de sustrato *S* consumido para la síntesis de una c-mol de biomasa	$\frac{mol_S}{cmol_x}$	Ec. (1.9)
a_j^{ana}	Cantidad de componente *i* destinado al anabolismo para la síntesis de una c-mol de biomasa	$\frac{mol_i}{cmol_x}$	Ec. (1.5)
a_i^{cat}	Cantidad de componente *i* destinado al catabolismo para la síntesis de una c-mol de biomasa	$\frac{mol_i}{cmol_x}$	Ec. (1.8)
B	Máxima Fuerza Impulsora Mínima	$\frac{kJ}{mol}$	Ec. (1.24)
b_S	Cantidad de sustrato *S* consumido para la síntesis de un mol de producto no catabólico	$\frac{mol_S}{mol_P}$	Ec. (1.17)
b_i^{ana}	Cantidad de componente *i* destinado al anabolismo para la síntesis de un mol de producto no catabólico	$\frac{mol_i}{mol_P}$	Ec. (1.10)
b_S^{cat}	Cantidad de sustrato *S* destinado al catabolismo para síntesis de un mol de producto no catabólico.	$\frac{mol_S}{mol_P}$	Ec. (1.14)
b_S^{TDF}	Cantidad de sustrato *S* destinada al catabolismo para suplir las irreversibilidades durante la síntesis de producto no catabólico	$\frac{mol_S}{mol_P}$	Ec. (1.16)
$\boldsymbol{C_{max}}$	Vector de concentraciones máximas para los metabolitos estudiados.	$\frac{mol}{L}$	Ec. (1.24)
$\boldsymbol{C_{min}}$	Vector de concentraciones mínimas para los metabolitos estudiados	$\frac{mol}{L}$	Ec. (1.24)
c	Número de carbonos	1	-
G	Energía libre de Gibbs	kJ	-
LB	Vector de límite inferior para los flujos metabólicos	$\frac{mmol}{gDW \cdot h}$	Ec. (1.23)
m_G	Energía libre de Gibbs requerida para el mantenimiento celular	$\frac{kJ}{cmol_x \cdot h}$	Ec. (1.19)
$m_{s,i}$	Fracción de sustrato i consumido para el mantenimiento celular	$\frac{mol_i}{cmol_x \cdot h}$	Ec. (1.20)

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\boldsymbol{N}$	Matriz estequiométrica	1	Ec. (1.22)
n_i	Coeficiente estequiométrico del componente *i*	1	Ec. (1.3)
q_i	Velocidad específica de consumo/producción del compuesto i	$\frac{mol_i}{cmol_x \cdot h}$	Ec. (1.21)
R	Constante de los gases ideales	$\frac{kJ}{mol \cdot K}$	-
$\boldsymbol{r}$	Vector de acumulación neta de cada componente en el metabolismo.	$\frac{mmol}{gDW \cdot h}$	Ec. (1.22)
$\boldsymbol{s}$	Vector de concentraciones de cada componente en el metabolismo.	$\frac{mmol}{gDW}$	Ec. (1.22)
T	Temperatura	K	-
TDF	Fuerza impulsora termodinámica para la síntesis de producto no catabólico	$\frac{kJ}{mol_P}$	Ec. (1.15)
UB	Vector de límite superior para los flujos metabólicos	$\frac{mmol}{gDW \cdot h}$	Ec. (1.23)
$\boldsymbol{v}$	Vector de flujos metabólicos	$\frac{mmol}{gDW \cdot h}$	Ec. (1.22)
X	Biomasa	1	Ec. (1.4)
$\boldsymbol{x}$	Vector de concentraciones para los metabolitos estudiados.	$\frac{mol}{L}$	Ec. (1.24)
x_i	Concentración del metabolito i	$\frac{mol}{L}$	Ec. (2.1)

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
α_i	Fracción de biomasa generada a partir del sustrato i	1	Ec. (3.25)
β_i	Fracción de producto no catabólico generado a partir del sustrato i	1	Ec. (3.34)
γ	Grado de reducción	1	Ec. (1.5)
$\Delta_{cat}G$	Energía libre de Gibbs para la reacción catabólica	$\frac{kJ}{mol}$	Ec. (1.3)
$\Delta_f G_j$	Energía libre de formación para el componente j	$\frac{kJ}{mol_j}$	-
$\Delta_R G_{theor}$	Valor teórico de la energía libre de Gibbs para la reacción de producto	$\frac{kJ}{mol}$	Ec. (1.12)
$\Delta_r G'$	Cambio de la energía libre de la reacción	$\frac{kJ}{mol}$	Sección 282.2
η	Eficiencia	1	-
μ	Velocidad de crecimiento de biomasa	h^{-1}	Ec. (1.1)
φ_i	Fracción de contribución del catabolismo del sustrato *i* en los procesos celulares	1	Ec. (3.22)

Subíndices

Subíndice	Término
C	Asociado al CO_2
EG	Etilenglicol
max	Valor máximo obtenible a las condiciones establecidas.
min	Valor mínimo obtenible a las condiciones establecidas.
N	Asociado a la fuente de nitrógeno.
O	Asociado al O_2
ox	Estado oxidado
red	Estado reducido
S	Asociado al sustrato S
W	Asociado al H_2O
X	Asociado a la biomasa

Superíndices

Superíndice	Término
ana	Anabolismo
cat	Catabolismo
mix	Parámetro descrito en un proceso con múltiples sustratos
T	Transpuesta

Abreviaturas

Abreviatura	Término
13dpg	1,3-difosfo glicerato
3pg	3-fosfoglicerato
3php	3-fosfohidroxipiruvato
AAO	Amino ácido oxidasa / Ethanolamina oxidasa
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CBM	Constraint-Based Modeling (Modelamiento basado en restricciones
Ciclo DHA	Ciclo de dihidroxiacetona
Ciclo RuMP	Ciclo de Ribulosa Monofosfato
CO2	Dióxido de carbono
DHA	Dihidroxiacetona
DHAK	Dihidroxiacetona quinasa
DHAP/dhap	Dihidroxiacetona fosfato
e4p	Eritrosa 4-fosfato
Ethan	Etanolamina
F6P/f6p	Fructosa 6-fosfato

Abreviatura	**Término**
Fald	Formaldehido
FBA	Flux Balance Analysis (Análisis de balance de flujos)
fdp	Fructosa disfosfato
G3P/g3p	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa
GAP	Gliceraldehido 3-fosfato
Gald	Glicolaldehido
GCALDOR1	Glicolaldehido Reductasa (Dependiente de NADH)
GCALDOR2	Glicolaldehido Reductasa (Dependiente de NADPH)
Glic/glyc	Glicerol
Glic-3-P	Glicerol 3-fosfato
GLYD	Glicerol Deshidrogenasa
GLYK	Glicerol quinasa.
H	Protones
H2O	Agua
H2O2	Peróxido de hidrógeno
H6P	Hexulosa 6-fosfato
Hpyr	Hidroxipiruvato
HPYRDC	Hidroxipiruvato descarboxilasa
L-ala	L-Alanina
L-ser	L-Serina
MDF	Max-min Driving Force (Máxima fuerza impulsora mínima)
MEDH	Metanol Deshidrogenasa
MEG/EG	Monoetilenglicol
MeOH/meoh	Metanol
NAD^+/nad	Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidada
NADH/nadh	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducida
$NADP^+$	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducida
NH4	Ion Amonio.
O2	Oxígeno dimolecular
P1PDP	Ruta dependiente de pentosas 1-fosfato
PEP/pep	Fosfoenol piruvato
PET	Polietilentereftaláto
PGCD	3-Fosfo glicerato deshidrogenasa
pi	Grupo fosfato
Pyr	Piruvato
R5P/r5p	Ribosa 5-fosfato
Ru1P	D-Ribulosa 1-fosfato
Ru5P/ru5p	D-Ribulosa 5-fosfato
RuALD	Ribulosa 1-fosfato aldolasa
RuPT	Ribulosa 5-fosfato mutasa
s7p	Sedoheptulosa 7-fosfato

Abreviatura	Término
SDC	Serina descarboxilasa
SDP	Ruta dependiente de Serina
SPAMT	Serina-Piruvato Transaminasa
Xu1P	Xilulosa 1-fosfato
Xu5P	Xilulosa 5-fosfato
XuALD	Xilulosa 1-fosfato aldolasa
XuPT	Xilulosa 5-fosfato mutasa

Introducción

La industria química ha sido uno de los pilares de desarrollo del mundo moderno y gracias a esta tenemos a nuestra disposición una diversidad de productos y servicios que han mejorado nuestra calidad de vida. Sin embargo, el acelerado crecimiento económico e industrial ha dado lugar a la implementación de procesos poco sostenibles que han dejado un gran impacto ambiental persistente hasta nuestros días [1]. Es por esto por lo que hoy en día hay un especial interés en el estudio, diseño, desarrollo e implementación de nuevos procesos que puedan ser realizados de manera tal que permitan satisfacer las necesidades del mundo actual a nivel económico y social, sin comprometer el medio ambiente de forma negativa para las futuras generaciones. A esto se le conoce como sostenibilidad o procesos sostenibles [2], [3].

A partir del concepto de sostenibilidad, surgen los conceptos de economía circular, el cual sugiere el máximo aprovechamiento de los recursos, productos y materiales manteniéndolos durante el mayor tiempo posible en la economía [4]–[6]; y la bioeconomía, la cual involucra el uso de recursos biológicos renovables y de residuos para la generación de productos, procesos y servicios en todos los sectores de comercio e industria [7]. Esta última busca hacer una transición de una economía sostenida por combustibles fósiles a una economía fundamentada en el aprovechamiento de recursos renovables de origen biológico, reduciendo así la dependencia en los recursos fósiles y apostando a una economía más responsable con el medio ambiente [7]–[9]. Bajo este esquema nace el concepto de biorrefinería que, al igual que una refinería de petróleo, busca transformar materia prima, principalmente de origen biológico, en productos de valor agregado a través de procesos biotecnológicos [10], [11].

Como materias primas a utilizar en procesos biotecnológicos se destacan materias de origen lignocelulósico (lignina, celulosa, hemicelulosa), residuos orgánicos (ácidos grasos y glicerol), entre otros. Estos últimos presentan un gran potencial para su uso en la generación de productos con valor agregado y, debido a que su disposición en el ambiente

puede causar un impacto considerable, aprovechar estos compuestos resultaría en una oportunidad para disminuir la carga ambiental que implican [12].

El glicerol puede obtenerse como subproducto de la producción de biodiesel y normalmente está presente dentro de una mezcla de compuestos orgánicos resultantes de este proceso, entre ellos el metanol. Esta mezcla se conoce como glicerol crudo y se estima que, por cada 9 kg de biodiesel producido a partir de aceite vegetal, se genera 1 kg de glicerol crudo como subproducto [12], [13]. La composición del glicerol crudo cambia considerablemente dependiendo del proceso de producción de biodiesel (Tabla 1-1) [14]. Este factor resulta de mucha importancia ya que el aprovechamiento de este subproducto implica que las condiciones del proceso y los procesos de pretratamiento deben ajustarse a esta composición.

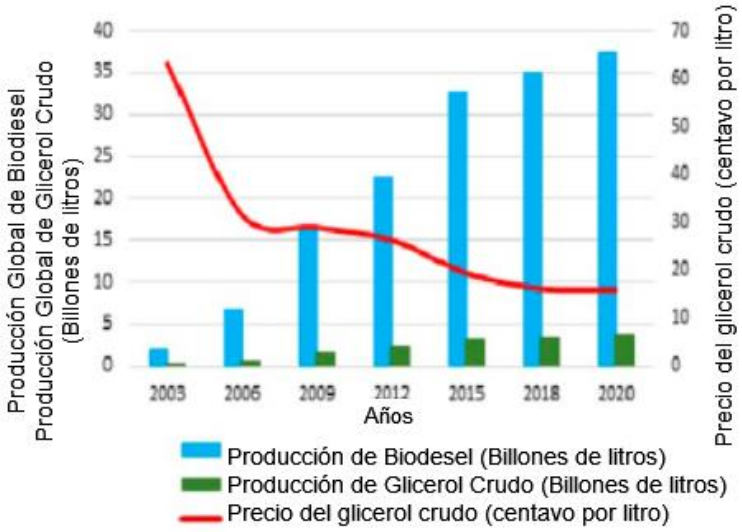
Tabla 1-1: Composición del glicerol crudo en diferentes muestras de la industria colombiana.

Componentes (%)	**Planta piloto**	**Planta industrial 1**	**Planta industrial 2**	**Planta industrial 3**
Glicerol	41.23	85.81	73.49	49.33
Agua	2.76	6.64	0.46	38.20
Metanol	20.79	-	23.61	4.41
Jabones	6.81	2.67	1.44	-
Cenizas	4.33	4.32	2.54	2.62
Otros compuestos orgánicos	24.08	0.56	0	5.44

Tomado de [14].

Debido al incremento de la producción de biodiesel en el mundo, se espera que la cantidad de glicerol crudo disponible aumente llegando incluso a sobrepasar su demanda, lo que ya está provocando una desvalorización de este en el tiempo [15]. El precio más reciente encontrado para el glicerol crudo es de 150 dólares por tonelada para el año 2019 [16].

Figura 1: Producción global de biodiesel y precio del glicerol crudo desde el 2003 al 2020.



Adaptado de [15].

Debido al bajo valor comercial que posee el glicerol crudo y a la creciente producción esperada de biodiesel a nivel tanto nacional como internacional, existe un gran interés en aprovechar el exceso de glicerol crudo y evitar así una mayor depreciación [12], [17], [18]. Debido a esto se han realizado diversos estudios para proponer alternativas para el uso de glicerol en productos con valor agregado [19]. Desde un punto de vista de procesos biotecnológicos, la mezcla de glicerol y metanol contenida en el glicerol crudo puede ser utilizada como una fuente de carbono y de electrones para la producción de biomasa y productos de valor agregado tales como el 1,3 propanodiol, alfa-ceto ácidos, etilenglicol, entre otros [20].

Para la presente tesis de maestría, se seleccionó el etilenglicol como producto de interés ya que este trabajo se viene realizando dentro del marco de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Ciencias que busca proponer una estrategia de economía circular para el reciclaje, degradación y síntesis bioquímica de Polietilentereftalato (PET). Debido a que durante el proceso de degradación bioquímica del PET se da la presencia de crecimiento microbiano para producir los monómeros constituyentes, se cree que parte del etilenglicol liberado del rompimiento del enlace éster del polímero es consumido para soportar el crecimiento microbiano. Por lo anterior, se hace necesario encontrar una alternativa para regenerar el etilenglicol consumido para su posterior uso en la producción

de PET reciclado. Para ello, se propone la producción de etilenglicol a través de un proceso biotecnológico utilizando glicerol crudo como sustrato, de manera que el proceso de reciclaje de PET cierre aún más su ciclo y se ajuste más a un modelo de economía circular.

El etilenglicol es un compuesto orgánico formado por una cadena sencilla de dos hidrocarbonos que tienen asociado cada uno un grupo hidroxilo (-OH), lo que lo convierte en el diol más simple. Se caracteriza por ser incoloro, inodoro, relativamente no volátil, con una viscosidad baja [21]. Este es ampliamente utilizado en la industria y entre sus principales aplicaciones se encuentran la producción de agentes anticongelantes y plásticos a base PET. Esto hace que la demanda de etilenglicol en el mundo sea de alrededor de 15 millones de toneladas al año con un valor cercano a los 20 billones de dólares [22].

Actualmente, la producción de etilenglicol se da principalmente a través de síntesis química utilizando materia prima derivada del petróleo. Sin embargo, debido a la creciente demanda de este producto en el mundo y a la necesidad de apuntar a nuevas tecnologías sostenibles, se han realizado nuevos avances para buscar alternativas para su producción [22]–[32]. Una de las primeras alternativas fue la conversión catalítica de materias primas derivadas de material lignocelulósico como glucosa, xilitol, entre otros, a etilenglicol y otros polioles [30]–[32]. Esto abrió la posibilidad de producir materiales plásticos derivados de materia prima biológica como el Bio-PET [33].

En el presente proyecto de maestría se busca desarrollar una propuesta *in silico* para la bioconversión de etilenglicol a partir de glicerol crudo. Esto se realiza a través de un diseño racional del bioproceso que incluye una evaluación de la factibilidad termodinámica, la reconstrucción de una ruta metabólica que dé cuenta de la producción de etilenglicol y su implementación en un modelo metabólico chasís. Mediante herramientas de ingeniería metabólica se podrán estimar las condiciones para lograr acercar la distribución de flujos metabólicos y rendimientos a los máximos teóricos establecidos por la termodinámica, así como la identificación de objetivos de mejoramiento metabólico. El modelamiento y simulación de las diferentes redes metabólicas darán cuenta de los escenarios más factibles a nivel del microorganismo (biocatalizador) para su producción.

1. Marco teórico

1.1 Antecedentes

1.1.1 Diseño racional de bioprocesos

El desarrollo tecnológico de los bioprocesos ha pasado a lo largo de su historia desde un enfoque empírico y experimental, en el cual había un conocimiento limitado de la compleja fisiología microbiana y existía una falta de modelos que describieran el comportamiento de las células, hasta un enfoque más teórico y sistemático gracias a la implementación de tecnologías de ingeniería genética y biología de sistemas [34], [35]. Estos avances han permitido la construcción de modelos matemáticos y la realización de simulaciones computacionales que permiten un mayor entendimiento del funcionamiento y la estructura de los seres vivos, logrando así abrir un amplio campo de posibilidades para la obtención de productos de interés en la industria a través de los bioprocesos [36]. Adicionalmente, es importante reconocer que el desarrollo de bioprocesos ha venido acompañado no solo por un mayor entendimiento de las funciones celulares, sino también por el avance a nivel del proceso y de la reacción [35]. Estos avances en conjunto permiten orientar el diseño y desarrollo de los bioprocesos usando un enfoque más racional sin dejar necesariamente de lado el enfoque experimental.

El diseño racional de bioprocesos se centra en la maximización de la producción de determinado metabolito deseado a través de diversas estrategias como el análisis termodinámico para establecer el rendimiento máximo teórico, y la capacidad de realizar modificaciones dentro del metabolismo a través de herramientas ómicas (Genómica, Transcriptómica, Metabolómica, entre otros) buscando acercar los resultados a la producción máxima teórica establecida [37], [38]. Otras herramientas experimentales como evolución dirigida de enzimas y herramientas computacionales para el diseño de redes

metabólicas también son utilizadas para estudiar y establecer las condiciones para alcanzar dicha producción [38].

Uno de los enfoques mayormente utilizados es el modelamiento basado en restricciones (Constraint-based Modeling, CBM), el cual proporciona un marco de trabajo para la generación de hipótesis y la evaluación de funciones celulares. El enfoque CBM se basa en implementar un conjunto de restricciones fisicoquímicas y biológicas derivadas de consideraciones fenomenológicas, con el fin de limitar las funciones y el comportamiento de las redes celulares. Las restricciones pueden ser de tipo [38]:

- Fisicoquímicas: Balances de materia y energía.
- Termodinámicas: Direccionalidad, fuerza impulsora y factibilidad-
- Topobiológicas: Distribución molecular, complejos enzimáticos, entre otras.
- Ambientales: Disponibilidad de nutrientes, pH del medio, entre otras.
- Regulatorias: Inhibición enzimática, expresión de genes, entre otras.

Al definir estas restricciones y un modelo matemático, se realiza un proceso iterativo en el que se logra la reconstrucción de las redes celulares seguido de la aplicación de otras restricciones biológicas para la definición de las funciones celulares deseadas [38].

Una vez logrados los objetivos a nivel celular, el siguiente paso es diseñar un entorno de reacción en el cual el proceso pueda ser llevado a cabo. Esta fase requiere de un conocimiento interdisciplinario que permita establecer las condiciones en las que el proceso deba realizarse para lograr los objetivos de producción deseados. Esta evaluación incluye aspectos técnicos, económicos y ambientales que deben ser satisfechos antes de que el proceso pueda ser implementado comercialmente [35], [39].

1.1.2 Análisis termodinámico y estimación de parámetros para el modelo de caja negra

El diseño de un proceso biológico se basa en el conocimiento de sus componentes y su relación estequiométrica. Debido a que la estequiometria de un proceso biológico depende de la velocidad especifica de crecimiento de la biomasa, es necesario establecer una

relación entre estas variables a través de un modelo de caja negra (*Black-box model*). Este modelo sólo utiliza los flujos de entrada y salida de los microorganismos los cuales son acoplados a través de un modelo general del microorganismo en estado estacionario sin profundizar en el metabolismo celular. Así, se disminuye considerablemente los grados de libertad del modelo, el cual viene determinado simplemente por balances elementales, de carga y de electrones [37].

La construcción de este modelo se puede realizar a partir de un análisis termodinámico, el cual se enfoca en estudiar las reacciones globales del catabolismo y del anabolismo para poder establecer los parámetros de la ecuación de Herbert-Pirt, la cual permite establecer la relación estequiométrica de cada componente en el proceso (Ecuación (1.1)) [14], [37].

$$q_s = a_S\mu + b_S q_p + m_S \tag{1.1}$$

Cada parámetro de la ecuación de Herbert-Pirt representa un proceso metabólico en el que se da el consumo del sustrato. Cada uno de estos parámetros pueden ser estimados a partir de datos experimentales o a partir de correlaciones obtenidas a través de análisis termodinámicos y la literatura.

Cuando se parte de un análisis termodinámico para la obtención de estos parámetros, este inicia con la definición de la reacción catabólica del proceso. En esta reacción, el sustrato pasa a través de una serie de reacciones de oxido-reducción que van extrayendo energía y electrones del sustrato hasta que este se encuentre lo más oxidado posible. La energía y los electrones extraídos son almacenados en moléculas energéticas como el ATP (Adenosín trifosfato) y en cofactores reductores como el NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido).

Dentro del modelo de caja negra se puede representar el catabolismo de forma simplificada considerando una estequiometría de reacción que represente estos procesos de oxido-reducción por mol de sustrato.

$$-1\, S_{red} + \, n_{A_o}\, A_{ox} + \cdots + n_{s_o} S_{ox} \, + \, n_{A_r} A_{red} = 0 \tag{1.2}$$

Donde S_{red} y S_{ox} representa al sustrato en su estado reducido y oxidado respectivamente, A_{red} y A_{ox} representan al aceptor de electrones en su estado reducido y oxidado respectivamente, y n_i representa los coeficientes estequiométricos que acompañan a cada componente de la reacción. Estos coeficientes son positivos y negativos para los productos y reactivos de la reacción, respectivamente. A partir de estos coeficientes estequiométricos y de la energía libre de formación de cada uno de los componentes que participan del proceso catabólico, se puede calcular la cantidad de energía libre de Gibbs disponible por mol de sustrato $\Delta_{cat}G$ (Ecuación (1.3)).

$$\Delta_{cat}G = -\sum_{i} n_i \, \Delta_f G_i \tag{1.3}$$

Donde $\Delta_f G_i$ es la energía libre de formación para el componente i. Una vez definida la reacción catabólica y la energía libre de Gibbs disponible, se puede obtener el valor para cada parámetro en la ecuación (1.1) como sigue.

- **Parámetro $\boldsymbol{a}$**: Representa la cantidad de sustrato utilizada para el crecimiento celular (Anabolismo celular). También se le entiende como el recíproco del rendimiento obtenido de biomasa por moles o masa de sustrato. Desde el punto de vista del modelo caja negra, los procesos anabólicos para la producción de biomasa pueden ser representados mediante una estequiometría de reacción que relaciona la cantidad de sustrato y otros componentes requeridos para la producción de 1 C-mol de biomasa. De esta manera, simplificamos una gran cantidad de procesos celulares en una única expresión.

$$a_S^{ana} S + a_N^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\, X + a_C^{ana} CO_2 + a_W^{ana} H_2O = 0 \tag{1.4}$$

Donde a_i^{ana} es el coeficiente estequiométrico para el componente *i* en la producción de biomasa. Para el sustrato S, podemos obtener su coeficiente estequiométrico como (Ecuación (1.5)):

$$a_S^{ana} = \frac{\gamma_X}{\gamma_S} \tag{1.5}$$

Donde γ_X y γ_S son el grado de reducción de la biomasa y del sustrato, respectivamente. El coeficiente estequiométrico de los otros componentes que participan en la producción de biomasa se puede calcular a partir de balances elementales y de carga.

Debido a que la producción de biomasa es un proceso no espontáneo, es necesario la adición de energía libre para que este pueda ser llevado a cabo. Sin embargo, la cantidad de energía requerida no puede ser calculada directamente y por lo tanto es necesario el uso de datos experimentales y correlaciones empíricas. Heijnen en 1999 presentó una simple correlación que proporciona el cálculo de la energía libre de Gibbs necesaria para la producción de 1 C-mol de biomasa en crecimiento heterotrófico en función del sustrato utilizado [40].

$$\Delta_X G = \sum_i a_i^{ana} \Delta_f G_i \approx a_G \tag{1.6}$$

$$a_G = 200 + 18(6 - c_S)^{1.8} + \exp\left[\left(\left(3.8 - \frac{\gamma_S}{c_S}\right)^2\right)^{0.16} (3.6 + 0.4c_S)\right] \tag{1.7}$$

Donde c_S es el número de átomos de carbono presente en el sustrato *S*. Una vez determinada la demanda energética para la producción de biomasa, la cantidad de sustrato requerida en el catabolismo para suplir esta demanda se puede definir como:

$$a_S^{cat} = \frac{a_G}{\Delta_{cat} G} \tag{1.8}$$

Finalmente, el valor del parámetro a se puede escribir como:

$$|a_S| = a_S^{cat} + a_S^{ana} = \frac{a_G}{\Delta_{cat} G} + \frac{\gamma_X}{\gamma_S} \tag{1.9}$$

Esté parámetro incluye tanto la cantidad de sustrato utilizada en el anabolismo para la formación de nueva biomasa como la cantidad utilizada en el catabolismo para extraer la energía necesaria para dar lugar a dicha biomasa [37].

- **Parámetro *b***: El parámetro *b* representa la cantidad de sustrato utilizada en la formación de productos no catabólicos. Estos productos son aquellos que no se obtienen directamente del catabolismo, sino que parten de otras rutas alternas. La formación de alguno de estos productos puede llegar a requerir energía adicional y por lo tanto se requerirá que una parte del sustrato consumido sea utilizado en el catabolismo para proveer la energía necesaria.

Para evaluar si la formación del producto no catabólico requiere energía adicional, se calcula inicialmente la energía libre de la reacción de conversión de sustrato a un mol de producto utilizando como coeficiente estequiométrico del sustrato b_S^{ana}.

$$-b_S^{ana}S + b_N^{ana}N_{fuente} + \cdots + 1\,Producto + b_C^{ana}CO_2 + b_W^{ana}H_2O = 0 \qquad (1.10)$$

$$b_S^{ana} = \frac{\gamma_P}{\gamma_S} \qquad (1.11)$$

Donde γ_P es el grado de reducción del producto no catabólico *P*. El resto de los coeficientes estequiométricos se calculan mediante balances elementales y de carga. A partir de la estequiometría calculada, podemos determinar el valor teórico de la energía libre de Gibbs para la reacción ($\Delta_R G_{theor}$) como:

$$\Delta_R G_{theor} = \sum_i b_i^{ana} \Delta_f G_i \qquad (1.12)$$

Donde b_i^{ana} es el coeficiente estequiométrico del componente i en la reacción anabólica. Dependiendo del valor teórico de la energía libre de Gibbs para la reacción de producto se pueden tener las siguientes situaciones:

- Si $\Delta_R G_{theor} \ll 0$, entonces la síntesis de producto anabólico puede liberar suficiente energía libre y ocurrir de forma espontánea. Por lo tanto, no se requiere del catabolismo del sustrato y el parámetro *b* puede definirse como:

$$b_S = b_S^{ana} = \frac{\gamma_P}{\gamma_S} \tag{1.13}$$

- En el caso contrario en que $\Delta_R G_{theor} > 0$, la síntesis de producto no catabólico requiere energía adicional y por lo tanto se debe destinar una cierta cantidad adicional de sustrato al catabolismo. Esta cantidad de sustrato a ser utilizada en el catabolismo se determina mediante la siguiente expresión:

$$b_S^{cat} = \frac{\Delta_R G_{theor}}{\Delta_{cat} G * \eta} \tag{1.14}$$

  Donde η representa la eficiencia de uso de la energía catabólica liberada en la síntesis del producto no catabólico. Esta posee un valor aproximado de 0.50. Esta energía biológica útil debe al menos cubrir la energía libre requerida.

