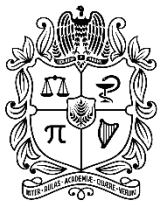

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Modelo matemático para el proceso de autorregulación térmica de *Escherichia coli*

Santiago Benavides López

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2018

Modelo matemático para el proceso de autorregulación térmica de *Escherichia coli*

Santiago Benavides López

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ingeniería – Ingeniería Química

Director:

Ph.D. Fabián Alberto Ortega Quintana

Codirector:

Ph.D. Hernán Darío Alvarez Zapata

Línea de Investigación:

Modelado y control de procesos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Procesos Dinámicos-KALMAN

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía

Medellín, Colombia

2018

“Si quieres encontrar los secretos del universo piensa en términos de energía, frecuencia y vibración”

Nikola Tesla

Agradecimientos

A todos los integrantes del grupo de investigación KALMAN por su apoyo y conocimientos brindados durante estos años, en especial los directores Fabián Ortega y Hernán Alvarez.

A los evaluadores, el doctor Mauricio Trujillo y la doctora Lina Gómez, que gracias a sus correcciones y sugerencias se logró una mejor versión de este documento.

Al profesor Freddy Bolaños, por su colaboración durante el difícil ajuste paramétrico del modelo computacional.

A mi novia Laura por su comprensión y sabios consejos en esas largas conversaciones que me sirvieron para poder lograr mis metas en este proyecto.

A toda mi familia, que me forjaron como persona y quienes estuvieron en todo momento expresando su apoyo para que este importante objetivo se haya hecho realidad.

Resumen

En el presente trabajo se desarrolla un modelo semifísico de base fenomenológica (MSBF) para el proceso de autorregulación térmica del organismo procariota *Escherichia coli*. La autorregulación térmica se define como el proceso fisiológico mediante el cual un organismo cambia su metabolismo ante variaciones de la temperatura ambiental. El modelo está basado en una descripción de los procesos bioquímicos globales que ocurren en el metabolismo energético y las condiciones de crecimiento aerobio en un biorreactor de tanque agitado. El ajuste del modelo se realiza con datos de la literatura para el crecimiento de *E. coli* K-12 cepa BW25113 a 37°C. Con el modelo se pueden predecir cambios en el metabolismo central de *E. coli*, el flujo de calor entre la bacteria y el entorno y la velocidad de crecimiento de la biomasa, para diferentes condiciones de temperatura del medio de cultivo.

Palabras clave: Modelo dinámico, metabolitos intracelulares, respuesta térmica, transferencia de calor.

Abstract

This work presents the development of a phenomenological-based semiphysical model (PBSM) for the process of thermal self-regulation of the prokaryotic organism *Escherichia coli*. Thermal self-regulation is defined as the physiological process which an organism changes its metabolism to variations in environmental temperature. The model is based on a description of the global biochemical processes that occur in energy metabolism under aerobic growth conditions in an agitated tank bioreactor. The fit of the model is performed with literature data for the growth of *E. coli* K-12 strain BW25113 at 37°C. The model can predict changes in the central metabolism of *E. coli*, the heat flow between the bacteria and the environment and the growth rate of the biomass, for different temperature conditions of the culture medium.

Keywords: Dynamic model, intracellular metabolites, thermal response, heat transfer.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XV**

Lista de Símbolos ..... **XVI**

Introducción **1**

1. Conceptos básicos del modelado de procesos biológicos **5**
1.1 Definiciones 5
1.1.1 Proceso y sistema 5
1.1.2 Modelo 6
1.1.3 Proceso Biológico 6
1.1.4 Diferencia entre bioproceso y proceso fisiológico 7
1.2 Modelos matemáticos 7
1.2.1 Características 7
1.2.2 Clasificación 8
1.2.3 Espectro de aplicación 10
1.3 Metodología de modelado semifísico de base fenomenológica (MSBF) 11
1.4 Características de Procesos biológicos 15
1.4.1 Reacciones enzimáticas 15
1.4.2 Efectos ambientales sobre las reacciones enzimáticas 17
1.4.3 Regulación enzimática y homeostasis 18
1.4.4 Respuesta dinámica de los sistemas autorregulados 20
1.4.5 Clasificación de modelos en bioprocesos 21
1.5 Contexto histórico del modelado de procesos biológicos 23
1.5.1 Etapa temprana 23
1.5.2 Etapa clásica 24
1.5.3 Etapa descriptiva 25
1.5.4 Etapa moderna 25
1.6 Estado del arte 26

2. Pre-construcción del modelo **29**
2.1 Descripción del proceso (Paso 1) 29
2.1.1 Generalidades de *Escherichia coli* 29
2.1.2 Medio externo al microorganismo 31
2.1.3 Medio intracelular 32

2.2 Nivel de detalle e hipótesis de modelado (Paso 2) 38
2.2.1 Consideraciones 38
2.2.2 Analogías 42
2.3 Definición de los sistemas de proceso (paso 3) 44
2.4 Estequiometría generalizada de reacciones 46

3. Construcción del modelo matemático 53
3.1 Principios de conservación - Estructura básica (Paso 4) 53
3.1.1 Balances de materia en SdeP S_I 55
3.1.2 Balances de materia en SdeP S_{II} 57
3.1.3 Balances de materia en SdeP S_{III} 58
3.1.4 Balances de materia en SdeP S_T 59
3.1.5 Balances de energía en todos los SdeP 59
3.2 Definición de ecuaciones con información relevante (Paso 5) 60
3.3 Especificación de variables, parámetros y constantes (Paso 6) 62
3.4 Ecuaciones constitutivas y de valoración - Estructura extendida (Paso 7) 63
3.4.1 Flujos molares específicos 64
3.4.2 Velocidades específicas de reacción 64
3.4.3 Velocidad de muerte celular 69
3.4.4 Masa total de los SdeP 69
3.4.5 Flujos de calor entre SdeP 70
3.5 Especificación de parámetros funcionales del modelo 74

4. Ajuste y simulación del modelo 77
4.1 Conteo de grados de libertad e identificación de parámetros (Paso 8) 77
4.1.1 Consideraciones iniciales para la identificación de parámetros 78
4.1.2 Identificación de pre-exponenciales de Arrhenius 79
4.1.3 Supresión de las restricciones y ajuste final 83
4.2 Modelo computacional (Paso 9) 84
4.3 Validación del modelo (Paso 10) 85
4.3.1 Compuestos extracelulares 85
4.3.2 Compuestos del metabolismo central de carbono 87
4.3.3 Coenzimas 89
4.3.4 Flujos respiratorios 92
4.3.5 Respuesta a la temperatura 94
4.3.6 Flujo de calor con el entorno 98
4.4 Discusión sobre el proceso autorregulación térmica 102

5. Conclusiones y recomendaciones 105
5.1 Conclusiones 105
5.2 Recomendaciones para futuras investigaciones 106

A. Anexo: Especificación de valores constantes del modelo 107

B. Anexo: Cálculo de los coeficientes de transferencia de calor 115

Bibliografía 123

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Espectro de modelos según su estructura. Adaptado de Karplus (1977) 10
Figura 1-2: Representación gráfica de los diferentes tipos de modelos dinámicos en bioprocesos. Adaptado de Dunn et al. (2003) 22
Figura 2-1: Geometría de una célula de *E. coli*..... 30
Figura 2-2: Micrografía electrónica de *E. coli* en proceso de división. Tomado de Amako & Umeda (1977). 31
Figura 2-3: Representación de perfiles de velocidad y cascada de energía por agitación en reactor de tanque agitado. Adaptado de Doran (2013), Schäfer (1997) y Solomon (1981)... 31
Figura 2-4: Representación del flujo laminar alrededor de *E. coli* cultivada en medio líquido. 32
Figura 2-5: Representación del acople de reacciones catabólicas y reacciones anabólicas dentro de una célula. Adaptado de Urs von Stockar (2013). 34
Figura 2-6: Principales procesos catabólicos (gris claro) y anabólicos (gris oscuro) en metabolismo aerobio. 34
Figura 2-7: Esquema del fenómeno de trasferencia de calor en la membrana y pared celular. 37
Figura 2-8: Analogía de *eddie* de Kolmogorov como flujo alrededor de un cuerpo inmerso. 42
Figura 2-9: Analogía del metabolismo de *E. coli* como reactor CSTR (DFP)..... 44
Figura 2-10: Sistemas de proceso para el modelo de autorregulación térmica en *E. coli*. 45
Figura 4-1: Diagrama de flujo simplificado del algoritmo genético. 80
Figura 4-2: Simulación de concentraciones de las salidas del modelo. Ajuste preliminar 81
Figura 4-3: Simulación de concentraciones intracelulares de G6P y PEP. Ajuste preliminar. 82
Figura 4-4: Simulación de concentraciones de las salidas del modelo. Ajuste final..... 83
Figura 4-5: Simulación de concentraciones intracelulares de compuestos del metabolismo central del carbono. Ajuste final. 84
Figura 4-6: Comparación de resultados de las salidas del modelo..... 86
Figura 4-7: Error cuadrático medio de las salidas del modelo. 87
Figura 4-8: Comparación de resultados de las salidas del modelo..... 88
Figura 4-9: Error cuadrático medio de las salidas del modelo. 88
Figura 4-10: Simulación de concentraciones intracelulares coenzimas. 90
Figura 4-11: Simulación de las velocidades respiratorias específicas del microorganismo.. 93

Figura 4-12: Simulación de la curva crecimiento del microorganismo a diferentes condiciones de temperatura ambiental. 95
Figura 4-13: Simulación de los metabolitos de la glucólisis a diferentes condiciones de temperatura ambiental. 95
Figura 4-14: Simulación de las salidas del modelo ante un aumento progresivo de la temperatura ambiental. 96
Figura 4-15: Simulación de los metabolitos de la glucólisis ante un aumento progresivo de la temperatura ambiental. 97
Figura 4-16: Curva característica de crecimiento y producción de calor para un microorganismo cultivado por lotes. Adaptado de Braissant et al. (2013). 98
Figura 4-17: Simulación de la curvas de crecimiento y producción de calor para *E. coli*. 99
Figura 4-18: Simulación de curvas de producción de calor en *E. coli* para a diferentes temperaturas ambientales. 100
Figura 4-19: Comparación de las salidas del modelo y la producción de calor con los datos experimentales de Marison et al. (1986) 101
Figura 4-20: Error cuadrático medio del modelo respecto a datos de Marison et al. (1986) 101
Figura 4-21: Lazo de control inherente a una reacción. Adaptado de (Cobelli & Carson, 2008) 103
Figura B-1: Correlación entre el número de potencia y Reynolds del impulsor para diferentes tipos de agitadores. **1** Rushton. **2** Canaletes. **3** Propela. Adaptado de Doran (2013). 120

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Modelos dinámicos para el metabolismo central del carbono para *E. coli*..... 27
Tabla 3-1: Estructura básica del modelo matemático. Nivel cero de especificación 61
Tabla 3-2: Variables, parámetros y constantes del modelo matemático 63
Tabla 3-3: Estructura extendida del modelo. Primer nivel de especificación 71
Tabla 3-4: Estructura extendida del modelo. Segundo de especificación..... 73
Tabla 3-5: Parámetros funcionales especificados de bibliografía..... 74
Tabla 3-6: Parámetros funcionales para identificación 75
Tabla 4-1: Concentración intracelular de coenzimas en fase de crecimiento [mM]. 91
Tabla A-1: Coeficientes estequiométricos [mmol]. Calculado según Sección 2.4, basados en (Clore & Venditti, 2013) y (Mathews et al., 2013). 107
Tabla A-2: Constantes termodinámicas. 108
Tabla A-3: Entalpías y energías libres de Gibbs de reacción [J/mmol]. Calculados a partir de (Alberty, 2003, 2006) y (Flamholz, Noor, Bar-Even, & Milo, 2012). 108
Tabla A-4: Constantes morfológicas por célula. Calculado a partir de (Milo, Jorgensen, Moran, Weber, & Springer, 2009), (Neidhardt, 1996) y (Wang, Zhou, Ji, & Zhao, 2013). 109
Tabla A-5: Concentraciones intracelulares asumidas como constantes [mmol/molBIO]. ...109
Tabla A-6: Conjunto de parámetros identificados - **versión preliminar** del modelo. 109
Tabla A-7: Conjunto de parámetros identificados - **versión final** del modelo. 111
Tabla A-8: Condiciones iniciales para los estados del modelo computacional. 112

Lista de Símbolos

Nomenclatura de compuestos considerados en el modelo

Símbolo	Compuesto	Fórmula Molecular	Masa molar [g·mol^{-1}]	Espacio de estados*
G6P	Glucosa 6_fosfato	$C_6H_{13}O_9P$	260.03	*x(1)*
FBP	Fructosa bifosfato	$C_6H_{14}O_{12}P_2$	340.00	*x(2)*
PEP	Fosfoenolpiruvato	$C_3H_5O_6P$	167.98	*x(3)*
PYR	Piruvato	$C_3H_4O_3$	88.02	*x(4)*
AcCoA	Acetil Coenzima A	$C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S$	809.13	*x(5)*
R5P	Ribosa 5_fosfaro	$C_5H_{11}O_8P$	230.02	*x(6)*
ATP	Adenosín trifosfato	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	507.00	*x(7)*
ADP	Adenosín difosfato	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	427.03	*x(8)*
CoA	Coenzima A	$C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S$	767.12	*x(9)*
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$	664.12	*x(10)*
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido	$C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2$	665.12	*x(11)*
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado	$C_{21}H_{28}N_7O_{17}P_3$	744.08	*x(12)*
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido	$C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3$	745.09	*x(13)*
BIO	Biomasa	$CH_{1,77}O_{0,49}N_{0,24}$	25.00	*x(14)*
GLU	Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	180.06	*x(15)*
ACE	Acetato	$C_2H_4O_2$	60.02	*x(16)*
NH_3	Amoniaco	NH_3	17.03	-
Pi	Fosfato	H_3PO_4	97.98	-
O_2	Oxígeno	O_2	31.99	-
CO_2	Dióxido de Carbono	CO_2	43.99	-
H_2O	Agua	H_2O	18.01	-

* El modelo considera 21 compuestos, de los cuales sólo 16 son estados. Adicionalmente hay dos temperaturas intracelulares variables que se consideran estados, para un total de 18.

Nomenclatura para la estructura matemática del modelo

Símbolo	Significado Físico	Unidades
A	Constante pre-exponencial de Arrhenius	$mol_{BIO}^{-1} \cdot s^{-1}$
A_s	Área superficial	cm^2
$\bar{A}_s$	Área superficial promedio	cm^2
C_p	Capacidad calorífica específica másica a presión constante	$J \cdot g^{-1} \cdot K^{-1}$
$\bar{C}_p$	Capacidad calorífica específica molar a presión constante	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
d	Perturbación del modelo (Temperatura)	K
D_i	Diámetro del impulsor	m
Ea	Energía de activación	$J \cdot mol^{-1}$
h	Coeficiente de transferencia de calor	$J \cdot s^{-1} \cdot (cm^2)^{-1} \cdot K^{-1}$
k	Conductividad térmica	$J \cdot s^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot K^{-1}$
k_a	Constante de afinidad	Según la ecuación
k_d	Constante de muerte celular	s^{-1}
K_{eq}	Constante de Equilibrio	$mol_{PROD} \cdot mol_{REAC}^{-1}$
$\bar{K}_m$	Constante especifica de Michaelis-Menten	Según la ecuación
L_c	Longitud característica	cm
$\bar{M}$	Masa promedio	g
MW	Masa molar	$g \cdot mol^{-1}$
N	Moles totales	mol
$\bar{n}$	Flujo molar específico	$mol \cdot mol_{BIO}^{-1} \cdot s^{-1}$
$\dot{n}$	Flujo molar	$mol \cdot s^{-1}$
N_i	Velocidad de rotación del impulsor	s^{-1}
N_P	Número de potencia del impulsor	Adimensional
Nu	Número de Nusselt	Adimensional
P_i	Potencia del impulsor	$J \cdot s^{-1}$
P_g	Potencia del impulsor en tanque gaseado	$J \cdot s^{-1}$
Pr	Número de Prandtl	Adimensional
$\dot{Q}$	Flujo de calor	W
R	Constante universal de gases ideales	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
$\bar{r}$	Velocidad de reacción específica	$mol_{BIO}^{-1} \cdot s^{-1}$

Continuación - Nomenclatura en la estructura matemática del modelo

Símbolo	Significado Físico	Unidades
r_d	Velocidad de muerte celular	$mol \cdot s^{-1}$
$\bar{r}_{max}$	Velocidad específica de reacción máxima	$mol_{BIO}^{-1} \cdot s^{-1}$
Re	Número de Reynolds	Adimensional
Re_i	Número de Reynolds del impulsor	Adimensional
T	Temperatura	K
u	Entrada del modelo (concentración inicial)	$g \cdot L^{-1}$
v	Velocidad	$cm \cdot s^{-1}$
V	Volumen	cm^3
$\bar{V}$	Volumen promedio en una célula	cm^3
W	Trabajo	J
W_i	Espesor de las palas del impulsor	m
X	Fracción molar	$mmol \cdot mol_{BIO}^{-1}$
x	Estado del modelo	Según el caso
y	Salida del modelo (concentración)	$g \cdot L^{-1}$
$\Delta\bar{H}_r^0$	Entalpía específica de reacción en condiciones estándar	$J \cdot mol^{-1}$
$\Delta G'^0_r$	Energía de Gibbs de reacción en condiciones estándar	J
ε	Energía de disipación	$J \cdot s^{-1} \cdot kg^{-1}$
μ	Viscosidad dinámica	$g \cdot cm^{-1} \cdot s^{-1}$
ρ	Densidad	$g \cdot (cm^3)^{-1}$
σ	Coeficiente estequiométrico	mol

Nomenclatura de subíndices y superíndices

Tipo	Símbolo	Significado
Subíndice	i	Corriente de entrada
Subíndice	j	Corriente de salida
Subíndice	k	Compuesto
Superíndice	l	Sistema de proceso
Subíndice	n	Reacción

Introducción

Los bioprocesos son una parte esencial de las industrias química, alimenticia y farmacéutica, y debido a la enorme gama de productos comerciales que generan resultan indispensables para la sociedad moderna. La característica principal que diferencia los bioprocesos de otras formas de procesamiento industrial es que se basan en la utilización de células vivas o partes de las mismas como agentes trasformadores de la materia. Numerosas aplicaciones se han logrado empleando cultivos de hongos y bacterias, así como aislamientos celulares de especies vegetales y animales (Doran, 2013). Dentro de los diferentes microorganismos empleados en bioprocesos se destaca *Escherichia coli* (*E. coli*), un organismo procariota utilizado tanto en procesos productivos como en estudios de bioquímica, biología molecular y biología pura. Este es un microorganismo relativamente simple y para el cual se dispone de gran cantidad de información, lo que permite usarlo como "organismo modelo". Es decir, las estrategias, métodos y herramientas desarrolladas a través de estudios en *E. coli*, se puede extrapolar a otros microorganismos adoptando procedimientos similares (Lee, 2009).

Para lograr una adecuada productividad en un bioproceso es necesario asegurar ciertas condiciones ambientales para el microorganismo. Estas son determinadas de forma experimental y se garantizan mediante un sistema de control acoplado al biorreactor donde se desarrolla la transformación. Las variables a controlar, comunes a cualquier bioproceso, son: composición del medio de cultivo, pH, temperatura, oxígeno disuelto y velocidad de agitación; aunque estas dos últimas dependen del tipo de cultivo. Todo organismo vivo interactúa de forma dinámica con su entorno, desarrollando diferentes respuestas ante variaciones en las condiciones ambientales. Esto se realiza mediante un conjunto de fenómenos de autorregulación conocidos como homeostasis, los cuales permiten que el pH intracelular, el potencial eléctrico a través de la membrana celular, el volumen citoplasmático y las concentraciones intracelulares de iones, se mantengan relativamente constantes y en valores para los que el organismo está adaptado o tolera (Sperelakis, 2012).

E. coli, al igual que cualquier otro organismo empleado como catalizador biológico, es sensible a los flujos de calor con el ambiente, desencadenando mecanismos de respuesta complejos para regular su homeostasis. Ante diferentes condiciones de temperatura se modifican las velocidades de las reacciones bioquímicas, la generación y consumo de energía en forma de ATP y la composición de los metabolitos intracelulares (Sizer, 1943; Tijhuis, Loosdrecht, & Heijnen, 1993; Ye et al., 2012). Igualmente, ante cambios en el metabolismo se producen variaciones en la tasa de producción de calor del microorganismo, alterando el flujo de calor con el medio (Maskow et al., 2010). En la mayoría de los bioprocesos, la temperatura es una variable de operación cuya manipulación se deja al sistema de control del biorreactor de turno, y se usa el rango de mejor crecimiento o producción de un determinado metabolito encontrado experimentalmente. No obstante, esta aproximación puede resultar simplista debido al carácter dinámico de las relaciones entre el flujo de calor y metabolismo (Maskow, 2013), particularmente en bioprocesos donde no se opera a temperatura constante.