Finalmente, es necesario considerar la fuerza impulsora termodinámica (TDF) que se requiere para la formación del producto. Esta representa la cantidad de energía disipada necesaria para sobrepasar las barreras energéticas que se encuentran en cada reacción de las rutas metabólicas involucradas. Se puede realizar estimaciones de esta energía requerida mediante la siguiente expresión:

$$TDF = 10 * c_p \tag{1.15}$$

Donde c_p es el número de átomos de carbono del producto no catabólico *P*. La cantidad de sustrato *S* destinado al catabolismo para la generación de esta fuerza impulsora se calcula como:

$$b_S^{TDF} = \frac{TDF}{\Delta_{cat}G * \eta} \tag{1.16}$$

Una vez determinadas todas las contribuciones necesarias para la generación del producto no catabólico, el parámetro b_S se puede definir como:

$$b_S = b_S^{cat} + b_S^{ana} + b_S^{TDF} = \frac{\Delta_R G_{theor}}{\Delta_{cat}G * \eta} + \frac{\gamma_P}{\gamma_S} + \frac{TDF}{\Delta_{cat}G * \eta} \tag{1.17}$$

Posteriormente, se puede definir la estequiometría de la síntesis de un mol de producto no catabólico mediante balances elementales y de carga.

$$-b\,S + b_N N_{fuente} + \cdots + 1\,Producto + b_C CO_2 + b_W H_2O = 0 \tag{1.18}$$

- **Parámetro m_S**: Este parámetro representa la cantidad de sustrato requerida para el mantenimiento celular. Usualmente esta cantidad de sustrato es utilizada en el catabolismo y la energía liberada ayuda a mantener las condiciones internas de las células y la estabilidad de todos sus componentes.

  Tijhuis y colaboradores propusieron una correlación que proporciona la cantidad de energía libre requerida para el mantenimiento celular de una C-mol de biomasa. Esta correlación depende únicamente de la temperatura del entorno y es aplicable para una amplia variedad de organismos (Ecuación (1.19)) [41].

$$m_G = 4.5 \exp\left(-\frac{69000}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298}\right)\right) \tag{1.19}$$

  Donde R es la constante de los gases ideales ($8.314 \times 10^{-3}\ kJ/mol \cdot K$) y T es la temperatura absoluta en Kelvin. Finalmente, la cantidad de sustrato requerida para llevar a cabo los procesos de mantenimiento celular se puede calcular considerando nuevamente la energía libre de Gibbs obtenida del catabolismo del sustrato.

$$m_S = \frac{m_G}{\Delta_{cat}G} \tag{1.20}$$

Una vez calculados los parámetros anteriores y habiendo definido la ecuación de Herbert-Pirt, es posible establecer la estequiometria total del proceso. Para el caso de un proceso aeróbico se puede obtener la siguiente estequiometría:

$$\left(\frac{q_S}{q_P}\right)S + \left(\frac{q_N}{q_P}\right)N_{fuente} + \left(\frac{q_H}{q_P}\right)H^+ + \left(\frac{q_O}{q_P}\right)O_2 + \left(\frac{q_C}{q_P}\right)CO_2 + \left(\frac{q_W}{q_P}\right)H_2O + \left(\frac{\mu}{q_P}\right)X + Producto \tag{1.21}$$

Si bien esta metodología permite obtener un modelo de caja negra que representa las condiciones del proceso, esta sólo se enfoca en el uso de una única fuente de carbono. Por lo tanto, su uso se encuentra menos generalizado debido a que no permite describir los procesos que involucran múltiples fuentes de carbono, lo cual es algo común en la naturaleza [42], [43].

Debido a que el propósito del presente proyecto es el uso de las principales fuentes de carbono provenientes del glicerol crudo (glicerol y metanol), se hace necesario la búsqueda y planteamiento de una metodología más generalizada que permita el estudio de procesos microbiológicos con múltiples fuentes de carbono.

Diversos autores han estudiado procesos de crecimiento celular con múltiples sustratos llevados a cabo en procesos en continuo e intermitentes y han planteado estrategias que permiten modelar el comportamiento de estos procesos [44]–[47]. Sin embargo, es necesario hacer una revisión más exhaustiva y proponer nuevos mecanismos que permitan representar estos procesos de manera más adecuada y así brindar una metodología más generalizada.

1.1.3 Crecimiento microbiano en múltiples sustratos

Existe una gran cantidad de artículos publicados referentes al crecimiento microbiano con múltiples sustratos para diferentes microorganismos [42]–[55]. Cada uno de estos abarca diferentes enfoques que buscan explicar los patrones de consumo de diferentes conjuntos

de sustratos y como estos afectan el rendimiento final en la producción de biomasa. Estos aspectos resultan de gran importancia debido a que es necesario determinar cómo estos sustratos son distribuidos en los diferentes procesos metabólicos como la generación de energía, la formación de biomasa, entre otros. Al igual que en los procesos con un único sustrato, los procesos con múltiples sustratos deben estar sujetos al máximo aprovechamiento de la energía liberada por el catabolismo y a la maximización del rendimiento de la biomasa generada por cantidad de sustratos consumidos. Por lo que una revisión del estado del arte nos permitirá determinar aquellas características relevantes que afectan estos procesos biológicos al presentarse un consumo de varios sustratos, y establecer estrategias que nos permitan modelar estos procesos desde un punto de vista termodinámico.

El estudio del crecimiento microbiano con múltiples sustratos se remonta a aproximadamente 1940, cuando Jacques Monod investigó el crecimiento de un microorganismo utilizando dos azucares en un medio discontinuo. En su trabajo, Monod encontró que los sustratos eran consumidos secuencialmente y la curva de crecimiento de biomasa presentaba dos fases de crecimiento. A este comportamiento lo denominó crecimiento diaúxico [47]. Posteriormente, otros autores realizaron diversos estudios para comprender más la naturaleza del consumo de múltiples sustratos en el crecimiento microbiano. Muchos de estos estudios fueron recopilados por Harder y Dijkhuizen en 1982, quienes también ofrecieron su propio análisis frente a los mismos y explicaban cómo la combinación de ciertos sustratos daba lugar a patrones de crecimiento secuencial y crecimiento simultáneo [47]. Esto resulta de gran importancia, ya que permite plantear hipótesis acerca del por qué se dan estos comportamientos y se buscaría plantear mecanismos desde un punto de vista cinético o termodinámico que representen estos resultados.

Otros estudios como el presentado por Babel y Müller en 1984 se interesaban más en los aspectos bioquímicos y energéticos de cada sustrato dentro del metabolismo. En su trabajo, proponen clasificar los sustratos como energéticamente deficientes o energéticamente en exceso de acuerdo con la cantidad de intermediarios energéticos obtenidos (ATP, NADH, NADPH, etc) en el metabolismo hasta llegar a un intermediario

central. Debido a que la cantidad de intermediarios obtenidos varía según la ruta metabólica utilizada para el consumo de cada sustrato, la clasificación de estos no resulta única [50]. Por otra parte, Gommers y colaboradores en 1987 proponen una clasificación diferente de acuerdo con el calor de combustión, el grado de reducción, y la proporción de cada sustrato consumido. Esto permite clasificar cada sustrato como limitados energéticamente o limitados en el contenido de carbono. Estas clasificaciones llevaron a los autores a proponer cuáles son las combinaciones de sustrato que, dependiendo de la naturaleza de cada uno y a la proporción en los que estos se encuentran, permitieran un mayor rendimiento en la producción de biomasa. Además, se observa cómo la presencia de un sustrato afecta la distribución del otro en los procesos anabólico y catabólico debido a que este podría resultar más conveniente en uno de estos procesos, disminuyendo así el flujo de carbono proveniente del otro sustrato a dicho proceso. Esto resulta de gran importancia, ya que permite proponer combinaciones de sustratos que maximicen la productividad del proceso de interés de acuerdo con las características de los mismos [51]. Sin embargo, es necesario ampliar el análisis de estas clasificaciones y comportamientos a un enfoque termodinámico que permita comprender qué características de estos sustratos, tales como su grado de reducción, número de carbonos, energía libre disponible, entre otros, son las que dan lugar a estas clasificaciones.

Investigadores como Thomas Egli (1993) y Atul Narang (1997) en sus respectivos estudios trataron de establecer metodologías para representar la cinética del crecimiento microbiano en múltiples sustratos. Egli y colaboradores en 1993 construyeron una metodología basada en modelos ya establecidos para el crecimiento microbiano para un solo sustrato y propusieron una forma de evaluar el efecto de la concentración de cada sustrato en el crecimiento celular y la concentración residual de cada sustrato [46]. Más adelante, a partir de 1997, Narang y colaboradores proponen una serie de modelos más elaborados en el que explican la cinética de crecimiento microbiano y consumo de sustratos tanto en reactores discontinuos como continuos. Estos modelos consideran aspectos fisiológicos claves como la actividad de las enzimas encargadas del consumo de cada sustrato, su metabolismo hasta intermediarios claves y la posterior producción de biomasa. Lo anterior le permitió a Narang explicar varios de los fenómenos encontrados en procesos con múltiples sustratos como el crecimiento diaúxico, la transición desde el consumo simultáneo de dos sustratos hasta el consumo preferencial de uno de ellos al cambiar la tasa de dilución, entre otros [43], [48].

En un estudio reciente realizado por Wang y colaboradores en 2019, se explica cómo el consumo de múltiples sustratos de forma secuencial o simultánea puede ser entendido desde las características topológicas del metabolismo y cómo los microorganismos seleccionan la mejor estrategia para el consumo de estos sustratos. Estas características topológicas vienen determinadas por los principales intermediarios en los que convergen los flujos metabólicos de cada sustrato, y por aquellos precursores que sirven para la generación de biomasa. Adicionalmente, los autores construyen un método que permite realizar predicciones acerca de los patrones de consumo de diferentes mezclas de sustratos y cómo esto se ve reflejado en diversos precursores del metabolismo [55]. Si bien este estudio proporciona algunas ideas en cuanto a cómo se puede distribuir cada sustrato en el metabolismo y cuál combinación de sustratos permite obtener determinado patrón de consumo, resulta limitado a la hora de comprender desde un punto de vista termodinámico las razones que dan lugar a estos comportamientos y cómo estos están relacionados con la naturaleza de cada sustrato y las condiciones del proceso.

Los anteriores estudios abarcan diferentes enfoques que van desde aspectos bioquímicos hasta cinéticos, con el fin de explicar los fenómenos encontrados en el crecimiento microbiano con múltiples sustratos. Si bien estos enfoques bioquímicos y cinéticos permiten entender la naturaleza de estos fenómenos a raíz de los estudios ya mencionados, pueden resultar limitados a la hora de entender desde un punto de vista físico las causas que los manifiestan. Esto debido a que todos los procesos de la naturaleza, incluidos los procesos biológicos con múltiples sustratos, se encuentran regidos por las leyes de la termodinámica. Estas leyes determinan la dirección y el alcance de estos procesos, y son las que proporcionarán los escenarios factibles que se pueden lograr, a diferencia de los enfoques previamente presentados. Por esta razón, se plantea que un enfoque termodinámico permitiría superar estas limitaciones y obtener una mayor visión de este tipo procesos, ya que al considerar los microorganismos como sistemas abiertos que intercambian materia y energía con el ambiente y que optimizan su metabolismo para convertir energía química proveniente de los sustratos en energía útil para maximizar la formación de biomasa, se podría comprender las razones que llevan a las diferentes distribuciones de los sustratos en los procesos celulares.

Este enfoque termodinámico permitirá no solamente tener una mejor comprensión de los procesos celulares que ocurren cuando hay presencia de múltiples sustratos, sino que también permitirá el diseño de bioprocesos más versátiles que permitirán el aprovechamiento de estos múltiples sustratos en la generación de productos de valor agregado. Es así como en este trabajo se presenta una metodología centrada en la construcción de un modelo de caja negra para un bioproceso con múltiples sustratos. Esta metodología parte del método propuesto por el Dr. J. J. Heijnen con la diferencia en que se proponen nuevos parámetros para dar cuenta de la influencia que tiene la presencia de varios sustratos en diferentes procesos.

1.1.4 Fermentación aerobia.

Varios estudios han evidenciado cómo los microorganismos pueden presentar un cambio en características tales como su velocidad de crecimiento, expresiones genéticas, metabolismo, entre otros, debido a la influencia de las condiciones intracelulares y extracelulares [56]–[60]. Un ejemplo de esto es el cambio de un metabolismo respiratorio a uno completamente fermentativo. Se ha encontrado que esta situación ocurre al exceder determinada velocidad de consumo de glucosa, lo que provoca una redistribución en los flujos metabólicos hacia la producción de etanol y una disminución en el consumo de oxígeno [56].

Se han propuesto diversas teorías que buscan explicar este fenómeno. Una de ellas propone que un alto consumo de glucosa provoca una saturación de las enzimas utilizadas en el metabolismo respiratorio, lo que conlleva a una redistribución de los flujos metabólicos de forma tal que permita mantener el estado homeostático en la célula [57], [58]. Otros estudios proponen la existencia de un límite en la velocidad de disipación de la energía libre de Gibbs dentro de la célula, en donde el metabolismo se establece de forma que la energía disipada por procesos irreversibles no llegue a ser letal para la célula [59], [60].

Estos estudios pueden resultar de utilidad para llevar a cabo muchos procesos biotecnológicos, ya que se pueden realizar diversas modificaciones al metabolismo de un microorganismo de manera tal que se obtenga una distribución de flujos metabólicos

deseada al momento de llegar al límite de la velocidad de la disipación de la energía libre de Gibbs para dicho organismo.

1.1.5 Ingeniería Metabólica: Principios y Generalidades

El entendimiento y la visualización de las redes metabólicas se ha convertido en un aspecto importante para la biología de sistemas y los procesos biológicos gracias a la obtención de información y generación de conocimiento acerca de los seres vivos. La disponibilidad de una red que permita describir un aspecto particular de un sistema biológico ya sea a nivel metabólico o transcripcional, nos permite entender el funcionamiento del sistema y proponer nuevas estrategias de interés comercial para el mejoramiento de los procesos biológicos [61]. La ingeniería metabólica tiene como fin modular el metabolismo de los microorganismos con el fin de producir la cantidad deseada del metabolito de interés a través de manipulaciones genéticas [62]. Esta utiliza los métodos de la ingeniería para el diseño y análisis de rutas metabólicas con el fin de lograr un objetivo particular. Este objetivo puede ser el incrementar la productividad del proceso o extender la capacidad metabólica del microrganismo añadiendo y eliminando genes específicamente [63].

Para una apropiada aplicación de la ingeniería metabólica se requiere un amplio conocimiento de la ruta metabólica del producto de interés, los genes que codifican las enzimas involucradas, la regulación de dichas enzimas, con la posibilidad de transferir, expresar o suprimir dichos genes en el microorganismo hospedero, realizar mutaciones y construir un vector de genes para ser expresados en el microorganismo hospedero [62]. Microorganismos como bacterias (*Escherichia coli*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) son los más utilizados como microorganismos hospederos en muchas aplicaciones de la ingeniería metabólica. Sin embargo, otros organismos como hongos, células animales y de plantas han ganado importancia en la aplicación de la ingeniería metabólica [62], [64].

Algunas de las estrategias mayormente utilizadas para el uso de la ingeniería metabólica son [62]:

- Aumentar la expresión del gen que codifica la enzima limitante de la velocidad de la ruta biosintética del producto de interés.
- Inhibir aquellas reacciones metabólicas que compiten con la ruta biosintética principal por el substrato o metabolito de interés, y que no resulten esenciales para la viabilidad del microorganismo.
- Expresión de genes heterólogos en el organismo de interés.
- Aplicación de ingeniería de enzimas para la formación de enzimas que no se encuentran naturalmente.

La aplicación de la ingeniería metabólica inicia con la definición de la red metabólica que representa el conjunto de reacciones que se dan en el metabolismo. La reconstrucción de la red metabólica es realizada a partir de información del genoma del organismo y todas las reacciones metabólicas de interés en el microorganismo deben estar incorporadas en la red reconstruida. La información de cada reacción puede ser recolectada de distintas bases de datos (KEGG, BRENDA, UniProt, BioCyC) a través de sus genes asociados, números EC, y términos GO (ontología genética por sus siglas en inglés) [65]–[67]. Adicionalmente, es necesario verificar que las reacciones metabólicas de interés se encuentren presentes en el microorganismo sobre el cuál se está trabajando. Esta información se puede verificar en la literatura y en estudios experimentales. Otros datos fisiológicos como la concentración de metabolitos secretados o la velocidad de consumo de sustrato y oxígeno son también de utilidad [61].

Una vez reconstruida y curada la red metabólica, esta debe ser expresada dentro de un modelo matemático para realizar simulaciones computacionales. El modelamiento basado en restricciones es el más utilizado para representar las redes metabólicas de forma matemática [38], [61]. A través de la formulación de balances de conservación de masa para cada metabolito y una suposición de pseudo-estado estacionario, se puede plantear un sistema de ecuaciones lineales que pueden ser expresadas de forma matricial (Ecuación (1.22)). Este sistema contiene una matriz estequiométrica, $\boldsymbol{N}$, de dimensión *m* por *n*, un vector, $\boldsymbol{r}$, que representa la acumulación neta de cada metabolito y un vector de flujos metabólicos, $\boldsymbol{v}$ [61], [63], [68].

$$\boldsymbol{r} = \frac{d\boldsymbol{S}}{dt} = \boldsymbol{N}\boldsymbol{v} = 0 \tag{1.22}$$

Normalmente, el sistema de ecuaciones resultante se encuentra indeterminado (*m*>*n*). Sin embargo, es posible realizar simplificaciones dentro de la red metabólica para disminuir los grados de libertad del sistema, o utilizar información experimental de los flujos internos y externos para completar la información necesaria para hallar una solución [63], [68].

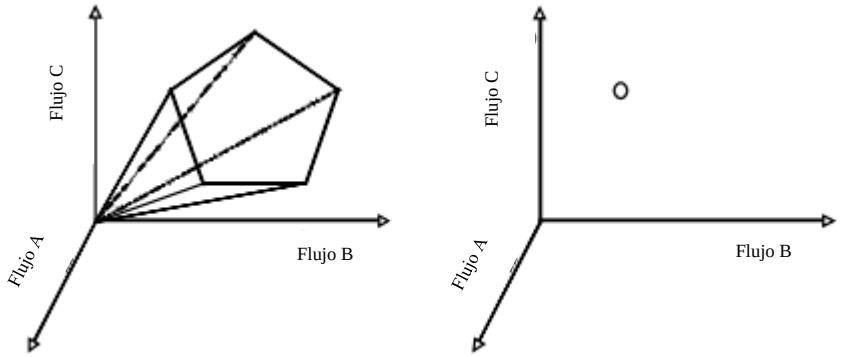
Una vez planteado el modelo matemático de la red metabólica, es posible realizar análisis matemáticos para determinar el comportamiento de la red metabólica dentro del organismo. Uno de los métodos más utilizados es el análisis de balance de flujos (FBA por sus siglas en ingles), el cual, mediante un conjunto de restricciones impuestas dentro del modelo matemático, busca determinar la distribución de los flujos metabólicos intracelulares a través de la optimización de una función objetivo (Ecuación (1.23)). Estas funciones objetivo pueden incluir la maximización de la producción de ATP, la minimización del consumo de nutrientes, la maximización del rendimiento de un producto deseado, la maximización de la velocidad de crecimiento, entre otros [61], [68].

$$\begin{gathered} Maximizar\ c^T\boldsymbol{v} \\ Sujeto\ a: \\ \boldsymbol{N}\boldsymbol{v} = 0 \\ LB \leq \boldsymbol{v} \leq UB \\ \boldsymbol{v} \in \mathbb{R} \end{gathered} \tag{1.23}$$

Dentro de las restricciones utilizadas para este análisis, se encuentran el asumir el sistema en estado estacionario, considerar la naturaleza termodinámica de las reacciones y por ende sus irreversibilidades y considerar las limitaciones cinéticas de cada enzima para llevar a cabo determinada reacción. Otras restricciones pueden ser impuestas en la magnitud de cada flujo metabólico [68].

La solución proporcionada por el análisis de balance de flujos no suele ser única sino un espacio de soluciones, de las cuales algunas pueden no tener sentido en la práctica. En la medida en que se vayan incorporando restricciones al sistema que permitan representar mejor el metabolismo celular, el espacio de soluciones será reducido logrando así proporcionar soluciones más realistas que se ajusten mejor en la práctica [36].

Figura 1-1: Espacio de soluciones del análisis de balance de flujos. Izquierda: Restricciones incompletas. Derecha: Restricciones suficientes.



Adaptado de [36].

Adicionalmente, es posible analizar las rutas metabólicas de interés desde un punto de vista termodinámico aplicando los mismos algoritmos de programación lineal como en el FBA. Tal es el caso del análisis propuesto por Elad Noor y colaboradores, el cual pretende establecer las condiciones necesarias a nivel de metabolismo tales como concentración de metabolitos, pH, fuerza iónica, entre otros, para que la ruta metabólica estudiada sea termodinámicamente factible en la dirección deseada [69]. Este análisis se realiza calculando la máxima fuerza impulsora mínima (Max-min Driving Force o MDF por sus siglas en ingles), la cual es una métrica termodinámica que se mide en unidades de kJ/mol y se obtiene al resolver el siguiente problema lineal:

$$\begin{gathered} Maximizar\ B \\ Sujeto\ a: \\ -(\boldsymbol{G}^{\circ} + RT \cdot \boldsymbol{N}^{\boldsymbol{T}} \cdot \boldsymbol{x}) \geq B \\ \ln(\boldsymbol{C_{min}}) \leq \boldsymbol{x} \leq \ln\,(\boldsymbol{C_{max}}) \end{gathered} \tag{1.24}$$

Donde $\boldsymbol{N}$ es la matriz estequiométrica, $\boldsymbol{G}^{\circ}$ es el vector columna de las energías libres de Gibbs de cada reacción a condiciones estándar, $\boldsymbol{x}$ es el vector columna de concentraciones para cada uno de los metabolitos considerados, B es el MDF calculado entre todas las fuerzas impulsoras para todas las reacciones, y $\ln(\boldsymbol{C_{min}})$ y $\ln(\boldsymbol{C_{max}})$ es el logaritmo natural de las concentraciones mínimas y máximas consideradas para cada metabolito,

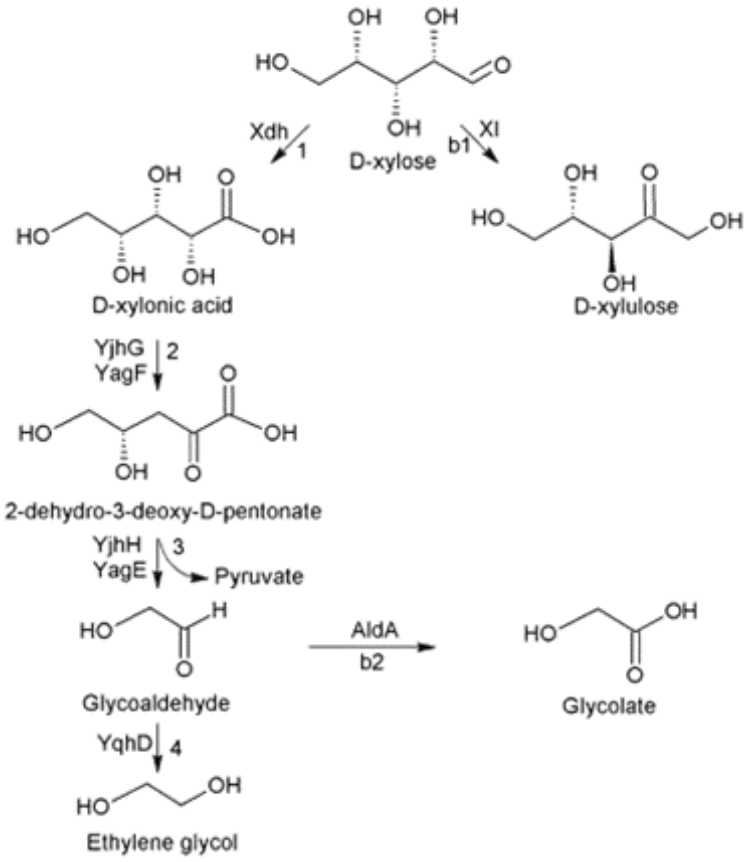
respectivamente. La maximización de B permite encontrar una solución en la que todas las reacciones están lo suficientemente alejadas del equilibrio como para darse en la dirección deseada, dados los rangos de concentración definidos.

Por otra parte, se puede utilizar la solución del problema dual asociado al problema lineal presentado en la ecuación (1.24) para determinar los precios sombra relacionados a las restricciones planteada en dicha ecuación. El precio sombra se define matemáticamente como la velocidad de cambio en el valor de la función objetivo con respecto a un cambio en los valores de la restricción asociada. Para este caso, el precio sombra asociado a un metabolito describe cómo varía el MDF con respecto a una variación en el rango de concentración del metabolito. Un precio sombra mayor que cero indica que un aumento en la concentración del metabolito asociado conllevará a un aumento en el valor óptimo de la función objetivo. Por otra parte, un precio sombra menor que cero indica que una disminución en la concentración del metabolito asociado conllevará a un aumento en el valor óptimo de la función objetivo. El precio sombra es igual a cero para aquellos metabolitos cuya variación en la concentración no tiene un efecto en la optimización de la función objetivo [69].

1.1.6 Producción biológica de etilenglicol

La producción biológica de etilenglicol fue demostrada por Liu y colaboradores en el año 2013, a través de la modificación genética de una cepa de *E. coli*. En este estudio, los investigadores lograron añadir una ruta metabólica que transformaba un azúcar de cinco carbonos como la xilosa en una molécula de glicolaldehido, la cual posee dos carbonos, y una molécula de piruvato, la cual posee 3 carbonos (Figura 1-2). Posteriormente, el glicolaldehido es reducido a etilenglicol utilizando NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) como donador de electrones. Los autores recalcaron que la reducción de glicolaldehido a etilenglicol llegaba a competir con la oxidación de glicolaldehido a glicolato, por lo que aconsejaban bloquear los genes asociados a esta última reacción para evitar una disminución en la producción de etilenglicol. Para este estudio se obtuvo un rendimiento final de 0.29 gramos de etilenglicol por cada gramo de xilosa consumida [25].

Figura 1-2: Ruta metabólica para la producción de etilenglicol a partir de la xilosa.



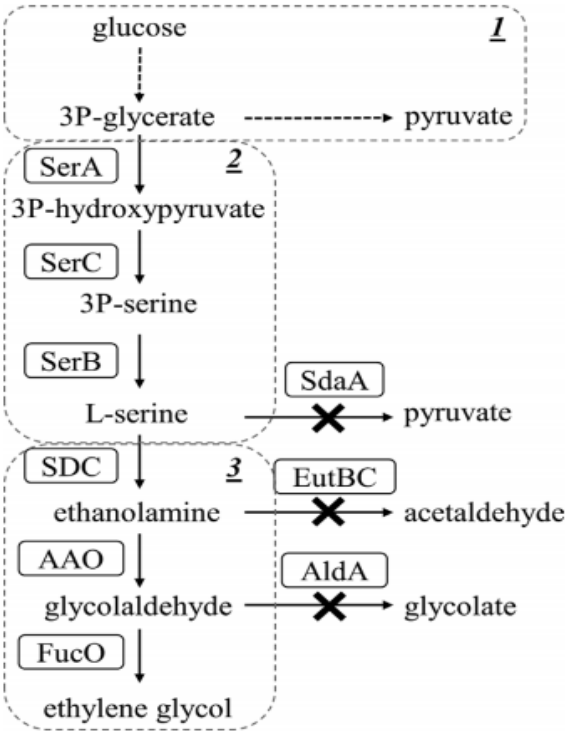
Tomado de [70].

Debido a que la ruta metabólica propuesta por Liu y colaboradores sólo aprovechaba dos de los cinco átomos de carbono de la pentosa, Pereira y colaboradores en el año 2016 propusieron una ruta alternativa utilizando glucosa como sustrato para la producción de etilenglicol, y lograr un mayor aprovechamiento de la cantidad de carbono utilizado en el proceso. En esta ruta, Pereira propone la conversión de intermediarios de 3 carbonos en etilenglicol a través de la L-serina como intermediario (Figura 1-3). La L-Serina es convertida en etanolamina a través de un proceso de descarboxilación y esta última es posteriormente desaminada para dar lugar al glicolaldehido que es posteriormente reducido a etilenglicol. Este último paso requiere la presencia de oxígeno molecular para llevar a cabo la desaminación produciendo una molécula de peróxido de hidrógeno [22].

Esta ruta alternativa abre la posibilidad de lograr la producción de etilenglicol a partir de otras fuentes de carbono como la glucosa y el glicerol. Pereira en su estudio obtuvo un

rendimiento final de 0.14 gramos de etilenglicol por cada gramo de glucosa consumida [22].

Figura 1-3: Ruta metabólica para la producción de etilenglicol utilizando L-serina como intermediario.



Tomado de [22].

Por otra parte, otros autores como Chen y colaboradores estudiaron en el año 2016 la producción de etilenglicol utilizando la especie *Corynebacterium glutamicum* y glucosa como fuente de carbono. Chen, utilizó la misma ruta propuesta por Pereira y adicionó una nueva ruta para la conversión de L-serina a glicolaldehido. En esta ruta, la serina es inicialmente desaminada para formar hidroxipiruvato, el cual es posteriormente descarboxilado para formar glicolaldehido. A diferencia de ruta propuesta por Pereira, esta no requiere el uso de oxígeno molecular para llevar a cabo la desaminación. En cambio, utiliza una transaminasa para llevar a cabo el proceso. En su estudio, obtuvieron un rendimiento máximo de 0.086 gramos de etilenglicol por gramo de glucosa y encontraron

que el etilenglicol producido era consumido una vez la glucosa se agotaba en el medio [71].

Otras investigaciones se han centrado en implementar la producción de etilenglicol en otras especies como *S. cerevisiae*, y autores como Salusjärvi y colaboradores en el año 2017 lograron implementar la ruta propuesta por Liu en una cepa de *S. cerevisiae* y estudiaron las actividades de cada una de las enzimas expresadas con el fin de establecer los efectos que tenía cada una en la producción de etilenglicol y otros productos [26]. Uranukul y colaboradores en el año 2019 reportaron la existencia de una ruta endógena que permitía la conversión de xilosa a etilenglicol a través de enzimas como la fosfofructoquinasa y la fructosa bifosfato aldolasa, las cuales son enzimas claves en la glucólisis [72].

Tomando en cuenta lo ya presentado para la producción biológica de etilenglicol y para el crecimiento microbiano con múltiples sustratos, el aporte del presente proyecto será demostrar que la producción biológica de etilenglicol se puede llevar a cabo utilizando una mezcla de sustratos que no son utilizados comúnmente en la industria biotecnológica, como el glicerol y el metanol presentes en el glicerol crudo de origen industrial. Esto no sólo permite ampliar el panorama de los sustratos que pueden ser utilizados para la producción de etilenglicol, sino que también permite establecer nuevas metodologías para el diseño de procesos biológicos con múltiples sustratos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Diseñar una plataforma biológica *in silico* para la producción de etilenglicol a partir de glicerol crudo a través de un análisis termodinámico y herramientas de la ingeniería metabólica.

1.2.2 Objetivos específicos

- Construir un modelo de caja negra a través de un análisis de factibilidad termodinámica que represente la bioproducción de etilenglicol a partir del cosustrato glicerol crudo (glicerol y metanol).

- Construir y seleccionar al menos un modelo metabólico para al menos un microorganismo chasis que represente la ruta metabólica para la producción de etilenglicol a partir del glicerol crudo buscando obtener los máximos teóricos planteados por el modelo de caja negra.
- Identificar los escenarios más convenientes para el modelo metabólico seleccionado que permita la producción de etilenglicol a partir del glicerol crudo acercándose a los máximos teóricos establecidos por la termodinámica.

1.3 Planteamiento del problema

¿Cuáles condiciones a nivel metabólico deben cumplirse para hacer posible la producción de etilenglicol a partir de glicerol crudo a través de un proceso biotecnológico utilizando microorganismos?

1.4 Hipótesis

Un análisis termodinámico permitirá establecer cuál debería ser la máxima producción teórica de etilenglicol por vía biotecnológica utilizando glicerol crudo (glicerol y metanol). Esta producción biotecnológica de etilenglicol puede alcanzarse mediante el estudio de las diferentes rutas metabólicas implicadas y la expresión de genes heterólogos específicos aplicando herramientas de la ingeniería metabólica para la construcción del microorganismo a ser utilizado.

2. Metodología

2.1 Estimación de la estequiometría del proceso a través del modelo de caja negra

Inicialmente se realiza la estimación de la estequiometría del proceso mediante la construcción de un modelo de caja negra utilizando la metodología propuesta por el profesor Ph.D J. J. Heijnen et al [37] descrito en la sección 1.1.2, el cual se centra en realizar un análisis termodinámico para cada uno de los procesos que ocurren internamente en el microorganismo y determinar así los parámetros relacionados la ecuación de Heerbert-Pirt (ecuación (1.1)). Inicialmente, se asume que los sustratos, glicerol y metanol, se consumen por separado de forma que podamos establecer los casos límite establecidos por la termodinámica al realizar este proceso con cada sustrato individualmente. Posteriormente, se amplía el estudio para el consumo de ambos sustratos de forma simultánea. Sin embargo, la metodología planteada en la sección 1.1.2 no es suficiente para explicar cómo se distribuye el flujo de carbono proveniente de dos o más sustratos dentro de los diferentes procesos celulares como el anabolismo, catabolismo y mantenimiento celular.

Para abordar el tema desde una mirada de múltiples sustratos, en la sección 3.3 se desarrolla una modificación a la metodología para un solo sustrato que permita extender su uso al caso de dos o más sustratos, siguiendo como línea directriz la metodología planteada por Heijnen et al [37]. Al igual que en el caso de un solo sustrato, el fin último es lograr el establecimiento del modelo de caja negra, el cual se alcanza a través de estimar los correspondientes parámetros.

Estos modelos de caja negra permitirán establecer principalmente los límites termodinámicos que puede llegar a tener el proceso y brinda un punto de partida para

análisis posteriores donde se buscará que el microorganismo seleccionado como chasís se ajuste a los límites establecidos y se logre una mayor generación del producto deseado.

2.2 Construcción y selección de un modelo metabólico para la producción de etilenglicol

Una vez establecida la estequiometría del proceso con múltiples sustratos a través del modelo de caja negra, es necesario plantear cómo se lleva a cabo la transformación del glicerol en etilenglicol dentro del microorganismo chasís. Esto con el fin de establecer si existen restricciones dentro de las rutas metabólicas que lleguen a afectar el rendimiento final del producto y así establecer estrategias para minimizarlas. Por tanto, se hace inicialmente un levantamiento y una verificación de la información biológica disponible para al menos un microorganismo chasís con el fin de obtener distintas redes metabólicas que permitan evaluar la producción biológica de etilenglicol. Adicionalmente, se hace un levantamiento de la información termodinámica de las distintas rutas metabólicas que participan del proceso con el fin de complementar el análisis de estas. Esta información se obtendrá principalmente de la literatura y de bases de datos especializadas como las que se presentan en la Tabla 2-1.

A partir de base de datos BiGG, se obtienen dos modelos metabólicos para los microorganismos *Escherichia coli K-12 MG1655* (iML1515) [73] y *Saccharomyces cerevisiae S288C* (iND750) [74] que sirvieron como base para estudiar la producción de etilenglicol en estos microorganismos. Adicionalmente, se consideró un tercer modelo para *Pichia pastoris* propuesto por Tomàs-Gamisans y colaboradores [75] con el mismo propósito. En la Tabla 2-2 se presentan algunas propiedades de estos modelos metabólicos.

Tabla 2-1: Base de datos utilizadas para la construcción de modelos metabólicos.

Base de datos	Descripción	Referencia
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	Almacena datos genómicos asociados a los genes de diferentes especies	[65]
BioCYC	Almacena información relacionada a distintos genomas microbianos y sus rutas metabólicas asociadas	[76], [77]
EcoCYC	Una base de datos especializada específicamente en el microorganismo *Escherichia coli* K-12	[77]
MetaCYC	Almacena información relacionada a diferentes rutas metabólicas y enzimas	[67]
BiGG	Una base de datos que recopila modelos metabólicos de diferentes organismos.	[78]
Universal Protein Resource (Uniprot)	Una base de datos especializada en proteínas y datos recopilados	[79]
eQuilibrator	Una base de datos especializada en el cálculo y análisis de constantes de equilibrio y energías libre de Gibbs de reacciones bioquímicas	[80]

Tabla 2-2: Características de los modelos metabólicos base para cada microorganismo.

Microorganismo	BiGG ID	# Genes	# Metabolitos	# Reacciones	# Reacciones extracelulares
Escherichia coli K-12 MG1655	iML1515	1516	1877	2712	331
Saccharomyces cerevisiae S288C	iND750	750	1059	1266	116
Pichia pastoris	iMT1026	1026	1706	2237	175

Tomado de [75], [78]

Estos modelos metabólicos se componen de una matriz estequiométrica que posee la información acerca de las diferentes reacciones que ocurren en el metabolismo y los metabolitos asociados, un conjunto de vectores que almacenan los limites inferiores y superiores de cada velocidad de reacción que ocurre en el metabolismo, y otra información adicional como la relación entre reacciones y genes, entre otros.

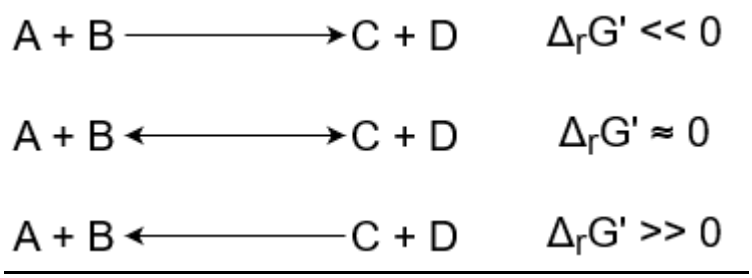
Para representar la producción de etilenglicol en cada uno de estos modelos metabólicos, se realizó inicialmente una revisión de las rutas metabólicas reportadas en la literatura de manera que se pudiera seleccionar aquellas que resultaran más adecuadas para el proceso [22]–[24], [26], [28], [70]–[72].

Para garantizar que los resultados que se obtienen sean consistentes desde el punto de vista estequiométrico y termodinámico, estos modelos metabólicos fueron analizados y curados manualmente a partir de la información encontrada en las diferentes bases de datos presentadas. El análisis y la modificación de estos modelos fue realizada a través de

la herramienta de Matlab COBRA (Constraint-Based Reconstruction and Analysis Toolbox por sus siglas en inglés) [81].

En este punto es muy importante considerar cada una de las reacciones biológicas que se encuentran en el microorganismo y evaluar la direccionalidad de cada reacción dentro del modelo. Esta direccionalidad va a estar determinada principalmente por los valores de la energía libre de Gibbs que puede tomar dicha reacción en determinadas condiciones. Si esta energía libre de Gibbs se encuentra muy alejada de los valores de equilibrio predefinidos ($\Delta_r G' \ll 0$ ó $\Delta_r G' \gg 0$), se considera la reacción irreversible y la reacción irá en una única dirección. De lo contrario, la reacción se considera reversible ($\Delta_r G' \approx 0$) y por lo tanto podrá llevarse a cabo en ambas direcciones (Figura 2-1).

Figura 2-1: Direccionalidad de las reacciones consideradas en el modelo metabólico de acuerdo a su valor del cambio en la energía libre de Gibbs.



Creación propia.

Al determinar la direccionalidad de cada reacción, se pueden refinar los límites entre los cuales cada reacción puede tomar un valor de velocidad. Es decir, se restringen los valores que puede tomar cada velocidad de reacción de acuerdo con la direccionalidad determinada para cada reacción. Esto permitirá obtener resultados más consistentes con la realidad y se previene la aparición de soluciones en futuros análisis que no son factibles desde el punto de vista termodinámico.

Una vez obtenidos estos modelos metabólicos, se hace una evaluación preliminar para establecer la eficiencia con la cual cada modelo logra convertir los sustratos, glicerol y metanol, en el producto deseado que es el etilenglicol. Durante esta evaluación se tiene

en cuenta aspectos como la cantidad de producto generado, energía consumida en el proceso en forma de ATP, entre otros. Este análisis se realizará a través de la herramienta COBRA toolbox de Matlab aplicando un análisis de balance de flujos (FBA por sus siglas en inglés) para distintos escenarios con diferentes velocidades de crecimiento y consumo de sustratos [81]. Al final, se seleccionará aquel modelo que cumpla con la estequiometría planteada en el modelo de caja negra, y que proporcione el mejor escenario para la producción de etilenglicol considerando aspectos tales como el rendimiento en la producción de etilenglicol por mol de carbono consumido, la cantidad de cofactores (ATP, NADH, NADPH) involucrados en el proceso, entre otros.

Finalmente, se utilizará esta misma herramienta de análisis para evaluar otros aspectos relevantes del modelo seleccionado como la influencia de la velocidad de crecimiento de biomasa en la producción de etilenglicol, entre otros.

2.3 Análisis termodinámico de rutas metabólicas

El análisis termodinámico de las rutas metabólicas consideradas permite tener un panorama más amplió de la factibilidad del proceso, logrando así que los resultados obtenidos sean consistentes tanto desde el punto de vista de los balances de materia como de la termodinámica. El análisis termodinámico realizado se dividió en dos partes, en la primera se busca determinar el rango de valores que pueden tomar las diferentes energías libres de Gibbs para cada una de las reacciones de producción de etilenglicol a condiciones determinadas; y la segunda busca determinar mediante algoritmos de optimización, la distribución de concentraciones para los metabolitos involucrados en estas rutas metabólicas de forma tal que cada proceso vaya en la direccionalidad deseada.

2.3.1 Rango de valores para las energías libre de Gibbs

Para evaluar la variación de la energía libre de Gibbs a partir de los valores estándar, se consideró el efecto de la concentración de los diferentes metabolitos que participan en dichas rutas a través de la metodología propuesta por Mavrovouniotis [37]. Esta metodología permite determinar la factibilidad termodinámica de una ruta metabólica mediante el cálculo de las energías libres de Gibbs máximas ($\Delta_r G_{max}$) y mínimas ($\Delta_r G_{min}$) de acuerdo con los valores máximos y mínimos que pueden tomar las concentraciones de los metabolitos involucrados (Ecuación (2.1)).

$$\Delta_{\mathrm{r}} G_{max,min} = \Delta_r G° + RTln\left(\prod_i x_i^{n_i}\right) \quad (2.1)$$

Donde $\Delta_r G°$ es la energía libre de Gibbs estándar de la reacción, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura en Kelvin, x_i es la concentración del metabolito i y n_i es el coeficiente estequiométrico para el metabolito i siendo negativo cuando este actúa como sustrato o positivo cuando este actúa como producto.

Las cantidades $\Delta_r G_{max}$ y $\Delta_r G_{min}$ representan la situación más favorable y menos favorable para la energía libre de Gibbs respectivamente. A partir de estas se puede establecer el rango de valores que pueden tomar las energías libres de Gibbs de cada reacción a determinadas condiciones.

El valor de $\Delta_r G_{max}$ se evalúa considerando los valores de la concentración máxima para los productos y la concentración mínima para los sustratos; mientras que para el valor $\Delta_r G_{min}$ se considera los valores de la concentración mínima para los productos y la concentración máxima para los sustratos.

Adicionalmente, los valores para la concentración de algunos cofactores como el ATP, NADH, NADPH, entre otros, son fijados a valores constantes debido a que estos son altamente regulados dentro del metabolismo.

2.3.2 Distribución óptima de concentraciones

Una vez definido el rango de valores que puede tomar la energía libre de Gibbs de cada reacción en las rutas de biosíntesis consideradas, es necesario establecer cuáles serían las condiciones apropiadas que permitan obtener un valor negativo de la energía libre para cada una de estas y poder garantizar que la ruta de biosíntesis sea factible desde el punto de vista termodinámico. Debido a que la temperatura y el valor del pH se mantienen prácticamente constantes a nivel de proceso y al interior de la célula, las concentraciones

de cada uno de los metabolitos implicados en cada reacción serán los que definan la factibilidad termodinámica de la ruta metabólica considerada.

Para este propósito se utilizó la librería de Python “eQuilibrator-API” creada por Elad Noor y colaboradores en el Instituto Weizmann de Ciencias en Israel [82]. Esta librería provee funciones para el cálculo de potenciales termodinámicos estándar para reacciones bioquímicas utilizando la base de datos propia de los autores. Adicionalmente, permite el análisis de rutas metabólicas mediante el método “Max-min Driving Force” descrito en la sección 1.1.5 (Ecuación (1.24)).

3. Resultados y discusión

Para tener una mayor comprensión del potencial que tiene cada sustrato considerado en la producción de etilenglicol, se construyeron inicialmente dos modelos de caja negra para cada uno de los sustratos considerados por separado. De esta manera es posible identificar las principales características que tiene la producción de etilenglicol a partir de cada sustrato, así como tener un panorama de los resultados que se puede obtener a la hora de integrar ambos sustratos en un mismo proceso.

Posteriormente se hace la propuesta teórica de un modelo de caja negra que involucre dos o más sustratos y se aplica para el presente estudio. En esta sección se evidencia la necesidad de usar nuevos parámetros que evidencien la influencia que tiene la presencia de diferentes sustratos en el metabolismo. Adicionalmente, se plantea qué posibles características del proceso son las que influenciaran la distribución de cada sustrato dentro del metabolismo celular.

Finalmente, se presenta un análisis de los diferentes modelos metabólicos construidos y seleccionados para la producción de etilenglicol a partir de glicerol y metanol. En este se evalúan los puntos clave de la producción de etilenglicol en diferentes microorganismos (*Escherichia Coli, Saccharomyces cerevisiae,* y *Pichia pastoris*) considerando diferentes rutas de biosíntesis y diferentes proporciones en el consumo de glicerol y metanol. Adicionalmente, se consideran otros aspectos importantes como el efecto de la velocidad de crecimiento de la biomasa y las limitaciones termodinámicas que presenta cada ruta de biosíntesis.

3.1 Modelos de caja negra

3.1.1 Producción biológica de etilenglicol a partir de glicerol

Para el análisis del modelo de caja negra se calcularon los parámetros de la ecuación de Herbert-Pirt utilizando el glicerol como fuente de energía y fuente de carbono. Inicialmente se evaluó si la reacción para la producción de etilenglicol ($\gamma_{EG} = 10\, e^{-}/mol_{EG}$) a partir de glicerol ($\gamma_{Glicerol} = 14\, e^{-}/mol_{Glicerol}$) es un buen candidato para ser considerado como reacción catabólica (Reacción 1, Tabla 3-1). Sin embargo, se encontró que la energía libre de Gibbs obtenida de esta reacción resulta ser muy pequeña ($-\Delta rG^{\circ\prime} = 5.62\ kJ/mol_{Glicerol}$) para que esta pueda ser acoplada a otros procesos y ser utilizada como fuente de energía del microorganismo.

Por lo tanto, es necesario encontrar otros aceptores de electrones que brinden la energía necesaria para los diferentes procesos que se están considerando. Para esto se evaluaron 6 casos diferentes en donde se utilizaron aceptores de electrones tales como: 2. Oxígeno ($O_2, \gamma_{O_2} = -4\, e^{-}/mol_{O_2}$); 3. Etanol ($C_2H_6O, \gamma_{C_2H_6O} = 12\, e^{-}/mol_{C_2H_6O}$); 4. Lactato ($C_3H_5O_3^{-}$, $\gamma_{C_3H_5O_3^{-}} = 12\, e^{-}/mol_{C_3H_5O_3^{-}}$); 5. Acetato ($C_2H_3O_2^{-}$, $\gamma_{C_2H_3O_2^{-}} = 8\, e^{-}/mol_{C_2H_3O_2^{-}}$); 6. Nitrato ($NO_3^{-}$, $\gamma_N = 5\, e^{-}/mol_{NO_3^{-}}$); 7. Metano ($CH_4$, $\gamma_{CH_4} = 8\, e^{-}/mol_{CH_4}$) (Tabla 3-1).

En la Tabla 3-1 se puede observar para las reacciones 4 y 5 cómo estas requieren la adición de dióxido de carbono (CO_2) al proceso. Esto se debe a que el glicerol posee una mayor cantidad de electrones por mol de carbono disponibles (4.67 e^{-}/c-mol) en comparación al lactato (4 e^{-}/c-mol) y al acetato (4 e^{-}/c-mol), por lo que este exceso de electrones debe ser transferido con el ánimo de mantener un estado redox celular. Una de las opciones es la reducción del CO_2, lo que permitiría el balance de electrones y de átomos de carbonos en el sistema.

Tabla 3-1: Reacciones catabólicas propuestas a partir de un mol de glicerol.

Caso	Reacción catabólica	$\Delta_{rxn}G^{\circ\prime}$ [kJ/mol]
1	$-C_3H_8O_3 - 0.2\ H_2O + 1.4\ C_2H_6O_2 + 0.2\ CO_2 = 0$	-5.62
2	$-\ C_3H_8O_3 - 3.5\ O_2 +\ 3\ CO_2 + 4\ H_2O = 0$	-1643.16
3	$-\ C_3H_8O_3 + 1.167\ C_2H_6O +\ 0.667\ CO_2 + 0.5\ H_2O = 0$	-105.68
4	$-C_3H_8O_3 - 0.5\ CO_2 + 1.167\ C_3H_5O_3^- + 1.167\ H^+ + 0.5\ H_2O = 0$	-82.97
5	$-\ C_3H_8O_3 - 0.5\ CO_2 + 1.75\ C_2H_3O_2^- + 1.75\ H^+ + 0.5\ H_2O =\ 0$	-149.61
6	$-C_3H_8O_3 - 3.5\ H^+ - 1.75\ NO_3^- + 1.75\ NH_4^+ + 3\ CO_2 + 2.25\ H_2O =\ 0$	-1031.93
7	$-\ C_3H_8O_3 + 1.75\ CH_4 + 1.25\ CO_2 + 0.5\ H_2O = 0$	-213.86

Creación propia.

Para los 7 casos planteados en la Tabla 3-1, se determinó la cantidad de energía libre que podría liberar cada reacción catabólica por mol de sustrato y el valor de cada parámetro de la ecuación de Herbert-Pirt, respectivamente. Cada parámetro se calculó a partir de los siguientes valores obtenidos para la formación de biomasa (Ecuación (1.7)) , la producción de un mol de etilenglicol a partir de glicerol (Ecuaciones (1.11) y (1.12)), y a partir del costo energético en el mantenimiento celular (Ecuación (1.19)) a una temperatura de 25°C (298.15 K) (Ecuaciones (3.1) (3.2), (3.3), (3.4) y (3.5)).

$$a_{glicerol}^{ana} = 0.3\ \left[\frac{mol_{glicerol}}{Cmol_x}\right] \tag{3.1}$$

$$a_G(Glicerol) = 428.06\ \frac{kJ}{Cmol_X} \tag{3.2}$$

$$b_{glicerol}^{ana} = 0.714\ \frac{mol_{glicerol}}{mol_{EG}} \tag{3.3}$$

$$\Delta_R G_{theor} =\ -0.987 \frac{kJ}{mol_{EG}} \tag{3.4}$$

$$m_G = 4.5635 \frac{kJ}{Cmol_x\ \cdot h} \tag{3.5}$$

Tabla 3-2: Parámetros de la ecuación de Herbert-Pirt para cada escenario utilizando glicerol como fuente de carbono y energía.

Caso	Aceptor de electrones	Energía libre de Gibbs liberada en el Catabolismo [kJ/mol]	Parámetro *a* [mol glicerol / mol de biomasa]	Parámetro *b* [mol glicerol / mol de producto]	Parámetro m_s [mol glicerol / mol de biomasa * h]
1	Etilenglicol	-5.62	76.525	-	0.8126
2	Oxigeno	-1643.16	0.561	0.739	0.0028
3	Etanol	-105.68	4.531	1.097	0.0432
4	Lactato	-82.97	5.459	1.202	0.0550
5	Acetato	-149.61	3.161	0.985	0.0305
6	Nitrato	-1031.93	0.715	0.753	0.0044
7	Metano	-213.86	2.302	0.904	0.0213

Creación propia.

Como se puede observar en la Tabla 3-2, el uso tanto de oxígeno como de nitrato como aceptores finales de electrones permite obtener una mayor cantidad de energía desde el catabolismo, lo que se refleja en una menor cantidad de glicerol requerida para llevar a cabo cada uno de los procesos descritos anteriormente y permite un mayor rendimiento tanto en la producción de biomasa como en la producción de etilenglicol.

Por otra parte, el uso de otros aceptores de electrones como etanol, lactato, acetato y metano, los cuales se consideran como subproductos del catabolismo permiten obtener una menor cantidad de energía liberada, lo que conllevaría a consumir una mayor cantidad relativa de sustrato para llevar a cabo estos procesos. Adicionalmente, debido a que estos aceptores de electrones son producidos desde el metabolismo a partir del flujo de carbono que entra al organismo, estos llegan a competir con la producción de biomasa y de etilenglicol, llegando a disminuir sus rendimientos en términos de moles de carbono en el sustrato alimentado.

3.1.2 Producción biológica de etilenglicol a partir de metanol

Similar al caso con glicerol, se determinó inicialmente si la reacción de producción de etilenglicol a partir de metanol ($\gamma_{metanol} = 6\, e^{-}/mol_{metanol}$) podría ser una fuente de energía para llevar a cabo los demás procesos celulares (Reacción 1, Tabla 3-3). Esta reacción presenta una fuerza impulsora de $-\Delta rG^{o\prime} = -8.526\ kJ/mol_{metanol}$, por lo que, en vez de liberar energía, requiere que esta sea adicionada para hacer el proceso factible termodinámicamente.

Por lo tanto, esta reacción no puede ser utilizada para llevar a cabo el catabolismo dentro del microorganismo y se deben considerar otros escenarios para hallar aquella reacción que proporcione la mayor cantidad de energía y pueda ser utilizada en el catabolismo. Nuevamente se consideraron 6 casos adicionales al caso 1 en donde se utilizaban: 2. Oxígeno $\left(O_2, \gamma_{O_2} = -4\, e^-/mol_{O_2}\right)$; 3. Etanol $\left(C_2H_6O, \gamma_{C_2H_6O} = 12\, e^-/mol_{C_2H_6O}\right)$; 4. Lactato $\left(C_3H_5O_3^-,\ \gamma_{C_3H_5O_3^-} = 12\, e^-/mol_{C_3H_5O_3^-}\right)$; 5. Acetato $\left(C_2H_3O_2^-,\ \gamma_{C_2H_3O_2^-} = 8\, e^-/mol_{C_2H_3O_2^-}\right)$; 6. Nitrato $\left(NO_3^-,\ \gamma_N = 5\, e^-/mol_{NO_3^-}\right)$; 7. Metano $\left(CH_4,\ \gamma_{CH_4} = 8\, e^-/mol_{CH_4}\right)$ como aceptores de electrones para cada caso respectivamente (Tabla 3-3).

Tabla 3-3: Reacciones catabólicas propuestas a partir de un mol de metanol.

Caso	**Reacción catabólica**	$\boldsymbol{\Delta_{rxn}G^{\circ\prime}}$ **[kJ/mol]**
1	$-CH_4O - 0.2\, CO_2 + 0.6\, C_2H_6O_2 + 0.2\, H_2O = 0$	8.53
2	$-CH_4O - 1.5\, O_2 + CO_2 + 2\, H_2O = 0$	-693.33
3	$-CH_4O + 0.5\, C_2H_6O + 0.5\, H_2O = 0$	-34.08
4	$-CH_4O - 0.5\, CO_2 + 0.5\, C_3H_5O_3^- + 0.5\, H^+ + 0.5\, H_2O = 0$	-24.55
5	$-CH_4O - 0.5\, CO_2 + 0.75\, C_2H_3O_2^- + 0.75\, H^+ + 0.5\, H_2O = 0$	-54.98
6	$-CH_4O - 0.75\, NO_3^- - 1.5\, H^+ + 0.75\, NH_4^+ + CO_2 + 1.25\, H_2O = 0$	-431.66
7	$-CH_4O + 0.75\, CH_4 + 0.25\, CO_2 + 0.5\, H_2O = 0$	-79.85

Creación propia

Similar al caso anterior, se puede observar para las reacciones con lactato y acetato que estas requieren la adición de dióxido de carbono (CO_2) al proceso. Esto principalmente porque la cantidad de electrones por mol de carbono disponibles en el metanol (6 e^-/c-mol) es mayor en comparación a los que se encuentran disponibles en el lactato (4 e^-/c-mol) y el acetato (4 e^-/c-mol), por lo que la reducción de CO_2 permitiría mantener un balance redox en el sistema.

De igual manera se determinó la cantidad de energía libre que podría liberar cada reacción catabólica por mol de sustrato y el valor de cada parámetro de la ecuación de Herbert-Pirt respectivamente. Nuevamente, cada parámetro se calculó a partir de los siguientes valores obtenidos para la formación de biomasa (Ecuación (1.7)), la producción de un mol de etilenglicol a partir de metanol (Ecuaciones (1.11) y (1.12)), y a partir del costo energético en el mantenimiento celular a una temperatura de 25°C (298.15 K).

$$a_{metanol}^{ana} = 0.7 \left[\frac{mol_{metanol}}{Cmol_x}\right] \tag{3.6}$$

$$a_G(metanol) = 698.23 \frac{kJ}{Cmol_X} \tag{3.7}$$

$$b_{metanol}^{ana} = 1.667 \frac{mol_{metanol}}{mol_{EG}} \tag{3.8}$$

$$\Delta_{theor}G° = 14.21 \frac{kJ}{mol_{EG}} \tag{3.9}$$

$$m_G = 4.5635 \frac{kJ}{Cmol_x \cdot h} \tag{3.10}$$

Similar al caso del glicerol, el uso de aceptores externos de electrones como el oxígeno y el nitrato proporcionan una mayor liberación de energía desde el catabolismo en comparación al uso de otros aceptores de electrones como el etanol, el lactato, el acetato y el metano. Esto se traduce en un menor consumo de metanol por parte del microorganismo para la formación de biomasa, etilenglicol, y para el mantenimiento celular requerido.

Tabla 3-4: Parámetros de la ecuación de Herbert-Pirt para cada escenario utilizando metanol como fuente de carbono y energía.

Caso	Aceptor de electrones	Energía libre de Gibbs liberada en el Catabolismo [kJ/mol]	Parámetro *a* [mol metanol / mol de biomasa]	Parámetro *b* [mol metanol / mol de producto]	Parámetro m_s [mol metanol / mol de biomasa * h]
1	Etilenglicol	8.53	-	-	-
2	Oxigeno	-693.33	1.707	1.765	0.0066
3	Etanol	-34.08	21.191	3.675	0.1339
4	Lactato	-24.55	29.146	4.454	0.1859
5	Acetato	-54.98	13.879	2.958	0.0861
6	Nitrato	-431.66	2.318	1.936	0.0106
7	Metano	-79.85	9.444	2.523	0.0571

Creación propia.