El modelado dinámico es una herramienta para el diseño, control, optimización, e incluso, entendimiento de los procesos (Epstein, 2008), su mayor ventaja es que permite evaluar el comportamiento de un sistema sin la necesidad de experimentar con él. El Grupo de Investigación en Procesos Dinámicos de la Universidad Nacional de Colombia (KALMAN), es un grupo especializado en modelamiento y control de proceso y en el cual se han desarrollado diversas investigaciones en el área de los bioprocesos (Alvarez, Lamanna, Vega, & Revollar, 2009; C. Gómez, Calderón, & Álvarez, 2008). Recientemente, el grupo ha identificado como principal falencia en el modelado de bioprocesos, la ausencia de una descripción de los fenómenos de transporte entre la célula y su entorno, la cual permite relacionar variables ambientales con el metabolismo intracelular (Ortega, Álvarez, & Botero, 2018). Esta falencia se encuentra en las descripciones matemáticas de la respuesta de *E. coli* a diferentes condiciones de temperatura ambiental, en especial el carácter dinámico y autorregulatorio de dicho fenómeno.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un modelo matemático capaz de cuantificar los cambios en el metabolismo de la glucosa y en el flujo de calor con el entorno que se dan en *E. coli* ante diferentes condiciones de temperatura ambiental. El modelo se fundamenta en el conocimiento de la bioquímica a nivel celular, los principios de conservación de la materia y la energía y los fenómenos de transporte. Para su desarrollo se emplea la metodología de

Modelamiento Semifísico de Base Fenomenológica (MSBF), desarrollada por el grupo KALMAN y la cual ha sido aplicada a investigaciones en diferentes áreas (Alvarez et al., 2009; Hoyos, López, & Alvarez, 2016). Con el modelo es posible predecir cambios en el metabolismo energético y variaciones en la velocidad de crecimiento del organismo de interés a diferentes condiciones de temperatura. Y si bien está desarrollado para *E. coli*, su estructura es generalizable a otros organismos procariotas.

Este modelo puede ser usado para optimizar las condiciones de crecimiento o producción de un bioproceso con *E. coli*, así como para definir condiciones para un mejor desempeño de los sistemas de control de temperatura de un biorreactor. Incluso, esta representación matemática del proceso permite de forma didáctica mejorar el entendimiento de la regulación térmica en el microorganismo. Así mismo puede ser usado como base para el desarrollo de modelo más complejos. Por ejemplo, aquellos que emplean estrés térmico para inducir la producción de una proteína recombinante (Valdez-Cruz, Ramírez, & Trujillo-Roldán, 2011). Otra posible aplicación para el modelo es su uso como sensor virtual para predecir un estado metabólico particular a partir de la medición de cambios de temperatura del medio. Investigaciones que emplean microcalorimetría ya han reportado resultados de este tipo (Maskow, 2013).

El presente documento está compuesto por cinco capítulos: el **Capítulo 1** inicia con los fundamentos teóricos sobre el modelado de bioproceso y se expone la metodología de modelamiento empleada. Así mismo se dan algunos aspectos teóricos que son necesarios considerar a la hora de modelar sistemas biológicos y se plantea el estado del arte de esta área del conocimiento. En el **Capítulo 2** se inicia el desarrollo del modelo partiendo de la descripción del proceso se explican las consideraciones y analogías usadas para la matematización del mismo. En el **Capítulo 3** se plantean los principios de conservación que permiten obtener la estructura básica del modelo y se dan las ecuaciones constitutivas que permiten generar la estructura extendida del modelo. El **Capítulo 4** continúa con el ajuste de los parámetros del modelo y su consecuente versión computacional. Seguidamente, se realiza la validación del modelo y se discuten los resultados obtenidos. Finalmente, en el **Capítulo 5** se encuentran las conclusiones de la investigación y algunas perspectivas para próximas investigaciones.

1. Conceptos básicos del modelado de procesos biológicos

En este capítulo se ponen en contexto los aspectos generales de la teoría de modelado de procesos, así como de algunas características particulares de los procesos biológicos. Se inicia con una serie de enunciados con la finalidad de definir al modelo como representación abstracta de un proceso real y especificar las diferentes formas de transformaciones biológicas. A continuación, se habla de las características de los modelos matemáticos y de su configuración en términos y estructura. Se sigue con una descripción de los diferentes tipos de modelos, resaltando ventajas y desventajas de cada uno. Así mismo, se explica la metodología de modelado semifísico de base fenomenológica (MSBF), la cual es seleccionada para desarrollar el presente trabajo. El capítulo continúa abordando el tema específico de los procesos biológicos, se explican las principales características de estos y se introduce al lector en aspectos matemáticos básicos para su descripción. Seguidamente se enuncia un sistema de clasificación particular para los modelos de bioproceso, agrupados según el nivel de detalle. El capítulo finaliza con una contextualización histórica del modelado de procesos biológicos y el estado del arte de la temática particular del presente trabajo.

1.1 Definiciones

1.1.1 Proceso y sistema

Un proceso es un conjunto de actuaciones de un fenómeno natural o de una operación artificial donde se transforma materia, energía y/o información. Los procesos ocurren en un intervalo de tiempo determinado y tienen una organización para las actuaciones, además generan un producto característico o salida del proceso (Alvarez, 2017; Real Academia Española, 2014). Bajo esta definición se observa que un proceso es algo real que ocurre en la naturaleza o que es creado por el hombre. Es importante enfatizar esto debido a que como menciona *Ross Ashby*

(1961), ‘‘*toda máquina real contiene un número de variables no inferior a infinito*’’. Por lo tanto, el científico que ha de enfrentarse con este infinito número de variables, tiene que escoger para su examen un número finito de ellas.

Para analizar un proceso, con su infinito número de variables, el único camino es definiéndolo como un sistema, el cual es un objeto abstracto. La abstracción es el acto de separar por medio de una operación intelectual las características relevantes del proceso para analizarlas aisladamente, bien porque se conoce cómo funciona y se puede describir de manera precisa, o porque sin saberlo detalladamente, se puede aplicar una analogía para describirlo (Álvarez, Gómez, & Botero, 2014; Real Academia Española, 2014). En cualquiera de los dos casos es necesaria una forma de lenguaje para abstraer el proceso y describirlo. Esto puede lograrse mediante una representación verbal, escrita, gráfica o matemática. Así, un arquitecto representa un espacio real a través de una maqueta, un ilustrador representa una idea mediante un dibujo, un periodista describe un suceso de forma verbal o escrita y un ingeniero representa un proceso mediante ecuaciones.

1.1.2 Modelo

Con base en la diferenciación entre proceso y sistema, y resaltando la importación del ejercicio de abstracción, se puede realizar una definición formal de modelo en el contexto de la ingeniería. Un modelo de un proceso es una representación mediante expresiones matemática de un grupo de fenómenos donde se transforma materia, energía e información, en un determinado intervalo de tiempo. Dicha representación debe, como mínimo, predecir el comportamiento cuantitativo de al menos una de las variables del proceso bajo unas determinadas condiciones.

1.1.3 Proceso Biológico

Un proceso biológico es una forma particular de proceso que se caracteriza porque el agente transformador de materia y la energía es, o proviene, de un ser vivo. Al igual que con otros procesos, ocurren en un intervalo de tiempo determinado, tiene una organización particular para el grupo de actuaciones y generan un producto característico o salida.

1.1.4 Diferencia entre bioproceso y proceso fisiológico

Todos los seres vivos realizan trasformaciones de la materia y la energía para garantizar su supervivencia. Por esto se hace necesario diferenciar aquellos procesos biológicos que se dan como un fenómeno natural, de aquellas operaciones diseñadas por el hombre para aprovechar esta capacidad de los seres vivos. Tradicionalmente esta diferencia se obtiene del contexto, sin embargo, como el presente trabajo trata de ambos, se propone el uso de dos términos para diferenciarlos.

Al hablar de bioprocesos, se hace referencia a aquellos diseñados por el hombre y que basados en el aprovechamiento del funcionamiento de las células tienen un fin productivo industrial. En estos se emplean células microbianas, animales o vegetales, o componentes celulares como enzimas, y dependiendo del agente trasformador utilizado, cada bioproceso tendrá características operativas distintivas. Por otra parte, se le llama proceso fisiológico a las transformaciones "internas" que realiza todo organismo como parte de su ciclo vital. El término proceso biológico se usa entonces para referirse de manera general a ambas formas de transformación. Esta diferenciación puede parecer innecesaria para un experto del área de bioprocesos, pero dada la gran cantidad de modelos matemáticos que se desarrollan en fisiología animal, vegetal y microbiana en la actualidad, vale la pena aclarar estos términos. Además, un buen diseño de bioprocesos viene acompañado de un correcto entendimiento de los procesos fisiológicos del organismo a aprovechar.

1.2 Modelos matemáticos

1.2.1 Características

Todo modelo, al ser una abstracción consciente, es siempre más simple que el proceso que describe, luego modelo y proceso nunca pueden ser iguales, así mismo se pueden desarrollar muchos modelos diferentes para un mismo proceso (Korn, 2003). Los modelos matemáticos se distinguen de otras formas de representación por el lenguaje del que se valen para lograr la descripción del objeto real. En los modelos matemáticos se usan números, ecuaciones y relaciones lógicas que generan conexiones entre cantidades medibles. Este lenguaje permite algo que ninguna otra forma de representación puede hacer de manera precisa: realizar predicciones cuantitativas de lo que ocurre al objeto real. Sin embargo, hay una concepción

errónea de que esto es lo único que se logra con el modelo matemático. Además de la capacidad de predicción, un modelo puede lograr una mejor descripción y explicación del proceso, permitir la optimización del mismo e incluso puede generar nuevas hipótesis no intuitivas (Epstein, 2008).

Los modelos matemáticos están compuestos por estructura y términos. Los términos están formados por constantes, parámetros y variables, mientras que la estructura hace referencia a la relación entre los diferentes términos del modelo mediante operadores matemáticos (Alvarez, 2011; Alvarez et al., 2009). Las constantes son valores numéricos fijos que van desde cantidades universalmente aceptados a valores arbitrariamente fijados por el modelador. Los parámetros están asociados a las entradas del proceso y deben ser definidos para que el modelo sea soluble, estos pueden ser determinados mediante ecuaciones constitutivas o identificación paramétrica. Las variables son los términos que sólo pueden conocerse al resolver el modelo, es decir, la incógnita que debe encontrar el modelo (Alvarez, 2017).

La estructura del modelo se construye a través de operadores lineales como la igualdad (=), adición (+), resta (-), división (/), desigualdad (>, <), derivación (dx/dy), entre otros. Por lo tanto, en un modelo la estructura básica siempre posee un carácter lineal, a diferencia de los términos que pueden ser o no lineales (Alvarez, 2017). La no linealidad de los términos se presenta, por lo general, en las ecuaciones constitutivas que describen los parámetros. Cuando esta se presenta confiere a un sistema de ciertas características, en particular, el comportamiento de sistemas no lineales no está sujeto al principio de superposición, como sí lo está un sistema lineal (Boeing, 2016).

1.2.2 Clasificación

Los modelos matemáticos pueden agruparse de diversas maneras. Por ejemplo, se diferencian entre modelos estáticos de dinámicos, esto si en su estructura se igualan o no todas las derivadas temporales a cero (estado estacionario). Así mismo, se diferencian modelos de parámetros distribuidos de modelos de parámetros concentrados, esto si la estructura del modelo tiene o no derivadas espaciales. Igualmente, un modelo puede ser representado en el dominio del tiempo o en el dominio de la frecuencia si se emplea alguna transformada para su representación matemática. Existen muchos otros tipos de agrupaciones, no obstante, no se pretende dar mayor detalle en este tipo de diferenciación, para ello se recomienda consultar a

(Hangos & Cameron, 2001) y (Ljung, 1999). Se definen entonces en este capítulo dos formas de clasificación de los modelos que están muy relacionadas: la primera según la cantidad de información que brindan y la segunda según la diferencia en la estructura matemática que lo compone.

Según la cantidad de información que brindan del fenómeno, los modelos se pueden agrupar en tres clases (Concari, 2001; L. Gómez, Amicarelli, Alvarez, & di Sciascio, 2004): Modelos explicativos, los cuales contienen la mayor cantidad de información posible, normalmente se basan en leyes y principios y no toman nada por analogía. Modelos descriptivos, los que, sin explicar los fenómenos, realizan una definición de las características, componentes y condiciones en que se presentan, describen los rasgos más relevantes del proceso y agregan supuestos para construir una hipótesis de operación creíble, desde la que se obtiene el modelo. Modelos puramente predictivos, los que se limitan a realizar una representación que permite calcular los efectos de las relaciones entre las variables de interés del sistema, sin brindar entendimiento de los fenómenos involucrados.

Según el origen de la estructura matemática, los modelos se clasifican en tres grupos (Alvarez, 2011, 2012; Rodrigues & Minceva, 2005): Modelos fenomenológicos, también llamados de caja blanca, los cuales están basados únicamente en fundamentos teóricos que permiten explicar perfectamente el comportamiento de los procesos. Todo en dichos modelos proviene de leyes o principios básicos y sus principios de formulación son, por ejemplo: la ley de conservación y la ley de causalidad (ley de gradiente). Modelos empíricos, también llamados de caja negra, se construyen sólo a partir de datos experimentales que se ajustan a una estructura matemática dada. Su formulación se apoya en las herramientas de estadística y tratamiento de señales para crear relaciones entre entradas y salidas del proceso. Modelos semifísicos, estos son obtenidos de la combinación de fenomenológicos y empíricos, por lo que también son llamados de caja gris. Estos pueden ser de base fenomenológica si poseen una estructura caja blanca o de base empírica si poseen una estructura caja negra.

Nótese que los modelos fenomenológicos tienen un carácter fuertemente explicativo, mientras los empíricos son puramente predictivos. Por su parte, los modelos caja gris de base fenomenológica tienen un carácter descriptivo. La descripción fenomenológica resulta atractiva debido a su carácter explicativo y poder de extrapolación. Sin embargo, son muy

difíciles de obtener debido a la alta complejidad matemática, por lo que este tipo de modelos son escasos en aplicaciones de ingeniería. Al contrario, la descripción empírica es muy simple, pero resulta útil en las tareas de optimización y control de procesos. La mayor desventaja de estos modelos es que son altamente dependientes de los datos, por lo que, si algo cambia en la operación del proceso, debe obtenerse un nuevo conjunto de datos y un nuevo modelo, es decir no son extrapolables y desconocen totalmente la naturaleza de las relaciones reales entre entradas y salidas del proceso. En el punto medio, la descripción semifísica brinda al modelo interpretabilidad sin comprometerse con una solución numérica extremadamente compleja.

1.2.3 Espectro de aplicación

La **Figura 1-1** presenta un espectro de aplicación de los modelos según su estructura matemática y se dan algunos ejemplos de ubicación de soluciones para problemas de modelado modernos. En el extremo "negro" del espectro se encuentran problemas en los cuales no se cuenta con leyes estructuradas para describir el comportamiento de las entidades que se quieren modelar. En general, todas las formas de interacciones sociales tienen esta característica, luego se requiere de métodos inductivos basados en estadística y datos experimentales para su descripción. En el extremo "blanco" se encuentran los problemas que cuentan con leyes deducidas a partir de primeros principios. Por ejemplo, en el análisis de sistemas eléctricos se cuenta con las ecuaciones de Maxwell y la descripción de sistemas físico-dinámicos se tienen las leyes de Newton (Karplus, 1977).

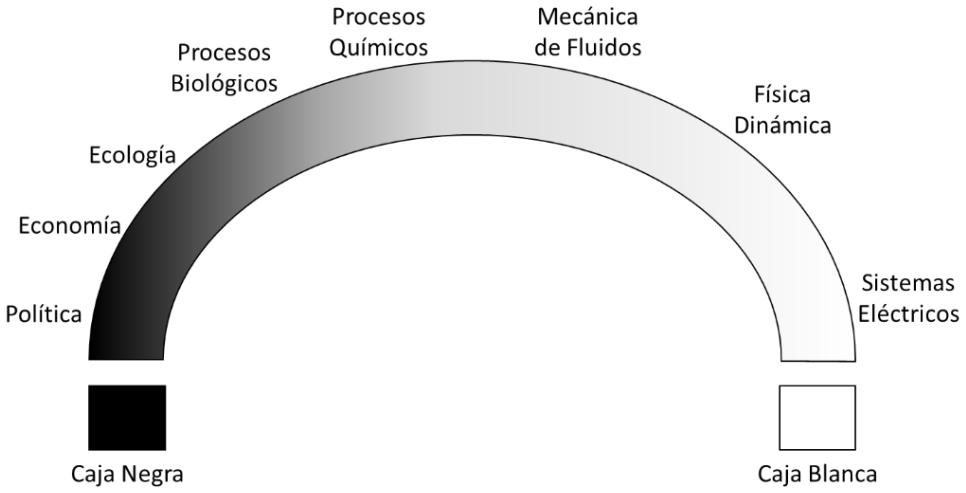

Figura 1-1: Espectro de modelos según su estructura. Adaptado de Karplus (1977)

En la parte media del espectro se aprecian diversos grados de "gris". En la zona "gris claro" hay problemas donde se cuenta con entendimiento general de los fenómenos implicados, pero obtener o ajustar una descripción puramente deductiva resulta imposible, dada la complejidad espacio-temporal del proceso o la carencia de datos distribuidos precisos. Por ejemplo, en mecánica de fluidos y en proceso químicos se cuenta con las ecuaciones de Navier-Stokes, fenómenos de transporte y deducciones de cinéticas químicas. A pesar de ello, solucionar modelos puramente fenomenológicos u obtener datos espacio-temporales de estos problemas resulta muy complejo. En la zona "gris oscuro" se encuentran procesos en los que se cuenta solo con un entendimiento parcial de los fenómenos implicados. Son ejemplos de esto los modelos de procesos biológicos, que heredan las características de los procesos químicos, sumado a que el entendimiento de la fisiología y la bioquímica aún se encuentra en construcción.

1.3 Metodología de modelado semifísico de base fenomenológica (MSBF)

Los modelos semifísicos de base fenomenológica permiten abordar problemas complejos sin necesidad de enfrentar al investigador con una matemática extremamente compleja y sin comprometer la interpretabilidad de la representación. Existen diversas propuestas metodológicas para este tipo de modelos, las cuales difieren en el número de pasos a ejecutar, secuencia de ejecución y en la forma de ejecución de cada paso (Ortega et al., 2018). En el presente trabajo de investigación se sigue la metodología de Modelado Semifísico de Base Fenomenológica (MSBF), desarrollada por el Grupo de Investigación en Procesos Dinámicos – KALMAN de la Universidad Nacional de Colombia de la sede Medellín. Dicha metodología se vale de diferentes formas de abstracción como el uso de analogías, para facilitar la concepción de las ecuaciones matemáticas. Dichas ecuaciones se encuentran fundamentadas en la universalidad de los principios de conservación y solo se hace uso de formulaciones empíricas para resolver incertidumbres paramétricas (Álvarez et al., 2014; C. Gómez et al., 2008).

La metodología de Álvarez et al. (2009), consiste en un algoritmo de diez pasos donde se inicia con la descripción verbal y un par de gráficas que permiten mejorar el entendimiento del proceso y facilitar la abstracción de este. Seguidamente, se aplican los principios de conservación para crear la estructura del modelo y se emplean ecuaciones constitutivas para

determinar el mayor número de parámetros posibles. Al final, se procede con la solución numérica del modelo mediante ordenador y se validan los resultados con datos experimentales. La metodología ha sido empleada para solucionar problemas de modelado de diferente índole (Alvarez et al., 2009; C. Gómez et al., 2008; Hoyos et al., 2016; Ortega et al., 2018). A continuación, se enumera los diez pasos y se explica cada uno de ellos:

1. Elaborar una descripción verbal y un Diagrama de Flujo de Proceso (DFP) que se complementen. El entendimiento del proceso es lo que da la capacidad de realizar abstracción del proceso en un sistema. Dicho entendimiento se sintetiza en una descripción verbal y el desarrollo del DFP, siendo ambos complementarios. El texto debe ser una descripción fiel de las sucesiones y características más relevantes del proceso, incluyendo los rasgos cuantitativos. El DFP debe contar con suficientes especificaciones para apreciar las características del proceso señalando y marcando las partes de forma adecuada. El objetivo de este paso es poder comunicar al lector de manera asertiva los pormenores del proceso.
2. Fijar un nivel de detalle para el modelo y postular una hipótesis de modelado. El objetivo del modelado hace referencia a la pregunta que responderá el modelo, es decir, definir qué permitirá predecir. El nivel de detalle habla de la profundidad de la descripción matemática, por ejemplo, si el modelo tendrá variaciones espaciales a nivel microscópico, o sólo opera a un nivel macroscópico mediante variaciones temporales. La hipótesis de modelado es la aplicación de una analogía que permita matematizar de manera fácil el proceso al describirlo como similar a un proceso conocido. Este paso permite fijar de manera explícita el grado de abstracción que el modelo realiza del proceso.
3. Definir los Sistemas de Proceso (SdeP) sobre los que se modelará y representar la relación de todos los SdeP en un Diagrama de Flujo en Bloque (DFB). El SdeP es una abstracción del proceso a la manera de un sistema, representa la región en la cual se aplican los principios de conservación y de cierta forma es análogo al volumen de control empleado en descripciones fenomenológicas. Un SdeP puede o no estar delimitado por una separación física en el proceso real y la cantidad de SdeP necesarios para el modelo depende de la exigencia del nivel de detalle. El DFB permite visualizar los SdeP seleccionados y las interacciones de materia y energía entre los mismos, facilitando en gran medida el paso siguiente. En conclusión, se divide el proceso a modelar en sistemas a través de los cuales se intercambia masa y energía.