3.1.3 Propuesta de reacciones catabólicas alternas

Adicional a los casos considerados previamente, se evaluó también la posibilidad de utilizar una nueva reacción catabólica que comprendiera el uso simultáneo de dos aceptores de electrones como lo son el oxígeno y el etilenglicol. Este concepto es similar al evidenciado durante la fermentación aeróbica para algunos microorganismos. Durante este proceso, el sustrato destinado para la producción de energía es utilizado tanto en procesos respiratorios como en procesos fermentativos, siendo esto controlado por la velocidad de consumo de sustrato (ver Sección 1.1.4).

Considerando el glicerol como sustrato, esta nueva reacción catabólica se puede definir como una reacción de semi-oxidación aerobia de glicerol a etilenglicol, la cual comprende la siguiente estequiometría general:

$$n_S\ C_3H_8O_3 + n_O\ O_2 + n_P\ C_2H_6O_2 + n_C\ CO_2 + n_W\ H_2O = 0 \qquad (3.11)$$

donde n_S, n_O, n_P, n_C, y n_W son los coeficientes estequiométricos que acompañan a cada sustancia. Estos coeficientes se pueden determinar mediante los diferentes balances elementales y de electrones para todas las sustancias consideradas. Sin embargo, se encontró que la solución de estos balances da lugar a más de una estequiometría válida para esta reacción. Aun delimitando esta estequiometría a un mol de glicerol, se logró observar que esta depende también de las moles de oxígeno que se van a consumir.

$$-1\ C_3H_8O_3 + n_O'\ O_2 + n_P'\ C_2H_6O_2 + n_C'\ CO_2 + n_W'\ H_2O = 0 \qquad (3.12)$$

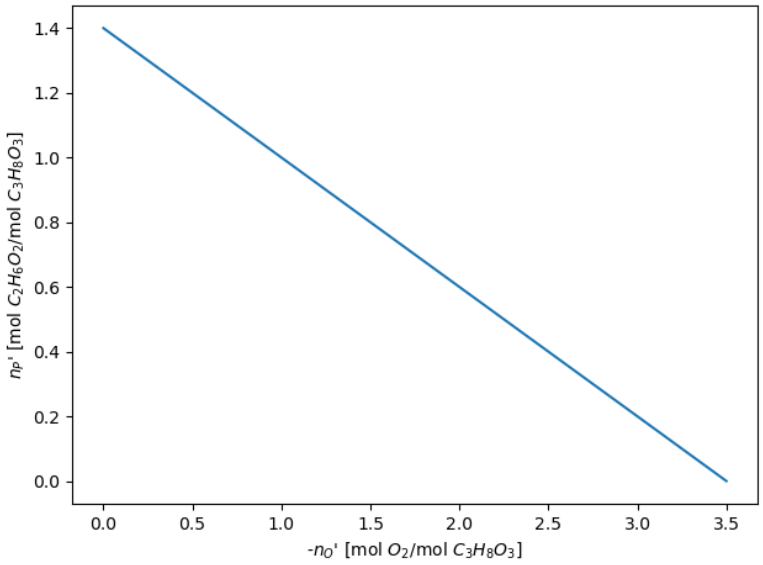
$$n_P{}' = 1.4 + 0.4\, n_O{}' \tag{3.13}$$

$$n_C{}' = 0.2 - 0.8\, n_O{}' \tag{3.14}$$

$$n_W{}' = -0.2 - 1.2\, n_O{}' \tag{3.15}$$

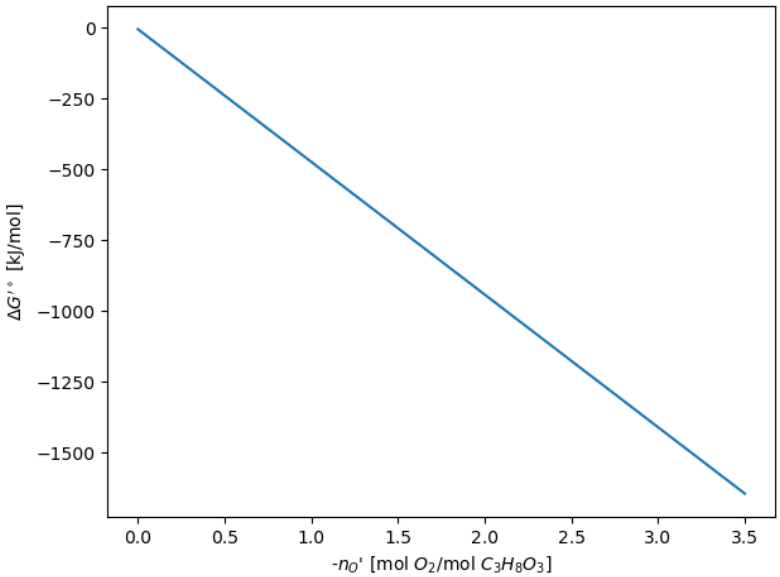
Al tomar el valor de $n_O{}' = 0$, se obtiene la estequiometría para la producción anaerobia de etilenglicol a partir de un mol de glicerol (Tabla 3-1, caso 1), mientras que para el valor de $n_O{}' = -3.5$ se obtiene la estequiometría para la oxidación aerobia del glicerol sin producción de etilenglicol (Tabla 3-1, caso 2). Por lo que podemos considerar que la reacción de semi-oxidación aerobia de glicerol a etilenglicol es en realidad un acoplamiento entre los dos procesos descritos anteriormente. La cantidad de oxígeno consumida en la reacción determinará por lo tanto la cantidad de etilenglicol que se puede producir (Figura 3-1) y la energía libre liberada por la reacción catabólica considerada (Figura 3-2).

Figura 3-1: Variación del coeficiente estequiométrico del etilenglicol con respecto al coeficiente estequiométrico del oxígeno para la reacción de semi-oxidación de glicerol.



Creación propia.

Figura 3-2: Variación de la energía libre de Gibbs liberada en la reacción de semi-oxidación de glicerol con respecto al coeficiente estequiométrico del oxígeno.



Creación propia.

Este acople tiene la ventaja de permitir la producción de etilenglicol mediante el proceso de catabolismo que ocurre en la célula, por lo que la producción de este no competirá directamente con el crecimiento celular, sino que será una consecuencia de este. Sin embargo, debido a que la síntesis de este producto y la generación de energía en el catabolismo vendrán siendo determinadas por la cantidad de oxígeno que es consumido en el proceso, es necesario establecer unas condiciones de consumo de oxígeno que permitan obtener un balance entre la cantidad de etilenglicol generada y la cantidad de energía libre obtenida para otros procesos celulares.

A modo de ejemplo, se presenta la estequiometría resultante para la reacción de semi-oxidación aerobia de glicerol a etilenglicol cuando se consume un mol de oxígeno por mol de glicerol consumido.

$$-1\ C_3H_8O_3 - O_2 + 1\ C_2H_6O_2 + 1\ CO_2 + 1\ H_2O = 0 \qquad (3.16)$$

Esta reacción posee un valor de energía libre de Gibbs $\Delta_r G°'$= -473.52 kJ/mol glicerol, la cual es superior a la energía libre de Gibbs obtenida mediante la fermentación anaerobia de glicerol a etanol (-105.68 kJ/mol glicerol) e incluso a la fermentación anaerobia de glucosa a etanol (-235.00 kJ/mol glucosa). Por lo tanto, esta reacción de semi-oxidación es un candidato ideal para ser utilizado como reacción catabólica en el proceso. Utilizando este valor de la energía libre obtenido y los parámetros calculados para la producción de biomasa y el mantenimiento celular, se obtuvieron las siguientes velocidades específicas de consumo y producción de cada sustancia considerada en el proceso por c-mol de biomasa producida.

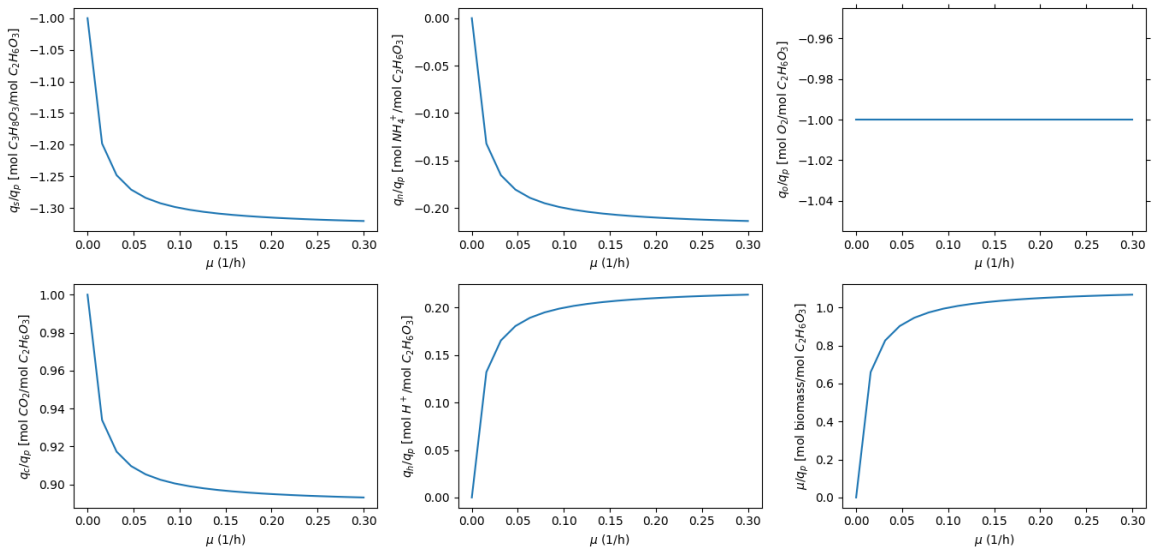
Tabla 3-5: Velocidades específicas de consumo y producción de los diferentes compuestos involucrados en la reacción de proceso seleccionada.

Sustancia	**Velocidad específica de consumo o producción**
Glicerol	$-q_s = 1.204\,\mu + 0.00964$
Fuente de nitrógeno (NH_4^+)	$-q_n = 0.2\,\mu$
Oxígeno	$-q_o = 0.904\,\mu + 0.00964$
Biomasa	μ
Etilenglicol	$q_p = 0.904\,\mu + 0.00964$
Dióxido de carbono	$q_c = 0.804\,\mu + 0.00964$
Agua	$q_w = 1.504\,\mu + 0.00964$
Protones (H^+)	$q_h = 0.2\,\mu$

Creación propia

En la Figura 3-3 se puede observar los coeficientes estequiométricos obtenidos para la reacción de proceso planteada para la producción de un mol de producto. En este se puede observar como la cantidad de sustrato y otros componentes que se requieren o se generan para la producción de etilenglicol varían con la velocidad de crecimiento. Adicionalmente, se observa como el coeficiente estequiométrico para el oxígeno es siempre el mismo para todas las velocidades de crecimiento consideradas. Esto debido a que el oxígeno y el etilenglicol participan únicamente en el catabolismo y las proporciones de estos se encuentran ya determinadas por la estequiometría planteada en la ecuación (3.16). Se puede observar también en la Figura 3-3 cómo a bajas velocidades de crecimiento, la cantidad de sustrato requerida para producir un mol de producto es menor en comparación a otros casos, por lo que este escenario resulta el más conveniente para llevar a cabo el proceso.

Figura 3-3: Coeficientes estequiométricos estimados de la reacción de proceso seleccionada como funciones de la velocidad de crecimiento.



Creación propia.

Para el caso del metanol también se evaluó la posibilidad de realizar una reacción de semi-oxidación de este para acoplar la producción de etilenglicol al catabolismo. Para esto se consideró un mol de metanol que se consume en el catabolismo y se construye la siguiente estequiometría

$$-1\ CH_4O + n_O{}''O_2 + n_P{}''C_2H_6O_2 + n_C{}''CO_2 + n_W{}''H_2O = 0 \tag{3.17}$$

Nuevamente, se encontró que los valores de los coeficientes estequiométricos para el etilenglicol ($n_P{}''$), el dióxido de carbono ($n_C{}''$) y el agua ($n_W{}''$) son dependientes del coeficiente estequiométrico que se considere para el oxígeno ($n_O{}''$) de la siguiente manera:

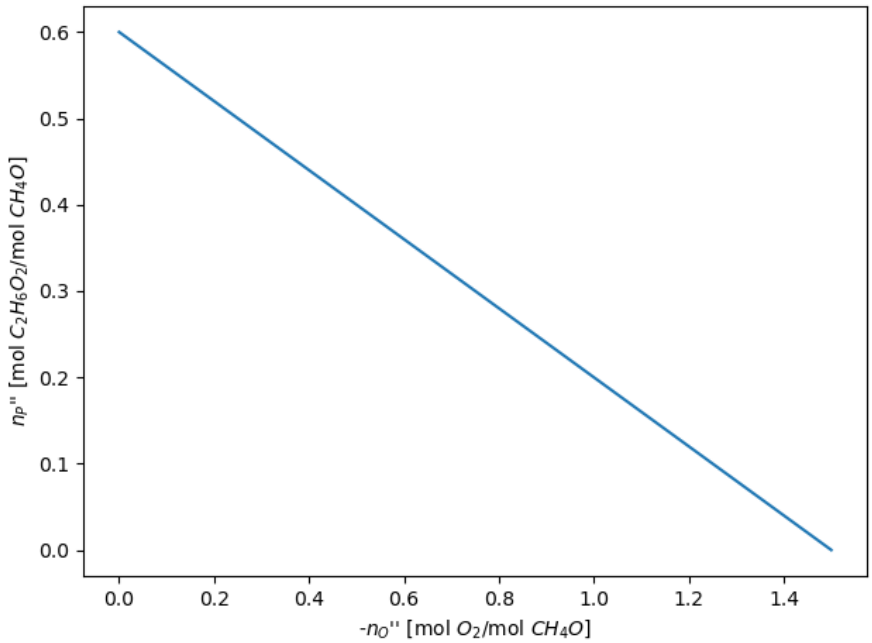
$$n_P{}'' = 0.6 + 0.4 n_O{}'' \tag{3.18}$$

$$n_C{}'' = -0.2 - 0.8\, n_O{}'' \tag{3.19}$$

$$n_W{}'' = 0.2 - 1.2\, n_O{}'' \tag{3.20}$$

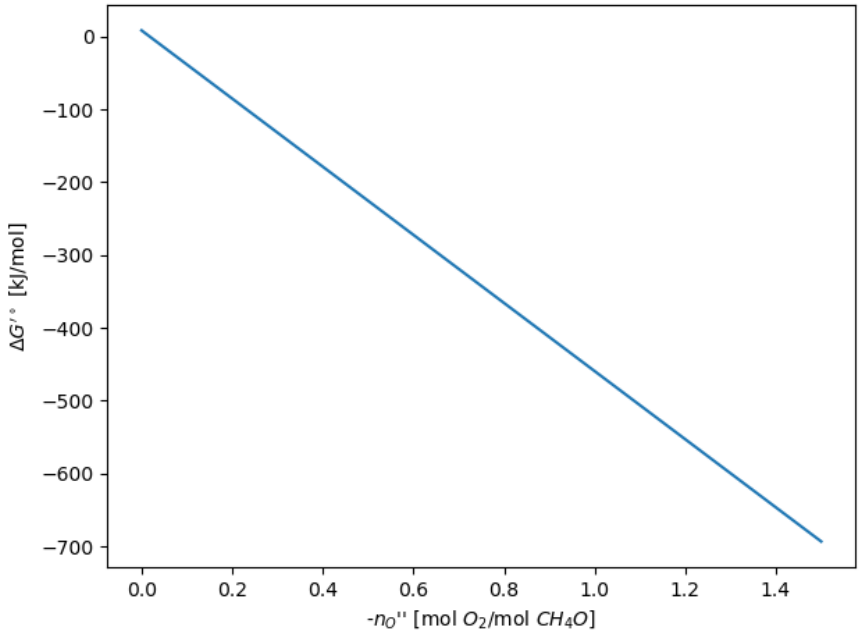
Se observa que al tomar el valor de $n_O'' = 0$, se obtiene la estequiometría para la producción anaerobia de etilenglicol a partir de un mol de metanol (Tabla 3-3, caso 1), mientras que para el valor de $n_O'' = -1.5$, se obtiene la estequiometría para la oxidación completa del metanol (Tabla 3-3, caso 2). Por lo que nuevamente observamos que esta reacción de semi-oxidación aerobia no es nada más que el acoplamiento entre la reacción de oxidación completa del metanol y la producción anaerobia de etilenglicol a partir del mismo sustrato. Por lo tanto, y similar al caso con el glicerol, la cantidad de oxígeno que se consume en esta reacción determinará tanto la cantidad de etilenglicol que se produce y la energía libre que se puede obtener.

Figura 3-4: Variación del coeficiente estequiométrico del etilenglicol con respecto al coeficiente estequiométrico del oxígeno para la reacción de semi-oxidación de metanol.



Creación propia.

Figura 3-5: Variación de la energía libre de Gibbs liberada en la reacción de semi-oxidación de metanol con respecto al coeficiente estequiométrico del oxígeno.



Creación propia.

Similar al caso del glicerol, este acople permitirá la producción de etilenglicol mediante el catabolismo y no competirá directamente con la producción de biomasa durante el proceso. Adicionalmente, se buscaría establecer un balance entre la cantidad de etilenglicol generada y la cantidad de energía libre obtenida a partir de la cantidad de oxígeno consumida para hacer el proceso viable.

Es posible establecer unas condiciones que permitan que este tipo de reacción ocurra mediante un mecanismo similar a la fermentación aerobia presentada anteriormente. Basándonos en la propuesta de Niebel para el límite en la disipación de la energía libre de Gibbs que hay para cada microorganismo [60], se buscaría establecer una velocidad de consumo de sustrato de manera que parte del flujo de carbono proveniente de este sea dirigido a procesos respiratorios para la generación principal de energía, y la otra parte destinada a la producción de etilenglicol de forma que ambos procesos permitan un balance en el correcto funcionamiento de la célula y una producción adecuada de etilenglicol. Para lograr que esto último suceda, se propone realizar modificaciones al metabolismo celular mediante la eliminación de genes asociados a rutas que compiten por

el flujo de carbono durante la fermentación aerobia como aquella relacionada a la producción de etanol, lactato, entre otras; y también mediante la adición de genes asociados a rutas de biosíntesis de etilenglicol (ver sección 3.3.3) de forma que se pueda redirigir el flujo de carbono hacia el producto de interés.

3.2 Propuesta preliminar de modelo de caja negra para fermentaciones con múltiples sustratos

La metodología planteada en la sección 1.1.2 representa una enorme ventaja en el diseño y análisis de bioprocesos debido a su base en el análisis termodinámico del proceso. Sin embargo, debido a que esta metodología sólo es aplicable a aquellos procesos en los que se encuentre involucrado un único sustrato, su utilidad se ve restringida para una gran cantidad de bioprocesos en los que se utiliza más de un sustrato. Por lo tanto, se hace necesario generalizar esta metodología para que sea aplicable a procesos con más de un sustrato. A continuación, se sugiere una metodología construida a partir del método planteado en la sección 1.1.2 y las investigaciones descritas en la sección 1.1.3.

3.2.1 Análisis termodinámico de las reacciones catabólicas para múltiples sustratos

Consideremos el caso para un proceso con dos sustratos que sirven tanto como fuente de energía como fuente de carbono.

$$\begin{aligned} -1\,S_1 + n_{O,1}O_2 + n_{C,1}CO_2 + n_{W,1}H_2O = 0 \\ -1\,S_2 + n_{O,2}O_2 + n_{C,2}CO_2 + n_{W,2}H_2O = 0 \end{aligned} \tag{3.21}$$

El catabolismo de cada sustrato proporcionará una cantidad determinada de energía libre de Gibbs por mol de sustrato consumido. Esta cantidad de energía permanece invariante a la presencia de otro sustrato. Sin embargo, la participación de cada sustrato en los procesos catabólicos se verá afectada por la presencia del otro. Esto se debe principalmente a que el catabolismo de un sustrato proporciona parte de la energía necesaria para llevar a cabo los procesos celulares, disminuyendo el flujo del otro sustrato hacia los procesos catabólicos.

Considerando que el sustrato 1 aporta una fracción φ_1 y el sustrato 2 aporta una fracción φ_2 de la energía necesaria para llevar a cabo una función celular (crecimiento, generación de producto no catabólico o mantenimiento), se puede determinar la cantidad de sustrato 1 y 2 invertido en el catabolismo para llevar a cabo estas actividades en la célula.
Para las fracciones φ_1 y φ_2, se tiene que la suma de estas debe representar la totalidad de la energía requerida para llevar a cabo determinado proceso celular.

$$\varphi_1 + \varphi_2 = 1 \tag{3.22}$$

Para el caso de un proceso con más de dos sustratos, se obtiene lo siguiente.

$$\sum_i \varphi_i = 1 \tag{3.23}$$

3.2.2 Análisis termodinámico para la producción de biomasa utilizando múltiples sustratos

Inicialmente se consideran reacciones anabólicas donde participa cada sustrato por separado en la formación de biomasa, para el caso de dos sustratos diferentes se tiene:

$$\begin{aligned} a_{S,1}^{ana} S_1 + a_{N,1}^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\,X + a_{C,1}^{ana} CO_2 + a_{W,1}^{ana} H_2O = 0 \\ a_{S,2}^{ana} S_2 + a_{N,2}^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\,X + a_{C,2}^{ana} CO_2 + a_{W,2}^{ana} H_2O = 0 \end{aligned} \tag{3.24}$$

De esta manera, para producir una C-mol de biomasa a partir de dos sustratos diferentes, la contribución de cada uno de estos se puede expresar como:

$$\begin{aligned} \alpha_1 * (a_{S,1}^{ana} S_1 + a_{N,1}^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\,X + a_{C,1}^{ana} CO_2 + a_{W,1}^{ana} H_2O = 0) \\ \alpha_2 * (a_{S,2}^{ana} S_2 + a_{N,2}^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\,X + a_{C,2}^{ana} CO_2 + a_{W,2}^{ana} H_2O = 0) \end{aligned} \tag{3.25}$$

$$\alpha_1 + \alpha_2 = 1 \tag{3.26}$$

En la ecuación (3.25) se toma como base la producción de una C-mol de biomasa donde α_1 y α_2 son las C-moles de biomasa producida a partir del sustrato 1 y 2, respectivamente. Para el caso de un proceso con más de dos sustratos, se puede obtener:

$$\sum_{i} \alpha_i = 1 \tag{3.27}$$

A partir de las ecuaciones (3.25) y (3.26), la cantidad de cada sustrato invertido en el anabolismo para la síntesis de biomasa en un proceso con dos sustratos es:

$$\begin{aligned} a_{S,1}^{ana-mix} &= \alpha_1 * a_{S,1}^{ana} = \alpha_1 * \frac{\gamma_X}{\gamma_{S,1}} \\ a_{S,2}^{ana-mix} &= \alpha_2 * a_{S,1}^{ana} = \alpha_2 * \frac{\gamma_X}{\gamma_{S,2}} \end{aligned} \tag{3.28}$$

Adicionalmente, la cantidad de energía necesaria para la producción de una C-mol de biomasa utilizando múltiples sustratos se puede definir asemejando el proceso a un circuito de resistencias en paralelo en donde cada resistencia representa la cantidad de energía necesaria para la formación de una C-mol de biomasa utilizando un único sustrato en específico:

$$a_G^{coup} = \frac{1}{\alpha_1 \frac{1}{a_{G,1}} + \alpha_2 \frac{1}{a_{G,2}}} \tag{3.29}$$

Donde $a_{G,1}$ y $a_{G,2}$ es la energía libre de Gibbs necesaria para la producción de 1 C-mol de biomasa en crecimiento heterotrófico a partir del sustrato 1 y sustrato 2, respectivamente. Esta analogía permite considerar la cantidad de energía necesaria para la producción de biomasa a partir de cada sustrato y obtener una descripción equivalente de cómo sería la cantidad de energía necesaria para la producción de biomasa en un proceso con dos sustratos, considerando el aporte que tiene cada uno de estos en el proceso a través de los parámetros $a_{G,1}$ y $a_{G,2}$.

A partir de lo anterior y considerando lo planteado en la sección 3.2.1, se puede obtener la cantidad de moles consumidas de cada sustrato en el catabolismo para satisfacer la demanda energética para la síntesis de biomasa:

$$a_{S,1}^{cat-mix} = \varphi_1 * \frac{a_G^{coup}}{\Delta_{cat} G_1} \left[\frac{mol_{S,1}}{C-mol_x}\right]$$
$$a_{S,2}^{cat-mix} = \varphi_2 * \frac{a_G^{coup}}{\Delta_{cat} G_2} \left[\frac{mol_{S,2}}{C-mol_x}\right] \quad (3.30)$$

Aquí, los valores de φ_1 y φ_2 representan la fracción de la demanda energética para la síntesis de biomasa (a_G^{coup}) que se satisface por el catabolismo del sustrato 1 y 2, respectivamente. Finalmente, la cantidad total de cada sustrato que es consumido en la síntesis de biomasa se puede definir como:

$$\boxed{a_{S,1}^{mix} = a_{S,1}^{cat-mix} + a_{S,1}^{ana-mix} = \varphi_1 * \frac{a_G^{coup}}{\Delta_{cat} G_1} + \alpha_1 * \frac{\gamma_X}{\gamma_{S,1}}}$$
$$\boxed{a_{S,2}^{mix} = a_{S,2}^{cat-mix} + a_{S,2}^{ana-mix} = \varphi_2 * \frac{a_G^{coup}}{\Delta_{cat} G_2} + \alpha_2 * \frac{\gamma_x}{\gamma_{S,2}}} \quad (3.31)$$

Donde podemos escribir la reacción para la formación de biomasa como:

$$a_{S,1}^{mix} S_1 + a_{S,2}^{mix} S_2 + a_N^{mix} N_{fuente} + \cdots + 1\, X + a_C^{mix} CO_2 + a_W^{mix} H_2O = 0 \quad (3.32)$$

3.2.3 Síntesis de producto no catabólico en un proceso con múltiples sustratos

Similar al proceso anabólico para la producción de biomasa, la síntesis de producto no catabólico se puede describir para cada uno de los sustratos involucrados en el proceso.

$$-b_{S,1}^{ana} S_1 + b_{N,1}^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\, Producto + b_{C,1}^{ana} CO_2 + b_{W,1}^{ana} H_2O = 0$$
$$-b_{S,2}^{ana} S_2 + b_{N,2}^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\, Producto + b_{C,2}^{ana} CO_2 + b_{W,2}^{ana} H_2O = 0 \quad (3.33)$$

Considerando la producción de un mol de producto, una porción de este debe ser producido a partir del sustrato 1 y la porción restante debe ser producida a partir del sustrato 2.

$$\beta_1 * (-b_{S,1}^{ana} S_1 + b_{N,1}^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\, Producto + b_{C,1}^{ana} CO_2 + b_{W,1}^{ana} H_2O = 0)$$
$$\beta_2 * (-b_{S,2}^{ana} S_2 + b_{N,2}^{ana} N_{fuente} + \cdots + 1\, Producto + b_{C,2}^{ana} CO_2 + b_{W,2}^{ana} H_2O = 0) \quad (3.34)$$

$$\beta_1 + \beta_2 = 1 \quad (3.35)$$

Donde β_1 y β_2 son las moles de producto producida a partir del sustrato 1 y 2 por mol de producto total respectivamente. Para el caso de un proceso con más de dos sustratos, se puede obtener:

$$\sum_i \beta_i = 1 \quad (3.36)$$

A partir de las ecuaciones (3.34) y (3.35), la cantidad de cada sustrato invertido en el anabolismo para la síntesis de producto anabólico en un proceso con múltiples sustratos es:

$$b_{S,1}^{ana-mix} = \beta_1 * b_{S,1}^{ana} = \beta_1 * \frac{\gamma_P}{\gamma_{S,1}}$$
$$b_{S,2}^{ana-mix} = \beta_2 * b_{S,1}^{ana} = \beta_2 * \frac{\gamma_P}{\gamma_{S,2}} \quad (3.37)$$

A partir de estos valores, se puede estimar la cantidad de energía requerida para el proceso de síntesis de producto anabólico como:

$$\Delta_R G_{theor}^{mix} = \beta_1 * \Delta_{theor} G_1 + \beta_2 * \Delta_{theor} G_2 \quad (3.38)$$

Al igual que en el caso de un solo sustrato, se determina si el valor de $\Delta_R G_{theor}^{mix}$ es lo suficientemente negativo como para que el proceso no requiera energía adicional (ver sección 1.1.2). En caso de que se requiera energía adicional del catabolismo, esta se puede calcular para cada sustrato de forma similar a la ecuación (3.30):

$$b_{S,1}^{cat-mix} = \varphi_1 * \frac{\Delta_{theor} G_{tot}}{\Delta_{cat} G_1 * \eta} \left[\frac{mol_{S,1}}{mol_P}\right]$$
$$b_{S,2}^{cat-mix} = \varphi_2 * \frac{\Delta_{theor} G_{tot}}{\Delta_{cat} G_2 * \eta} \left[\frac{mol_{S,2}}{mol_P}\right] \quad (3.39)$$

Luego, considerando la fuerza impulsora termodinámica del proceso, obtenemos que para cada sustrato:

$$b_{S,1}^{TDF-mix} = \varphi_1 * \frac{TDF}{\Delta_{cat} G_1 * \eta} \left[\frac{mol_{S,1}}{mol_P}\right]$$
$$b_{S,2}^{TDF-mix} = \varphi_2 * \frac{TDF}{\Delta_{cat} G_2 * \eta} \left[\frac{mol_{S,2}}{mol_P}\right] \quad (3.40)$$

Finalmente, la cantidad de cada sustrato consumida en el proceso de síntesis de producto no catabólico es:

$$\boxed{b_{S,1}^{mix} = \varphi_1 * \frac{\Delta_{theor} G_{tot}}{\Delta_{cat} G_1 * \eta} + \beta_1 * \frac{\gamma_P}{\gamma_{S,1}} + \varphi_1 * \frac{TDF}{\Delta_{cat} G_1 * \eta}}$$
$$\boxed{b_{S,2}^{mix} = \varphi_2 * \frac{\Delta_{theor} G_{tot}}{\Delta_{cat} G_2 * \eta} + \beta_2 * \frac{\gamma_P}{\gamma_{S,2}} + \varphi_2 * \frac{TDF}{\Delta_{cat} G_2 * \eta}} \quad (3.41)$$

De esta manera, podemos escribir la reacción de síntesis de producto no catabólico (P) como:

$$b_{S,1}^{mix} S_1 + b_{S,2}^{mix} S_2 + b_N^{mix} N_{fuente} + \cdots + 1\,P + b_C^{mix} CO_2 + b_W^{mix} H_2O = 0 \quad (3.42)$$

3.2.4 Mantenimiento celular en procesos con múltiples sustratos

De acuerdo con lo planteado en la sección 1.1.2, la energía requerida para el mantenimiento celular depende principalmente de la temperatura del proceso. Por lo tanto, la cantidad de cada sustrato que se requiere en el catabolismo para suplir el mantenimiento celular se puede definir como:

$$\boxed{m_{S,1}^{mix} = \varphi_1 * \frac{m_G}{\Delta_{cat}G_1 * \eta}}$$
$$\boxed{m_{S,2}^{mix} = \varphi_2 * \frac{m_G}{\Delta_{cat}G_2 * \eta}} \quad (3.43)$$

Nuevamente, los valores de φ_1 y φ_2 representan la fracción de la energía requerida para el mantenimiento celular (m_G) que se satisface por el catabolismo del sustrato 1 y 2, respectivamente.

3.2.5 Consideraciones generales para los parámetros α_i, β_i y φ_i

Como se observa en las secciones anteriores, los parámetros α_i, β_i y φ_i representan las contribuciones que tiene cada sustrato en la formación de una c-mol de biomasa, la formación de un mol de producto no catabólico, y la contribución del catabolismo del sustrato *i* en los diferentes procesos celulares, respectivamente. De acuerdo con la revisión realizada en la sección 1.1.3, estos parámetros pueden depender principalmente de la naturaleza de los sustratos utilizados $(\gamma_{S,i}, c_{S,i})$, la concentración de alimento de estos en el medio $(x_{S,i})$, las rutas metabólicas utilizadas para su asimilación, la naturaleza de la biomasa (γ_X), la naturaleza del producto no catabólico de interés (γ_P), y la velocidad de crecimiento de la biomasa (μ).

La naturaleza de cada sustrato determina la cantidad de carbono, electrones y energía que cada uno de estos puede aportar a los diferentes procesos celulares. El uso de un sustrato que aporte mayor energía por mol de carbono permitirá que otros se aprovechen más para llevar a cabo otros procesos celulares, disminuyendo su participación en el catabolismo. Por otra parte, sustratos que debido a su estructura permitan una fácil asimilación y obtención de intermediarios metabólicos, serán mayormente aprovechados para la generación de biomasa y otros productos.

Así mismo, la disponibilidad de cada sustrato determinará cómo el microorganismo adecuará su metabolismo para maximizar la producción de biomasa. Esto se observará principalmente en el parámetro α_i, en donde será mayor para aquel sustrato que se

encuentre más abundante para ser consumido. Esto, sin embargo, también estará sujeto a la preferencia que tenga la célula de consumir un sustrato u otro, dando lugar a los patrones de crecimiento diaúxico o simultaneo.

Las rutas metabólicas utilizadas para la asimilación de cada sustrato definen cuanta energía y electrones son posibles de obtener y cuanta energía es necesaria para producir los intermediarios necesarios para los otros procesos celulares. Esto permite definir aquellos sustratos que tendrán un mayor aporte tanto en el catabolismo como en el anabolismo. Adicionalmente, gracias a las herramientas de biología molecular, es posible realizar modificaciones en el metabolismo que nos permita favorecer determinada distribución de acuerdo con lo que se requiera.

Finalmente, la velocidad de crecimiento de biomasa define a nivel general la velocidad en la que se dan los procesos celulares y cuáles de estos predominan más en el metabolismo. No obstante, debido a que cada enzima que participa en la asimilación de cada sustrato posee una capacidad limitada para llevar a cabo su proceso, la velocidad de crecimiento de biomasa puede llegar a valores que hagan que se alcance la máxima capacidad de estas enzimas. Se ha evidenciado que, para sostener una velocidad de crecimiento mayor, las células redistribuyen sus flujos metabólicos y pueden pasar del consumo simultáneo de varios sustratos al consumo preferencial de uno sólo [43], [45], [48]. Esto se vería reflejado en los valores de los parámetros α_i, β_i y φ_i, en donde el valor de estos sería igual a 1 para el sustrato que presente este consumo preferencial, y se obtendría nuevamente el modelo de caja negra para un único sustrato planteado por Heijnen.

Por lo tanto, los parámetros α_i, β_i y φ_i se pueden definir como una función de:

$$\alpha_i = f\left(\gamma_{S,i}, \gamma_X, c_{S,i}, x_{S,i}, \mu\right) \tag{3.44}$$

$$\beta_i = f\left(\gamma_{S,i}, \gamma_P, c_{S,i}, x_{S,i}, \mu\right) \tag{3.45}$$

$$\varphi_i = f\left(\gamma_{S,i}, c_{S,i}, x_{S,i}, \mu\right) \tag{3.46}$$

3.2.6 Modelo de caja negra para el proceso de producción de etilenglicol a partir de glicerol y metanol.

Siguiendo el análisis planteado hasta ahora para la construcción de un modelo de caja negra para múltiples sustratos, es posible construir un modelo que represente la producción de etilenglicol a partir de glicerol y metanol. Para esto, se utilizarán como reacciones catabólicas que utilizan como aceptor de electrones el oxígeno (ver Tabla 3-1, caso 2; y Tabla 3-3, caso 2).

Para el proceso de producción de biomasa, se utilizan los parámetros a_S^{ana} calculados para cada sustrato (ver ecuaciones (3.1) y (3.6)) y la demanda energética para la síntesis de biomasa a partir de estos (ver ecuaciones (3.2) y (3.7)). Por otra parte, para el proceso de síntesis de etilenglicol se considera los parámetros b_S^{ana} calculados para cada sustrato (ver ecuaciones (3.3) y (3.8)) y la energía libre de Gibbs de cada reacción teórica (ver ecuaciones (3.4) y (3.9)). Finalmente, la demanda energética para llevar a cabo los procesos de mantenimiento se calcula para una temperatura de 298.15 (ver ecuación (3.5) o (3.10)).

A partir de esta información y de las ecuaciones propuestas en las secciones 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 y 3.2.5, podemos obtener las siguientes expresiones.

$$a_G^{coup} = \frac{1}{\alpha_1 \frac{1}{428.06} + \alpha_2 \frac{1}{698.23}} \left[\frac{kJ}{Cmol_X}\right] \tag{3.47}$$

$$\Delta_R G_{theor}^{mix} = -0.987\,\beta_1 + 14.21\,\beta_2 \left[\frac{kJ}{mol_{EG}}\right] \tag{3.48}$$

$$a_{glicerol}^{mix} = \varphi_1 * \frac{a_G^{coup}}{1643.16} + 0.3\,\alpha_1 \left[\frac{mol_{glicerol}}{Cmol_X}\right] \tag{3.49}$$

$$a_{metanol}^{mix} = \varphi_2 * \frac{a_G^{coup}}{693.33} + 0.7\,\alpha_2 \left[\frac{mol_{metanol}}{Cmol_X}\right] \tag{3.50}$$

$$b_{glicerol}^{mix} = \varphi_1 * \frac{\Delta_R G_{theor}^{mix}}{1643.16 * \eta} + 0.714\,\beta_1 + \varphi_1 * \frac{TDF}{1643.16 * \eta}\ \left[\frac{mol_{glicerol}}{mol_{EG}}\right] \quad (3.51)$$

$$b_{metanol}^{mix} = \varphi_2 * \frac{\Delta_R G_{theor}^{mix}}{693.33 * \eta} + 1.667\,\beta_2 + \varphi_2 * \frac{TDF}{693.33 * \eta}\ \left[\frac{mol_{metanol}}{mol_{EG}}\right] \quad (3.52)$$

$$m_{s,glicerol}^{mix} = \varphi_1 * \frac{4.5635}{1643.16 * \eta}\ \left[\frac{mol_{glicerol}}{Cmol_X \cdot h}\right] \quad (3.53)$$

$$m_{s,metanol}^{mix} = \varphi_2 * \frac{4.5635}{693.33 * \eta}\ \left[\frac{mol_{metanol}}{Cmol_X \cdot h}\right] \quad (3.54)$$

Una vez definidos los valores de α_i, β_i y φ_i para cada sustrato, la velocidad especifica de consumo de cada sustrato por parte de la biomasa es:

$$q_{glicerol} = a_{glicerol}^{mix} * \mu + b_{glicerol}^{mix} * q_p + m_{s,glicerol}^{mix} \quad (3.55)$$

$$q_{metanol} = a_{metanol}^{mix} * \mu + b_{metanol}^{mix} * q_p + m_{s,metanol}^{mix} \quad (3.56)$$

Finalmente, se puede obtener la velocidad específica de consumo de los otros componentes que participan en el proceso y así establecer la estequiometría total del proceso.

$$\begin{aligned}\left(\frac{q_{glicerol}}{q_P}\right) C_3H_8O_3 + \left(\frac{q_{metanol}}{q_P}\right) CH_4O + \left(\frac{q_N}{q_P}\right) NH_4^+ + \left(\frac{q_H}{q_P}\right) H^+ \\ + \left(\frac{q_O}{q_P}\right) O_2 + \left(\frac{q_C}{q_P}\right) CO_2 + \left(\frac{q_W}{q_P}\right) H_2O + \left(\frac{\mu}{q_P}\right) CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} \\ + C_2H_6O_2\end{aligned} \quad (3.57)$$

3.3 Reconstrucción y análisis de los modelos metabólicos

Los tres modelos metabólicos seleccionados de la base de datos BiGG sirvieron para evaluar diferentes escenarios para la producción de etilenglicol a partir de glicerol y

metanol. Debido a que existen diferentes mecanismos tanto para el consumo de glicerol y metanol, como para la producción biológica de etilenglicol, se hace una breve descripción de los mecanismos utilizados para cada caso en los modelos metabólicos considerados.

3.3.1 Rutas metabólicas para el consumo de glicerol

Para los tres modelos base seleccionados se encontró que estos poseen diferentes rutas metabólicas que asocian el uso de glicerol a diferentes procesos como la glucólisis, metabolismo de ácidos grasos entre otros. En el presente proyecto se tiene especial interés en aquellas rutas que involucran el consumo de glicerol desde un entorno extracelular hacia el metabolismo de carbono central, ya que es a partir de este en donde el carbono que ingresa al sistema puede ser distribuido a los diferentes subprocesos para la producción de biomasa y la producción de etilenglicol.

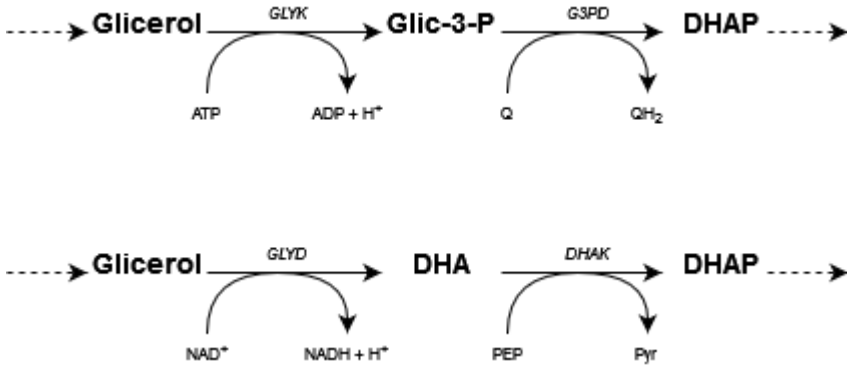
De entre todas las rutas posibles para el consumo de glicerol, se consideraron principalmente dos de ellas que se encuentran ampliamente reportadas en los microorganismos de interés (Tabla A-1):

- **Ruta oxidativa para la asimilación de glicerol:** Esta ruta se caracteriza por el uso de la enzima glicerol kinasa (GLYK), la cual utiliza ATP para fosforilar el glicerol intracelular y producir glicerol 3-fosfato (Glic-3-P). Bajo condiciones aeróbicas, el glicerol 3-fosfato es transportado hacia una enzima denominada glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PD) para ser convertido en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), el cual es incorporado dentro de las rutas del carbono central. Para el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, el Glic-3-P es transportado hacia la mitocondria para ser transformado en DHAP (Figura 3-6, arriba).

- **Ruta reductiva para la asimilación de glicerol:** Esta ruta se da principalmente en *Escherichia coli K-12* cuando la enzima glicerol kinasa es desactivada. En este caso, el glicerol es oxidado mediante la enzima glicerol deshidrogenasa (GLYD) para producir dihidroxiacetona (DHA). Esta última puede ser fosforilada mediante una dihidroxiacetona kinasa (DHAK) para producir dihidroxiacetona fosfato. Esta

última enzima utiliza el fosfoenolpiruvato (PEP) como donador del grupo fosfato. Sin embargo, otras versiones de esta enzima en otros microrganismos utilizan el ATP como donador de grupo fosfato (Figura 3-6, abajo).

Figura 3-6: Rutas metabólicas seleccionadas para el consumo de glicerol. Arriba: Ruta oxidativa. Abajo: Ruta reductiva.



Creación propia.

3.3.2 Rutas metabólicas para el consumo de metanol

Entre los modelos metabólicos seleccionados, el modelo iMT1026 (*P. pastoris*) es el único que tiene incorporada una ruta de asimilación de metanol al metabolismo central. Por esta razón se realizó una revisión bibliográfica de las posibles rutas alternativas que pueden se agregadas a los modelos iML1515 (*E. coli*) e iND750 (*S. cerevisiae*) para permitir el consumo de metanol en estos [83]–[86] (Tabla A-1). A continuación, se hace una breve descripción de las rutas seleccionadas:

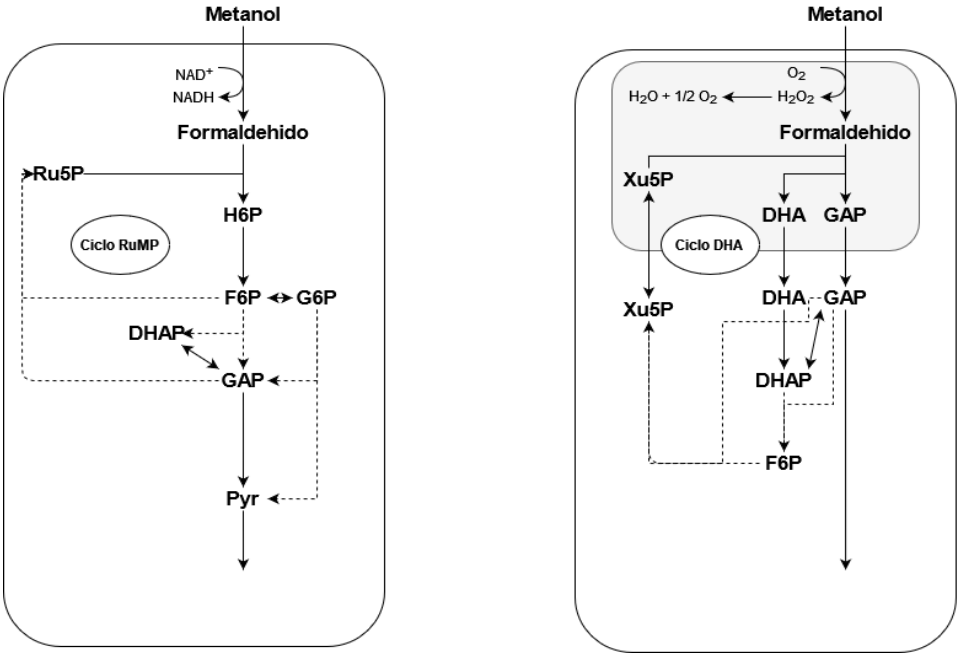
- **Ruta dependiente de metanol deshidrogenasa:** Esta ruta se caracteriza por el uso de la enzima metanol deshidrogenasa (EC 1.1.1.244), la cual es una enzima característica de los microorganismos metilotrofos. Esta enzima utiliza el NAD^+ como aceptor de electrones para dar paso a la formación de formaldehido. Esta última molécula puede ser posteriormente utilizada en una ruta asimilatoria para formar los compuestos necesarios para la biosíntesis de biomasa o en una ruta desasimilatoria para obtener mayor energía.

- **Ruta dependiente de alcohol oxidasa:** Esta ruta se da principalmente en el peroxisoma de eucariotas metilotrofos. Se caracteriza por el uso de la enzima alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13) la cual utiliza oxígeno como aceptor de electrones dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno y formaldehido. Similar al caso anterior, el formaldehido puede ser utilizado en rutas asimilatorias o desasimilatorias pero el peróxido de hidrógeno debe ser degradado por la enzima catalasa (EC 1.11.1.6/1.11.1.21) debido a que este es tóxico para la célula.

Existen varias rutas asimilatorias para el formaldehido generado y estas pueden variar dependiendo del microorganismo considerado. Para este estudio, se consideraron dos rutas principales las cuales se encuentran relacionadas a microorganismos procariontes y eucariontes, respectivamente (Figura 3-7).

- La primera ruta se denota como el ciclo de Ribulosa monofosfato (ciclo RuMP) (Figura 3-7, izquierda), la cual se caracteriza por la condensación de una molécula de formaldehido con una de D-Ribulosa 5-fosfato (Ru5P) mediante la enzima Hexulosa 6-fosfato sintasa (EC 4.1.2.43) para formar Hexulosa 6-fosfato (H6P). Esta molécula es posteriormente transformada en Fructosa 6-fosfato (F6P) mediante la enzima Hexulosa 6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.27). A partir de este punto, la fructosa 6-fosfato es transformada hasta obtener 2 moléculas de tres carbonos, en donde una de estas debe ser el gliceraldehido 3-fosfato (GAP). Para esto, el flujo de carbono puede ser dirigido a través de la glicolisis hasta la formación de dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehido 3-fosfato; o mediante la ruta de Entner-Doudoroff que da lugar a la formación de piruvato (Pyr) y gliceraldehido 3-fosfato. Una vez obtenido el gliceraldehido 3-fosfato, este es redirigido mediante la ruta no oxidativa de pentosas fosfato para regenerar la D-Ribulosa 5-fosfato utilizada inicialmente, cerrando así el ciclo. Por cada 3 moléculas de formaldehido que son condensadas, una molécula de dihidroxiacetona fosfato o de piruvato es generada [67], [76], [77].

Figura 3-7: Rutas metabólicas seleccionadas para el consumo de metanol. Izquierda: Ruta dependiente de metanol deshidrogenasa y ciclo RuMP. Derecha: Ruta dependiente de alcohol oxidasa y ciclo DHA.



Creación propia.

- La segunda ruta considerada es el ciclo de dihidroxiacetona (ciclo DHA) (Figura 3-7, derecha), el cual se encuentra ampliamente presente en microorganismos eucariontes del género *Pichia* y *Candida*. En esta ruta, la enzima dihidroxiacetona sintasa (EC 2.2.1.3) transfiere un grupo glicolaldehido de la xilulosa 5-fosfato (Xu5P) al formaldehido formando así dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehido 3-fosfato. Estos productos posteriormente salen del peroxisoma hacia el citoplasma y luego pasan por una serie de reacciones a través de la ruta de pentosas fosfato para regenerar la xilulosa 5-fosfato utilizada y, por cada tres ciclos, generar una molécula de gliceraldehido 3-fosfato que puede ser utilizada para los procesos biosíntesis [67], [76], [77].

3.3.3 Rutas de biosíntesis de etilenglicol

Con base en las rutas metabólicas reportadas en la literatura, se seleccionaron dos rutas descritas como la ruta dependiente de serina (SDP) y la ruta dependiente de pentosas 1-fosfato (P1PDP). Estas rutas se seleccionaron debido a su aparente facilidad de ser

incorporadas al metabolismo del carbono central, lo que permitiría una vía para la producción del etilenglicol a partir del glicerol y el metanol. En la Tabla A-2 se puede encontrar más información acerca de los genes asociados a estas rutas de biosíntesis. A continuación, se hace una breve descripción de cada ruta evaluada:

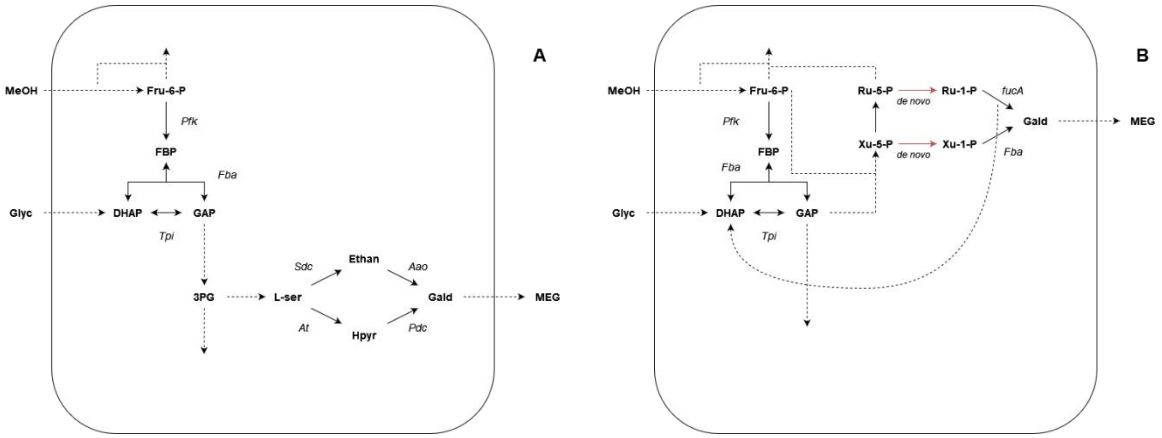
- **Ruta dependiente de serina (SDP):** La ruta dependiente de serina, como su nombre lo indica, se caracteriza por el uso del aminoácido L-serina (L-ser) como precursor para la producción de etilenglicol (Figura 3-8, A). En esta ruta, la L-serina es transformada en glicolaldehido (Gald), el precursor del etilenglicol, mediante dos vías diferentes. La primera vía implica el uso de una transaminasa (EC 2.6.1.-) que facilita la desaminación de la L-serina para la producción de hidroxipiruvato (Hpyr), el cual es posteriormente descarboxilado mediante la enzima hidroxipiruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.40). El hidroxipiruvato también puede ser obtenido mediante la hidrolización del grupo fosfato del 3-fosfo hidroxipiruvato (EC no reportado). En la segunda vía, la L-serina es descarboxilada mediante la enzima serina descarboxilasa (EC 4.1.1.-), para producir etanolamina (Ethan) que es posteriormente desaminada mediante la enzima etanolamina oxidasa (EC 1.4.3.8). Esta última vía se caracteriza por el uso de oxígeno molecular y la producción de peróxido de hidrógeno el cual deberá ser eliminado posteriormente por la célula debido a su toxicidad. Dependiendo del aceptor de electrones que se esté utilizando para el proceso, el uso de una vía resultará más apropiado para representar los modelos de caja negra propuestos anteriormente.

  Una vez obtenido el glicolaldehido, este es reducido mediante la enzima glicolaldehido reductasa (EC 1.1.1.77 / 1.1.1.2) para obtener el etilenglicol (MEG). Se han registrado diferentes versiones de esta enzima que utilizan NADH o NADPH como cofactores.

- **Ruta dependiente de pentosas-1-fosfato (P1PDP)*:*** La ruta dependiente de pentosas-1-fosfato se destaca por el uso de pentosas-1-fosfato como xilulosa-1-fosfato (Xu1P), ribulosa-1-fosfato (Ru1P), entre otros, para la producción de etilenglicol (Figura 3-8, B). Adicionalmente, esta ruta genera como producto

secundario dihidroxiacetona fosfato (DHAP), la cual puede ser aprovechada en la glicolisis para la producción de energía o para la generación de más producto. Si bien esta ruta metabólica es de las más estudiadas para la producción de etilenglicol, esta se limita al uso de azucares de cinco carbonos como la xilosa, la arabinosa, entre otros. Esto debido a que las pentosas-1-fosfato requeridas sólo se pueden producir naturalmente mediante estos sustratos. Por esta razón, en el presente proyecto se propone evaluar una reacción *De novo* que permita unir las rutas del metabolismo central y la P1PDP con el fin de poder usar el glicerol y el metanol como sustratos para la producción de etilenglicol mediante esta ruta. Esta reacción tiene como objetivo la conversión de una pentosa-5-fosfato, como la ribulosa-5-fosfato o la xilulosa-5-fosfato, en sus respectivos isómeros con el grupo fosfato en el carbono 1. Esta reacción es similar a la llevada a cabo por la enzima fosfopentomutasa (EC 5.4.2.7), en donde la D-ribosa-5-fosfato es convertida en D-ribosa-1-fosfato [87], [88]. Por lo tanto, se pueden explorar estrategias de ingeniería de proteínas para la expresión de una enzima con las características necesarias para llevar a cabo esta reacción hipotética.

Figura 3-8: Rutas metabólicas seleccionadas para la producción biológica de etilenglicol. A: Ruta dependiente de serina. B: Ruta dependiente de pentosas 1-fosfato.



Creación propia.

3.3.4 Análisis de los modelos metabólicos construidos

Una vez obtenidos los tres modelos metabólicos con las respectivas modificaciones para considerar la producción de etilenglicol a partir del consumo de glicerol y metanol, se realizó para cada uno de estos un análisis de balance de flujos con el fin de evaluar que cada modelo metabólico tenga la capacidad de representar el proceso y obtener sus respectivos rendimientos. Debido a que se tiene interés en que cada microorganismo consuma el glicerol y el metanol presente de forma simultánea, se evaluó como variaba la producción de etilenglicol a diferentes proporciones de glicerol y metanol consumido. Para esto se consideró inicialmente la entrada de 40 milimoles de carbono por gramo de biomasa seca por hora (40 mmol-C gDW-1 h-1) que se reparten entre el glicerol y el metanol que ingresan en los modelos. Adicionalmente, se eliminó la restricción en el consumo de oxígeno por parte de los modelos para representar un proceso completamente aerobio y se buscó maximizar lo mayor posible el flujo extracelular de etilenglicol para cada caso. Posteriormente, se calculó el rendimiento obtenido para cada escenario evaluado en cada modelo metabólico considerando la cantidad de moles de carbono que terminaron en el producto de interés.

A continuación, se presentan los resultados para cada modelo metabólico considerando las dos rutas de biosíntesis de etilenglicol por separado:

- **Ruta dependiente de Serina:** En la Figura 3-9 se presentan los rendimientos en carbono obtenidos para cada modelo metabólico con la ruta dependiente de serina a distintas proporciones de glicerol y metanol en la entrada. Como se puede observar, el modelo metabólico iML1515 (*E. coli*) presenta un mayor rendimiento en la producción de etilenglicol en comparación a los otros modelos a medida que la proporción de metanol consumido incrementa. Este resultado puede estar asociado a la ruta metabólica seleccionada para representar el consumo de metanol dentro de este modelo, ya que permite la producción de NADH mediante la enzima metanol deshidrogenasa que puede ser utilizado posteriormente para la producción de etilenglicol y en la generación de energía. Esta generación de NADH permite que haya un menor flujo de carbono dirigido hacia las rutas desasimilatorias para la generación de energía y equivalentes reductores, por lo que puede ser mayormente aprovechado en la producción de etilenglicol.

  Por otra parte, para el modelo iND750 (*S. cerevisiae*) se observa una variación leve en el rendimiento de la producción de etilenglicol cuando el consumo de metanol empieza a ser predominante. Debido a que el modelo contempla un consumo de metanol a partir de la enzima alcohol oxidasa, este no llega a producir una gran cantidad de agentes reductores en comparación al modelo iMl1515, haciendo que parte del flujo de carbono sea redireccionado hacia la producción de estos agentes reductores para ser utilizados en la producción de etilenglicol y en la generación de energía.