4. Aplicar sobre cada uno de los SdeP los principios de conservación a todas las propiedades de interés. En este paso se aplican balances de materia y energía, para describir las variaciones de las propiedades de interés del modelo. Estos balances se plantean en forma de ecuaciones diferenciales y se debe siempre verificar las suposiciones hechas para su deducción. Lo más común es realizar un balance de materia total, un balance de materia por cada componente y un balance general de energía. Con este paso se comienza a generar la estructura básica del modelo.
5. Seleccionar entre las ecuaciones dinámicas de balance aquellas con información valiosa para cumplir con el objetivo del modelo. Definir las dinámicas con información suficiente y pertinente al objetivo del modelo, y descartar aquellas que se repiten o no aportan información. Esto está directamente relacionado con el objetivo del modelo pues depende de la selección de las ecuaciones que permiten discernir las variables a calcular. Con este paso se refina la abstracción matemática y se define la estructura básica del modelo.
6. Definir para las ecuaciones dinámicas de balance esenciales los parámetros, las variables y las constantes en cada SdeP. De manera explícita, definir cada uno de los términos y así diferenciar entradas, estados y salidas del modelo. Se recomienda el uso de tablas donde se precise el tipo de término, simbología, significado y unidades empleadas para expresarlo. Esto último ha de representar extremo cuidado ya que del manejo de unidades depende la congruencia del modelo. Las constantes deben ser definidas con una adecuada referencia bibliográfica o con base en la realidad física del proceso.
7. Hallar ecuaciones constitutivas o de valoración que permitan calcular el mayor número de parámetros en cada SdeP. Las ecuaciones constitutivas o de valoración son usadas para evaluar un parámetro del modelo a través de una igualdad o de una función matemática. Las ecuaciones constitutivas provienen de datos empíricos o leyes de gradiente y comúnmente se obtienen de revisión bibliográfica. Por su parte, las ecuaciones de valoración son las ecuaciones algebraicas que se generan al igualar a cero la deriva de un balance. Es posible que usando ecuaciones constitutivas o de valoración aparezcan nuevos parámetros dentro de las funciones, pero se espera que esos nuevos parámetros sean más simples de hallar. En este punto es donde la analogía toma gran relevancia, pues permite identificar los parámetros del modelo con base en la hipótesis de modelado. Aunque las ecuaciones constitutivas o de valoración hacen parte del modelo, no pertenecen a la estructura básica del mismo, por lo que conforman su estructura extendida.

8. Verificar los grados de libertad del modelo. Los grados de libertad se calculan como la diferencia entre el número de incógnitas y el número de ecuaciones del modelo. Se busca que ambas cantidades sean iguales, es decir cero grados de libertad. En general, cuando el modelo posee más incógnitas que ecuaciones deben reducirse las incógnitas haciendo explícitos algunos de los parámetros, valiéndose nuevamente de ecuaciones constitutivas. Esto quiere decir que este paso se desarrolla de manera cíclica junto con el paso anterior reduciendo cada vez más los grados de libertad del modelo. Cero grados de libertad implica que el modelo está listo para resolverse y tendrá una única solución. Puede darse el caso en que la carencia de información no será posible igualar el número de incógnitas con el número de ecuaciones. Si esto ocurre se debe hacer uso de algún tipo de algoritmo de optimización para identificar los parámetros del modelo.
9. Obtener el modelo computacional o solución del modelo matemático. Se recomienda que la solución o integración del modelo se realice de forma numérica, empleando ordenador y un software de preferencia. Al aplicar un método numérico debe tenerse especial cuidado con la selección de los pasos de integración que pueden introducir al modelo comportamientos dinámicos no deseados.
10. Validar el modelo para diferentes condiciones y evaluar su desempeño. La validación consiste en comparar el modelo con datos experimentales del comportamiento de las variables de interés. En un inicio, la comparación se puede hacer de forma cualitativa y luego pasar a verificar con datos numéricos. Se enfatiza en que no se debe usar el mismo conjunto de datos experimentales empleado durante la identificación de parámetros, pues esto induce sesgos en la capacidad predictiva del modelo. El proceso de validación da los límites o alcances del modelo, es decir, en qué condiciones resulta fiable.

Para un mayor detalle del algoritmo de la metodología se recomienda consultar el capítulo 2 de (Alvarez, 2017). Para mejorar la comprensión de la aplicación de la misma se recomienda al lector consultar alguno de los casos de estudio desarrollados por el grupo de investigación (Alvarez et al., 2009; Hoyos et al., 2016). En la presente tesis, la metodología se trabaja en tres grandes secciones: Pre-construcción del modelo que abarca los pasos uno a tres y se encuentra en el **Capítulo 2**. Construcción de la estructura matemática del modelo que se compone de los pasos cuatro a siete y se encuentra en el **Capítulo 3**. Y ajuste y simulación del modelo que aborda los tres últimos pasos y se encuentra en el **Capítulo 4**. Dentro de cada capítulo se diferencian los pasos de la metodología MSBF marcados en el título de la respectiva sección.

1.4 Características de Procesos biológicos

Tanto los bioprocesos como los procesos fisiológicos pueden ser descritos mediante herramientas matemáticas propias de la ingeniería como ecuaciones diferenciales y leyes de gradiente. Específicamente, los procesos biológicos poseen tratamientos ingenieriles similares a los procesos químicos, debido principalmente a que las transformaciones biológicas son un conjunto de reacciones químicas. Así, una reacción biológica puede ser descrita aplicando conceptos fundamentales de la química, particularmente de la química orgánica. A pesar de esta similitud fenomenológica, existen diferencias relevantes que hacen a los bioprocesos más complejos que los procesos químicos (Atkinson, 1986; Heinzle, Biwer, & Cooney, 2007). En esta sección se detallan algunas de estas características como la catálisis mediante enzimas, la sensibilidad a condiciones ambientales y los sistemas regulatorios del metabolismo. Otras características de los procesos biológicos son resaltadas por (Ortega, Álvarez, & Botero, 2017).

1.4.1 Reacciones enzimáticas

Una característica particular de los procesos biológicos es que las reacciones que se dan en los seres vivos se encuentran catalizadas principalmente por enzimas. Estas son proteínas producidas por el mismo organismo, las cuales favorecen la velocidad de una reacción siempre y cuando esta sea posible termodinámicamente. El conjunto de todas las enzimas presentes en un organismo en un instante de tiempo determina las reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que realiza, es decir su metabolismo. A su vez la cantidad de cada enzima en un organismo depende de la expresión génica que controla la síntesis de proteínas ante una determinada condición ambiental (J. M. Berg, Tymoczko, & Stryer, 2015; Mathews, Van Holde, Appling, & Anthony-Cahill, 2013). La velocidad a la cual se lleva a cabo cada reacción enzimática se representa mediante una expresión de cinética enzimática. En sistemas biológicos dichas expresiones suelen ser de origen empírico y en la actualidad se cuentan con diferentes formalismos (Saa & Nielsen, 2017).

Algunos de los formalismos más empleados para representar la velocidad de las reacciones enzimática son: las leyes de potencia (Voit, 2013), las aproximaciones lineales basadas en series de Taylor (Hatzimanikatis & Bailey, 1997), la ley de acción de masa (Voit, Martens, & Omholt, 2015), las representaciones basadas en termodinámica de procesos irreversibles (Ederer & Gilles, 2007), entre otros. Cabe aclarar que en el desarrollo de modelos dinámicos

no suelen mezclarse estos formalismos y cada uno cuenta con ventajas y desventajas tanto en la calidad de la descripción como la operatividad (Saa & Nielsen, 2017). En el presente trabajo se opta por usar la cinética tipo de Michaelis-Menten debido a que es la de uso más difundido en bioprocesos, además de poseer poca cantidad de parámetros, los cuales son fácilmente interpretables (Michaelis & Menten, 1913). Esta cinética tiene origen mecanicista, pero se encuentra simplificada bajo supuestos que permiten una representación más compacta. La cinética de Michaelis-Menten se representa mediante la siguiente expresión:

$$r_x = \frac{r_{\max} C_x}{K_m + C_x}$$

donde C_x es la concentración del compuesto x, r es la velocidad de aparición o desaparición del compuesto x y r_{max} es la velocidad máxima de la reacción a concentración infinita de x, por lo que está asociada a la concentración de la enzima que cataliza la reacción. Por su parte, K_m es la contante de Michaelis-Menten, esta se interpreta como una constante de disociación entre el complejo enzima sustrato, es decir, un factor inverso a la afinidad de la enzima por el compuesto que cataliza. K_m se calcula como la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima. Típicamente, r_{max} y r poseen la mismas unidades [mol/(m^3.s)] y K_m posee las mismas unidades que la concentración del compuesto x [mol/m^3].

El éxito de la cinética de Michaelis-Menten para representar reacciones enzimáticas radica en que a concentraciones altas de sustrato ($C_A >> K_m$) la velocidad de la reacción llega a un valor máximo que depende de la concentración de enzima ($r_A \approx r_{max}$) y la velocidad se aproxima a una cinética de orden cero. Por otro lado, a concentración baja de sustrato ($C_A << Km$) hay enzimas disponibles para incrementar la velocidad de la reacción ($r_A \approx r_{max}/K_m$) y la velocidad se aproxima a una cinética de primer orden. Esto permite describir el comportamiento de la mayoría de las enzimas, así como la velocidad de crecimiento microbiano mediante una extensión de esta cinética, apreciable en el modelo Monod (Monod, 1942).

Los procesos que se llevan a cabo dentro de un ser vivo tienen una mayor cantidad de reacciones que un proceso químico típico. Además, estas reacciones bioquímicas suelen estar altamente interconectadas, a pesar de la alta especificidad que poseen las enzimas. Esto porque casi cada reacción metabólica es catalizada por una enzima diferente. A su vez, cada

metabolito puede participar un varias reacciones y la acción de cada enzima puede estar regulada por diversos metabolitos, generando una red metabólica con numerosas interacciones (Walhout, Vidal, & Dekker, 2012). Todo esto genera en los procesos biológicos comportamientos dinámicos típicamente no lineales (Prigogine & Nicolis, 1985).

1.4.2 Efectos ambientales sobre las reacciones enzimáticas

Las concentraciones de reactantes y enzimas no son las únicas variables que afectan la velocidad de una reacción bioquímica, factores ambientales como pH, oxígeno y temperatura también son significativos. Para reacciones enzimáticas, el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción se expresa mediante la ecuación de Arrhenius (Logan, 1982). Esta indica un aumento en la velocidad de la reacción en función de la temperatura y es incluida fácilmente en el término de la velocidad máxima de la reacción de la ecuación de Michaelis-Menten (Doran, 2013):

$$r_{\max} = A_r e^{\frac{-Ea}{RT}}$$

donde R es la constante universal de los gases ideales [J/(mol.K)], T es la temperatura absoluta [K]. A_r es el factor pre-exponencial de Arrhenius y Ea es la energía de activación de la reacción [kJ/mol]. Cabe aclarar que la aplicabilidad de esta ecuación se encuentra limitada a los rangos en los cuales las proteínas son desnaturalizadas por efectos térmicos. La mayoría de las proteínas se desnaturalizan entre los 45 y 50°C y se ha demostrado que la ecuación de Arrhenius solo es aplicable para reacciones enzimáticas entre 0 y 53°C. Temperaturas superiores producen una rápida disminución de la velocidad de reacción (Sizer, 1943, 1944).

Existen otras ecuaciones empleadas para representar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas. Sin embargo, la ecuación de Arrhenius continúa siendo la más difundida. Como caso particular se menciona la ecuación de Ratkowsky (Ratkowsky, Lowry, McMeekin, Stokes, & Chandler, 1983), empleada con éxito para describir la dependencia de la temperatura del crecimiento microbiano (Amillastre, Aceves-Lara, Uribelarrea, Alfenore, & Guillouet, 2012). En el presente documento se opta por la expresión de Arrhenius para reproducir el efecto de la temperatura sobre las reacciones bioquímicas, y para abordar el problema del límite de desnaturalización se incluye en los balances de materia un término de degradación de la biomasa dependiente de la temperatura.

El pH también tiene un efecto significativo sobre la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, al punto que la máxima velocidad sólo se da a valores específicos, afectando tanto la velocidad máxima como la constante de Michaelis-Menten. Para la representación matemática de esta variable no existe una única ecuación de uso difundido, por lo que las ecuaciones constitutivas deben consultarse para cada caso particular. El presente trabajo no considera efectos del pH al asumir que se cuenta con un sistema de control adecuado y que la *E. coli* es capaz de mantener las condiciones homeostáticas intracelulares de esta variable.

1.4.3 Regulación enzimática y homeostasis

En los organismos existen diversos sistemas de control sobre la acción de las enzimas y por ende sobre la velocidad de las reacciones metabólicas. Esta regulación depende de las concentraciones de metabolitos y la disponibilidad de energía en un momento particular. Chubukov et al. (2012) reconocen tres niveles principales de regulación de la actividad enzimática. En primera instancia, la velocidad de las reacciones depende de la concentración de sustratos mediante la ley de acción de masas. Un segundo nivel se da por la regulación alostérica, en la que, un metabolito u otra molécula efectora interactúa con la enzima modificando su afinidad por el sustrato y la capacidad para formar y liberar el producto. Se le conoce como activador a la molécula que induce cambios conformacionales que mejoran la actividad enzimática, mientras se le llama inhibidor a la molécula que genera el efecto contrario. El tercer nivel se da cuando las velocidades de las reacciones se modifican en función de la cantidad total de enzima presente. La síntesis de enzimas depende de los mecanismos de expresión génica, las regulaciones transcripcionales y traduccionales y la señalización celular.

Matemáticamente, la regulación a nivel de ley de acción de masas se logra describir al hacer depender los términos cinéticos del modelo de la concentración de todos los sustratos involucrados en la reacción. En el caso de la regulación alostérica, existen diferentes ecuaciones constitutivas empleadas para representar este fenómeno, la más empleada es la ecuación de Hill (Hill, 1910). En esta se eleva a un coeficiente (n) el término de la concentración de sustrato en la ecuación de Michaelis-Menten que indica mayor ($n>0$) o menor ($n<0$) actividad de la enzima. La ecuación de Hill se indica a continuación:

$$r_A = \frac{r_{\max} C_A{}^n}{K_h + C_A{}^n}$$

En esta expresión el término de la constante de Michaelis-Menten es remplazado por la constante de Hill (K_h), aunque poseen la misma interpretación y unidades. Cabe resaltar que dentro de cada uno de los formalismos para representar la velocidad de las reacciones enzimática, existen diferentes formas de incluir la regulación alostérica (Saa & Nielsen, 2017). Aquí solo se menciona la ecuación de Hill, pues es la más empleada cuando se trabaja con el formalismo de Michaelis-Menten. Por su parte, la regulación a nivel de expresión génica se incorpora a un modelo al expresar la velocidad máxima de la reacción como una función de la concentración de enzima total ($r_{max} = f(C_{enzima})$). A su vez, se necesita de un balance de masa para las enzimas consideradas y un conjunto de ecuaciones constitutivas que describan los fenómenos de síntesis enzimática, los cuales dependen del sistema de señalización celular, la transcripción y traducción de genes.

Los dos primeros niveles de regulación actúan de forma casi instantánea mientras el tercer nivel permite un control relativamente lento, pero que opera a largo plazo (Doran, 2013). En el metabolismo celular los tres niveles de regulación actúan al unísono para garantizar la viabilidad del organismo ante diferentes condiciones ambientales. La respuesta de los organismos a diferentes condiciones ambientales recibe el nombre de respuesta celular homeostática (Kültz, 2005). La homeostasis son el conjunto procesos fisiológicos de autorregulación que garantizan que las propiedades del medio interno del organismo se mantengan relativamente constantes y en valores a los que el organismo está adaptado tolera (Sperelakis, 2012).

En la respuesta celular homeostática se diferencia otro mecanismo de respuesta a cambios ambientales llamado respuesta celular al estrés. Mientras la primera es permanente, la segunda se activa a través del sistema transductores de señales en respuesta a condiciones ambientales fuera de los rangos fisiológicos (Kultz, 2003). Sin embargo, ambos procesos de adaptación tienen en común que dependen de la disponibilidad de energía, la cual a nivel intracelular se traduce en la disponibilidad de moléculas de Adenosín Trifosfato (ATP). En consecuencia, tanto el metabolismo energético como el crecimiento celular están estrechamente coordinados por la disponibilidad energética del organismo en un momento dado y ante diferentes condiciones ambientales (Kültz, 2005).

En el presente trabajo se consideran tanto los efectos dinámicos de ley de acción de masa como los de la regulación alostérica, sin considerar la regulación a nivel de expresión génica más allá de los efectos sobre la disponibilidad de energía en forma de ATP. Es decir, el modelo permite observar los cambios en el metabolismo energético ante diferentes condiciones de temperatura, incluyendo condiciones de estrés térmico, más no aporta información sobre el sistema transductor de señales y la expresión génica. Como se verá en el **Capítulo 3**, para matematizar la velocidad de las reacciones se emplea una versión modificada de la cinética de Michaelis-Menten para múltiples sustratos. Para representar los efectos de regulación alostérica se opta por no hacer uso de la ecuación de Hill, sino que se propone una modificación a la ecuación de Michaelis-Menten en el término K_m. Para matematizar la demanda de energía en forma de ATP por parte del tercer nivel de regulación se usa una ecuación empírica dependiente de la temperatura propuesta previamente por otro autor.

1.4.4 Respuesta dinámica de los sistemas autorregulados

Los procesos regulatorios enzimáticos se traducen en una serie de realimentaciones o *feedbacks* que rigen el comportamiento dinámico de los seres vivos. Una realimentación consiste en el hecho de que parte de la salida del sistema vuelve a entrar en él, bien sea como masa, energía o como una señal. Por ejemplo, en una ruta metabólica los productos de la misma modifican la velocidad a la que esta se realiza. Además, cambios ambientales modifican la disponibilidad de enzimas para catalizar reacciones, lo que a su vez afecta la energía disponible en forma de ATP. Las realimentaciones metabólicas pueden ser negativas o positivas y permiten que el sistema tenga capacidad de control y autocorrección, siendo una característica fundamental de los seres vivos (Maroto & Monk, 2008).

Desde un punto de vista cinético, las realimentaciones que rigen las reacciones enzimáticas causan que las concentraciones intracelulares de intermediarios metabólicos no sean en muchos casos constantes, experimentando variaciones periódicas oscilatorias (Mathews et al., 2013). Las oscilaciones de metabolitos intracelulares de la glucólisis se asocian a la regulación enzimática debida a la carga energética de la célula en enzimas como la fosfofructoquinasa (Termonia & Ross, 1981), y en *E. coli* se asocian particularmente al sistema fosfotransferasa (Maria, 2015). La frecuencia de estas oscilaciones ha demostrado ser constante ante un amplio rango de temperaturas ambientales (Betz & Chance, 1965) en un fenómeno conocido como compensación térmica (Ruoff, Zakhartsev, & Westerhoff, 2007).

En la bibliografía existen una gran cantidad de modelos bioquímicos de fenómenos oscilatorios intracelulares para diversos organismos, incluyendo *E. coli* (Diaz Ricci, 2000; Maria, 2015). No obstante, los que consideran los efectos de la temperatura son escasos (Ruoff, Christensen, Wolf, & Heinrich, 2003; Xiao, Drengstig, & Ruoff, 2009). Es preciso señalar que en un sistema de reacciones bioquímicas, descrito mediante cinéticas de Michaelis-Menten, es posible controlar la aparición de oscilaciones y la frecuencias de las mismas mediante el valor de la constante K_m (Bier, Bakker, & Westerhoff, 2000; Goldbeter, 2013).

1.4.5 Clasificación de modelos en bioprocesos

En el mundo de los bioprocesos existe una clasificación particular de los modelos matemáticos empleados. En esta los modelos se organizan según el nivel de detalle de la representación del fenómeno biológico y la interpretabilidad de los parámetros. Dicha clasificación separa a los modelos de bioprocesos entre estructurados y no estructurados, segregados y no segregados. Debido al uso difundido de estos términos es necesario definirlos y explicar cómo encaja con la clasificación mencionada en la **Sección 1.2.2**. Vale aclarar que ambas formas de clasificar no son contradictorias, simplemente son maneras diferentes de realizar la agrupación.

A los modelos que predicen variables fisiológicas, bioquímicas o de regulación intracelular, es decir, aquellos que dan detalle de la estructura interna de las células, se les conoce como modelos estructurados. Nótese que los modelos de bioprocesos estructurados se valen de una correcta representación de los procesos fisiológicos, con la finalidad de dar una descripción más acertada del proceso biológico, lo que permite una mejor toma de decisiones a nivel productivo. Por el contrario, las representaciones matemáticas que no consideran características fisiológicas internas de la célula se conocen como modelos no estructurados.

Un tipo particular de modelos estructurados son los llamados modelos cibernéticos, los que se basan en la premisa de que los mecanismos por los cuales los organismos coordinan sus reacciones metabólicas permiten tener un control óptimo de sus procesos internos. El concepto se basa en la suposición de que la evolución ha seleccionado los mecanismos que realizan un mejor control y que esto es suficiente para dar el criterio de óptimo (Schügerl & Bellgardt, 2012). Es importante resaltar que en los modelos estructurados no tiene sentido asumir la hipótesis de crecimiento equilibrado, es decir, la hipótesis de que no se da acumulación de nutrientes intracelulares.

A los modelos que consideran la heterogeneidad de la población celular, es decir, que no consideran que una célula promedio represente toda la población, se conocen como modelos segregados. Por ejemplo, un modelo que considere la posición en el ciclo celular de la población, diferenciando entre células jóvenes, células en reproducción y células en fase de senescencia, es un modelo segregado (Díaz, 2012; Schügerl y Bellgardt, 2000). Por el contrario, los modelos que consideran la representación de una población celular como un promedio se conocen como modelos no segregados.

Por lo tanto, existen combinaciones entre estos tipos de modelos. La **Figura 1.2** esquematiza estas formas de representación de los bioprocesos. Si se compra con la clasificación expuesta en el la **Sección 1.2.2**, un modelo no estructurado-no segregado sería asimilable (aunque no igual) a una representación caja negra de un bioproceso. A medida que se da mayor detalle de los procesos fisiológicos la descripción se mueve en el espectro hacia tonos grises. Además, si hay heterogeneidad en la población, a medida que el modelo es capaz de describirla, este va ganando capacidad fenomenológica. Por lo tanto, la descripción segregada-estructurada es la que más se acerca a lo que ocurren en un biorreactor (Fredrickson, 1991). No obstante, hay autores que aún consideran que debido a la dificultad para representar los mecanismos fisiológicos y el problema para estimar parámetros intracelulares o poblacionales, la descripción no estructurados-no segregada es más deseable (Parolini & Carcano, 2010), la cual también puede lograrse con modelos semifísicos de base fenomenológica.

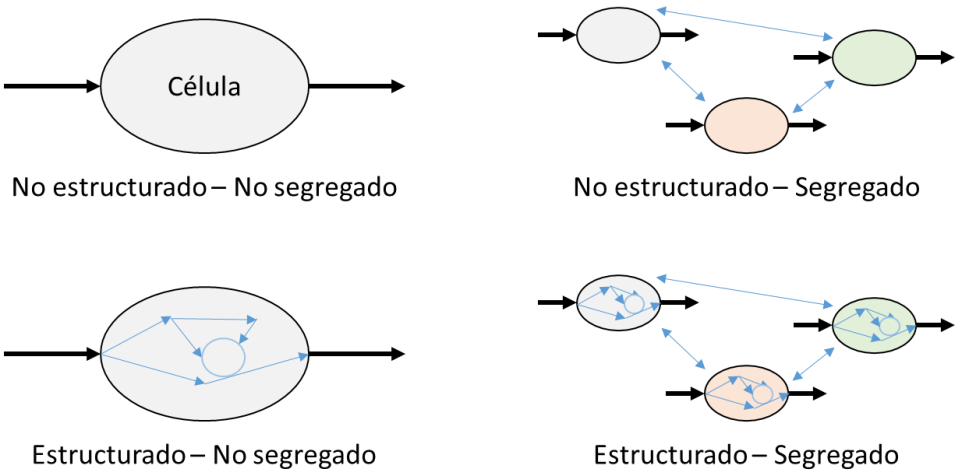

Figura 1-2: Representación gráfica de los diferentes tipos de modelos dinámicos en bioprocesos. Adaptado de Dunn et al. (2003)

1.5 Contexto histórico del modelado de procesos biológicos

La historia de las descripciones matemáticas de sistemas biológicos data desde inicios del siglo XIX. Numerosos autores han realizado aportes significativos, pero desafortunadamente no existe una bibliografía que detalle los cerca de 200 años de historia en esta área. En esta sección no se pretende concretar esta ardua labor, por lo que solo se opta por explicar los aportes más significativos en orden cronológico, enfatizando aquellos que permitieron un cambio de paradigma. Para esto se propone dividir la historia del modelado de sistemas biológicos en cuatro grandes periodos, agrupados según el detalle de la representación de los fenómenos biológicos. Así, la historia de los modelos matemáticos de sistemas biológicos se divide en: etapa temprana, etapa clásica, etapa descriptiva y etapa moderna. A continuación, se detallan las características de los modelos de cada periodo y se exponen algunas limitantes de estos.

1.5.1 Etapa temprana

Este periodo del modelamiento de sistemas biológicos abarca todo el siglo XIX. Durante éste, las representaciones matemáticas de procesos biológicos, naturales o artificiales, eran muy escasas. Las pocas descripciones existentes se caracterizan por el uso de modelos empíricos, principalmente funciones sigmoides con pocos parámetros, cierto grado de interpretabilidad y la capacidad de proporcionar predicciones acertadas (Parolini & Carcano, 2010). De este periodo se resaltan dos trabajos. El primero desarrollado por Pierre-François Verhulst (1838), quien logró describir la dinámica de crecimiento de poblaciones biológicas mediante la ecuación logística. Esta aún cuenta con vigencia y es la base de muchos modelos en ecología (Kingsland, 1995). El segundo aporte relevante lo desarrolló Thomas Robert Malthus (1803), siendo la primer persona en comprender la naturaleza autocatalítica del crecimiento de las poblaciones biológicas, la cual genera un respuesta a manera de ley exponencial.

La mayor limitante de los modelos de este periodo es que desconocen completamente los efectos de las condiciones ambientales. A pesar de esto, siguen siendo implementados e incluso se desarrollaron nuevas ecuaciones con este tipo de estructura ya entrados en la segunda mitad del siglo XX. Para un mayor detalle de este tipo de modelos se recomienda la lectura del artículo original (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van Riet, 1990). En este se realiza una rápida revisión de estos modelos, al tiempo que se evalúa la capacidad de ajuste a datos experimentales del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus plantarum*.

1.5.2 Etapa clásica

La etapa clásica del modelamiento de sistemas biológicos abarca la primera mitad del siglo XX. Esta comienza un cambio de paradigma generado gracias a los trabajos en fisiología vegetal de Frederick Blackman (1905). Este autor no desarrolló en principio ningún modelo, no obstante, mediante trabajos experimentales relacionó cuantitativamente el crecimiento vegetal con la concentración de sustratos y variables ambientales como la temperatura. Sin embargo, el verdadero punto de inflexión se da en 1913 cuando Leonor Michaelis y Maude Menten proponen un modelo matemático para representar la cinética de reacciones enzimáticas. Este modelo se basa en una deducción teórica y posee interpretabilidad paramétrica, permitiendo una descripción de base fenomenológica de las reacciones biológicas. Más tarde, en 1925, George Briggs y John Haldane dilucidaron que la mayor ventaja del modelo de Michaelis y Menten es que se le puede aplicar toda la teoría de cinética química.

Posteriormente, el trabajo de Michaelis y Menten se extrapoló a la descripción del crecimiento de poblaciones microbianas. Esto se logró gracias al aporte de Jacques Monod quien en 1942 propuso un modelo para crecimiento de microorganismos en función de la concentración de sustrato. De este trabajo se derivan una gran cantidad de modelos que siguen la misma estructura de caja gris de tipo semiempírica (Konak, 2007). Un resumen de algunas representaciones matemática de este tipo puede ser consultado en (Caramihai & Severin, 2013). Esta clase de modelos posibilita relacionar crecimiento celular, concentración de sustrato y algunas variables ambientales (Parolini & Carcano, 2010). Por ejemplo, la temperatura puede adicionarse fácilmente al modelo de Monod al expresar la rata de crecimiento máxima (μ_{max}) como una función tipo Arrhenius (Doran, 2013).

En la actualidad los modelos con la estructura clásica tipo Monod dominan ampliamente el campo de los bioprocesos (Ortega et al., 2017). Esto gracias a la poca cantidad de parámetros que poseen y a la existencia de metodologías experimentales para ajustarlos. Como desventaja estos modelos consideran a la entidad biológica como un componente homogéneo, lo resulta insuficiente cuando el organismo es sometido a condiciones ambientales variantes que afectan el crecimiento y la composición de las células. Además, son incapaces de discernir alteraciones fisiológicas a la largo de una población, imposibilitando cuantificar la diferenciación morfológica en los individuos de la misma (Caramihai & Severin, 2013).

1.5.3 Etapa descriptiva

De la necesidad de mejorar los modelos clásicos debido a estas dos limitaciones mencionadas, se desarrolla la etapa descriptiva. Esta etapa abarca desde mediados del siglo XX hasta el inicio de la década de los 90s y empieza con una investigación paradigmática en el campo de fisiología. En 1952 Alan Hodgkin y Andrew Huxley, partiendo de consideraciones físicas y biológicas, matematizaron la generación y transmisión de los impulsos nerviosos. Este aporte resultó ser la primera aplicación exitosa de modelado matemático para un proceso fisiológico, correlacionando de manera excelente con datos experimentales y permitiendo explicar el comportamiento de un fenómeno biológico incluso antes de ser medido directamente (Schwiening, 2012). Este modelo de carácter semifísico les valió el premio Nobel de medicina en 1965 y sirvió de punto de partida para el advenimiento tanto de los modelos estructurados y como de los segregados.

De los primeros modelos estructurados en microbiología se resaltan las investigaciones de Paul Weiss y J. Lee Kavanau (1957) e Ivan Málek (1958), los cuales fueron posteriormente condensados por Arnold Gerhard Fredrickson (Fredrickson, 1976). Por su parte, resulta difícil rastrear el origen de los modelos segregados, sin embargo se pueden resaltar los trabajos tempranos de Norman Bailey y Albert Bharucha-Reid (Bailey, 1964; Bharucha-Reid, 1960). Así como los trabajos de Doraiswami Ramkrishna et al. (Ramkrishna, Fredrickson, & Tsuchiya, 1967). Diversos ejemplos de modelos estructurados y/o segregados de bioprocesos pueden ser consultados en el capítulo 13 de (Schügerl & Bellgardt, 2012). En este se aprecia un incremento de la complejidad de la descripción biológica a medida que se modelan diferentes tipos de comportamientos.

1.5.4 Etapa moderna

La etapa moderna del modelado de procesos biológicos abarca desde la última década del siglo XX hasta la actualidad. En esta se continúa abogando por una descripción más detallada de los fenómenos fisiológicos y la heterogeneidad de las poblaciones biológicas, pero se diferencia fundamentalmente de la etapa descriptiva por el desarrollo de nuevos métodos analíticos y el crecimiento exponencial de la capacidad de computo (Navas, Esteban, & Quesada, 2009), lo que ha generado un cambio en la forma como se entiende y se enseña la biología. Ejemplos de esto son la aparición de nuevos paradigmas científicos como la biología de sistemas, la

ingeniería metabólica y la bioinformática. Cada uno de estos afronta el problema de representar los sistemas biológicos de diferente forma, pero en última instancia buscan la misma meta, un mejor entendimiento de los fenómenos biológicos.

En este contexto moderno, la metodología MSBF aplicada a sistemas biológicos, surge como una gran alternativa gracias a su carácter didáctico-explicativo, y a que mediante el uso de analogías permite lidiar con descripciones fenomenológicas incompletas y problemas de identificación de parámetros (Álvarez et al., 2014; Ortega et al., 2017). El presente trabajo, en el desarrollo de un modelo matemático para el proceso de autorregulación térmica de *Escherichia coli*, procura una descripción matemática dinámica de base fenomenológica a nivel metabólico. Además, al analizar la población celular se considera que todos los individuos son homogéneos, por lo tanto, es un modelo estructurado y no segregado. La descripción de fenómenos autorregulatorios lo incluyen dentro del grupo de los modelos cibernéticos y si se ubica dentro de los paradigmas modernos de modelado, sigue la aproximación *bottom-up* de la biología de sistemas (Sobie, Lee, Jenkins, & Iyengar, 2011).

1.6 Estado del arte

Desde el comienzo del siglo XXI, se han desarrollado diversos modelos dinámicos del metabolismo central de *E. coli* que describen respuestas a diferentes estímulos ambientales. Cada uno de ellos se basa en distintas suposiciones y tienen como objetivo representar diferentes aspectos del microorganismo. Es por esto que cada modelo varía de forma significativa en la cantidad de metabolitos, reacciones y parámetros que consideran. La **Tabla 1-1** muestra algunos de estos modelos, señalando algunas de sus características principales, como las rutas metabólicas que consideran y su complejidad numérica.

Nótese en la **Tabla 1-1** que en años más recientes se han desarrollado modelos más extensos, esto gracias al incremento de la capacidad de cómputo y al mejoramiento de las técnicas analíticas. Se destaca que esta tabla da razón de los parámetros totales del modelo y no de los identificados, siendo la labor de identificación paramétrica una de las más arduas desde el punto de vista computacional. De los modelos mostrados solo los de Buchholz et al. (2002), Kadir et al. (2010), Usuda et al. (2010), Khodayari et al. (2014), Jahan et al (2016). y Kurata et al (2018). poseen ecuaciones para el cálculo de la biomasa. Mientras solo los modelos de Peskov et al (2012). y Maria (2015) describen dinámicas oscilatorias intracelulares.

Tabla 1-1: Modelos dinámicos para el metabolismo central del carbono para *E. coli*.

Autores (Año)	Cantidades consideradas			Rutas consideradas	
	Metabolitos	Reacciones	Parámetros	C. Krebs	Pentosas P.
Chassagnole et al. (2002)	18	30	127	No	Si
Buchholz et al. (2002)	3	5	24	No	No
Degenring et al. (2004)	10	22	122	No	Si
Ceric y Kurtanjek (2006)	10	24	144	Si	Si
Kadir et al. (2010)	24	35	150	Si	Si
Usuda et al. (2010)	30	52	255	Si	Si
Peskov et al. (2012)	28	70	90	Si	Si
Maria (2015)	9	7	17	No	No
Khodayari et al. (2014)	93	138	73	Si	Si
Jahan et al. (2016)	49	43	323	Si	Si
Kurata y Sugimoto (2018)	51	46	351	Si	Si

Además de la cantidad de metabolitos y reacciones consideradas, los modelos de la **Tabla 1-1** difieren en las ecuaciones cinéticas de su estructura secundaria. Esto no solo debido a las consideraciones asumidas, sino a la variedad de formalismos existentes para estas ecuaciones (Saa & Nielsen, 2017). Al punto que, según Lima et al. (2016), esta es la principal causa de que se generen discrepancias mayores en los resultados obtenidos entre modelos metabólicos dinámicos para *E. coli*. Es de gran interés para el presente trabajo que en ninguno de los modelos metabólicos mencionados consideran la temperatura como variable de proceso. En estos, el ajuste a datos experimentales se realiza para una condición ambiental de temperatura de 37°C, el cual se asume como constante de operación a lo largo del proceso.

En la literatura existen modelos que describen el crecimiento de *E. coli* en función de la temperatura, aunque todos ellos de carácter empírico, siendo la mayoría generados para aplicaciones a la industria de alimentos (Ben Yaghlene, Leguerinel, Hamdi, & Mafart, 2009; Corradini & Peleg, 2009; Fujikawa, Kai, & Morozumi, 2004; Van Derlinden, Bernaerts, & Van Impe, 2008). Incluso hay disponibilidad de un modelo estocástico que relaciona crecimiento

microbiano, temperatura y presión (Kumar & Libchaber, 2013). Sin embargo, no se encontró ningún modelo que relacione estas variables desde una perspectiva fenomenológica. No así ocurre con *Saccharomyces cerevisiae*, pues para este microrganismo se han modelado los efectos dinámicos en el crecimiento celular y la producción de etanol para diferentes temperaturas y modos de operación en el reactor (Amillastre et al., 2012).

En la revisión bibliográfica solo se encontró un modelo metabólico dinámico que considera la temperatura como variable de entrada al proceso. Este fue desarrollado por Ruoff et al. (2003) para *Saccharomyces cerevisiae*. El modelo posee 9 metabolitos, 7 reacciones y 14 parámetros, no posee ecuaciones para el crecimiento de biomasa, pero describe comportamientos oscilatorios intracelulares. Como apreciación, el modelo de Ruoff no cuenta con un balance de energía y analiza los efectos de la autorregulación térmica desde una perspectiva no cibernética. No obstante, al ser uno de los pocos materiales de consulta en el tema es de alta relevancia y se resalta su aporte al presente trabajo.

Con esta sección se finaliza el primer capítulo de la tesis que abarca el marco teórico y conceptual del problema de estudio. En el siguiente capítulo se da inicio de la metodología MSBF desarrollando los tres primeros pasos de la misma.

2. Pre-construcción del modelo

En la pre-construcción del modelo se hace uso de diferentes formas de abstracción para crear el sistema que representa el proceso. Esta abstracción facilita la concepción de las ecuaciones matemáticas y permite entender y comunicar el proceso que se quiere modelar, así como limitar los alcances de la investigación. En este capítulo se abarcan los pasos uno, dos y tres de la metodología MSBF, es decir, se realiza la descripción del proceso, se define el nivel de detalle y la hipótesis de modelado y se limitan los sistemas de proceso. En el apartado final del capítulo se dan las ecuaciones estequiométricas generales de las reacciones intracelulares consideras. La obtención de estas ecuaciones no hace parte la metodología, pero permiten simplificar la aplicación de los principios de conservación en el **Capítulo 3**.

2.1 Descripción del proceso (Paso 1)

La representación matemática del proceso de autorregulación térmica en *E. coli* requiere tanto de una descripción de las características generales del microorganismo y su metabolismo, como del medio circundante en el cual se desarrolla. Esto último es indispensable para entender y representar de forma adecuada los fenómenos de transferencia térmica entre *E. coli* y su medio ambiente. Es por esto que la sección se divide en tres partes: En la primera se enuncian las generalidades morfológicas y fisiológicas de *E. coli*. En la segunda, se describen los fenómenos hidráulicos que se dan alrededor del microorganismo cuando es cultivado en un biorreactor de tanque agitado. En la parte final, se detallan los procesos metabólicos internos de este tipo de microorganismo en crecimiento aerobio.

2.1.1 Generalidades de *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo gram negativo de la familia de las enterobacterias que tienen como nicho ecológico la flora intestinal de animales de sangre caliente, actuando normalmente como comensal. Es un quimioheterótrofo, es decir, depende de compuestos orgánicos para obtener

energía y átomos de carbono. Posee la capacidad para crecer tanto en medios aerobios como anaerobios, su temperatura de crecimiento preferente es de 37 °C y tiene capacidad de motilidad mediante flagelos (Croxen et al., 2013; Welch, 2006). *E. coli* es ampliamente utilizada tanto en procesos productivos como en estudios de ciencia básica. Es un organismo relativamente simple y para el cual se dispone de gran cantidad de información, lo cual permite usarlo como "organismo modelo". Es decir, las estrategias, métodos y herramientas desarrolladas a través de estudios en *E. coli*, se puede extender a otros organismos procariotas, adoptando procedimientos similares (Lee, 2009).

El tamaño y la forma de una célula de *E. coli* pueden variar en función de cambios ambientales y de la etapa del ciclo celular en que se encuentre. Mediciones por microscopía electrónica establecen una forma aproximada a un cilindro de bordes esféricos (**Figura 2-1**) con radio y longitud total promedio de 0.8 μm y 2 μm respectivamente (Phillips, Kondev, Theriot, Garcia, & Chasan, 2010). La densidad promedio del microorganismo es de 1.1 g/ml (Baldwin, Myer, Anderson, Koch, & Koch, 1995). Aproximadamente dos tercios del contenido de todas las células es agua, por lo que se ha estimado por separado la densidad de los componentes no acuosos en 1.3 g/ml (Howard, 2001). Experimentalmente se ha determinado el espesor conjunto de la membrana y pared celular en 28.7 Å (Hobot, Carlemalm, Villiger, & Kellenberger, 1984). Adicionalmente, en la **Figura 2-2** se muestra una micrografía real de una célula de *E. coli* donde se puede apreciar su morfología.

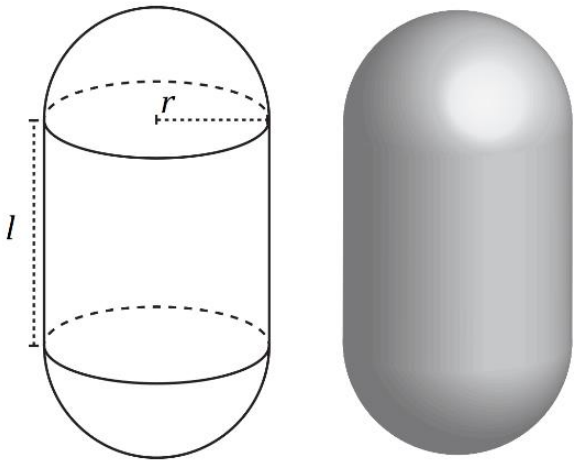

Figura 2-1: Geometría de una célula de *E. coli*.

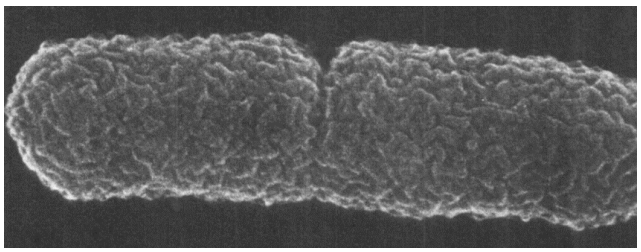

Figura 2-2: Micrografía electrónica de *E. coli* en proceso de división. Tomado de Amako & Umeda (1977).

2.1.2 Medio externo al microorganismo

El biorreactor de tanque agitado es el tipo de biorreactor de mayor uso en bioprocesos (Kadic & Heindel, 2014), en este la energía cinética del impulsor se trasforma en movimiento del medio de cultivo. Un fluido confinado agitado por un impulsor desarrolla un flujo turbulento que a escala macroscópica se aprecia como grandes remolinos. Sin embargo, la mayoría de las células bacterianas, como *E. coli*, tienen tamaños entre 1 y 2 μm. A esta escala el flujo del medio alrededor de la bacteria se comporta de forma laminar y por ende posee bajos número de Reynolds (Purcell, 1977). En el fenómeno conocido como cascada de energía por agitación, la energía de la turbulencia se transmite de la escala macroscópica en remolinos o *eddies* cada vez menores, hasta que en la escala más pequeña el flujo del *eddie* es laminar y la energía es disipada por la acción de la viscosidad en forma de calor que va al mismo medio (Kolmogorov, 1941, 1962; Richardson, 1922). La **Figura 2-3** se hace una representación de como a medida que se hace un acercamiento sobre un fluido en un tanque agitado, la turbulencia se subdivide en remolinos cada vez más pequeños, hasta que se alcanza un tamaño donde priman las fuerzas viscosas y el flujo es laminar.