  Finalmente, para el modelo iMT1026 (*P. pastoris*) se observa que si bien el consumo de una gran proporción de glicerol con metanol aumenta el rendimiento en la producción de etilenglicol frente al rendimiento obtenido cuando solo se consume glicerol, este disminuye a medida que aumenta la proporción de metanol que es consumido frente a la proporción de glicerol. Este resultado puede estar asociado al mecanismo que posee este modelo para consumir el metanol, el cual a diferencia del mecanismo utilizado por el modelo iML1515, no genera equivalentes reductores y los primeros electrones extraídos no se encuentran disponibles. Debido a que el microorganismo debe satisfacer determinadas demandas energéticas y mantener el balance redox, un mayor flujo de carbono

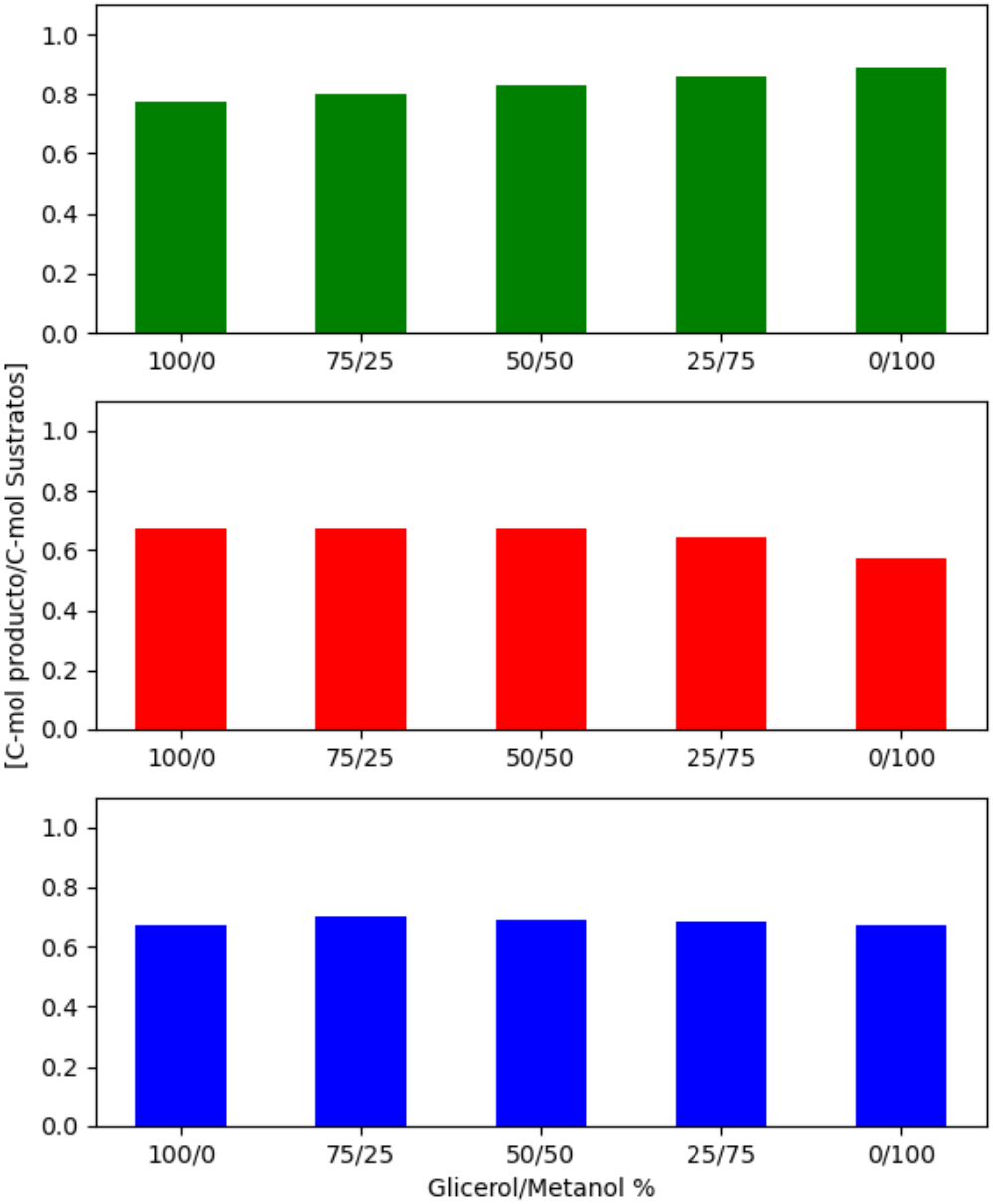
debe ser redireccionado a otros procesos cuando este proviene principalmente del metanol.

- **Ruta dependiente de pentosas 1-fosfato:** Se observó en general para los tres modelos metabólicos que la ruta dependiente de pentosas 1-fosfato presenta mayores rendimientos en comparación a la ruta dependiente de serina (Figura 3-10). Este resultado se hace más evidente para el modelo iML1515 en donde para bajas velocidades de consumo de metanol en comparación al glicerol, el rendimiento en moles de carbono es cercano a la unidad, lo que indicaría que la mayor parte del flujo de carbono que entra al sistema terminaría en el producto deseado.

  No obstante, se evidenció en los flujos extracelulares obtenidos para el modelo iML1515 que a medida que el consumo de metanol incrementaba en el sistema, se empezaba a dar el consumo de CO_2 y por lo tanto el rendimiento calculado era mayor a la unidad (ver Tabla B-4). Este resultado puede explicarse a partir de la cantidad de agentes reductores que se generan dentro del metabolismo debido al consumo de metanol, los cuales generan un desbalance dentro del sistema y por lo tanto requiere la adición de CO_2 para compensar el excedente de agentes reductores y maximizar aún más la producción de etilenglicol.

  Para el caso de los modelos iND750 e iMT1026 se observan comportamientos similares a los observados para estos mismos modelos utilizando la ruta de la serina, resaltando nuevamente la influencia que tiene los mecanismos de consumo de glicerol y metanol en el rendimiento de la producción de etilenglicol y probablemente de otros productos metabólicos.

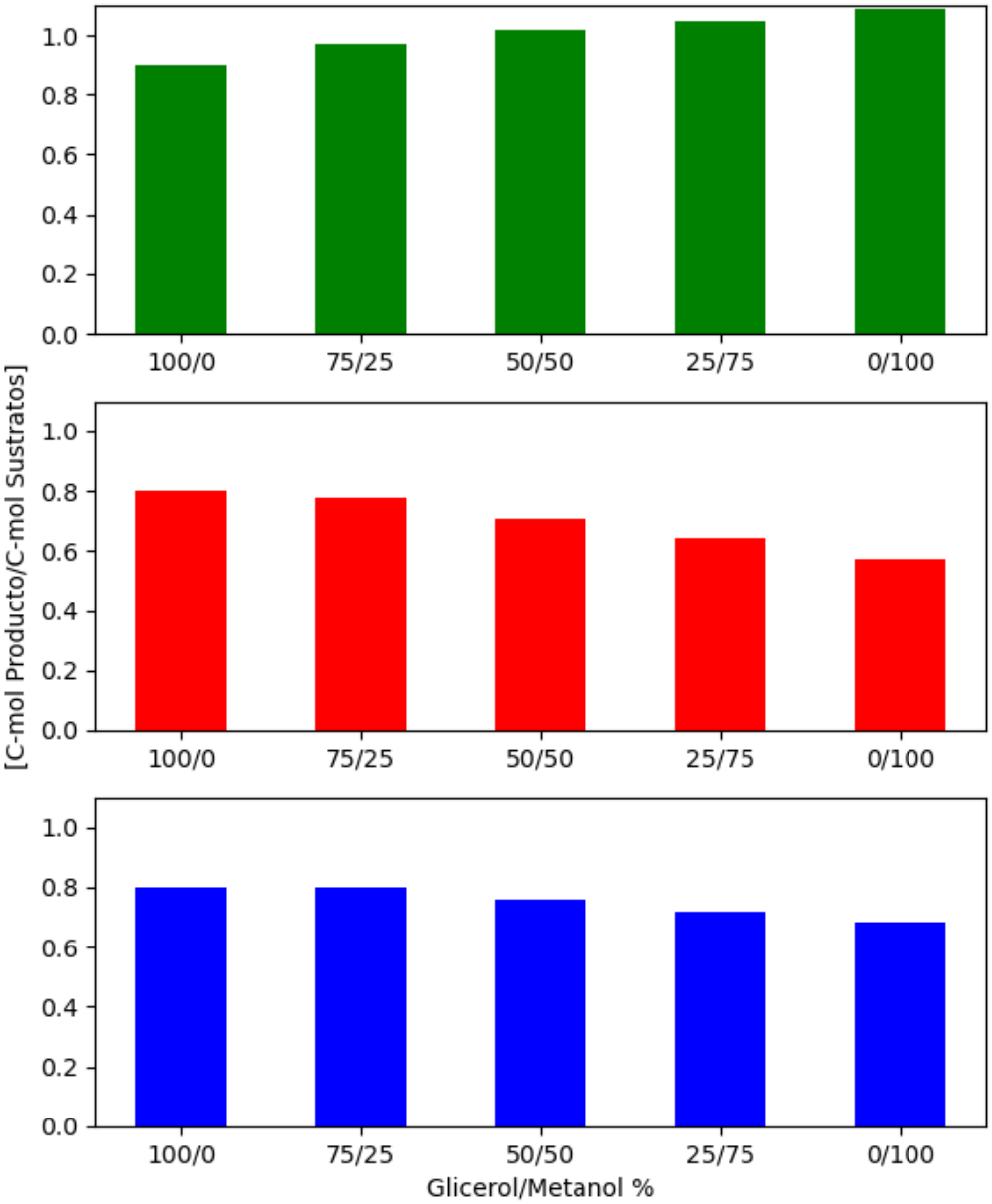
Figura 3-9: Rendimientos obtenidos por mol de carbono consumido para la producción de etilenglicol utilizando la ruta dependiente de serina. Arriba: iML1515 (*E. coli*). Medio: iND750 (*S. cerevisiae*). Abajo: iMT1026 (*P. pastoris*).



100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

Figura 3-10: Rendimientos obtenidos por mol de carbono consumido para la producción de etilenglicol utilizando la ruta dependiente de pentosas 1-fosfato. Arriba: iML1515 (*E. coli*). Medio: iND750 (*S. cerevisiae*). Abajo: iMT1026 (*P. pastoris*).



100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

Para ambos casos se observa como las reacciones involucradas en cada ruta de biosíntesis ejercen un efecto en el rendimiento final del proceso. Para el caso de la ruta SDP, esta posee una reacción que involucra la descarboxilación de un metabolito, obteniéndose así un rendimiento menor en términos de carbono en la producción de etilenglicol al compararse con la ruta P1PDP. Por otra parte, la ruta P1PDP no posee reacciones que incluyan descarboxilaciones, por lo que se aprovecha más el carbono consumido. Sin embargo, esta ruta requiere la formación de azucares de 5 carbonos, lo que resulta demandante energéticamente, y la inclusión de una reacción aún no descrita, para la cual se tendría que hacer estudios con el fin de implementarla en el metabolismo.

3.3.5 Análisis de los intermediarios energéticos generados

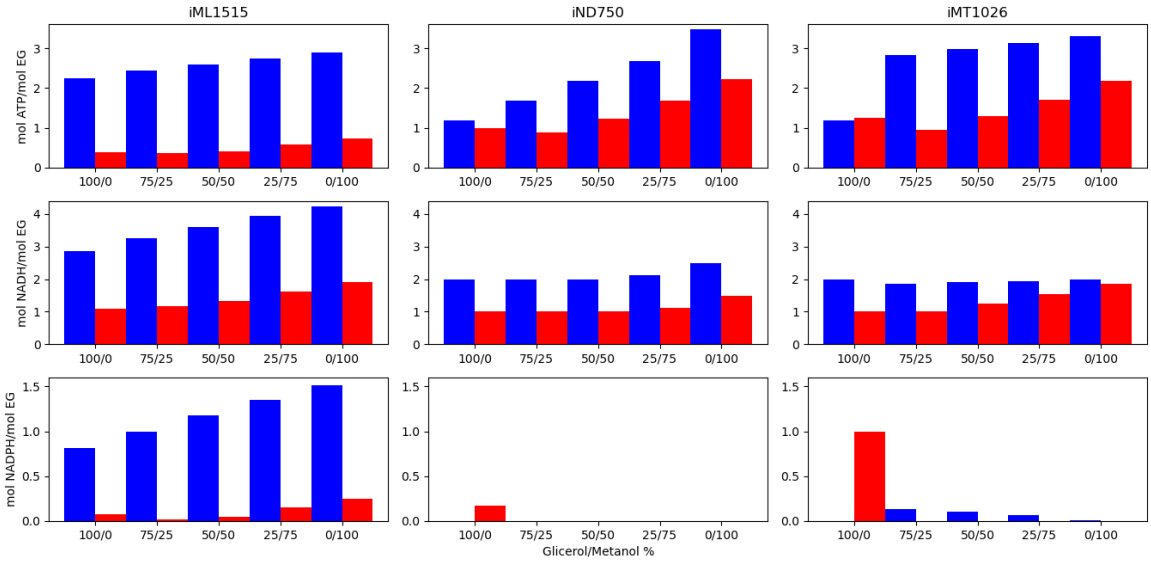
Para cada escenario considerado se evaluó la generación (y a la vez consumo) de intermediarios energéticos como ATP, NADH y NADPH dentro del citosol y se realizó una comparación de estos para cada modelo metabólico y cada ruta de biosíntesis de etilenglicol considerada. Se observó en general que los modelos que utilizan la ruta SDP presentaban una mayor generación de estos cofactores en comparación a los modelos que utilizan la ruta P1PDP para la producción de etilenglicol.

El ATP se puede generar dentro del metabolismo mediante la fosforilación de ADP a nivel de sustrato o mediante la enzima ATPasa a través de un gradiente de concentración de protones generado por la cadena transportadora de electrones. Este último mecanismo genera la mayor parte del ATP celular en condiciones aerobias y utiliza NADH junto con otros agentes reductores para la generación del gradiente de concentración [89]. Usualmente la cantidad de ATP generado depende de la cantidad de ATP requerido por otros procesos celulares, lo que garantiza así un óptimo aprovechamiento energético. Por lo tanto, se buscaría principalmente que la generación del producto de interés requiera un menor consumo de ATP en el organismo, lo que se vería expresado en una menor generación de ATP a la final y por lo tanto el aprovechamiento del NADH y otros cofactores en otros procesos que maximicen la producción.

Para los tres modelos estudiados, se encontró que el modelo iML1515 presenta una menor producción de ATP por mol de etilenglicol producido utilizando la ruta P1PDP, lo que demuestra que este puede llevar a cabo el proceso con el menor gasto energético posible

entre los tres. Los modelos iND750 e iMT1026 presentan una generación de ATP similar para cada escenario de consumo de sustratos cuando se utiliza la ruta P1PDP. Se observa también para los tres modelos la existencia de un posible mínimo en la producción de ATP por mol de etilenglicol producido cuando la relación de consumo de glicerol y metanol es de 75% a 25%, respectivamente.

Figura 3-11: Rendimiento en la generación de los intermediarios principales por mol de etilenglicol generado para los diferentes escenarios estudiados para cada modelo metabólico. Azul: Ruta dependiente de serina. Rojo: Ruta dependiente de pentosas 1-fosfato.



100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

El NADH por su parte puede ser generado por la reducción de diferentes sustratos mediante deshidrogenasas, por vías oxidativas del metabolismo como la glucólisis, por el ciclo de ácidos tricarboxilicos, entre otros [89]. El NADH generado es principalmente utilizado para la generación de energía mediante la cadena transportadora de electrones en procesos aerobios. En procesos anaeróbicos, la generación de energía se da principalmente por la fosforilación de ADP a nivel de sustrato y por lo tanto el NADH

generado debe ser utilizado para reducir intermediarios del metabolismo del carbono central para conservar así el balance redox. El NADH también puede ser utilizado para la producción de NADPH mediante una enzima transhidrogensa si esta se encuentra presente.

Para los presentes modelos, debido a que se evaluó la máxima producción de etilenglicol posible en el metabolismo, una gran parte del NADH generado es consumido por la reacción de reducción del glicolaldehido cuando este cofactor es utilizado como donador de electrones. La otra parte es utilizada principalmente para la generación de energía mediante la cadena transportadora de electrones. Se observa para el modelo iML1515 que la cantidad de NADH producido aumenta a medida que incrementa la proporción de metanol que ingresa al sistema. La cantidad de NADH producido cuando la ruta P1PDP es utilizada es menor en comparación a cuando se utiliza la ruta SDP. Tomando en cuenta que la ruta P1PDP presenta un mayor rendimiento en la producción de etilenglicol a comparación de la ruta SDP, se puede decir que la primera tiene la capacidad de producir una mayor cantidad de etilenglicol con una cantidad menor de NADH, por lo que resulta conveniente desde el punto de vista energético.

Para los modelos iND750 e iMT1026 se observa un patrón similar al visto en el modelo iML1515 en cuanto a la cantidad de NADH por mol de etilenglicol producido cuando se utiliza una ruta u otra. Entre los modelos estudiados, el iND750 presenta la menor producción de NADH por mol de etilenglicol cuando se utiliza la ruta P1PDP. Sin embargo, su rendimiento en la producción de etilenglicol es bajo a comparación del rendimiento obtenido con el modelo iML1515 con la misma ruta. Para el modelo iMT1026 con la ruta SDP, se observa particularmente que la cantidad de NADH generado por mol de etilenglicol disminuye a medida que aumenta la cantidad de metanol que ingresa al sistema.

Finalmente, el NADPH es utilizado principalmente como agente reductor en rutas anabólicas dentro del metabolismo. Este es producido mediante la reducción de $NADP^+$ a través de diferentes rutas como la fase oxidativa de la ruta de pentosas fosfato. Este también puede ser utilizado para la producción de etilenglicol mediante reductasas de aldehídos dependientes de NADPH.

En la Figura 3-11 se puede observar para el caso del modelo iML1515 que la generación de NADPH por mol de etilenglicol incrementa a medida que aumenta la proporción de metanol al considerar la ruta SDP. Este comportamiento se puede explicar a partir de los flujos metabólicos obtenidos para cada escenario, en donde parte de estos se daban a través de la ruta de biosíntesis de aspartato, el cual es posteriormente convertido en treonina y posteriormente en glicina. Esta última es utilizada para la generación de serina a través de la enzima Glicina hidroximetil transferasa (EC 2.1.2.1). El NADPH requerido para esta ruta se obtiene a través de la enzima transhidrogenasa (EC 1.6.1.1) utilizando NADH como donador de electrones (Datos no presentados).

Por otra parte, al considerar la ruta P1PDP, se observa en la Figura 3-11 cómo la generación de NADPH es mucho menor en comparación a la dada por la ruta SDP. Al evaluar los flujos metabólicos utilizando la ruta P1PDP, se observa que una menor parte de estos se dan en rutas alternas que requieran el uso de NADPH. Por lo tanto, al considerar la producción de etilenglicol utilizando la ruta P1PDP y el NADH como donador final de electrones para la reducción de glicolaldehido a etilenglicol, la cantidad de NADPH involucrada en el proceso será mínima. Sin embargo, se espera que al utilizar el NADPH como donador final de electrones para la reducción de glicolaldehido a etilenglicol, el rendimiento en la generación de NADPH por mol de etilenglicol sea mucho mayor.

Para los modelos iND750 e iMT1026, se observa una generación poco apreciable o nula de este intermediario para ambas rutas de biosíntesis en todos los escenarios considerados a excepción del modelo iMT1016 cuando se considera el consumo de glicerol y la ruta P1PDP, en donde los niveles de NADPH generado se asemejan a aquellos observados en el modelo iML1515 utilizando la ruta SDP.

Considerando el rendimiento obtenido para la producción de etilenglicol en ambas rutas metabólicas y el rendimiento en la generación de los intermediarios principales del metabolismo, se optó por continuar con los análisis posteriores (Efecto de la velocidad de crecimiento, análisis termodinámico de las rutas de biosíntesis y distribución óptima de concentraciones para los metabolitos considerados) utilizando únicamente el modelo

iML1515. Esto además simplifica este análisis dado a que este modelo representa un microorganismo simple en comparación a los otros dos ya evaluados.

3.3.6 Efecto de la velocidad de crecimiento en la producción de etilenglicol

Una vez establecida la máxima cantidad de producto que se puede obtener a las diferentes condiciones de consumo de glicerol y metanol, el siguiente paso es evaluar cómo la velocidad de crecimiento llega a impactar la producción de etilenglicol. Para esto, se realiza un análisis de sensibilidad en el que se evalúa la máxima producción de etilenglicol a diferentes valores de la velocidad de crecimiento. Esta variación en la velocidad de crecimiento se lleva hasta que la producción de etilenglicol disminuye a cero.

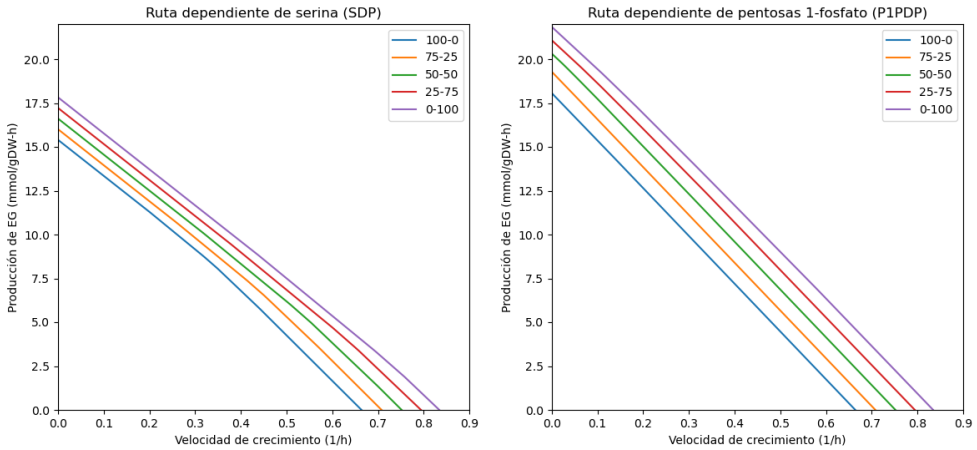
En la Figura 3-12 se puede observar que la producción de etilenglicol compite con la producción de biomasa para todos los casos considerados. Tanto para la ruta SDP como para la ruta P1PDP, se logra alcanzar una máxima producción de etilenglicol cuando la velocidad de crecimiento de biomasa es mínima. Adicionalmente, se observa por una parte como algunas líneas presentan un cambio en su pendiente, lo que indica una redistribución en los flujos metabólicos debido a la velocidad de crecimiento celular establecida y al efecto que tiene el mantenimiento celular a través de su demanda de ATP. Por otra parte, se observa para cada escenario como una mayor proporción de metanol da lugar a una mayor generación de etilenglicol, similar a lo observado en las figuras Figura 3-9 y Figura 3-10.

Estos resultados demuestran cómo la producción de etilenglicol es un proceso completamente desacoplado al crecimiento de biomasa y se da principalmente en condiciones mínimas de crecimiento en dónde los flujos metabólicos son dirigidos hacia la síntesis de este producto.

Debido a que la naturaleza ha evolucionado para favorecer el crecimiento celular, la inserción de genes asociados a la producción de etilenglicol no será suficiente para llevar a cabo este proceso. Por lo tanto, las estrategias de diseño de un microorganismo capaz de producir etilenglicol a partir de glicerol y metanol deben estar enfocadas a la redirección del flujo metabólico hacia la ruta seleccionada mediante la eliminación (*knock-out*) de genes que involucren reacciones que compitan con la producción de etilenglicol, y la

regulación positiva (Up) o negativa (Down) de aquellos genes que favorezcan o no la producción de etilenglicol, respectivamente. Algunos ejemplos sería la eliminación de rutas competitivas como aquellas relacionadas a la producción de etanol, lactato, acetato, entre otros. Por otra parte, se pueden regular algunas reacciones asociadas a las rutas de la glucólisis, pentosas fosfato, fosforilación oxidativa, entre otras para redirigir la mayor parte del flujo metabólico hacia la producción de etilenglicol.

Figura 3-12: Efecto de la velocidad de crecimiento en la producción de etilenglicol para el modelo metabólico de *E. coli* a las diferentes condiciones de consumo de glicerol y metanol.



100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

3.4 Análisis termodinámico del proceso

3.4.1 Análisis termodinámico de las rutas metabólicas seleccionadas para la producción de etilenglicol.

Si bien se observó que las rutas metabólicas evaluadas poseen un gran potencial de ser utilizadas para la producción de etilenglicol, es necesario evaluar la factibilidad termodinámica que cada una de estas tiene para llevar a cabo el proceso. Por esta razón,

se hizo una revisión en base de datos de las diferentes energías libre de Gibbs estándar de cada reacción y se evaluaron cómo estas varían con las condiciones intracelulares que se pueden llegar a encontrar (Tabla 3-6) [80].

Tabla 3-6: Energía libre de Gibbs de las diferentes reacciones metabólicas consideradas para la producción de etilenglicol.

Ruta metabólica	ID	Reacción	Estequiometría	Energía libre de Gibbs estándar [kJ/mol]
SDP	SPAMT	Serina-Piruvato transaminasa	L-Ser + Pyr <=> L-Ala + HPyr	4.2
	HPYRDC	Hidroxipiruvato descarboxilasa	HPyr + H -> GCAld + CO2	-17.6
	SDC	Serina descarboxilasa	L-Ser + H -> CO2 + Etha	-7.8
	AAO	Etanolamina oxidasa	Etha + H2O + O2 -> GCAld + NH4 + H2O2	-101.4
P1PDP	RuPT	Ribulosa-5-fosfato mutasa	Ru5P <=> Ru1P	-1.6
	XuPT	Xilulosa-5-fosfato mutasa	Xu5P <=> Xu1P	-1.6
	RuALD	Ribulosa-1-fosfato aldolasa	Ru1P <=> GCAld + DHAP	12.8
	XuALD	Xilulosa-1-fosfato aldolasa	Xu1P <=> GCAld + DHAP	12.8
Reducción del glicolaldehido	GCALDOR1	Glicolaldehido reductasa (NADH)	GCAld + NADH <=> MEG + NAD+	-20.6
	GCALDOR2	Glicolaldehido reductasa (NADPH)	GCAld + NADPH <=> MEG + NADP+	-20.6

Creación propia.

En la Tabla 3-7 se observan las concentraciones establecidas para algunos metabolitos considerados en este análisis. La concentración de estos metabolitos se mantiene constante durante todo el análisis mientras que las concentraciones de otros metabolitos considerados podrán variar entre 0.001 a 10 mM. Estos valores se obtuvieron principalmente de diferentes fuentes bibliográficas para el microorganismo *Escherichia coli* [37], [69], [90].

Tabla 3-7: Concentración mínima y máxima para cada uno de los metabolitos considerados en el análisis termodinámico.

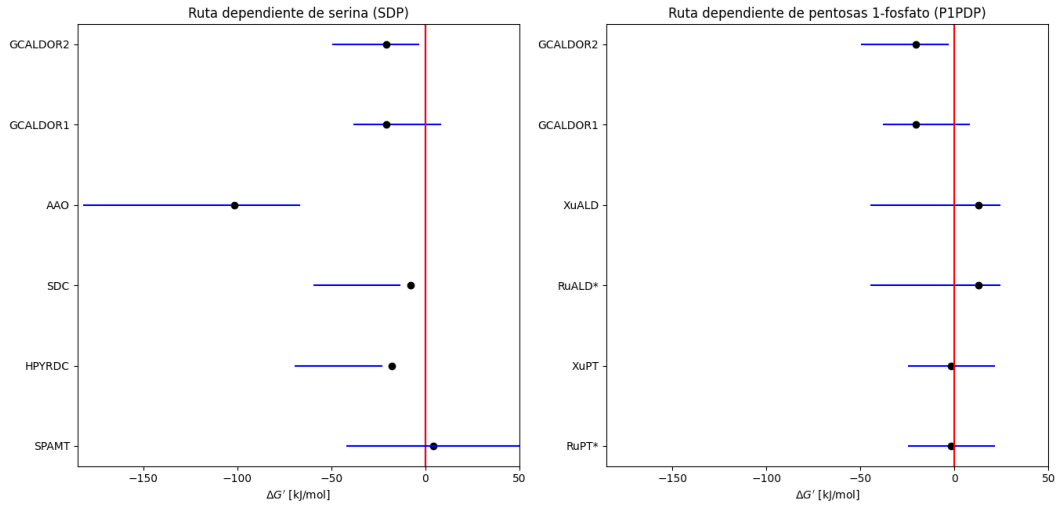
Metabolito	Concentración [mM]
NADH	1
NAD^+	10
NADPH	10
$NADP^+$	1
ATP	3.36
ADP	1.3
Pi	10
CO_2	0.01

Creación propia.

En la Figura 3-13 (Izquierda) se observan los resultados obtenidos para el análisis de factibilidad termodinámica de la ruta SDP. En ella, se observa que la mayoría de las reacciones presentan valores menores que cero para $\Delta_r G_{min}$ y $\Delta_r G_{max}$, lo que indica que, para el amplio espectro de concentraciones considerado, estas reacciones se darán principalmente en el sentido descrito por la estequiometría propuesta. Inclusive para valores altamente negativos, estar reacciones se pueden considerar irreversibles. No obstante, se observa que para la reacción “Serina-Piruvato transaminasa” (SPAMT), el valor $\Delta_r G_{max}$ llega a ser positivo, lo que indica que existen distribuciones de concentraciones que pueden hacer que la energía libre de Gibbs de esta reacción llegue a ser positiva, haciendo que esta se desarrolle en sentido contrario al propuesto por la estequiometría y creando un cuello de botella en la ruta.

Así mismo se observa en los resultados obtenidos para la ruta P1PDP que el rango de valores de $\Delta_r G$ va desde valores negativos a valores positivos, lo que indica que la energía libre de Gibbs para estas reacciones puede tomar valores tales que estas pueden llevarse a cabo en ambas direcciones y presentan la posibilidad de generar cuellos de botella (Figura 3-13, derecha).