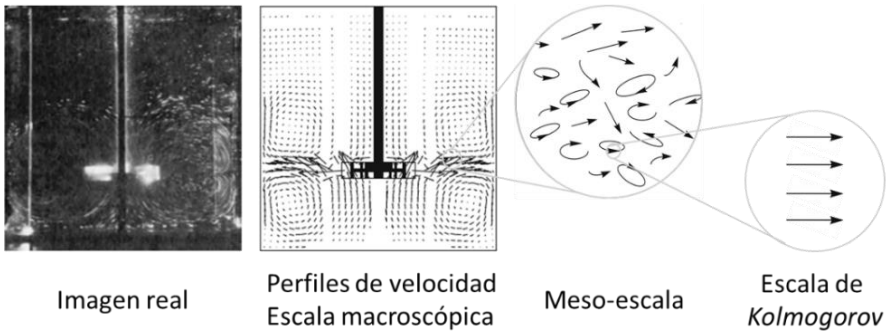

Figura 2-3: Representación de perfiles de velocidad y cascada de energía por agitación en reactor de tanque agitado. Adaptado de Doran (2013), Schäfer (1997) y Solomon (1981).

El tamaño y la velocidad del remolino más pequeño, también llamado *eddie* de Kolmogorov, es función de la energía cinética suministrada al fluido por el impulsor. Una célula de *E. coli* en un biorreactor de tanque agitado experimenta el medio circundante como un *eddie* de Kolmogorov de flujo laminar a través del cual puede desplazarse o es trasportada por arrastre (Purcell, 1977; Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2006). En la **Figura 2-4** se muestra una representación del flujo laminar alrededor de una célula de *E. coli* en la escala de Kolmogorov. Mientras se desplaza dentro del microtorbellino, la bacteria toma nutrientes del medio circundante, trasportándolos a través de su membrana y pared celular hasta el citoplasma.

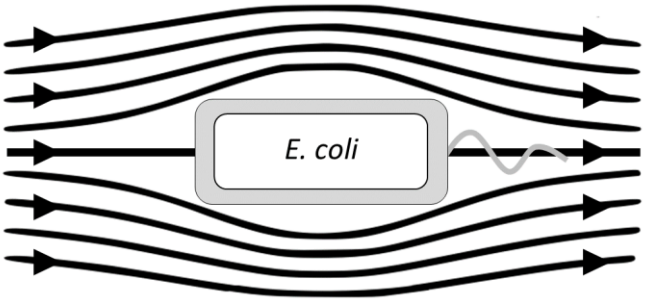

Figura 2-4: Representación del flujo laminar alrededor de *E. coli* cultivada en medio líquido.

En el interior de la célula estos nutrientes son oxidados en las reacciones metabólicas para generar la energía que mantiene el ciclo vital del organismo. Los subproductos de estas reacciones oxidativas son luego liberados al medio a través de la membrana y pared celular. Debida a que la velocidad de agitación del tanque modifica la velocidad y el tamaño de los *eddie* de Kolmogorov, esta modifica la disponibilidad y el trasporte de nutrientes y productos metabólicos (Ortega et al., 2018).

2.1.3 Medio intracelular

E. coli, al igual que cualquier otro ser vivo, opera como un sistema termodinámico abierto, intercambiando de manera contante materia y energía con su entorno. El intercambio de materia se da cuándo el organismo toma sustrato del medio circundante y libera posteriormente los productos de las reacciones metabólicas. Por su parte, el intercambio de energía se da al transferirse calor, producto de una diferencia de temperatura entre el medio y el organismo. Así mismo se trasfiere energía cuando el microorganismo realiza trabajo (W) sobre el entorno o viceversa. Este trabajo puede entenderse como proceso de expansión-compresión o desplazamiento mecánico entre el organismo y el entorno. Además de estos

procesos, el metabolismo de los seres vivos implica el intercambio de energía química, en la cual las sustancias intracelulares experimentan transformaciones a través de reacciones formando o rompiendo enlaces y generando nuevos compuestos.

Las reacciones metabólicas tienen la capacidad de generar o consumir energía en forma de calor. Las reacciones que generan calor se les llama exotérmicas y se caracteriza por un cambio de la entalpía de reacción negativo ($\Delta H<0$), mientras que las reacciones que absorben calor se les llama endotérmicas y se caracteriza por un cambio de la entalpía de reacción positivo ($\Delta H>0$). De forma similar, algunas de estas reacciones se encuentran favorecidas por un potencial termodinámico y se dan de forma espontánea, mientras otras no se encuentran favorecidas y, por lo tanto, no se dan de forma espontánea. Las reacciones favorecidas se les llama exergónicas y se caracterizan por un cambio en la energía libre de Gibbs negativo ($\Delta G<0$). Las reacciones no favorecidas se les llama endergónicas y se caracterizan por un cambio en la energía libre de Gibbs positivo ($\Delta G>0$).

En el interior de la célula, el metabolismo está conformado por una intrincada red de miles de reacciones bioquímicas que acopla procesos favorecidos termodinámicamente con procesos no favorecidos. Los procesos favorecidos se asocian a la generación de energía mediante degradación de los nutrientes que el organismo adquiere del entorno, lo que se conoce como procesos catabólicos. Los procesos no favorecidos consumen energía y se dan para mantener las funciones fisiológicas, generar moléculas funcionales y permitir el crecimiento y la multiplicación del organismo, a estos se les conoce como procesos anabólicos. Para que las reacciones endergónicas se lleven a cabo es indispensable acoplarlas a reacciones favorecidas.

En la mayoría de los organismos, la principal molécula para almacenar energía química es el adenosín trifosfato (ATP) (Mathews, Van Holde, & Ahern, 2002). De manera general las reacciones metabólicas no favorecidas suelen estar asociadas directa o indirectamente con el consumo de ATP, mientras las reacciones favorecidas suelen estar asociadas con su generación. Procesos catabólicos como la glucólisis y el ciclo del Krebs están asociados a la generación de ATP, mientras los procesos anabólicos como la síntesis de biomasa están asociados a su consumo (Urs von Stockar, 2013). La **Figura 2-5** esquematiza la lógica termodinámica del metabolismo, bajo esta se da la existencia de los seres vivos sin violar la segunda ley de la termodinámica.

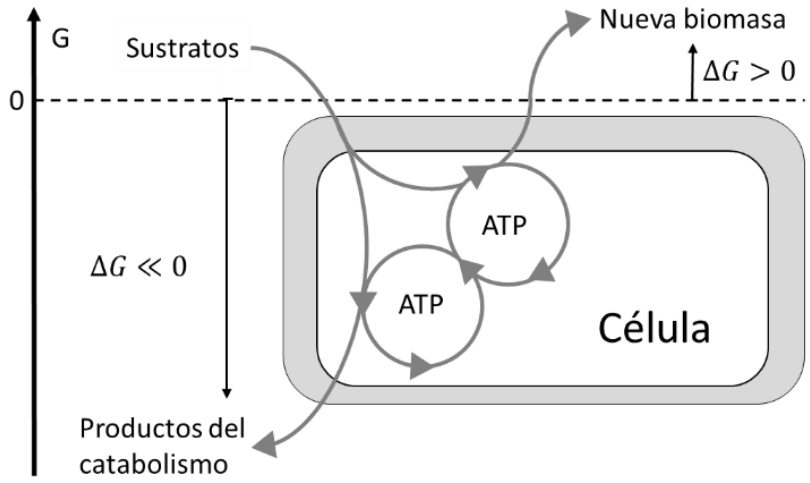

Figura 2-5: Representación del acople de reacciones catabólicas y reacciones anabólicas dentro de una célula. Adaptado de Urs von Stockar (2013).

Tanto los procesos anabólicos como los catabólicos se dan de forma continua y son indispensables para el funcionamiento del organismo, además ambos están fuertemente integrados a través de las dinámicas intracelulares del ATP. En la **Figura 2-6** se esquematizan los principales procesos anabólicos y catabólicos que se dan en el interior de una célula de *E coli* en presencia de oxígeno y con glucosa como fuente de carbono. Bajo estas condiciones, los principales productos oxidados del metabolismo son el anión acetato y el dióxido de carbono (Lara, 2011).

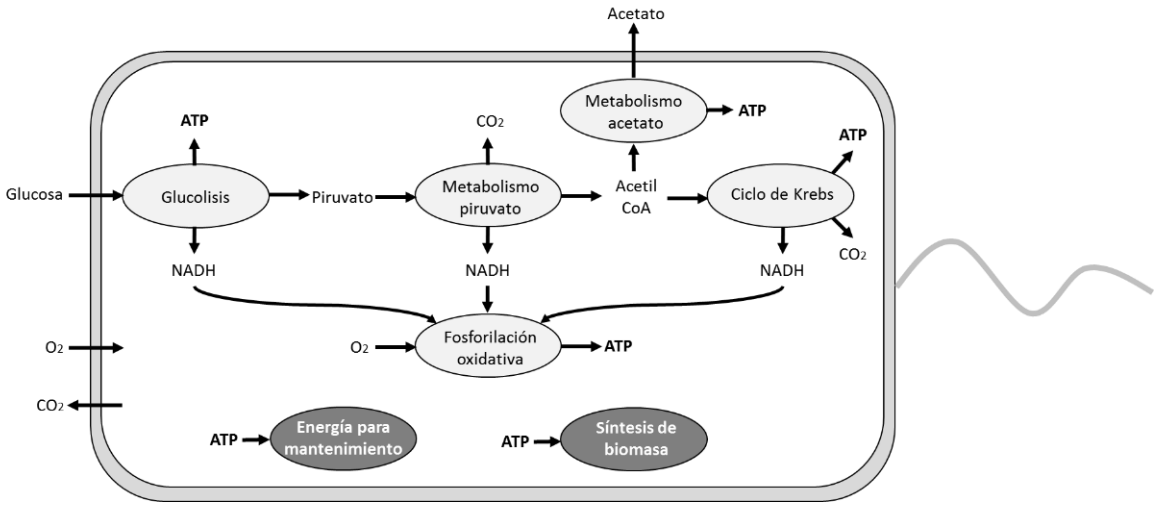

Figura 2-6: Principales procesos catabólicos (gris claro) y anabólicos (gris oscuro) en metabolismo aerobio.

El metabolismo implica muchos otros procesos adicionales, en la **Figura 2-6** solo se expresan los que mayor energía generan y consumen en forma de ATP. Cada uno de estos procesos está compuesto por una serie de reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas, por ejemplo, la glucólisis es un conjunto de diez reacciones, el metabolismo del piruvato es una única reacción y el ciclo de Krebs implica ocho reacciones (Mathews et al., 2002). El metabolismo del acetato está compuesto por dos reacciones reversible asociados a condiciones anaerobias o al sobre flujo metabólico en altas concentraciones de glucosa (Lara, 2011). La fosforilación oxidativa es realizada por cuatro complejos enzimáticos, cada uno con varias reacciones (J. M. Berg et al., 2015).

Los procesos anabólicos suelen ser más complejos pues implican cientos de reacciones, por ejemplo, la energía para mantenimiento representa el consumo de ATP necesario para sostener gradientes osmóticos y repolimerizar proteínas y otras moléculas que pierden su capacidad funcional por procesos naturales de degradación (Tijhuis et al., 1993). Por su parte, la síntesis de biomasa es un término ampliamente usado en bioprocesos que permite agrupar todas las reacciones anabólicas relacionadas al crecimiento y multiplicación del microorganismo, como la producción de aminoácidos, nucleótidos, entre otros (Noor, Eden, Milo, & Alon, 2010).

El calor liberado o consumido por las reacciones metabólicas, así como el flujo de nutrientes y productos oxidados a través de la membrana y pared celular que intercambia calor sensible entre el citoplasma y el medio de cultivo, generan una variación en la temperatura intracelular. Esta variación afecta las velocidades de las reacciones bioquímicas, modificando los procesos metabólicos de generación y consumo de ATP, modificando a su vez la generación o consumo de calor de las reacciones metabólicas y los flujos de nutrientes y productos oxidados (Ye et al., 2012). Al incrementar la temperatura, normalmente se incrementan las velocidades de reacción (Connors, 1990). Al llegar a temperaturas superiores a los 45°C, la mayoría de las enzimas que catalizan las reacciones bioquímicas se desnaturalizan, provocando una rápida caída de las velocidades de reacción.

Los procesos mostrados en la **Figura 2-6** siguen una relación proporcional directa entre temperatura y velocidad de reacción dentro del rango fisiológico del microorganismo. No obstante, debido a la ley de acción de masas, estas velocidades dependen también de las

concentraciones intracelulares de metabolitos. En el caso particular de las reacciones anabólicas, al aumentar la temperatura intracelular, la velocidad de desnaturalización de los biopolímeros aumentan y los gradientes osmóticos se modifican, haciendo necesario consumir mayor cantidad de ATP por parte de la célula para mantener su equilibrio osmótico (Tijhuis et al., 1993). Adicionalmente, ante condiciones muy elevadas de temperatura (estrés térmico), *E. coli* desencadena un sistema de respuesta, conocido como respuesta de choque térmico, que redirige la utilización de energía hacia la estabilización macromolecular mediante la producción de proteínas, principalmente chaperonas que controlar la desnaturalización de proteínas del hospedero (Kultz, 2003). Estos procesos se ven reflejados en el aumento del consumo de energía para mantenimiento y una disminución de la síntesis de biomasa.

Cuando un microorganismo permanece tiempos prolongados a alta temperatura es incapaz de producir suficiente energía para evitar los procesos de degradación de macromoléculas y muere. Si por el contrario, el microorganismo se lleva a baja temperatura, la velocidad de las reacciones bioquímicas disminuye tanto que no puede generar el suficiente ATP como para satisfacer los procesos fisiológicos. En este punto el microorganismo puede morir o entrar en un estado de latencia. Los valores numéricos para definir alta o baja temperatura dependen de las adaptaciones evolutivas de cada organismo. Para *E. coli* el intervalo de temperatura que soporta, sin ver gravemente disminuida su velocidad de crecimiento, está entre 20 y 43°C, aunque esto depende también de la cepa (Jones, VanBogelen, & Neidhardt, 1987; Marr, Ingraham, & Squires, 1964). A escala de laboratorio los bioprocesos suelen requerir energía en forma de calor para alcanzar rangos de temperatura adecuados para el microrganismo. Por el contrario, a escala industrial el calor generado por las reacciones metabólicas puede ser tal que aumenta la temperatura del medio de cultivo y el biorreactor necesita un sistema de enfriamiento (Doran, 2013).

Finalmente, es necesario tener en cuenta que no solo la temperatura del medio externo afecta el flujo de calor hacia la célula, los fenómenos hidráulicos también juegan un papel importante en la trasferencia de calor (Cengel & Ghajar, 2011). En una bacteria, la transferencia de calor está caracterizada por un coeficiente de transferencia de calor convectivo entre la partícula (la célula) y el fluido (el medio de cultivo). Este coeficiente de transferencia es función de la velocidad relativa entre la partícula y el fluido (Barigou, Mankad, & Fryer, 1998). Dicha velocidad es a la vez dependiente de varios factores, entre los más importantes están la

velocidad del *eddie* de Kolmogorov, la densidad relativa entre el medio y la célula y la velocidad y dirección de nado del microorganismo (Lareo, Fryer, & Barigou, 1997). Aunque esto último solo aplica para las bacterias con motilidad, como es el caso de *E. coli* (H. C. Berg, 1993, 2008). La **Figura 2-7** esquematiza los fenómenos de transferencia de calor que se dan entre la célula y el medio circundante.

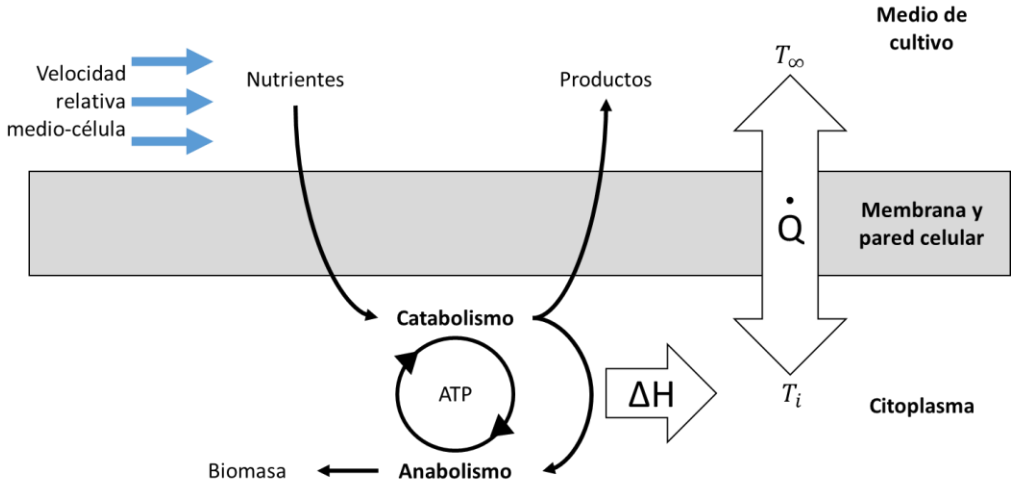

Figura 2-7: Esquema del fenómeno de trasferencia de calor en la membrana y pared celular.

En la **Figura 2-7**, las flechas delgadas representan flujos de materia, mientras las flechas gruesas simbolizan energía en forma de calor. Las flechas azules denotan el flujo del fluido alrededor de la célula, es decir, la cantidad de movimiento del medio de cultivo. ΔH es la entalpía de las reacciones metabólicas y $\dot{Q}$ el flujo de calor entre la célula y el medio circundante. Dicho flujo depende de la diferencia entre la temperatura intracelular T_i y la temperatura en el medio de cultivo T_∞. Un cambio en la velocidad relativa entre la bacteria y el medio modifica a su vez el coeficiente de transferencia de calor en la superficie.

Cabe resaltar que en esta representación no se tiene en cuenta la formación de una capa límite térmica o de cantidad de movimiento en la interfaz entre la célula y el medio, esto porque en el presente trabajo se opera con la transferencia de calor mediante análisis de parámetros concentrados. Bajo este tipo de análisis se supone que los cuerpos se comportan como un "bulto" cuya temperatura interior permanece uniforme en todo momento durante un proceso de transferencia de calor. Es decir, se tiene en cuenta la variación temporal de la temperatura, mas no la variación espacial, lo cual proporciona una gran simplificación del problema de transferencia de calor sin mucho sacrificio de la exactitud (Cengel & Ghajar, 2011).

2.2 Nivel de detalle e hipótesis de modelado (Paso 2)

El objetivo del modelo es responder a dos preguntas: ¿Cuáles son los cambios que se dan en el metabolismo central de *E. coli* ante diferentes condiciones de temperatura? y ¿Cómo es el cambio en el flujo de calor entre *E. coli* y el medio ante diferentes condiciones de temperatura? Ambas preguntas serán analizadas en un contexto dinámico, ajustando el modelo a datos tomados de cultivos aerobios en biorreactor de tanque agitado, con glucosa como fuente de carbono y operando por lotes. En este punto es necesario valerse de una serie de consideraciones para limitar el número de variables del proceso y representarlo como un sistema mediante un proceso de abstracción lógica. Además, se requiere hacer uso de dos analogías: La primera describe el medio circundante a la célula y permite calcular la trasferencia de energía térmica entre la célula y el entorno. La segunda, sirve para representar los procesos metabólicos intracelulares y facilitar la matematización de los mismos.

2.2.1 Consideraciones

A continuación se enuncian todas las consideraciones que, junto con las analogías que se discuten más abajo, dan forma la hipótesis del modelo.

- Los procesos intracelulares mostrados en la **Figura 2-7** representan los mayores intercambios de energía metabólica en el ciclo vital de *E. coli*. Adicional a estos, se considera una ruta general de pentosas fosfato que suple la necesidad de equivalentes reductores en forma de NADPH en la síntesis de biomasa (Mathews et al., 2013).
- Exceptuando condiciones particulares de deficiencia de nutrientes, el metabolismo celular posee una dirección favorecida hacia la oxidación de sustratos. El estudio de estas condiciones no hace parte del alcance del presente trabajo, luego no se consideran reacciones de flujo de carbono inverso como la gluconeogénesis.
- Las reacciones metabólicas consideradas, no son reacciones químicas que cuentan con una descripción mecanicista. Son en realidad balances globales que relacionan cantidades medidas experimentalmente mediante coeficientes de acoplamiento o rendimientos, siguiendo una descripción típica de textos de bioquímica.
- La síntesis de biomasa se realiza a partir de metabolitos intermediarios de las rutas catabólicas y no de la glucosa (Fredrickson, 1976; Noor et al., 2010). En esta reacción la fuente de nitrógeno se obtiene directamente del medio como amoníaco acuoso.

- El producto extracelular más representativo en *E. coli* es el acetato (Lara, 2011), luego este es considerado como el único ácido orgánico producto del metabolismo.
- La densidad y contenido de agua intracelular es siempre constante, es decir, un aumento de la biomasa implica un cambio proporcional del volumen de las células en el biorreactor.
- El aumento de la biomasa, y por ende el cambio de volumen de esta en el biorreactor, es un proceso más lento que las demás dinámicas que se consideran en el modelo.
- El consumo de ATP en la energía para mantenimiento agrupa todos los mecanismos que garantizan la integridad funcional de la célula, estos son: el trasporte activo para mantener gradientes osmóticos, la síntesis de nuevas proteínas desnaturalizadas y la producción de proteínas chaperonas (Kultz, 2003; Tijhuis et al., 1993).
- El modelo sólo describe la escala metabólica, no da información cuantitativa respecto a mecanismos de señalización, activación de factores de trascripción y expresión de génica.
- El comportamiento dinámico del metabolismo central del carbono de *E. coli* se representa de forma adecuada mediante balances globales de los procesos mostrados en la **Figura 2-7**. Esta presunción es factible al proveer al modelo de mecanismos de regulación alostérica enzimática y al acoplar los procesos catabólicos y anabólicos mediante la generación y consumo de ATP. En otras palabra, la apreciación es válida al considerar las realimentaciones entre reacciones bioquímicas (Link, Christodoulou, & Sauer, 2014).
- El flujo de calor entre la célula y su entorno puede ser descrito de manera adecuada mediante balances globales de los procesos representados en la **Figura 2-7**. Esto es válido gracias a que la entalpía en las reacciones es una función de estado y a que se tienen en cuenta los flujos más representativos de sustancias que entran y salen de la célula (Bevan & Boerio-Goates, 2000).
- La temperatura exterior a la célula es homogénea, es decir, no se considera capa límite térmica y el análisis de transferencia de calor se realiza bajo el criterio de parámetros concentrados (Cengel & Ghajar, 2011).
- Los medios de cultivo empleados con *E. coli* no poseen alta viscosidad (Newton, Schofield, Vlahopoulou, & Zhou, 2016; Schneider & Doetsch, 1974), por lo tanto se desprecia la disipación de energía en forma de calor, producto de la cascada de energía por agitación.

- *E. coli* es un organismo procariota y como tal no posee organelas internas (Lodish et al., 2015), el citoplasma se ve entonces como un único compartimento interno.
- La membrana y pared celular del organismo son tomados como una única barrera que separa el citoplasma del exterior. Esta estructura única se llama en adelante membrana-pared.
- En la membrana-pared no hay acumulación de metabolitos. En esta estructura sólo se lleva a cabo la reacción de la fosforilación y transporte de la glucosa del medio hacia el citoplasma, mediante el sistema enzimático Pts (Deutscher et al., 2014).
- En procariotas, la fosforilación oxidativa es un fenómeno que ocurre en la superficie interna de la membrana citoplasmática (Doelle, 1969). No obstante, los metabolitos que participan en este proceso no traspasan la membrana, por lo tanto, para el modelo aquí propuesto, se considera que este proceso ocurre en el citoplasma y no en la membrana-pared.
- En el modelo no se considera la coenzima flavín adenín dinucleótido (FAD), por lo que en la fosforilación oxidativa el único aporte de equivalentes reductores lo da el NADH. Para evitar incongruencia con la producción de ATP, se considera que en el ciclo de Krebs se producen 3,6 moles de NADH por mol de AcCoA y no 3 moles. Un mol de FADH equivale a 1,5 moles de ATP y 0,6 moles de NADH equivalen a la misma cantidad de ATP en fosforilación oxidativa.
- Todas las reacciones metabólicas se llevan a cabo en el interior del microrganismo, sin embargo, es necesario definir la reacción de síntesis de biomasa tanto dentro del microrganismo como en el medio de cultivo dado el carácter variable extracelular que posee la biomasa.
- Los únicos compuestos que pueden entrar o salir de la célula son: glucosa, acetato, amoniaco, fosfato, agua, oxígeno y dióxido de carbono. La concentración intracelular de estos es siempre constante y su flujo a través de la membrana-pared depende únicamente de la demanda o producción por parte del metabolismo del microorganismo.
- La bacteria siempre se mueve a una velocidad constante, luego el consumo energético producto de su motilidad es independiente de las condiciones ambientales. Lo que implica que no hay un cambio en la concentración de ATP como producto de la motilidad bacteriana, siendo este un valor de consumo basal.

- Toda la población microbiana en el biorreactor es homogénea, luego todos los individuos están sometidos a las mismas condiciones ambientales y generan las mismas respuestas a nivel metabólico.
- Se tiene en cuenta la velocidad de muerte celular en el biorreactor, esta es una variable macroscópica que es función de la temperatura del medio de cultivo.
- Dentro del biorreactor sólo se considera la fase líquida, es decir, se asume que tanto el oxígeno que necesita la célula como el dióxido de carbono que produce se encuentran disueltos en fase acuosa. Por ello el modelo no implementa la descripción de la transferencia de masa en el reactor.
- La pérdida de materia en el biorreactor, producto de procesos de evaporación, es despreciable, además la densidad del medio de cultivo se considera como constante.
- En el medio de cultivo, la temperatura del medio y la concentración de oxígeno disuelto y dióxido de carbono están controlados. Estos son valores constantes que operan como entradas del sistema. Gracias a estos, los flujos de oxígeno y dióxido de carbono entre la célula y el medio sólo dependen de la demanda o producción por parte del microorganismo.
- En el medio de cultivo hay control de pH, luego los efectos de este sobre el microorganismo son despreciados.
- El único reactivo limitante para la síntesis de biomasa considerado es la glucosa, es decir, las fuentes de nitrógeno, fósforo y sales minerales están en exceso y disponibles.
- Debido al tamaño que posee *E. coli* y al hecho de que no forma agregados en cultivos en medio líquido, no se consideran efectos de estrés hidrodinámico sobre el microorganismo (Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2006).
- Las concentraciones de metabolitos intracelulares es muy baja (Bennett et al., 2009), además los rangos de temperatura fisiológica que soporta *E. coli* son muy reducidos (Jones et al., 1987; Marr et al., 1964). Luego, se asume que la capacidad calorífica del citoplasma y la membrana-pared son constantes, siendo la capacidad calorífica a volumen constante igual a la capacidad calorífica a presión constante.
- De forma análoga, se considera que en el medio de cultivo no hay efectos representativos de los cambios de concentración y temperatura sobre la capacidad calorífica. Por esto para cada compuesto se emplea la capacidad calorífica de la especie pura, despreciando los efectos del cambio de temperatura.

- Para todas las reacciones, la variación en el calor sensible de los reactantes y productos es despreciable respecto a la entalpía de la reacción, luego, la entalpía de reacción es la estándar (Doran, 2013).
- Las únicas interacciones energéticas en el proceso son calentamiento-enfriamiento y reacción química. Por lo tanto, no se tienen en cuenta cambios de fase o interacciones dilución-concentración.
- Se supone que todos los efectos energéticos de campos (eléctricos, magnéticos, gravitatorios, etc.) están compensados. Por lo tanto, la única cantidad energética de interés para los balances es la energía interna.
- No se tienen en cuenta los efectos de partes móviles sobre el proceso como los fenómenos de expansión-compresión en la membrana-pared o trabajo de eje sobre el medio de cultivo en la agitación del biorreactor. Luego, el trabajo (W) es despreciable en los balances de energía.

2.2.2 Analogías

Tras definir las consideraciones, se da paso a la descripción de las dos analogías propuestas. La primera analogía se basa en la descripción de la cascada de energía por agitación para representar el flujo del medio de cultivo alrededor de la bacteria a escala microscópica. El *eddie* de Kolmogorov es visto como un flujo laminar de velocidad constante que lleva la célula *E. coli* como un cuerpo inmerso en el seno del fluido. La dirección del flujo laminar puede ser vertical u horizontalmente dependiendo si el impulsor del biorreactor es de flujo axial o radial y la velocidad de flujo del medio equivale a la velocidad (v_K) del *eddie* de Kolmogorov. La **Figura 2-8** esquematiza dicha analogía.

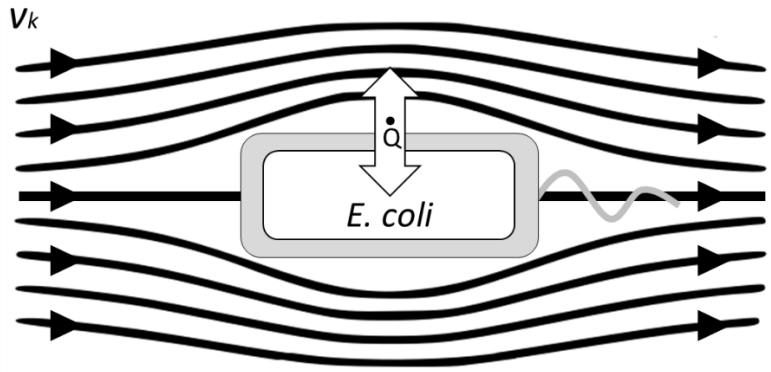

Figura 2-8: Analogía de *eddie* de Kolmogorov como flujo alrededor de un cuerpo inmerso

Nótese que hay una velocidad relativa entre el flujo en el *eddie* y la bacteria que determina las características de la trasferencia de calor que se da entre ambos. Por lo tanto, el coeficiente de trasferencia de calor de dicho fenómeno se calcula mediante una correlación acorde con la geometría descrita, tomando la velocidad de nado promedio del microorganismo como la velocidad del cuerpo dentro del *eddie*. Cabe resaltar que, aunque la analogía se desarrolla para una célula de *E. coli*, es aplicable a otras bacterias con diferente tamaño o forma.

Para microorganismos con forma no esférica, como *E. coli*, es posible analizar la transferencia de calor para diferentes orientaciones de la célula respecto al flujo. Sin embargo, se ha demostrado que el ángulo de aproximación no es relevante para el coeficiente de trasferencia de calor en partículas de forma elíptica a números de Reynolds bajos (Richter & Nikrityuk, 2013), como es el caso de los *eddie*s de Kolmogorov. La analogía propuesta permite analizar el coeficiente de transferencia de calor en diferentes condiciones hidrodinámicas macroscópicas, que varían la velocidad de flujo en el *eddie*, por ejemplo, cerca o lejos del agitador, tanto en matraces como biorreactores o biorreactores de diferente tamaño.

En la segunda analogía que usa el modelo, los procesos metabólicos dentro de *E. coli* operan de forma similar a un reactor químico perfectamente agitado (CSTR) donde hay un flujo de entrada constante de reactivos y una generación de productos. En la **Figura 2-9** se representa la analogía junto con el esquema de las reacciones bioquímicas consideradas. Esta figura hace las veces de diagrama de flujo de proceso (DFP) de la metodología MSBF. En esta se representa en rojo a las moléculas de intercambio energético, en azul a las coenzimas y en negro a los demás metabolitos, nutrientes y productos. Las flechas delgadas simbolizan flujos de materia, la flecha gruesa intercambio de energía en forma de calor y cada recuadro de borde gris representa una reacción. En total se usa 12 reacciones para representar el metabolismo central de *E. coli*.

Las reacciones 1 a 10 están vinculadas a proceso catabólicos del metabolismo central. Por su parte, las reacciones 11 y 12 hacen parte de los procesos anabólicos. Las reacciones 3 y 9 son las únicas de carácter reversible. Bajo este esquema simplificado se puede dar seguimiento a los principales sustratos y productos del crecimiento de *E. coli* tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Las reacciones seleccionadas en la analogía son simplificaciones de los principales procesos de consumo y generación de energía en forma de ATP. Aquí se tienen en

cuenta las conversiones donde se dan las principales realimentaciones en el flujo de carbono, así como los puntos con mayor cambio de energía disponible (ΔG) y, por lo tanto, los más regulados a nivel metabólico.

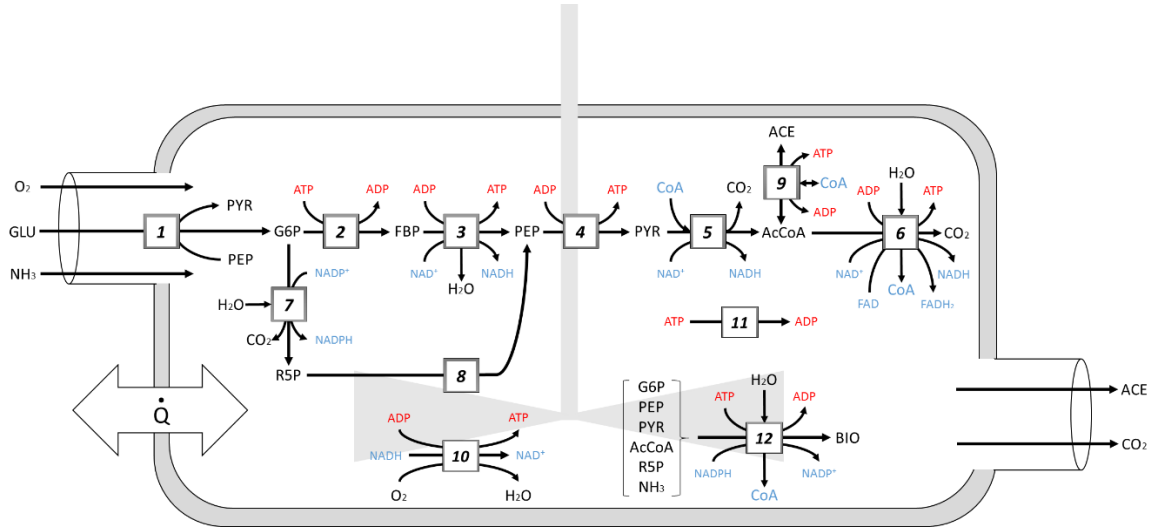

Figura 2-9: Analogía del metabolismo de *E. coli* como reactor CSTR (DFP).

La glucólisis se agrupa en cuatro reacciones (1, 2, 3 y 4), mientras para la ruta de las pentosas fosfato se tiene dos reacciones (7 y 8). Se toman como una única reacción los procesos del metabolismo del piruvato (5), el ciclo de Krebs (6), el metabolismo del acetato (9) y la fosforilación oxidativa (10). Finalmente, la energía para mantenimiento (11) y la síntesis de biomasa (12), se representan cada una mediante una sola reacción. La estequiometría de cada reacción se analiza en la **Sección 2.4** y la explicación detallada de cada una de las rutas bioquímicas que engloban se deja para la **Sección 3.4.2** donde se realiza la deducción de las cinéticas. Al inicio del documento en la sección de **Lista de símbolos** se da la nomenclatura de cada compuesto considerado en este esquema de reacciones con su respectiva fórmula química y masa molar.

2.3 Definición de los sistemas de proceso (paso 3)

Se definen tres Sistemas de Proceso (SdeP). El citoplasma celular donde se llevan a cabo todas las reacciones metabólicas (SdeP S_I). La membrana-pared celular, a través de la cual se intercambian energía y materia con el medio y se realiza la reacción de transporte y fosforilación de la glucosa mediante el sistema Pts (SdeP S_{II}). Y la fase líquida del medio de

cultivo en el reactor (SdeP S_{III}). La **Figura 2-10** muestra estos tres sistemas de procesos con sus respectivos flujos. Las flechas delgadas representan los flujos de materia, mientras las flechas gruesas representan los flujos de energía. A manera de notación, se emplean números arábigos para marcar corrientes y números romanos para señalar los sistemas de proceso, excepto el sistema de proceso total que se marca con la letra *T*.

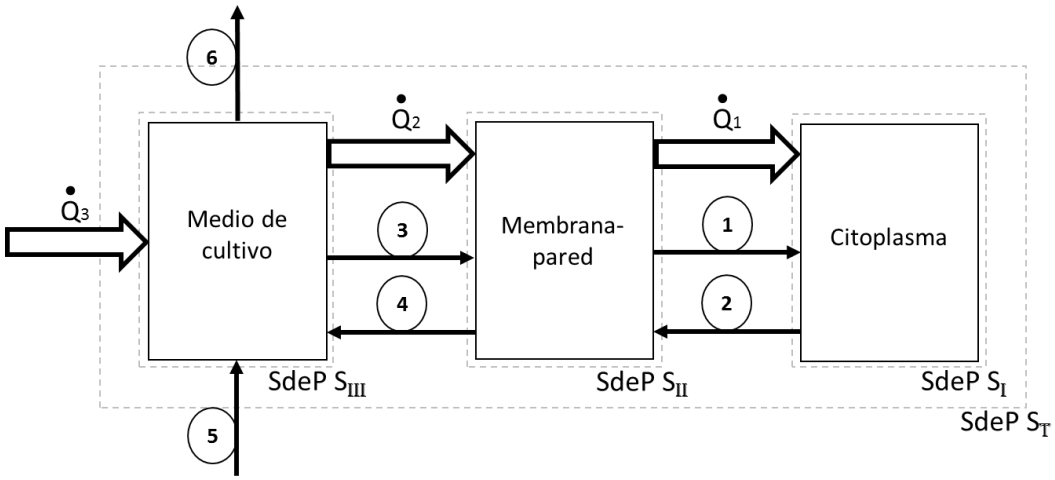

Figura 2-10: Sistemas de proceso para el modelo de autorregulación térmica en *E. coli*.

Los nutrientes se trasportan desde el medio de cultivo a la célula a través de la corriente 3 y luego de atravesar la membrana-pared ingresan en el citoplasma por la corriente 1. Los productos oxidados de las reacciones metabólicas salen del citoplasma en la corriente 2 y luego de a travesar la membrana pasan al medio de cultivo mediante la corriente 4. La energía en forma de calor trasferida entre la célula y la membrana-pared se representa como $\dot{Q}_1$ y la transferencia entre la membrana-pared y el medio como $\dot{Q}_2$. La corriente 5 representa la entrada de oxígeno al medio líquido desde las burbujas de aire que entran al biorreactor y la corriente 6 simboliza la salida de dióxido de carbono del medio líquido hacia las burbujas de aire. El flujo de energía $\dot{Q}_3$ es la transferencia de calor desde el elemento final del sistema de control de temperatura del biorreactor hacia el medio líquido.

Cabe resaltar que estos flujos energéticos se presentan como unidireccionales, con el medio aportando calor a la célula. Sin embargo, se puede dar el caso inverso dependiendo de la escala de proceso y la temperatura del medio. En el SdeP S_{III} no se lleva a cabo ninguna reacción, mientras en SdeP S_{II} se da una única reacción en la transferencia y fosforilación de la glucosa

al citoplasma. Por su parte, en SdeP S_I se llevan a cabo casi todas las demás reacciones bioquímicas descritas con anterioridad, siendo la parte de la célula donde se acumulan metabolitos. Por esto, las corrientes 4 y 5 son iguales y las corrientes 1 y 2 difieren únicamente en que la primera carga glucosa con un grupo fosfato (G6P) y la segunda glucosa sin fosfato (GLU), aunque ambos en equivalencia molar. En el medio de cultivo no se da acumulación de metabolitos, pero sí de biomasa.

El sistema de proceso total (SdeP S_T), hace referencia a la agrupación de los tres sistemas definidos y, como tal, permite visualizar las entradas de materia y energía externos que afectan el modelo. En el SdeP S_T definido en la **Figura 2-10** se aprecian los flujos de entrada y salida de gases y la energía suministrada por el elemento final de control de temperatura en el biorreactor. Como se verá en el próximo capítulo, en la mayoría de los casos al aplicar los principios de conservación sobre el sistema total se obtienen ecuaciones redundantes, aunque se recomienda definirlo debido a que en ocasiones puede aportar información relevante para la solución del modelo (Alvarez, 2017).

2.4 Estequiometría generalizada de reacciones

Según la metodología MSBF, el paso siguiente a la definición de los sistemas de proceso es la aplicación de los principios de conservación sobre cada sistema de proceso. No obstante, en el presente trabajo se considera como paso intermedio la obtención de la estequiometría generalizada de cada reacción. Esta simplifica la aplicación de los principios de conservación y es indispensable para obtener las razones molares de desaparición de reactivos y aparición de productos. Para esto se determinan signos preestablecidos para los coeficientes estequiométricos de cada sustancia en las reacciones en las cuales participa lo que permite describir fácilmente el sistema reactivo (Alvarez, 2011). Esta estequiometría generalizada posibilita calcular las variables de estado termodinámicas del proceso y su relación con las velocidades de generación y consumo de diferentes metabolitos (Bevan & Boerio-Goates, 2000).

Una célula por sí sola es un sistema complejo compuesto por miles de moléculas diferentes que interactúan a través de un número aún más grande de reacciones bioquímicas altamente interconectadas (Kummer & Olsen, 2005; Lobo, 2008). Para simplificar el análisis de dicha complejidad, desde la bioquímica se describen muchas reacciones metabólicas como balances

globales que relacionan cantidades medidas experimentalmente mediante coeficientes de acoplamiento o rendimientos. Esto diferencia significativamente a las redes metabólicas de las expresiones de reacciones mecanicistas usadas en química pura. Por ejemplo, se sabe que por cada mol de glucosa metabolizada aeróbicamente se producen en promedio 32 moles de ATP, lo cual se representa mediante la siguiente reacción estequiométrica:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 32ADP + 32Pi \longrightarrow 6CO_2 + 32H_2O + 32ATP$$

Sin embargo, se puede afirmar que no hay una conexión química directa entre la oxidación de la glucosa y la síntesis de ATP, por lo menos desde una perspectiva mecanicista. Además, no se puede predecir una estequiometría de 32 moles ATP valiéndose únicamente de consideraciones químicas. Las estequiometrías con coeficientes de acoplamiento son rasgos fenotípicos adquiridos durante la evolución y son el resultado de un compromiso entre reacciones que aportan y otras que generan energía bajo las leyes de la termodinámica (Mathews et al., 2013). En el presente documento se siguen este tipo de estequiometrías y, por lo tanto, no tiene sentido hablar de balances de electrones o realizar una verificación estricta de los estados de oxidación de los metabolitos considerados en el proceso.