Figura 3-13: Resultados del análisis de factibilidad termodinámica para la ruta dependiente de serina y la ruta de pentosas 1-fosfato. Línea azul: Rango de valores de la energía libre de Gibbs. Punto (•): Energía libre de Gibbs estándar de la reacción.



Creación propia.

A partir de los resultados anteriores se resalta la importancia de garantizar las condiciones intracelulares apropiadas que permitan llevar a cabo cada reacción en la dirección deseada. Esto se puede lograr estableciendo una distribución de concentraciones para los metabolitos involucrados a través de la modificación de algunas velocidades de reacción en la ruta considerada. Estas modificaciones se pueden lograr a través de una mayor o menor expresión de los genes asociados a reacciones como HPYRDC, AAO, GCALDOR, entre otros; o a través de una modificación de estos genes que permita cambiar algunas características de las enzimas asociadas tales como su afinidad al sustrato, capacidad catalítica, entre otras.

3.4.2 Distribución óptima de concentraciones

Para la determinación de las condiciones necesarias para dar lugar a la producción de etilenglicol mediante las distintas rutas de biosíntesis, se seleccionaron para cada caso un conjunto de reacciones que representan el flujo de carbono desde el consumo de glicerol y metanol, hasta la producción final de etilenglicol. En estos se encuentran incluidas la ruta reductiva para la asimilación de glicerol y la ruta dependiente de metanol deshidrogenasa junto al ciclo RuMP. Para el estudio de la ruta SDP, se incluyen las reacciones de la glucólisis entre el gliceraldehido 3-fosfato hasta el 3-fosfo glicerato, la ruta de biosíntesis

de L-serina y la ruta de biosíntesis para este caso. Por otra parte, para el estudio con la ruta P1PDP se incluyen las reacciones de la ruta no oxidativa de pentosas fosfato y la ruta de biosíntesis para este caso junto a la reacción *de novo* propuesta.

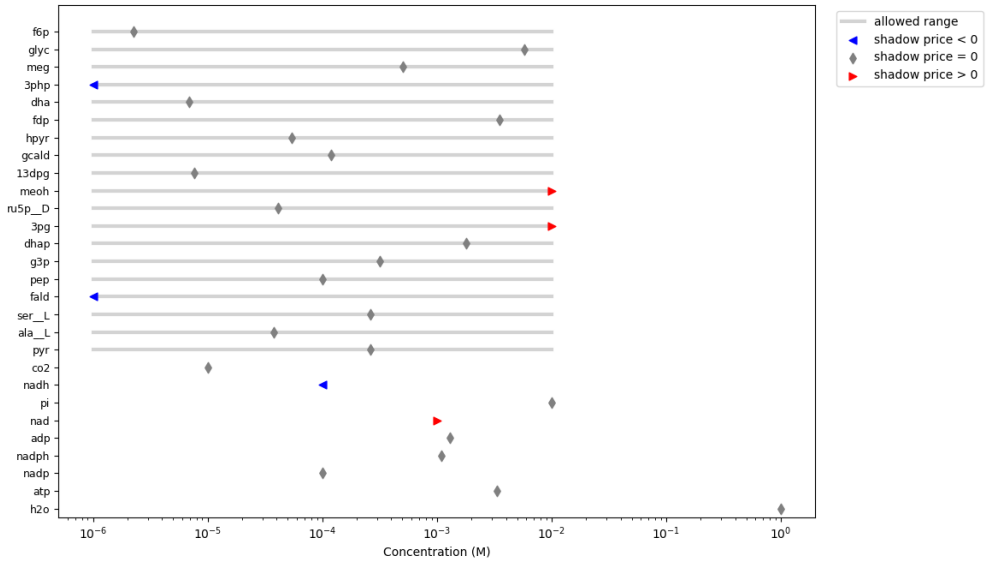
Este análisis se centró en determinar la distribución de concentraciones óptima qué permitiera obtener la máxima fuerza impulsora para cada reacción evaluada, a condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica y pMg constantes. Se seleccionó una velocidad de consumo de 40 C-mmol/gDW.h de carbono distribuido en un 75% proveniente del glicerol y un 25% proveniente del metanol (10 mmol Glicerol/gDW.h y 10 mmol Metanol/gDW.h). El valor de la temperatura, pH, fuerza iónica y pMg se establecieron en 298 K, 7, 250mM y 3, respectivamente.

Para cada escenario se obtuvieron los siguientes resultados:

Ruta dependiente de Serina (SDP): En la Figura 3-14 se observa cómo la concentración de algunos metabolitos como el Metanol (meoh), 3-fosfoglicerato (3pg), 3-fosfo hidroxipiruvato (3php), formaldehido (fald), NADH (nadh) y NAD^+ (nad) puede llegar a tener un gran impacto en la viabilidad termodinámica de toda la ruta considerada observada a través del valor del MDF. Esto se observa a través de los precios sombra (*Shadow prices*), que representan el efecto de la variación en la concentración de los metabolitos en la función objetivo del problema lineal. Estos se obtienen al solucionar el problema dual del problema lineal principal (ver Sección 1.1.5).

El precio sombra de metabolitos como el Metanol (meoh), 3-fosfoglicerato (3pg) y NAD^+ (nad) indican que, un aumento en la concentración de estos metabolitos modifica el valor de la energía libre de Gibbs para las reacciones asociadas, de forma que se obtiene un aumento en el valor de la función objetivo B. De forma similar, el precio sombra de metabolitos como 3-fosfo hidroxipiruvato (3php), formaldehido (fald) y NADH (nadh) demuestran que, una disminución en la concentración de estos modifica la energía libre de Gibbs para las reacciones asociadas de manera que se obtiene un aumento en el valor de la función objetivo (ver Ecuación (1.24)).

Figura 3-14: Resultados obtenidos de la distribución óptima de concentraciones para la producción de etilenglicol a partir de la ruta dependiente de serina. Proporción glicerol – Metanol: 75 - 25.

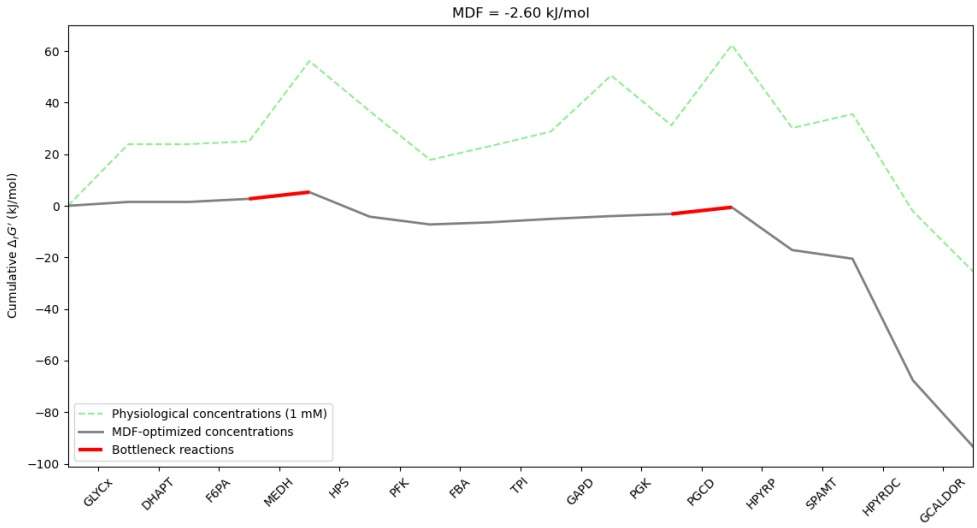


Obtenido a través de la herramienta eQuilibrator-Pathway.

Adicionalmente, se observó en la Figura 3-15 cómo el acumulado de la energía libre de Gibbs que es disipada a medida que se avanza en la ruta considerada, es mayor a las concentraciones óptimas calculadas en comparación a la energía disipada a las concentraciones iniciales en donde todos los metabolitos se encontraban a una concentración de 1mM. También, se determinó mediante el algoritmo de solución que las reacciones MEDH (Metanol Deshidrogenasa) y PGCD (3-Fosfo glicerato deshidrogenasa) pueden generar cuellos de botella en el proceso debido al valor positivo para la energía libre de Gibbs para cada reacción, respectivamente. Se observó que en estas reacciones participan intermediarios tales como NADH y NAD, y metabolitos como metanol, formaldehido, 3-fosfo glicerato y 3-fosfo hidroxipiruvato, los cuales fueron identificados anteriormente como generadores de impacto en el proceso. Por lo que se puede observar cómo el efecto de la concentración de estos metabolitos en la energía libre de Gibbs de cada reacción se ve reflejado en la viabilidad termodinámica de esta ruta, permitiendo que en cada paso de reacción se dé la liberación de energía y generando un flujo metabólico en la dirección deseada.

Figura 3-15: Perfiles de la energía libre de Gibbs disipada para la producción de etilenglicol utilizando la ruta dependiente de serina. Línea punteada: Perfil de energía a condiciones

fisiológicas. Línea gris: Perfil de energía a condiciones óptima calculadas. Linea roja: Posible reacción limitante. Proporción glicerol – Metanol: 75 - 25.

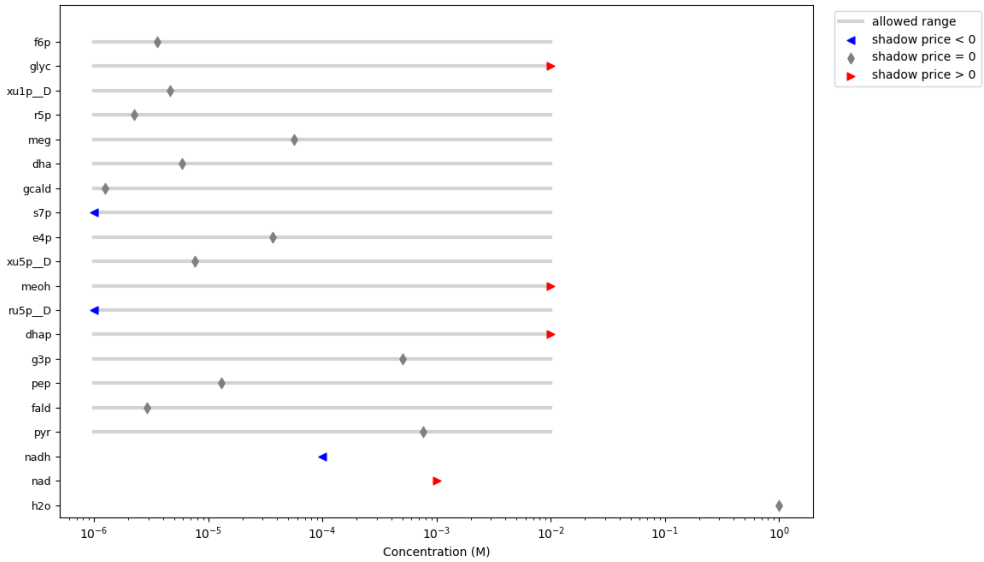


Obtenido a través de la herramienta eQuilibrator-Pathway.

Ruta dependiente de pentosas 1-fosfato: En este escenario se encontró también cómo la concentración de metabolitos como el glicerol (glyc), metanol (meoh), dihidroxiacetona fosfato (dhap), ribulosa 5-fosfato (ru5p_D), sedoheptulosa 7-fosfato (s7p), NADH (nadh) y NAD^+ (nad) están relacionados con valores de precio sombra diferentes de cero, lo que refleja la influencia que estos tienen en la viabilidad termodinámica del proceso a través del valor del MDF (Figura 3-16).

El precio sombra de metabolitos como el glicerol (glyc), metanol (meoh), dihidroxiacetona fosfato (dhap) y NAD^+ (nad) indican que, un aumento en la concentración de estos metabolitos, modifican el valor de la energía libre de Gibbs de las reacciones asociadas de forma que conlleva a un aumento en el valor de la función objetivo B. Por otra parte, el precio sombra de metabolitos como ribulosa 5-fosfato (ru5p_D), sedoheptulosa 7-fosfato (s7p) y NADH (nadh) demuestran que una disminución en la concentración de estos metabolitos, modifican el valor de la energía libre de Gibbs de las reacciones asociadas, y aumentando el valor de la función objetivo.

Figura 3-16: Resultados obtenidos de la distribución óptima de concentraciones para la producción de etilenglicol a partir de la ruta dependiente de pentosas 1-fosfato. Proporción glicerol – Metanol: 75 - 25.



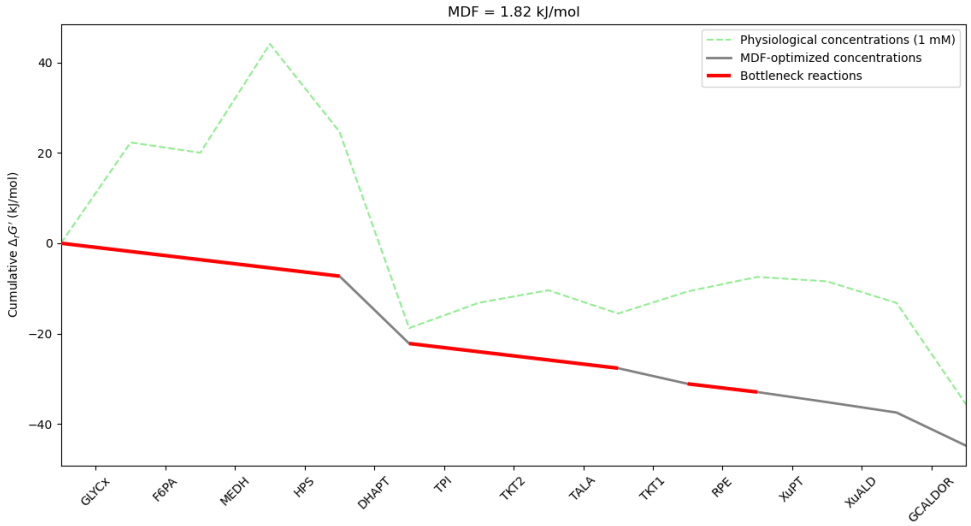
Obtenido a través de la herramienta eQuilibrator-Pathway.

Finalmente, los perfiles de la energía libre de Gibbs disipada para el escenario óptimo muestran que cada paso de reacción está asociado con una pendiente negativa, lo que indica que el valor de la energía libre de cada reacción es negativo. Esto resulta de gran importancia ya que se logra ubicar un escenario en donde no se requiere energía adicional en la ruta (Figura 3-17).

Sin embargo, se puede observar que algunas reacciones son marcadas por el algoritmo como cuellos de botella a pesar de poseer valores negativos en la energía libre de Gibbs. Este resultado puede explicarse a partir de lo observado en la Figura 3-16, en donde se identificaron metabolitos que tienen asociados un precio sombra diferente de cero. Por lo que el valor de la concentración de estos puede generar un impacto en el proceso, ya que se puede modificar el valor de la energía libre de Gibbs de cada reacción lo suficiente como para que estos lleguen a ser positivos e imposibiliten el flujo de carbono a través de esta ruta.

Figura 3-17: Perfiles de la energía libre de Gibbs disipada para la producción de etilenglicol utilizando la ruta dependiente de pentosas 1-fosfato. Línea punteada: Perfil de energía a

condiciones fisiológicas. Línea gris: Perfil de energía a condiciones óptima calculadas. Linea roja: Posible reacción limitante. Proporción glicerol – Metanol: 75 - 25.



Obtenido a través de la herramienta eQuilibrator-Pathway.

Los resultados anteriores demuestran cómo una distribución óptima de concentraciones para cada uno de los metabolitos involucrados puede hacer que la ruta sea factible desde un punto de vista termodinámico. También resalta aquellas reacciones que pueden actuar como cuellos de botella en el proceso al tener unas concentraciones diferentes en los metabolitos involucrados. Esto resulta de gran importancia ya que la producción biológica de etilenglicol no se da de forma regular en la naturaleza y las condiciones intracelulares de muchos organismos están establecidas para otros fines. Por lo tanto, es necesario desde el punto de vista del diseño de microorganismos establecer estrategias como las presentadas en la sección 3.4.1 para lograr las condiciones intracelulares necesarias para hacer factible el proceso.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

En el presente trabajo se desarrolló un estudio *in silico* para la bioproducción de etilenglicol a partir las fuentes de carbono principales encontradas en el glicerol crudo (glicerol y metanol). Este estudio abarcó desde el desarrollo de un modelo de caja negra para el proceso y la propuesta de algunas modificaciones del método seleccionado para su desarrollo, hasta la construcción y selección de un modelo metabólico que permitió identificar las principales características y desafíos que implica la producción biológica de etilenglicol a partir del sustrato seleccionado. Los resultados obtenidos indican que el proceso es factible siempre y cuando se cumplan ciertas condiciones a nivel de metabolismo. A continuación, se presentan las conclusiones más relevantes para cada objetivo planteado en la sección 1.2 y para la hipótesis planteada en la sección 1.4.

- **Objetivo 1 -** "Construir un modelo de caja negra a través de un análisis de factibilidad termodinámica que represente la bioproducción de etilenglicol a partir del cosustrato glicerol crudo (glicerol y metanol)."

  Siguiendo la metodología de diseño racional de bioprocesos propuesta por Heijnen, se construyeron diversos modelos de caja negra para cada sustrato por separado y se observó cómo la producción de etilenglicol a partir de los sustratos considerados no brindaba la suficiente energía libre para llevar a cabo otros procesos celulares. Por esta razón, se evaluó la posibilidad de utilizar diferentes reacciones catabólicas que generaran la suficiente energía libre para llevar a cabo el proceso, y se consideraron las reacciones de producción de etilenglicol a partir de cada sustrato como procesos no catabólicos. Entre las reacciones consideradas, se seleccionó aquella que utiliza oxígeno como aceptor de

electrones debido a la cantidad de energía libre que puede generar y la utilidad que tiene en el proceso.

Adicionalmente, se planteó la posibilidad de utilizar reacciones catabólicas alternas que representaran una combinación entre la reacción de síntesis de etilenglicol y la oxidación aerobia de los sustratos considerados. Estas reacciones se denominaron como de semi-oxidación aerobia de cada sustrato y permiten considerar el etilenglicol como producto del catabolismo, lo que simplifica el planteamiento de los modelos de caja negra. Para llevar a cabo un proceso de esta clase, se propone basarse en las ideas planteadas para la fermentación aerobia (ver sección 1.1.4), en donde se logre distribuir los flujos metabólicos hacia la producción de etilenglicol para mantener controlada la energía libre de Gibbs disipada en el proceso.

Finalmente, se realizó una propuesta preliminar para la construcción de un modelo de caja negra para múltiples sustratos, la cual se basa principalmente en las ideas propuestas por Heijnen. Dado a que se ha demostrado que la presencia de múltiples sustratos afecta la forma en la que estos son utilizados por el organismo (ver sección 1.1.3), se plantean un conjunto de parámetros adicionales que den cuenta del efecto que tiene la presencia de múltiples sustratos en los diferentes procesos celulares.

Si bien, se hacen consideraciones generales de estos parámetros adicionales y se les relaciona con otras variables de proceso como la naturaleza de sustratos, concentración, velocidad de crecimiento, entre otros, no se ha podido establecer correlaciones para obtener estos parámetros. Esto hace que los modelos de caja negra que se pueden plantear para múltiples sustratos no estén completamente definidos para los análisis posteriores.

- **Objetivo 2 -** "Construir y seleccionar al menos un modelo metabólico para al menos un microorganismo chasis que represente la ruta metabólica para la producción de etilenglicol a partir del glicerol crudo buscando obtener los máximos teóricos planteados por el modelo de caja negra."

A partir de los tres modelos metabólicos seleccionados para cada microorganismo (*E. coli, S. cerevisiae, y P. pastoris*), se evaluaron diferentes escenarios para la producción de etilenglicol a partir de dos rutas metabólicas de biosíntesis (SDP y P1PDP) y diferentes patrones de consumo de glicerol y metanol. Cada modelo metabólico fue curado y modificado manualmente para incluir las reacciones necesarias para el consumo de glicerol y metanol, y para incluir las rutas de biosíntesis seleccionadas. Adicionalmente, se seleccionó el NADH como donador final de electrones para la reducción de glicolaldehido a etilenglicol debido a su fácil obtención en el metabolismo.

A través del análisis de balance de flujo se demostró la capacidad que tiene cada microrganismo para llevar a cabo el proceso en su metabolismo. Sin embargo, se encontró que el rendimiento en la producción de etilenglicol depende de la proporción de cada sustrato en el alimento, la capacidad metabólica que tiene cada microrganismo para asimilar estos sustratos, y la ruta de biosíntesis considerada.

Se observó también como la capacidad metabólica de cada microorganismo implicaba el uso de diferentes proporciones de intermediarios energéticos tales como ATP, NADH y NADPH en la producción de etilenglicol. Estos resultados permitieron seleccionar al microorganismo *E. coli* como el más apropiado debido a su alto rendimiento en la producción de etilenglicol, la cantidad de intermediarios involucrados, y la facilidad de su estudio.

- **Objetivo 3** - "Identificar los escenarios más convenientes para el modelo metabólico seleccionado que permita la producción de etilenglicol a partir del glicerol crudo acercándose a los máximos teóricos establecidos por la termodinámica."

Para el modelo metabólico seleccionado se encontró tanto para la ruta SDP como la ruta P1PD, cómo una mayor proporción de metanol daba como resultado un mayor rendimiento en la producción de etilenglicol. Este escenario, sin embargo, venía acompañado del consumo de CO_2 por parte del microorganismo para

mantener un balance redox y maximizar la producción de etilenglicol. A nivel de proceso, este consumo puede representar un desafío debido a la necesidad de agregar CO_2 al medio, y a la de garantizar que este sea correctamente consumido. Adicionalmente, se tendría que considerar el uso de otras rutas metabólicas que sean más adecuadas para el consumo de CO_2. Por esta razón, se considera más apropiado el consumo de los sustratos en una proporción 75% Glicerol y 25% metanol, dado que este escenario no presenta el consumo de CO_2 y permite obtener un buen rendimiento en la producción de etilenglicol. Además, en la Figura 3-11 se puede observar para la ruta P1PDP, cómo esta proporción permite obtener valores mínimos en la cantidad de ATP, NADH y NADPH involucrados por mol de etilenglicol.

Por otra parte, en la sección 3.3.6 se logró evidenciar el efecto que tiene la velocidad de crecimiento de biomasa en la síntesis de etilenglicol. Para todos los casos considerados, se encontró que la síntesis de etilenglicol es mayor a bajas velocidades de crecimiento, demostrando que este proceso compite directamente con el crecimiento de biomasa. A partir de esto, y de las modificaciones necesarias al metabolismo, se puede proponer llevar a cabo el proceso de síntesis de etilenglicol a bajas velocidades de crecimiento para maximizar su producción, o acoplar la síntesis de etilenglicol con la producción de biomasa de forma que se llegue a aumentar la productividad del proceso.

Posteriormente, se realizó un estudio termodinámico de las rutas consideradas para la síntesis de etilenglicol. Inicialmente, se realizó un análisis de factibilidad termodinámica para ambas rutas y se encontró que la mayor parte de las reacciones dentro ruta SDP pueden estar lo suficientemente alejadas del equilibrio como para desarrollarse en la dirección deseada a diferentes condiciones de concentración. Por otra parte, la ruta P1PDP posee reacciones que se pueden desarrollar muy cercanamente al equilibrio e incluso ir en dirección contraria a la deseada. Por lo tanto, es necesario asegurar que las condiciones de concentración a nivel intracelular sean las adecuadas como para llevar a cabo el proceso en la dirección adecuada.

Finalmente, se implementó la herramienta eQuilibrator-Pathway para determinar la distribución de concentraciones óptima para cada ruta de síntesis, que permitiera llevar a cabo el proceso a la dirección deseada. Esto se logró a través de la maximización de la mínima fuerza impulsora asociada a una reacción (MDF), de forma que las otras fuerzas impulsoras fueran lo suficientemente mayores para realizar el proceso. Para ambos casos se encontró la distribución óptima de concentraciones que permitía aumentar la fuerza impulsora y la disipación de la energía libre de Gibbs, siendo esta última mayor para la ruta SDP. Sin embargo, la ruta SDP aún presenta reacciones que pueden llegar a ocurrir en la dirección contraria a la deseada, mientras que la distribución encontrada para la ruta P1PDP asegura que todas las reacciones vayan en la dirección necesaria para la síntesis de etilenglicol (ver Figura 3-15 y Figura 3-17). Adicionalmente, con la ayuda de la herramienta, se logró identificar aquellas reacciones que pueden representar un cuello de botella dentro del proceso. Estas reacciones se destacan por poseer una fuerza impulsora que puede llegar a ser sensible a las variaciones de los metabolitos asociados a estas reacciones, lo cual se evidencia en el valor del precio sombra de cada uno de estos (ver Figura 3-14 y Figura 3-16).

- **Hipótesis** - "Un análisis termodinámico permitirá establecer cuál debería ser la máxima producción teórica de etilenglicol por vía biotecnológica utilizando glicerol crudo (glicerol y metanol). Esta producción biotecnológica de etilenglicol puede alcanzarse mediante el estudio de las diferentes rutas metabólicas implicadas y la expresión de genes heterólogos específicos aplicando herramientas de la ingeniería metabólica para la construcción del microorganismo a ser utilizado."

  La construcción de un modelo de caja negra para múltiples sustratos representa actualmente un reto por terminar debido a las limitaciones que se tiene para encontrar los parámetros asociados a la presencia de múltiples sustratos. Sin embargo, una vez establecido completamente el modelo para cada escenario que se desee considerar, se podrá obtener la máxima producción teórica de etilenglicol por vía biotecnológica utilizando glicerol crudo.

Por otra parte, el análisis de los diferentes modelos metabólicos para cada microorganismo permitió establecer cuál es el rendimiento en la producción de etilenglicol para cada uno de estos considerando diferentes rutas de biosíntesis y las restricciones a nivel del metabolismo que cada microorganismo tiene. En general, se observó que la producción de etilenglicol depende principalmente de la ruta de biosíntesis considerada, siendo la ruta P1PDP la que mayor rendimiento proporciona en comparación a la ruta SDP, y de la cantidad de intermediarios reductores que se generan en el metabolismo. En el presente estudio se utilizó el NADH como intermediario reductor para el paso final en la síntesis de etilenglicol, sin embargo, no se descarta la posibilidad de utilizar NADPH como intermediario para llevar a cabo el proceso.

Finalmente, el estudio termodinámico realizado a cada ruta reveló que, si bien ambas son aptas para llevar a cabo el proceso, la ruta P1PDP puede presentar ciertas limitaciones a nivel energético debido a una mayor presencia de reacciones que pueden generar cuellos de botella y una menor cantidad de energía disipada total en comparación a la ruta SDP (ver Figura 3-15 y Figura 3-17). Por lo tanto, a la hora de construir un microorganismo que lleve a cabo este proceso, deben considerarse estos aspectos que pueden llegar a ser limitantes y encontrar un punto intermedio entre el rendimiento que se puede obtener y la fuerza impulsora necesaria para llevar a cabo el proceso.

4.2 Recomendaciones

Se presentan como una serie de aspectos que se podrían realizar en un futuro para emprender investigaciones similares o fortalecer la investigación realizada.

Las principales recomendaciones para futuras investigaciones son:

i. Finalizar la construcción de la metodología para la construcción de modelos de caja negra para múltiples sustratos a través de la definición matemática de los parámetros adicionales propuestos. Este proceso puede llevarse a cabo mediante la búsqueda y recolección de diferentes resultados experimentales de aquellas investigaciones que involucren el crecimiento de microorganismo con múltiples sustratos. Con esta información, se puede empezar a correlacionar diferentes aspectos del proceso como la naturaleza y concentración de los sustratos considerados, velocidad de crecimiento, entre otros, con aquellos procesos celulares como el catabolismo, la producción de biomasa, la síntesis de producto no catabólico, entre otros.

ii. Respecto al análisis con modelos metabólicos, resultaría de utilidad poder establecer diferentes modificaciones a nivel genético que permitan acoplar la producción de biomasa con la síntesis de etilenglicol, de forma que ambos procesos puedan llevarse a cabo simultáneamente. Este análisis puede llevarse a cabo mediante diferentes algoritmos de optimización que permitan encontrar un número de modificaciones a realizar en el metabolismo para maximizar la síntesis del producto generado manteniendo cierta producción de biomasa. Algunos de estos algoritmos son el optKnock, optForce y optGene, sin embargo, no se descarta la posibilidad de utilizar otros que puedan ser de utilidad.

iii. Para la completa implementación de la ruta P1PDP, es necesario investigar la posibilidad de sintetizar una enzima que lleve a cabo la reacción *de novo* propuesta. Debido a que esta reacción es similar a la realizada por la enzima Fosfopentomutasa, esta podría utilizarse como punto de partida para la construcción de una nueva enzima que pueda llevar a cabo el mismo proceso utilizando ribulosa 5-fosfato o xilulosa 5-fosfato.

A. Anexo: Genes asociados a las reacciones de interés

Tabla A-1: Genes asociados a las reacciones de asimilación de Glicerol y Metanol.

Ruta metabólica	**Reacción**	***E. coli***	***S. cerevisiae***	***P. pastoris***	**Genes heterólogos**
Ruta oxidativa de asimilación de glicerol	Glicerol kinasa	glpK (b3926)	GUT1 (YHL032C)	GUT1 (A0A1B2JH13)	-
	Glicerol 3-fosfato dehidrogenasa	glpD (b3426)	GUT2 (YIL155C)	GUT2 (A0A1B2J663)	-
Ruta reductiva de asimilación de glicerol	Glicerol dehidrogenasa	gldA (b3945)	-	-	-
	Dihidroxiacetona fosfotransferasa	dhaM (b1198), dhaL (b1199), dhaK (b1200)	-	-	-
Oxidación de metanol a formaldehido	Metanol dehidrogenasa	-	-	-	mdh (*Bacillus methanolicus*)
	Alcohol oxidasa	-	-	AOX1(PAS_chr4_0821) AOX2(PAS_chr4_0152)	-
Ciclo RuMP	Hexulosa 6-fosfato sintasa	-	-	-	hxlA (*Bacilus subtilis*) rmpA (*Methylomonas aminofaciens*) rmpA (*Mycobacterium gastri*)
	Hexulosa 6-fosfato isomerasa	-	-	-	hxlB (*Bacilus subtilis*) rmpB (*Methylomonas aminofaciens*) rmpB (*Mycobacterium gastri*)
Ciclo DHA	Dihidroxiacetona sintasa	-	-	DAS1, DAS2	-
	Dihidroxiacetona kinasa	-	DAK1, DAK2	DAK	-

Construido a partir de la información encontrada en [67], [76], [79]

Tabla A-2: Genes asociados a las rutas de biosíntesis consideradas para la producción de etilenglicol.

Ruta metabólica	**Reacción**	***E. coli***	***S. cerevisiae***	***P. pastoris***	**Genes heterólogos**
Ruta dependiente de serina	Serina transaminasa	-	-	-	AGXT (*Homo sapiens*) Agxt (*Mus musculus*) sgaA (*Hyphomicrobium methylovorum*) sgaA (*Methylorubrum extorquens*)
	3-fosfohidroxipiruvato fosfatasa	nudL (b1813) *	-	-	-
	Hidroxipiruvato descarboxilasa	-	-	-	No reportado (*Mus musculus*)
	Serina descarboxilasa	-	-	-	atSDC (*Arabidopsis thaliana*) BnSDC (*Brassica napus*)
	Etanolamina oxidasa	-	-	-	EutA (*Bacillus megaterium*)
Ruta dependiente de pentosas 1-fosfato	Ribulosa 5-fosfato mutasa	-	-	-	*De novo*
	Xilulosa 5-fosfato mutasa	-	-	-	*De novo*
	Ribulosa 1-fosfato aldolasa	fucA (b2800)	-	-	-
	Xilulosa 1-fosfato aldolasa	-	-	-	-
	Glicolaldehido reductasa (NADH)	fucO (b2799)	(YLL056C)	-	-
	Glicolaldehido reductasa (NADPH)	yqhD (b3011)	ADH7 (YCR105W)	-	-

Construido a partir de la información encontrada en [67], [76], [79]

B. Anexo: Flujos extracelulares obtenidos para cada modelo metabólico en cada escenario

Tabla B-1: Flujos extracelulares para el modelo iML1515 utilizando la ruta SDP en cada escenario.

	100/0	**75/25**	**50/50**	**25/75**	**0/100**
$C_3H_8O_3$	-13.33	-10.00	-6.67	-3.33	0.00
CH_4O	0.00	-10.00	-20.00	-30.00	-40.00
$C_2H_6O_2$	15.40	16.01	16.61	17.22	17.83
O_2	-8.16	-9.98	-11.80	-13.62	-15.44
CO_2	9.20	7.99	6.77	5.56	4.35
H_2O	7.13	11.98	16.83	21.68	26.52

$C_3H_8O_3$: Glicerol, CH_4O: Metanol, $C_2H_6O_2$: Etilenglicol, O_2: Oxígeno molecular, CO_2: Dióxido de carbono, H_2O: Agua. 100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

Tabla B-2: Flujos extracelulares para el modelo iND750 utilizando la ruta SDP en cada escenario.

	100/0	**75/25**	**50/50**	**25/75**	**0/100**
$C_3H_8O_3$	-13.33	-10.00	-6.67	-3.33	0.00
CH_4O	0.00	-10.00	-20.00	-30.00	-40.00
$C_2H_6O_2$	13.33	13.33	13.33	12.84	11.47
O_2	-13.33	-16.67	-20.00	-24.57	-31.31
CO_2	13.33	13.33	13.33	14.32	17.05
H_2O	13.33	20.00	26.67	34.81	45.58

$C_3H_8O_3$: Glicerol, CH_4O: Metanol, $C_2H_6O_2$: Etilenglicol, O_2: Oxígeno molecular, CO_2: Dióxido de carbono, H_2O: Agua. 100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

Tabla B-3: Flujos extracelulares para el modelo iMT1026 utilizando la ruta SDP en cada escenario.

	100/0	**75/25**	**50/50**	**25/75**	**0/100**
$C_3H_8O_3$	-13.33	-10.00	-6.67	-3.33	0.00
CH_4O	0.00	-10.00	-20.00	-30.00	-40.00
$C_2H_6O_2$	13.33	13.96	13.77	13.59	13.40
O_2	-13.33	-15.10	-18.90	-22.70	-26.50
CO_2	13.33	12.08	12.45	12.83	13.20
H_2O	13.33	18.12	25.35	32.57	39.80

$C_3H_8O_3$: Glicerol, CH_4O: Metanol, $C_2H_6O_2$: Etilenglicol, O_2: Oxígeno molecular, CO_2: Dióxido de carbono, H_2O: Agua. 100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

Tabla B-4: Flujos extracelulares para el modelo iML1515 utilizando la ruta P1PDP en cada escenario.

	100/0	**75/25**	**50/50**	**25/75**	**0/100**
$C_3H_8O_3$	-13.33	-10.00	-6.67	-3.33	0.00
CH_4O	0.00	-10.00	-20.00	-30.00	-40.00
$C_2H_6O_2$	15.66	17.62	19.33	20.70	21.85
O_2	-7.52	-5.94	-5.01	-4.92	-5.39
CO_2	8.69	4.75	1.34	-1.40	-3.69
H_2O	6.36	7.13	8.67	11.24	14.46

$C_3H_8O_3$: Glicerol, CH_4O: Metanol, $C_2H_6O_2$: Etilenglicol, O_2: Oxígeno molecular, CO_2: Dióxido de carbono, H_2O: Agua. 100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

Tabla B-5: Flujos extracelulares para el modelo iND750 utilizando la ruta P1PDP en cada escenario.

	100/0	**75/25**	**50/50**	**25/75**	**0/100**
$C_3H_8O_3$	-13.33	-10.00	-6.67	-3.33	0.00
CH_4O	0.00	-10.00	-20.00	-30.00	-40.00
$C_2H_6O_2$	16.00	15.57	12.21	12.84	11.47
O_2	-6.67	-11.07	-17.82	-24.57	-31.31
CO_2	8.00	8.86	11.59	14.32	17.05
H_2O	5.33	13.28	24.05	34.81	45.58

$C_3H_8O_3$: Glicerol, CH_4O: Metanol, $C_2H_6O_2$: Etilenglicol, O_2: Oxígeno molecular, CO_2: Dióxido de carbono, H_2O: Agua. 100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

Tabla B-6: Flujos extracelulares para el modelo iMT1026 utilizando la ruta P1PDP en cada escenario.

	100/0	**75/25**	**50/50**	**25/75**	**0/100**
$C_3H_8O_3$	-13.33	-10.00	-6.67	-3.33	0.00
CH_4O	0.00	-10.00	-20.00	-30.00	-40.00
$C_2H_6O_2$	16.00	16.00	15.23	14.42	13.62
O_2	-6.67	-10.00	-15.26	-20.61	-25.95
CO_2	8.00	8.00	9.54	11.15	12.76
H_2O	5.33	12.00	20.98	30.06	39.14

$C_3H_8O_3$: Glicerol, CH_4O: Metanol, $C_2H_6O_2$: Etilenglicol, O_2: Oxígeno molecular, CO_2: Dióxido de carbono, H_2O: Agua. 100 – 0: 100% Glicerol, 0% Metanol; 75 – 25: 75% Glicerol, 25% Metanol; 50 – 50: 50% Glicerol, 50% Metanol; 25 – 75: 25% Glicerol, 75% Metanol; 0 – 100: 0% Glicerol, 100% Metanol. Moles de carbono consumidas: 40 c-mmol/gDW·h.

Creación propia.

Bibliografía

[1] J. B. Mariano and E. R. la Rovere, “Environmental impacts of the oil industry,” *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, 2010, [Online]. Available: https://www.eolss.net/Eolss-SampleAllChapter.aspx

[2] Acciona, “What is sustainability?” https://www.activesustainability.com/sustainable-development/what-is-sustainability/ (accessed Jul. 28, 2019).

[3] University of Alberta, “What is sustainability?,” p. 3.

[4] J. Korhonen, A. Honkasalo, and J. Seppälä, “Circular Economy: The Concept and its Limitations,” *Ecological Economics*, vol. 143, pp. 37–46, 2018, doi: 10.1016/j.ecolecon.2017.06.041.

[5] Acciona, “¿En qué consiste la economía circular? | Sostenibilidad para todos,” *16 January*, 2017. https://www.sostenibilidad.com/desarrollo-sostenible/en-que-consiste-la-economia-circular/ (accessed Jul. 28, 2019).

[6] Fundación para la Economía Circular, “Economía Circular.” https://economiacircular.org/wp/?page_id=62 (accessed Jul. 28, 2019).

[7] I. Issa, S. Delbrück, and U. Hamm, “Bioeconomy from experts’ perspectives – Results of a global expert survey,” *PLoS One*, vol. 14, no. 5, pp. 1–22, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0215917.

[8] Bioökonomie BW, “What is a bioeconomy?,” 2012. https://www.biooekonomie-bw.de/en/bw/definition/ (accessed Jul. 29, 2019).

[9] BIOSTEP, “What is bioeconomy ?,” 2013. http://www.bio-step.eu/background/what-is-bioeconomy/ (accessed Jul. 28, 2019).

[10] F. Cherubini, “The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals,” *Energy Convers Manag*, vol. 51, no. 7, pp. 1412–1421, 2010, doi: 10.1016/j.enconman.2010.01.015.

[11] G. A. Płaza and D. Wandzich, “Biorefineries – New Green Strategy For Development Of Smart And Innovative Industry,” *Management Systems in Production Engineering*, vol. 23, no. 3, pp. 150–155, Sep. 2016, doi: 10.2478/mspe-02-03-2016.

[12] G. J. Suppes, “Glycerol Technology Options for Biodiesel Industry,” in *The Biodiesel Handbook: Second Edition*, Second Edi., AOCS Press, 2010, pp. 439–455. doi: 10.1016/B978-1-893997-62-2.50016-4.

[13] S. K. Yeong, Z. Idris, and H. A. Hassan, *Palm Oleochemicals in Non-food Applications*. AOCS Press, 2012. doi: 10.1016/B978-0-9818936-9-3.50023-X.

[14] D. Puerta, “Diseño in silico de una red metabólica, a partir de cultivos microbianos mixtos, para un microorganismo chasís capaz de producir ácido propiónico a partir de glicerol crudo: aproximación desde la termodinámica y la ingeniería metabólica,” 2019.

[15] S. Nomanbhay, R. Hussein, and M. Y. Ong, “Sustainability of biodiesel production in Malaysia by production of bio-oil from crude glycerol using microwave pyrolysis: A review,” *Green Chem Lett Rev*, vol. 11, no. 2, pp. 135–157, 2018, doi: 10.1080/17518253.2018.1444795.

[16] A. Dias da Silva Ruy, A. Luíza Freitas Ferreira, A. Ésio Bresciani, R. Maria de Brito Alves, and L. Antônio Magalhães Pontes, “Market Prospecting and Assessment of the Economic Potential of Glycerol from Biodiesel,” in *Biomass [Working Title]*, no. tourism, IntechOpen, 2020, p. 13. doi: 10.5772/intechopen.93965.

[17] OCDE/FAO, *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026*. OECD, 2017. doi: 10.1787/agr_outlook-2017-es.

[18] Fedebiocombustibles, “Información Estadística Sector Biocombustibles.” http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-produccion-titulo-Biodiesel.htmhttp://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-produccion-titulo-Biodiesel.htm (accessed Aug. 11, 2019).

[19] C. Len and R. Luque, “Continuous flow transformations of glycerol to valuable products: an overview,” *Sustainable Chemical Processes*, vol. 2, no. 1, pp. 1–10, 2014, doi: 10.1186/2043-7129-2-1.

[20] CORPODIB, “Programa estratégico para la biotransformación sostenible de glicerina cruda en 1,3-propanodiol y prospectiva para desarrollar una biorefinería en ECODIESEL COLOMBIA S.A,” vol. 3529. 2016.

[21] H. Yue, Y. Zhao, X. Ma, and J. Gong, “Ethylene glycol: Properties, synthesis, and applications,” *Chem Soc Rev*, vol. 41, no. 11, pp. 4218–4244, 2012, doi: 10.1039/c2cs15359a.

[22] B. Pereira, H. Zhang, M. de Mey, C. G. Lim, Z. J. Li, and G. Stephanopoulos, “Engineering a novel biosynthetic pathway in Escherichia coli for production of renewable ethylene glycol,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 113, no. 2, pp. 376–383, 2016, doi: 10.1002/bit.25717.

[23] T. U. Chae, S. Y. Choi, J. Y. Ryu, and S. Y. Lee, “Production of ethylene glycol from xylose by metabolically engineered Escherichia coli,” *AIChE Journal*, vol. 64, no. 12, pp. 4193–4200, 2018, doi: 10.1002/aic.16339.

[24] L. Salusjärvi, S. Havukainen, O. Koivistoinen, and M. Toivari, “Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 103, no. 6, pp. 2525–2535, 2019, doi: 10.1007/s00253-019-09640-2.

[25] H. Liu, K. R. M. Ramos, K. N. G. Valdehuesa, G. M. Nisola, W. K. Lee, and W. J. Chung, “Biosynthesis of ethylene glycol in Escherichia coli,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 97, no. 8, pp. 3409–3417, 2013, doi: 10.1007/s00253-012-4618-7.

[26] L. Salusjärvi *et al.*, “Production of ethylene glycol or glycolic acid from D-xylose in Saccharomyces cerevisiae,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 101, no. 22, pp. 8151–8163, 2017, doi: 10.1007/s00253-017-8547-3.

[27] S. Kandasamy, S. P. Samudrala, and S. Bhattacharya, “The route towards sustainable production of ethylene glycol from a renewable resource, biodiesel waste: A review,” *Catal Sci Technol*, vol. 9, no. 3, pp. 567–577, 2019, doi: 10.1039/c8cy02035c.

[28] B. Pereira *et al.*, “Efficient utilization of pentoses for bioproduction of the renewable two-carbon compounds ethylene glycol and glycolate,” *Metab Eng*, vol. 34, pp. 80–87, 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2015.12.004.

[29] Chemical Engineering, “Ethylene Glycol Production - Chemical Engineering,” *Ethylene Glycol Production*, 2015. https://www.chemengonline.com/ethylene-glycol-production/?printmode=1%0Ahttp://www.chemengonline.com/ethylene-glycol-production/?printmode=1 (accessed Aug. 14, 2019).

[30] J. Sun and H. Liu, “Selective hydrogenolysis of biomass-derived xylitol to ethylene glycol and propylene glycol on supported Ru catalysts,” *Green Chemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 135–142, 2011, doi: 10.1039/c0gc00571a.

[31] J. Pang, M. Zheng, A. Wang, and T. Zhang, “Catalytic Hydrogenation of Corn Stalk to Ethylene Glycol and 1,2-Propylene Glycol,” *Ind Eng Chem Res*, vol. 50, pp. 6601–6608, 2011.

[32] N. Ji *et al.*, “Catalytic conversion of cellulose into ethylene glycol over supported carbide catalysts,” *Catal Today*, vol. 147, no. 2, pp. 77–85, 2009, doi: 10.1016/j.cattod.2009.03.012.

[33] V. Siracusa and I. Blanco, “Bio-polyethylene (Bio-PE), Bio-polypropylene (Bio-PP) and Bio-poly(ethylene terephthalate) (Bio-PET): Recent developments in bio-based

polymers analogous to petroleum-derived ones for packaging and engineering applications," *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 8, 2020, doi: 10.3390/APP10155029.

[34] C. Wittmann and J. C. Liao, *Industrial Biotechnology*. Weinheim, Germany: Wiley;VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017. doi: 10.1002/9783527807833.

[35] D. Kuhn, L. M. Blank, A. Schmid, and B. Bühler, "Systems biotechnology - Rational whole-cell biocatalyst and bioprocess design," *Eng Life Sci*, vol. 10, no. 5, pp. 384–397, 2010, doi: 10.1002/elsc.201000009.

[36] B. Palsson, "The challenges of in silico biology," *Nat Biotechnol*, vol. 18, no. 11, pp. 1147–1150, 2000, doi: 10.1038/81125.

[37] U. von Stockar, *Biothermodynamics*. CRC Press, 2013.

[38] R. Mahadevan, A. P. Burgard, I. Famili, S. van Dien, and C. H. Schilling, "Applications of metabolic modeling to drive bioprocess development for the production of value-added chemicals," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 10, no. 5, pp. 408–417, Oct. 2005, doi: 10.1007/BF02989823.

[39] P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, N. al Haque, K. v. Gernaey, and J. M. Woodley, "Advances in the process development of biocatalytic processes," *Org Process Res Dev*, vol. 17, no. 10, pp. 1233–1238, 2013, doi: 10.1021/op4001675.

[40] J. J. Heijnen and R. Kleerebezem, "Bioenergetics of Microbial Growth," *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, pp. 1–24, 2010, doi: 10.1002/9780470054581.eib084.

[41] L. Tijhuis, M. van Loosdrecht, and J. Heijnen, "A thermodynamically based correlation for maintenance Gibbs energy requirements in …," *Biotechnol Bioeng*, vol. 42, no. 4, pp. 509–519, 1993, [Online]. Available: http://www3.interscience.wiley.com/journal/107623668/abstract%5Cnpapers2://publication/uuid/FA5791A7-1589-4B3D-97D2-6E9DCC92FD90

[42] M. E. Poccia, A. J. Beccaria, and R. G. Dondo, "Modeling the microbial growth of two escherichia coli strains in a multi-substrate environment," *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 31, no. 2, pp. 347–354, 2014, doi: 10.1590/0104-6632.20140312s00002587.

[43] A. Narang, "The steady states of microbial growth on mixtures of substitutable substrates in a chemostat," *J Theor Biol*, vol. 190, no. 3, pp. 241–261, 1998, doi: 10.1006/jtbi.1997.0552.

[44] K. Kovarova, "Growth Kinetics of Escherichia coli: Effect of Temperature, Mixed Substrate Utilization and Adaptation to Carbon-Limited Growth.," Swiss Federal Institute of technology, Zürich., 1996.

[45] T. Egli, C. Bosshard, and G. Hamer, “Simultaneous utilization of methanol–glucose mixtures by Hansenula polymorpha in chemostat: Influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 28, no. 11, pp. 1735–1741, 1986, doi: 10.1002/bit.260281118.

[46] T. Egli, U. Lendenmann, and M. Snozzi, “Kinetics of microbial growth with mixtures of carbon sources,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 63, no. 3–4, pp. 289–298, 1993, doi: 10.1007/BF00871224.

[47] W. Harder and L. Dijkhuizen, “Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms.,” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 297, no. 1088, pp. 459–480, 1982, doi: 10.1098/rstb.1982.0055.

[48] A. Narang, A. Konopka, and D. Ramkrishna, “The dynamics of microbial growth on mixtures of substrates in batch reactors,” *J Theor Biol*, vol. 184, no. 3, pp. 301–317, 1997, doi: 10.1006/jtbi.1996.0275.

[49] T. Egli, C. Bosshard, and G. Hamer, “Simultaneous utilization of methanol–glucose mixtures by Hansenula polymorpha in chemostat: Influence of dilution rate and mixture composition on utilization pattern,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 28, no. 11, pp. 1735–1741, 1986, doi: 10.1002/bit.260281118.

[50] W. Babel and R. H. Muller, “Mixed substrate utilization in micro-organisms: Biochemical aspects and energetics,” *J Gen Microbiol*, vol. 131, no. 1, pp. 39–45, 1985, doi: 10.1099/00221287-131-1-39.

[51] P. J. F. Gommers, B. J. van Schie, J. P. van Dijken, and J. G. Kuenen, “Biochemical limits to microbial growth yields: An analysis of mixed substrate utilization,” *Biotechnol Bioeng*, vol. 33, no. 6, pp. 799–799, 1989, doi: 10.1002/bit.260330620.

[52] L. Dijkhuizen and W. Harder, “Regulation of Autotrophic and Heterotrophic Metabolism in Pseudumunas uxalaticus 0x1. Growth on Fructose and on Mixtures of Fructose and Formate in Batch and Continuous Cultures,” *Arch Microbiol*, vol. 123, no. 1, p. [1] L. Dijkhuizen and W. Harder, “Regulation of au, 1979.

[53] L. Dijkhuizen and W. Harder, “Regulation of autotrophic and heterotrophic metabolism in Pseudomonas oxalaticus OX1: Growth on mixtures of oxalate and formate in continuous culture,” *Arch Microbiol*, vol. 123, no. 1, pp. 55–63, Oct. 1979, doi: 10.1007/BF00403502.

[54] L. Dijkhuizen and W. Harder, “Regulation of autotrophic and heterotrophic metabolism in Pseudomonas oxalaticus OX1: Growth on mixtures of acetate and formate in continuous culture,” *Arch Microbiol*, vol. 123, no. 1, pp. 47–53, 1979, doi: 10.1007/BF00403501.

[55] X. Wang, K. Xia, X. Yang, and C. Tang, “Growth strategy of microbes on mixed carbon sources,” *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09261-3.

[56] A. Litsios, Á. D. Ortega, E. C. Wit, and M. Heinemann, “Metabolic-flux dependent regulation of microbial physiology,” *Curr Opin Microbiol*, vol. 42, pp. 71–78, 2018, doi: 10.1016/j.mib.2017.10.029.

[57] K. Zhuang, G. N. Vemuri, and R. Mahadevan, “Economics of membrane occupancy and respiro-fermentation,” *Mol Syst Biol*, vol. 7, no. 1, p. 500, Jan. 2011, doi: 10.1038/msb.2011.34.

[58] M. Szenk, K. A. Dill, and A. M. R. de Graff, “Why Do Fast-Growing Bacteria Enter Overflow Metabolism? Testing the Membrane Real Estate Hypothesis,” *Cell Syst*, vol. 5, no. 2, pp. 95–104, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.cels.2017.06.005.

[59] X. Yang *et al.*, “Physical bioenergetics: Energy fluxes, budgets, and constraints in cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 118, no. 26, Jun. 2021, doi: 10.1073/pnas.2026786118.

[60] B. Niebel, S. Leupold, and M. Heinemann, “An upper limit on Gibbs energy dissipation governs cellular metabolism,” *Nat Metab*, vol. 1, no. 1, pp. 125–132, 2019, doi: 10.1038/s42255-018-0006-7.

[61] C. Wittmann and S. Y. Lee, *Systems Metabolic Engineering*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. doi: 10.1007/978-94-007-4534-6.

[62] R. Kulkarni, “Metabolic engineering: Biological art of producing useful chemicals,” *Resonance*, vol. 21, no. 3, pp. 233–237, 2016, doi: 10.1007/s12045-016-0318-4.

[63] Y. T. Yang, G. N. Bennett, and K. Y. San, “Genetic and metabolic engineering,” *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 1, no. 3, pp. 49–60, 1998.

[64] W. Niu, J. Guo, and S. van Dien, *Metabolic Engineering for Bioprocess Commercialization*. Cham: Springer International Publishing, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-41966-4.

[65] M. Kanehisa, “KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,” *Nucleic Acids Research*, 2000. https://www.kegg.jp/

[66] Technische Universitat Braunschweig, “Enzyme Database - BRENDA,” *B-glucosidase information*, 2018. https://www.brenda-enzymes.org/

[67] R. Caspi *et al.*, “The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update,” *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. D1, pp. D445–D453, Jan. 2020, doi: 10.1093/nar/gkz862.

[68] E. Klipp, R. Herwig, A. Kowald, C. Wierling, and H. Lehraach, *Systems Biology in Practice*. 2005.

[69] E. Noor, A. Bar-Even, A. Flamholz, E. Reznik, W. Liebermeister, and R. Milo, “Pathway Thermodynamics Highlights Kinetic Obstacles in Central Metabolism,” *PLoS Comput Biol*, vol. 10, no. 2, 2014, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003483.

[70] H. Liu, K. R. M. Ramos, K. N. G. Valdehuesa, G. M. Nisola, W. K. Lee, and W. J. Chung, “Biosynthesis of ethylene glycol in Escherichia coli,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 97, no. 8, pp. 3409–3417, 2013, doi: 10.1007/s00253-012-4618-7.

[71] Z. Chen, J. Huang, Y. Wu, and D. Liu, “Metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for the de novo production of ethylene glycol from glucose,” *Metab Eng*, vol. 33, pp. 12–18, 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2015.10.013.

[72] B. Uranukul, B. M. Woolston, G. R. Fink, and G. Stephanopoulos, “Biosynthesis of monoethylene glycol in Saccharomyces cerevisiae utilizing native glycolytic enzymes,” *Metab Eng*, vol. 51, pp. 20–31, 2019, doi: 10.1016/j.ymben.2018.09.012.

[73] J. M. Monk *et al.*, “iML1515, a knowledgebase that computes Escherichia coli traits,” *Nat Biotechnol*, vol. 35, no. 10, pp. 8–12, 2017.

[74] N. C. Duarte, M. J. Herrgård, and B. Ø. Palsson, “Reconstruction and Validation of Saccharomyces cerevisiae iND750, a Fully Compartmentalized Genome-Scale Metabolic Model,” *Genome Res*, vol. 14, no. 7, pp. 1298–1309, Jul. 2004, doi: 10.1101/gr.2250904.

[75] M. Tomàs-Gamisans, P. Ferrer, and J. Albiol, “Fine-tuning the P. pastoris iMT1026 genome-scale metabolic model for improved prediction of growth on methanol or glycerol as sole carbon sources,” *Microb Biotechnol*, vol. 11, no. 1, pp. 224–237, 2018, doi: 10.1111/1751-7915.12871.

[76] P. D. Karp *et al.*, “The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways,” *Brief Bioinform*, vol. 20, no. 4, pp. 1085–1093, Jul. 2019, doi: 10.1093/bib/bbx085.

[77] I. M. Keseler *et al.*, “The EcoCyc Database in 2021,” *Front Microbiol*, vol. 12, Jul. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.711077.

[78] Z. A. King *et al.*, “BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models,” *Nucleic Acids Res*, vol. 44, no. D1, pp. D515–D522, Jan. 2016, doi: 10.1093/nar/gkv1049.

[79] UniProt consortium, “UniProt.” https://www.uniprot.org/

[80] M. E. Beber *et al.*, “eQuilibrator 3.0: a database solution for thermodynamic constant estimation,” *Nucleic Acids Res*, vol. 50, no. D1, pp. D603–D609, Jan. 2022, doi: 10.1093/nar/gkab1106.

[81] L. Heirendt *et al.*, “Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0,” *Nat Protoc*, vol. 14, no. 3, pp. 639–702, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41596-018-0098-2.

[82] E. Noor, H. S. Haraldsdóttir, R. Milo, and R. M. T. Fleming, “Consistent Estimation of Gibbs Energy Using Component Contributions,” *PLoS Comput Biol*, vol. 9, no. 7, p. e1003098, Jul. 2013, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003098.

[83] F. Meyer, P. Keller, J. Hartl, O. G. Gröninger, P. Kiefer, and J. A. Vorholt, “Methanol-essential growth of Escherichia coli,” *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, p. 1508, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03937-y.

[84] C. T. Chen *et al.*, “Synthetic methanol auxotrophy of Escherichia coli for methanol-dependent growth and production,” *Metab Eng*, vol. 49, no. June, pp. 257–266, 2018, doi: 10.1016/j.ymben.2018.08.010.

[85] B. M. Woolston, J. R. King, M. Reiter, B. van Hove, and G. Stephanopoulos, “Improving formaldehyde consumption drives methanol assimilation in engineered E. coli,” *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04795-4.

[86] Z. Dai *et al.*, “Metabolic construction strategies for direct methanol utilization in Saccharomyces cerevisiae,” *Bioresour Technol*, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.100.

[87] H. O. Kammen and R. Koo, “Phosphopentomutases,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 244, no. 18, pp. 4888–4893, 1969, doi: 10.1016/s0021-9258(18)94286-9.

[88] K. Hammer-Jespersen and A. Munch-Petersem, “Phosphodeoxyribomutase from Escharichia coli.,” *Eur J Biochem*, vol. 17, pp. 9–25, 2019.

[89] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, and P. A. Weil, *Harper. Bioquímica ilustrada*. Mc Graw Hill Education, 2010.

[90] A. Kümmel, S. Panke, and M. Heinemann, “Putative regulatory sites unraveled by network-embedded thermodynamic analysis of metabolome data,” *Mol Syst Biol*, vol. 2, pp. 1–10, 2006, doi: 10.1038/msb4100074.