Como se indica en la **Figura 2-9**, el modelo propuesto considera doce reacciones para describir el metabolismo central de *E. coli*. Las relaciones estequiométricas de las reacciones 1 a 7 y 9 a 10 pueden ser consultadas en textos de bioquímica, donde se encuentran los procesos globales que representan (Enjalbert, Millard, Dinclaux, Portais, & Létisse, 2017; Mathews et al., 2002). Por su parte, en las reacciones 8, 11 y 12 se requieren enunciar algunas consideraciones particulares. La reaccione 8 es un proceso que cuenta con metabolitos diferentes a los considerados en el modelo y en el caso de los dos procesos anabólicos (11 y 12), sus relaciones estequiométricas no se encuentran disponibles y, por lo tanto, deben ser propuestos. A continuación, se presenta la estequiometría para las reacciones 1 a 7 y 9 a 10:

- Estequiometría reacción 1: Transporte activo de glucosa mediante el sistema Pts

$$C_6H_{12}O_6 + C_3H_5O_6P \longrightarrow C_6H_{13}O_9P + C_3H_4O_3$$

- Estequiometría reacción 2: Glucólisis fase de consumo de ATP

$$C_6H_{13}O_9P + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 \longrightarrow C_6H_{14}O_{12}P_2 + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$$

- Estequiometría reacción 3: Glucólisis fase de producción de ATP parte 1

$$C_6H_{14}O_{12}P_2 + 2C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 2H_3PO_4 + 2C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2 \longleftrightarrow$$
$$2C_3H_5O_6P + 2C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 2C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + 2H_2O$$

- Estequiometría reacción 4: Glucólisis fase de producción de ATP parte 2

$$C_3H_5O_6P + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 \longrightarrow C_3H_4O_3 + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$$

- Estequiometría reacción 5: Metabolismo piruvato por parte del sistema Pdh

$$C_3H_4O_3 + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2 \longrightarrow$$
$$C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + CO_2$$

- Estequiometría reacción 6: Ciclo de Krebs

$$C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + H_3PO_4 + 3.6C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2 + 2H_2O \longrightarrow$$
$$C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 3.6C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + 2CO_2$$

- Estequiometría reacción 7: Pentosas fosfato fase oxidativa

$$C_6H_{13}O_9P + 2C_{21}H_{28}N_7O_{17}P_3 + H_2O \longrightarrow C_5H_{11}O_8P + 2C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 + CO_2$$

- Estequiometría reacción 9: Metabolismo del acetato

$$C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + H_3PO_4 \longleftrightarrow$$
$$C_2H_4O_2 + C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S$$

- Estequiometría reacción 10: Fosforilación oxidativa

$$C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2 + 2.5C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 2.5H_3PO_4 + 0.5O_2 \longrightarrow$$
$$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2 + 2.5C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 3.5H_2O$$

A continuación, se sigue con la estequiometría generalizada para las tres reacciones restantes (8, 11 y 12) detallando las consideraciones para su deducción:

- Estequiometría reacción 8: Pentosas fosfato fase no oxidativa. En esta parte de la ruta se producen seis diferentes tipos azúcares en cinco reacciones reversibles y que finaliza con una realimentación de carbohidratos sobre la ruta de la glucólisis. Desde una perspectiva global, la fase no oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato resultan en la conversión de tres azúcares de cinco carbonos a dos azúcares de seis carbonos y una de tres. Los productos reales de esta reacción son fructosa_6_fosfato (F6P) y gliceraldehido_3_fosfato (G3P), los cuales no son considerados en el desarrollo del modelo. Luego, para describir correctamente la realimentación del flujo de carbono, se toman como productos a G6P y PEP, los cuales cumplen con la perspectiva global de

esta fase pues son compuestos fosfatados de seis y tres carbonos respectivamente, con lo que se propone la siguiente expresión estequiométrica para la reacción 8:

$$3C_5H_{11}O_8P \longrightarrow + 2C_6H_{13}O_9P + C_3H_5O_6P + H_2$$

Esta reacción "ficticia" permite al modelo seguir los flujos de carbono a lo largo de la glucólisis. Además, debido a que las entalpías de formación de la G6P y PEP, no son muy diferentes de las de la F6P y el G3P (Alberty, 2006), el balance de energía bajo el criterio de primera ley de la termodinámica se cumple. Cabe resaltar que el hidrógeno diatómico que aparece como producto es necesario para un correcto balance de la reacción, sin embargo, por simplificación este no se tiene en cuenta en el desarrollo del modelo.

- Estequiometría reacción 11: Energía para mantenimiento. El consumo de energía para mantenimiento se puede implicar a una reacción de hidrólisis de ATP en el que se genera energía disponible (ΔG) que permite mantener funcionales los procesos celulares (Kamerlin & Warshel, 2009). La velocidad de esta reacción es proporcional a la necesidad energética bajo una condición ambiental dada. Se propone entonces la siguiente expresión estequiométrica para la reacción 9:

$$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + H_2O \longrightarrow C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + H_3PO_4$$

- Estequiometría reacción 11: Síntesis de biomasa. Para la construcción de la estequiometría generalizada de esta reacción se requiere una mayor explicación. En primera instancia se selecciona una fórmula molecular para *E. coli*, aquí se emplea la composición elemental propuesta por Roels (1980) que da como resultado una masa molar de 25 g/mol. El segundo paso consiste en seleccionar los metabolitos intermediarios de los procesos catabólicos a partir de los cuales se genera la biomasa. Existen doce metabolitos intermediarios que producen los diferentes componentes de la biomasa (Noor et al., 2010), de estos, el esquema de reacciones propuesto cuenta con cinco de ellos: G6P, PEP, PYR, AcCoA y R5P. Adicional a estos se considera un sexto precursor, el NH_3 como fuente de nitrógeno.

Además de estos seis compuesto, para que se lleve a cabo la biosíntesis, una célula necesita de NADPH para aportar equivalentes reductores y ATP para aportar la energía que favorece la reacción (Mathews et al., 2013). Experimentalmente se han determinado los requerimientos de estas dos moléculas, así, para producir una mol de biomasa de *E. coli* se necesitan en promedio 0.425 moles de NADPH (Csonka & Fraenkel, 1977) y 0.5 moles ATP (Taymaz-Nikerel, Borujeni, Verheijen, Heijnen, & van Gulik, 2010). Si se considera la equivalencia molar de NADPH con NADP y ATP con ADP, es posible plantear la siguiente reacción estequiométrica:

$$a\mathrm{C_6H_{13}O_9P} + b\mathrm{C_5H_{11}O_8P} + c\mathrm{C_3H_5O_6P} + d\mathrm{C_3H_4O_3} + e\mathrm{C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S} + f\mathrm{NH_3} + 0.425\mathrm{C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3} + 0.5\mathrm{C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3} + g\mathrm{H_2O} + h\mathrm{O_2} \longrightarrow \mathrm{CH_{1,77}O_{0,49}N_{0,24}} + i\mathrm{C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S} + j\mathrm{H_3PO_4} + 0.425\mathrm{C_{21}H_{28}N_7O_{17}P_3} + 0.5\mathrm{C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2} + k\mathrm{CO_2}$$

donde los coeficientes a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k son incógnitas que pueden ser encontradas aplicando algebra lineal. Sin embargo, es de notar que esta reacción vista como un sistema de ecuaciones posee infinitas soluciones, luego para encontrar el valor de las incógnitas se resuelve como un problema de optimización bajo un criterio termodinámico. Como se mencionó con anterioridad, los procesos anabólicos no son favorecidos termodinámicamente, es decir, poseen cambios de energía libre positivas ($\Delta G>0$), y necesitan aporte energético en forma de ATP para hacerse favorecidas. Por lo tanto, si no se considera el aporte de la energía libre de formación de ATP y ADP, el cambio en energía libre de esta reacción en condiciones estándar debe ser el mayor posible, sin que ningún coeficiente se haga cero. Los valores de las energías libres de reacción pueden ser consultados en la **Tabla A-3** del **Anexo A**. La optimización numérica se realizó empleando el software Wolfram Mathematica® licenciado por la Universidad Nacional de Colombia, obteniendo la siguiente expresión estequiométrica para la reacción 12:

$$0.002C_6H_{13}O_9P + 0.0078C_5H_{11}O_8P + 0.0002C_3H_5O_6P +$$
$$0.0008C_3H_4O_3 + 0.482C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S + 0.24NH_3 +$$
$$0.425C_{21}H_{30}N_7O_{17}P_3 + 0.5C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 + 0.075H_2O + 0.2125O_2 \longrightarrow$$
$$CH_{1,77}O_{0,49}N_{0,24} + 0.482C_{21}H_{36}N_7O_{16}P_3S + 0.51H_3PO_4 +$$
$$0.425C_{21}H_{28}N_7O_{17}P_3 + 0.5C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2 + 0.018CO_2$$

A parte de los coeficientes de acople experimentales para NADPH y ATP, no es posible realizar una comparación cuantitativa de esta estequiometría con alguna reportada en la bibliografía. Esto debido a que la cantidad de metabolitos precursores de biomasa considerados no coincide con la da otros trabajos reportados, afectando el valor de los coeficientes. Sin embargo, se puede realizar una comparación cualitativa de datos. Por ejemplo, en modelos de ingeniera metabólica para *E. coli* se ha encontrado que el mayor flujo de carbono hacia biomasa se da desde AcCoA, mientras, G6P, PEP, PYR y R5P aportan flujos de uno a dos órdenes de magnitud inferiores a los AcCoA (Feist et al., 2007; Hädicke & Klamt, 2017), lo que concuerda con los valores de los coeficientes obtenidos de la optimización.

Por otro lado, se ha encontrado que la mayor parte de lo que compone a la biomasa de *E. coli* viene de metabolitos del ciclo Krebs, seguido de metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato y, en última instancia, de la glucólisis (Bennett et al., 2009; Noor et al., 2010). En la estequiometría propuesta, AcCoA es el único precursor de la biomasa en el ciclo de Krebs, siendo el metabolito que aporta carbono para la biomasa de mayor coeficiente en la reacción 12. Además, R5P es el único precursor de biomasa en la ruta de las pentosas fosfato, siendo el metabolito que aporta carbono para la biomasa con el segundo coeficiente más grande la reacción propuesta. Y en última instancia, los tres metabolitos precursores de biomasa de la glucólisis son los de menor coeficiente en la síntesis de biomasa.

Con esta sección finaliza el segundo capítulo que contiene la pre-construcción del modelo y abarca los pasos tres a cuatro de la metodología MSBF. En el siguiente capítulo se continúa con la metodología, desarrollando los pasos cuatro a siete para obtener el modelo matemático en cuestión.

3. Construcción del modelo matemático

En el presente capítulo se desarrollan las ecuaciones matemáticas que componen la estructura básica y la estructura extendida del modelo para el proceso de autorregulación térmica de *E. coli*. El capítulo abarca de los pasos cuatro a siete de la metodología MSBF, dejando los tres últimos pasos para el siguiente capítulo. En la primera sección se realiza la construcción de la estructura básica, la cual se divide en la aplicación de los balances de materia y energía para cada sistema de proceso, la definición de las ecuaciones con información relevante y la determinación de las variables, parámetros y constantes del modelo. En la sección final se desarrolla la estructura extendida, con esta se resuelven los parámetros estructurales que se tenían como incógnitas de la estructura básica, quedando definidos a partir de parámetros funcionales y sus respectivas ecuaciones constitutivas y de valoración.

3.1 Principios de conservación - Estructura básica (Paso 4)

La estructura básica hace referencia al conjunto de ecuaciones obtenidas a partir de los principios de conservación, aplicados a cada sistema de proceso definido en la **Sección 2.3** y con base en las consideraciones listadas en la **Sección 2.2.1**. Los principios de conservación pueden ser representados de diferente forma. En esta tesis se opta por especificar los balances de materia en cantidades molares, con los metabolitos intracelulares en forma de fracción molar, es decir, milimoles de compuesto por mol de biomasa (X). En consecuencia, las unidades de flujo y velocidades de reacción son valores específicos por mol de biomasa. Por el contrario, las cantidades que se encuentran en el medio de cultivo se expresan en milimoles totales de compuesto (N). Esto debido a que las demandas metabólicas son siempre proporcionales en cada mol de biomasa, mientras los cambios en el biorreactor dependen de la cantidad total de biomasa. Si bien puede parecer arbitrario, esto cobra sentido al momento de seguir la homogeneidad dimensional en los balances y validar el modelo con datos experimentales.

A lo largo de capítulo se sigue la nomenclatura de las tablas de símbolos y subíndices que se encuentra al inicio del documento. A continuación, se muestran las expresiones generales de los balances de materia:

- Balance de materia total para cualquier SdeP:

$$\frac{dN^l}{dt} = \sum_i \sum_k \bar{n}_{k,i} \cdot N_{BIO} - \sum_j \sum_k \bar{n}_{k,j} \cdot N_{BIO} + \sum_n \sum_k \sigma_{k,n} \cdot \bar{r}_n \cdot N_{BIO} \quad [=] \quad \frac{mmol}{s}$$

- Balance materia por componente en SdeP S_I:

$$\frac{dX_k^l}{dt} = \sum_i \sum_k \bar{n}_{k,i} - \sum_j \sum_k \bar{n}_{k,j} + \sum_n \sigma_{k,n} \cdot \bar{r}_n \quad [=] \quad \frac{mmol_k}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance materia por componente en SdeP S_{II}:

$$\frac{dX_k^{II}}{dt} = \sum_i \sum_k \bar{n}_{k,i} - \sum_j \sum_k \bar{n}_{k,j} + \sum_n \sigma_{k,n} \cdot \bar{r}_n \quad [=] \quad \frac{mmol_k}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia por componente en SdeP S_{III}:

$$\frac{dN_k^{III}}{dt} = \sum_i \sum_k \bar{n}_{k,i} \cdot N_{BIO}^{III} - \sum_j \sum_k \bar{n}_{k,j} \cdot N_{BIO}^{III} \quad [=] \quad \frac{mmol_k}{s}$$

El término σ para reacción expresa aparición o desaparición según el signo del coeficiente estequiométrico, positivo (+) si es un producto y negativo (-) si es un reactivo. Todo según el esquema de reacciones propuesto en la **Sección 2.4** y cuyos valores numéricos se encuentran resumidos en la **Tabla A-1** del **Anexo A**. Nótese que la expresión con concentraciones molares no tiene sentido dentro de la célula, pues no es posible definir la concentración de biomasa como una variable intracelular. La biomasa es una cantidad extrínseca al metabolismo que se emplea para balances macroscópicos, sin embargo, esta cantidad alberga al mismo tiempo a todo el metabolismo, lo que la hace difícil de conceptualizar en modelos estructurados.

En los balances de energía se tiene como variable de interés a la energía térmica y de forma similar, siguiendo las consideraciones de la **Sección 2.2.1**, se obtiene la siguiente formulación general aplicable a cualquiera de los tres sistemas de proceso.

- Balance energía para cualquier SdeP:

$$\frac{dT^l}{dt} = \frac{1}{\rho^l \cdot V^l \cdot C_p^l} \left(\begin{array}{l} \dot{Q} + \sum_i \sum_k \bar{n}_{k,i} \cdot \bar{C}_{p,k} (T_i - T^l) \cdot N_{BIO}^{III} - \\ \sum_j \sum_k \bar{n}_{k,j} \cdot \bar{C}_{p,k} (T^l - T_j) \cdot N_{BIO}^{III} - \sum_n \bar{r}_n \cdot \Delta \bar{H}_{r_n}^0 \cdot N_{BIO}^{III} \end{array} \right) \quad [=] \quad \frac{K}{s}$$

En esta expresión la entalpía de cada reacción se calcula a partir de la diferencia entre entalpía de formación de productos y reactivos mediante la ley de Hess (Leicester, 1951). A su vez, la entalpía de formación de un compuesto químico puede ser consultada en manuales y libros especializados. No obstante, los valores de entalpías de formación de muchos metabolitos intracelulares aún no se encuentran disponibles, incluso para el metabolismo central del carbono (Li et al., 2010). En la **Tabla A-3** del **Anexo A** se encuentran los valores considerados para estos parámetros. Para una discusión detallada de las leyes de conservación, nomenclatura y deducción de estas expresiones generales para los balances de materia y energía, se recomienda consultar los libros (Alvarez, 2011) y (Alvarez, 2017). A continuación, se presentan todos los balances de materia y energía para cada sistema de proceso, así como los balances para cada uno de los 21 compuestos considerados. De antemano se aclara que las ecuaciones no son numeradas durante su deducción, para esto se espera hasta la siguiente sección cuando se tiene la estructura definida.

3.1.1 Balances de materia en SdeP S_I

- Balance de materia total

$$\frac{dN^I}{dt} = \sum_k \overline{n}_{k,1} \cdot N_{BIO} - \sum_k \overline{n}_{k,2} \cdot N_{BIO} + \sum_k \sum_{n=2}^{12} \sigma_{k,n} \cdot \overline{r}_n \cdot N_{BIO} \quad [=] \quad \frac{mmol}{s}$$

- Balance de materia para G6P

$$\frac{dX^I_{G6P}}{dt} = \sigma_{G6P,1} \cdot \overline{r}_1 - \sigma_{G6P,2} \cdot \overline{r}_2 - \sigma_{G6P,7} \cdot \overline{r}_7 + \sigma_{G6P,8} \cdot \overline{r}_8 - \sigma_{G6P,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{G6P}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para FBP

$$\frac{dX^I_{FBP}}{dt} = \sigma_{FBP,2} \cdot \overline{r}_2 - \sigma_{FBP,3} \cdot \overline{r}_3 \quad [=] \quad \frac{mmol_{FBP}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para PEP

$$\frac{dX^I_{PEP}}{dt} = \sigma_{PEP,3} \cdot \overline{r}_3 - \sigma_{PEP,4} \cdot \overline{r}_4 - \sigma_{PEP,1} \cdot \overline{r}_1 + \sigma_{PEP,8} \cdot \overline{r}_8 - \sigma_{PEP,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{PEP}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para PYR

$$\frac{dX^I_{PYR}}{dt} = \sigma_{PYR,4} \cdot \overline{r}_4 + \sigma_{PYR,1} \cdot \overline{r}_1 - \sigma_{PYR,5} \cdot \overline{r}_5 - \sigma_{PYR,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{PYR}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para AcCoA

$$\frac{dX^I_{AcCoA}}{dt} = \sigma_{AcCoA,5} \cdot \overline{r}_5 - \sigma_{AcCoA,6} \cdot \overline{r}_6 - \sigma_{AcCoA,9} \cdot \overline{r}_9 - \sigma_{AcCoA,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{AcCoA}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para R5P

$$\frac{dX^{I}_{R5P}}{dt} = \sigma_{R5P,7} \cdot \overline{r}_7 - \sigma_{R5P,8} \cdot \overline{r}_8 - \sigma_{R5P,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{R5P}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para ATP

$$\frac{dX^{I}_{ATP}}{dt} = -\sigma_{ATP,2} \cdot \overline{r}_2 + \sigma_{ATP,3} \cdot \overline{r}_3 + \sigma_{ATP,4} \cdot \overline{r}_4 + \sigma_{ATP,6} \cdot \overline{r}_6 + \sigma_{ATP,9} \cdot \overline{r}_9 +$$
$$\sigma_{ATP,10} \cdot \overline{r}_{10} - \sigma_{ATP,11} \cdot \overline{r}_{11} - \sigma_{ATP,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{ATP}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para ADP

$$\frac{dX^{I}_{ADP}}{dt} = \sigma_{ADP,2} \cdot \overline{r}_2 - \sigma_{ADP,3} \cdot \overline{r}_3 - \sigma_{ADP,4} \cdot \overline{r}_4 - \sigma_{ADP,6} \cdot \overline{r}_6 - \sigma_{ADP,9} \cdot \overline{r}_9 -$$
$$\sigma_{ADP,10} \cdot \overline{r}_{10} + \sigma_{ADP,11} \cdot \overline{r}_{11} + \sigma_{ADP,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{ADP}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para CoA

$$\frac{dX^{I}_{CoA}}{dt} = -\sigma_{CoA,5} \cdot \overline{r}_5 + \sigma_{CoA,6} \cdot \overline{r}_6 + \sigma_{CoA,9} \cdot \overline{r}_9 + \sigma_{CoA,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{CoA}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para NAD

$$\frac{dX^{I}_{NAD}}{dt} = -\sigma_{NAD,3} \cdot \overline{r}_3 - \sigma_{NAD,5} \cdot \overline{r}_5 - \sigma_{NAD,6} \cdot \overline{r}_6 + \sigma_{NAD,10} \cdot \overline{r}_{10} \quad [=] \quad \frac{mmol_{NAD}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para NADH

$$\frac{dX^{I}_{NADH}}{dt} = \sigma_{NADH,3} \cdot \overline{r}_3 + \sigma_{NADH,5} \cdot \overline{r}_5 + \sigma_{NADH,6} \cdot \overline{r}_6 - \sigma_{NADH,10} \cdot \overline{r}_{10} \quad [=] \quad \frac{mmol_{NADH}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para NADP

$$\frac{dX^{I}_{NADP}}{dt} = -\sigma_{NADP,7} \cdot \overline{r}_7 + \sigma_{NADP,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{NADP}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para NADPH

$$\frac{dX^{I}_{NADPH}}{dt} = \sigma_{NADPH,7} \cdot \overline{r}_7 - \sigma_{NADPH,12} \cdot \overline{r}_{12} \quad [=] \quad \frac{mmol_{NADPH}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para ACE

$$\frac{dX^{I}_{ACE}}{dt} = -\overline{n}_{ACE,2} + \sigma_{ACE,9} \cdot \overline{r}_9 = 0 \quad [=] \quad \frac{mmol_{ACE}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para NH_3

$$\frac{dX^{I}_{NH_3}}{dt} = \overline{n}_{NH_3,1} - \sigma_{NH_3,12} \cdot \overline{r}_{12} = 0 \quad [=] \quad \frac{mmol_{NH_3}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para Pi

$$\frac{dX_{Pi}^{I}}{dt} = \overline{n}_{Pi,1} - \sigma_{Pi,3} \cdot \overline{r}_3 - \sigma_{Pi,6} \cdot \overline{r}_6 - \sigma_{Pi,9} \cdot \overline{r}_9 - \sigma_{Pi,10} \cdot \overline{r}_{10} + \sigma_{Pi,11} \cdot \overline{r}_{11} + \sigma_{Pi,12} \cdot \overline{r}_{12} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{Pi}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para H_2O

$$\frac{dX_{H_2O}^{I}}{dt} = \overline{n}_{H_2O,1} + \sigma_{H_2O,3} \cdot \overline{r}_3 - \sigma_{H_2O,6} \cdot \overline{r}_6 - \sigma_{H_2O,7} \cdot \overline{r}_7 + \sigma_{H_2O,10} \cdot \overline{r}_{10} -$$

$$\sigma_{H_2O,11} \cdot \overline{r}_{11} - \sigma_{H_2O,12} \cdot \overline{r}_{12} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{H_2O}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para O_2

$$\frac{dX_{O_2}^{I}}{dt} = \overline{n}_{O_2,1} - \sigma_{O_2,10} \cdot \overline{r}_{10} - \sigma_{O_2,12} \cdot \overline{r}_{12} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{O_2}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para CO_2

$$\frac{dX_{CO_2}^{I}}{dt} = -\overline{n}_{CO_2,2} + \sigma_{CO_2,5} \cdot \overline{r}_5 + \sigma_{CO_2,6} \cdot \overline{r}_6 + \sigma_{CO_2,7} \cdot \overline{r}_7 + \sigma_{CO_2,12} \cdot \overline{r}_{12} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{CO_2}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

3.1.2 Balances de materia en SdeP S_{II}

- Balance de materia total

$$\frac{dN^{II}}{dt} = \sum_k \overline{n}_{k,2} \cdot N_{BIO} + \sum_k \overline{n}_{k,3} \cdot N_{BIO} - \sum_k \overline{n}_{k,1} \cdot N_{BIO} - \sum_k \overline{n}_{k,4} \cdot N_{BIO} - \sigma_{GLU,1} \cdot \overline{r}_1 \cdot N_{BIO} \ [=] \ \frac{mmol}{s}$$

- Balance de materia para GLU

$$\frac{dX_{GLU}^{II}}{dt} = \overline{n}_{GLU,3} - \sigma_{GLU,1} \cdot \overline{r}_1 = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{GLU}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para ACE

$$\frac{dX_{ACE}^{II}}{dt} = \overline{n}_{ACE,2} - \overline{n}_{ACE,4} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{ACE}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para NH_3

$$\frac{dX_{NH_3}^{II}}{dt} = \overline{n}_{NH_3,3} - \overline{n}_{NH_3,1} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{NH_3}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para Pi

$$\frac{dX_{Pi}^{II}}{dt} = \overline{n}_{Pi,3} - \overline{n}_{Pi,1} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{Pi}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para H_2O

$$\frac{dX^{II}_{H_2O}}{dt} = \overline{n}_{H_2O,3} - \overline{n}_{H_2O,1} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{H_2O}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para O_2

$$\frac{dX^{II}_{O_2}}{dt} = \overline{n}_{O_2,3} - \overline{n}_{O_2,1} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{O_2}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

- Balance de materia para CO_2

$$\frac{dX^{II}_{CO_2}}{dt} = \overline{n}_{CO_2,2} - \overline{n}_{CO_2,4} = 0 \ [=] \ \frac{mmol_{CO_2}}{mol_{BIO} \cdot s}$$

3.1.3 Balances de materia en SdeP S_{III}

Para todos los balances en el SdeP S_{III} se divide por un factor de mil a la biomasa para garantizar la congruencia de unidades. La biomasa se encuentra en milimoles mientras las cantidades intracelulares están en valores específicos por mol de biomasa. Esto también se aplica para el SdeP S_T y los balances de energía.

- Balance de materia total

$$\frac{dN^{III}}{dt} = \left(\sum_k \overline{n}_{k,4} + \sum_k \overline{n}_{k,5} - \sum_k \overline{n}_{k,3} - \sum_k \overline{n}_{k,6} + \sigma_{BIO,12} \cdot \overline{r}_{12} \right) \cdot (N^{III}_{BIO} / 1000) [=] \ \frac{mmol}{s}$$

- Balance de materia para BIO

$$\frac{dN^{III}_{BIO}}{dt} = \sigma_{BIO,12} \cdot \overline{r}_{12} \cdot (N^{III}_{BIO} / 1000) - r_d \ [=] \ \frac{mmol_{BIO}}{s}$$

- Balance de materia para GLU

$$\frac{dN^{III}_{GLU}}{dt} = -\overline{n}_{GLU,3} \cdot (N^{III}_{BIO} / 1000) \ [=] \ \frac{mmol_{GLU}}{s}$$

- Balance de materia para ACE

$$\frac{dN^{III}_{ACE}}{dt} = \overline{n}_{ACE,4} \cdot (N^{III}_{BIO} / 1000) \ [=] \ \frac{mmol_{ACE}}{s}$$

- Balance de materia para NH_3

$$\frac{dN^{III}_{NH_3}}{dt} = -\overline{n}_{NH_3,2} \cdot (N^{III}_{BIO} / 1000) \ [=] \ \frac{mmol_{NH_3}}{s}$$

- Balance de materia para Pi

$$\frac{dN^{III}_{Pi}}{dt} = -\overline{n}_{Pi,2} \cdot (N^{III}_{BIO} / 1000) \ [=] \ \frac{mmol_{Pi}}{s}$$

- Balance de materia para H_2O

$$\frac{dN_{H_2O}^{III}}{dt} = -\overline{n}_{H_2O,3} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) \text{ [=] } \frac{mmol_{H_2O}}{s}$$

- Balance de materia para O_2

$$\frac{dN_{O_2}^{III}}{dt} = \dot{n}_{O_2,5} - \overline{n}_{O_2,3} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) = 0 \text{ [=] } \frac{mmol_{O_2}}{s}$$

- Balance de materia para CO_2

$$\frac{dN_{CO_2}^{III}}{dt} = -\dot{n}_{CO_2,6} + \overline{n}_{CO_2,4} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) = 0 \text{ [=] } \frac{mmol_{CO_2}}{s}$$

3.1.4 Balances de materia en SdeP S_T

- Balance de materia total

$$\frac{dN^{T}}{dt} = \dot{n}_{O_2,5} - \dot{n}_{CO_2,6} - \overline{n}_{O_2,3} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) + \overline{n}_{CO_2,4} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) \text{ [=] } \frac{mmol}{s}$$

- Balance de materia para O_2

$$\frac{dN_{O_2}^{T}}{dt} = \dot{n}_{O_2,5} - \overline{n}_{O_2,3} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) = 0 \text{ [=] } \frac{mmol_{O_2}}{L \cdot s}$$

- Balance de materia para CO_2

$$\frac{dN_{CO_2}^{T}}{dt} = -\dot{n}_{CO_2,6} + \overline{n}_{CO_2,4} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) = 0 \text{ [=] } \frac{mmol_{CO_2}}{L \cdot s}$$

3.1.5 Balances de energía en todos los SdeP

- Balance de energía en el citoplasma

$$\frac{dT^{I}}{dt} = \frac{1}{\rho^{I} \cdot V^{I} \cdot C_p^{I}} \left(\begin{array}{l} \dot{Q}_1 + \sum_k \overline{n}_{k,1} \cdot \overline{C}_{p,k} (T^{II} - T^{I}) \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) - \\ \sum_k \overline{n}_{k,2} \cdot \overline{C}_{p,k} (T^{I} - T^{II}) \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) - \sum_{n=2}^{12} \overline{r}_n \cdot \Delta \overline{H}_{r_n}^{0} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) \end{array} \right) \text{ [=] } \frac{K}{s}$$

- Balance de energía en la membrana-pared

$$\frac{dT^{II}}{dt} = \frac{1}{\rho^{II} \cdot V^{II} \cdot C_p^{II}} \left(\begin{array}{l} -\dot{Q}_1 + \dot{Q}_2 + \sum_k \overline{n}_{k,2} \cdot \overline{C}_{p,k} (T^{I} - T^{II}) \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) + \sum_k \overline{n}_{k,3} \cdot \overline{C}_{p,k} (T^{III} - T^{II}) \cdot \\ (N_{BIO}^{III} / 1000) - \sum_k \overline{n}_{k,1} \cdot \overline{C}_{p,k} (T^{II} - T^{I}) \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) - \\ \sum_k \overline{n}_{k,4} \cdot \overline{C}_{p,k} (T^{III} - T^{II}) \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) - \overline{r}_1 \cdot \Delta \overline{H}_{r_1}^{0} \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) \end{array} \right) \text{ [=] } \frac{K}{s}$$

- Balance de energía en el medio de cultivo

$$\frac{dT^{III}}{dt} = \frac{1}{\rho^{III} \cdot V^{III} \cdot C_p^{III}} \left(\begin{array}{l} -\dot{Q}_2 + \dot{Q}_3 + \sum_k \overline{n}_{k,4} \cdot \overline{C}_{p,k} (T^{II} - T^{III}) \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) - \\ \sum_k \overline{n}_{k,3} \cdot \overline{C}_{p,k} (T^{III} - T^{II}) \cdot (N_{BIO}^{III} / 1000) \end{array} \right) = 0 \ [=] \ \frac{K}{s}$$

3.2 Definición de ecuaciones con información relevante (Paso 5)

Las ecuaciones con información relevante son todas aquellas que sin ser redundantes aportan información para la solución del modelo. De las ecuaciones definidas, se descartan los tres balances de materia total aplicados a cada uno de los SdeP y el balance de materia del SdeP S_T. En el biorreactor, se descartan los balances de H_2O y NH_3, el primero no aporta información a los objetivos del modelo y el segundo se considera un reactivo en exceso. En el caso de los balances de energía, el aplicado sobre SdeP S_{III} no aporta información debido a que la temperatura en este sistema es considerada como una entrada del proceso, y como tal se determinada a la hora de realizar la simulación. Sin embargo, se resalta que esta ecuación representa la acción que el controlador debe realizar para mantener la temperatura del medio de cultivo constante y puede ser relevante en trabajos asociados al control de procesos.

Otra simplificación de las ecuaciones se logra expresando las ecuaciones diferenciales que están igualadas a cero como ecuaciones algebraicas, resaltando que pueden pasar a ser parte de las ecuaciones constitutivas o de valoración. A partir de estas, se pueden determinar los flujos entre los sistemas de procesos, además la mayoría de estos pueden ser igualados entre si gracias a que la membrana-pared no acumula materia. Por otro lado, los flujos molares ($\dot{n}$) no aportan información para el modelo. La nomenclatura para los flujos se redefine de la siguiente manera:

$$\overline{n}_{GLU,3} = \overline{n}_{GLU}$$
$$\overline{n}_{ACE,4} = \overline{n}_{ACE,2} = \overline{n}_{ACE}$$
$$\overline{n}_{NH_3,3} = \overline{n}_{NH_3,1} = \overline{n}_{NH_3}$$
$$\overline{n}_{Pi,3} = \overline{n}_{Pi,1} = \overline{n}_{Pi}$$
$$\overline{n}_{H_2O,3} = \overline{n}_{H_2O,1} = \overline{n}_{H_2O}$$
$$\overline{n}_{O_2,3} = \overline{n}_{O_2,1} = \overline{n}_{O_2}$$
$$\overline{n}_{CO_2,4} = \overline{n}_{CO_2,2} = \overline{n}_{CO_2}$$

En la **Tabla 3-1** se enumeran las ecuaciones diferenciales que conforman la estructura básica del modelo. En esta se redefinen las ecuaciones en espacio de estados, lo que facilita la programación del modelo computacional en el siguiente capítulo. El modelo cuenta con un total de 18 estados (*x*), siendo cada uno una variable del proceso. Los estados 1 a 13 son variables intracelulares, mientras los estados 14 a 16 son variables extracelulares y hacen las veces de salidas (*y*). Los estados 17 y 18 son las temperaturas del citoplasma y la membrana-pared celular respectivamente. La temperatura del medio de cultivo es la perturbación (*d*).

Tabla 3-1: Estructura básica del modelo matemático. Nivel cero de especificación

N°	Estado	Ecuación	Unidades
1	X^I_{G6P}	$\dot{x}(1)=\sigma_{G6P,1}\cdot\bar{r}_1-\sigma_{G6P,2}\cdot\bar{r}_2-\sigma_{G6P,7}\cdot\bar{r}_7+\sigma_{G6P,8}\cdot\bar{r}_8-\sigma_{G6P,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{G6P}}{mol_{BIO}\cdot s}$
2	X^I_{FBP}	$\dot{x}(2)=\sigma_{FBP,2}\cdot\bar{r}_2-\sigma_{FBP,3}\cdot\bar{r}_3$	$\frac{mmol_{FBP}}{mol_{BIO}\cdot s}$
3	X^I_{PEP}	$\dot{x}(3)=\sigma_{PEP,3}\cdot\bar{r}_3-\sigma_{PEP,4}\cdot\bar{r}_4-\sigma_{PEP,1}\cdot\bar{r}_1+\sigma_{PEP,8}\cdot\bar{r}_8-\sigma_{PEP,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{PEP}}{mol_{BIO}\cdot s}$
4	X^I_{PYR}	$\dot{x}(4)=\sigma_{PYR,4}\cdot\bar{r}_4+\sigma_{PYR,1}\cdot\bar{r}_1-\sigma_{PYR,5}\cdot\bar{r}_5-\sigma_{PYR,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{PYR}}{mol_{BIO}\cdot s}$
5	X^I_{AcCoA}	$\dot{x}(5)=\sigma_{AcCoA,5}\cdot\bar{r}_5-\sigma_{AcCoA,6}\cdot\bar{r}_6-\sigma_{AcCoA,9}\cdot\bar{r}_9-\sigma_{AcCoA,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{AcCoA}}{mol_{BIO}\cdot s}$
6	X^I_{R5P}	$\dot{x}(6)=\sigma_{R5P,7}\cdot\bar{r}_7-\sigma_{R5P,8}\cdot\bar{r}_8-\sigma_{R5P,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{R5P}}{mol_{BIO}\cdot s}$
7	X^I_{ATP}	$\dot{x}(7)=-\sigma_{ATP,2}\cdot\bar{r}_2+\sigma_{ATP,3}\cdot\bar{r}_3+\sigma_{ATP,4}\cdot\bar{r}_4+\sigma_{ATP,6}\cdot\bar{r}_6+\sigma_{ATP,9}\cdot\bar{r}_9+\sigma_{ATP,10}\cdot\bar{r}_{10}-\sigma_{ATP,11}\cdot\bar{r}_{11}-\sigma_{ATP,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{ATP}}{mol_{BIO}\cdot s}$
8	X^I_{ADP}	$\dot{x}(8)=\sigma_{ADP,2}\cdot\bar{r}_2-\sigma_{ADP,3}\cdot\bar{r}_3-\sigma_{ADP,4}\cdot\bar{r}_4-\sigma_{ADP,6}\cdot\bar{r}_6-\sigma_{ADP,9}\cdot\bar{r}_9-\sigma_{ADP,10}\cdot\bar{r}_{10}+\sigma_{ADP,11}\cdot\bar{r}_{11}+\sigma_{ADP,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{ADP}}{mol_{BIO}\cdot s}$
9	X^I_{CoA}	$\dot{x}(9)=-\sigma_{CoA,5}\cdot\bar{r}_5+\sigma_{CoA,6}\cdot\bar{r}_6+\sigma_{CoA,9}\cdot\bar{r}_9+\sigma_{CoA,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{CoA}}{mol_{BIO}\cdot s}$
10	X^I_{NAD}	$\dot{x}(10)=-\sigma_{NAD,3}\cdot\bar{r}_3-\sigma_{NAD,5}\cdot\bar{r}_5-\sigma_{NAD,6}\cdot\bar{r}_6+\sigma_{NAD,10}\cdot\bar{r}_{10}$	$\frac{mmol_{NAD}}{mol_{BIO}\cdot s}$
11	X^I_{NADH}	$\dot{x}(11)=\sigma_{NADH,3}\cdot\bar{r}_3+\sigma_{NADH,5}\cdot\bar{r}_5+\sigma_{NADH,6}\cdot\bar{r}_6-\sigma_{NADH,10}\cdot\bar{r}_{10}$	$\frac{mmol_{NADH}}{mol_{BIO}\cdot s}$
12	X^I_{NADP}	$\dot{x}(12)=-\sigma_{NADP,7}\cdot\bar{r}_7+\sigma_{NADP,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{NADP}}{mol_{BIO}\cdot s}$
13	X^I_{NADPH}	$\dot{x}(13)=\sigma_{NADPH,7}\cdot\bar{r}_7-\sigma_{NADPH,12}\cdot\bar{r}_{12}$	$\frac{mmol_{NADPH}}{mol_{BIO}\cdot s}$
14	N^{III}_{BIO}	$\dot{x}(14)=\sigma_{BIO,12}\cdot\bar{r}_{12}\cdot\left(x(14)/1000\right)-r_d$	$\frac{mmol_{BIO}}{s}$

Continuación Tabla 3-1: Estructura básica del modelo matemático.

15	N_{GLU}^{III}	$\dot{x}(15) = -\overline{n}_{GLU,3} \cdot \left(x(14)/1000\right)$	$\frac{mmol_{GLU}}{s}$
16	N_{ACE}^{III}	$\dot{x}(16) = \overline{n}_{ACE,4} \cdot \left(x(14)/1000\right)$	$\frac{mmol_{ACE}}{s}$
17	T^{I}	$\dot{x}(17) = \frac{\left(\begin{array}{l}\dot{Q}_1 + (\overline{n}_{NH_3}\overline{C}_{pNH_3} + \overline{n}_{Pi}\overline{C}_{pPi} + \overline{n}_{H_2O}\overline{C}_{pH_2O} + \overline{n}_{O_2}\overline{C}_{pO_2}) \cdot \\ (x(18) - x(17))(x(14)/1000) - (\overline{n}_{ACE}\overline{C}_{pACE} + \overline{n}_{CO_2}\overline{C}_{pCO_2}) \cdot \\ (x(17) - x(18))(x(14)/1000) - (\overline{r}_2 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_2} + \overline{r}_3 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_3} + \\ \overline{r}_4 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_4} + \overline{r}_5 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_5} + \overline{r}_6 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_6} + \overline{r}_7 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_7} + \overline{r}_8 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_8} + \\ \overline{r}_9 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_9} + \overline{r}_{10} \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_{10}} + \overline{r}_{11} \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_{11}} + \overline{r}_{12} \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_{12}})(x(14)/1000) \end{array}\right)}{M^I \cdot C_p^I}$	$\frac{K}{s}$
18	T^{II}	$\dot{x}(18) = \frac{\left(\begin{array}{l} -\dot{Q}_1 + \dot{Q}_2 + (\overline{n}_{ACE}\overline{C}_{pACE} + \overline{n}_{CO_2}\overline{C}_{pCO_2}) \cdot (x(17) - x(18)) \cdot \\ (x(14)/1000) + (\overline{n}_{GLU}\overline{C}_{pGLU} + \overline{n}_{NH_3}\overline{C}_{pNH_3} + \overline{n}_{Pi}\overline{C}_{pPi} + \\ \overline{n}_{H_2O}\overline{C}_{pH_2O} + \overline{n}_{O_2}\overline{C}_{pO_2}) \cdot (u - x(18)) \cdot (x(14)/1000) - \\ (\overline{n}_{NH_3}\overline{C}_{pNH_3} + \overline{n}_{Pi}\overline{C}_{pPi} + \overline{n}_{H_2O}\overline{C}_{pH_2O} + \overline{n}_{O_2}\overline{C}_{pO_2}) \cdot (x(18) - x(17)) \cdot \\ (x(14)/1000) - (\overline{n}_{ACE}\overline{C}_{pACE} + \overline{n}_{CO_2}\overline{C}_{pCO_2}) \cdot (d - x(18)) \cdot \\ (x(14)/1000) - \overline{r}_1 \cdot \Delta\overline{H}^0_{r_1}(x(14)/1000) \end{array}\right)}{M^{II} \cdot C_p^{II}}$	$\frac{K}{s}$

3.3 Especificación de variables, parámetros y constantes (Paso 6)

Desde las ecuaciones que conforman la estructura básica listada en el apartado anterior se especifican los términos del modelo matemático, los cuales se clasifican en variables, parámetros o constantes del modelo. La **Tabla 3-2** lista los diferentes términos del modelo. En esta se indican los estados (*x*), las salidas (*y*) y la perturbación del proceso (*d*). Para esta nomenclatura las variables resultan equivalentes a los estados. De estos solo son considerados salidas las cantidades extracelulares, debido a que estas son las que comúnmente se cuantifican en la mayoría de los experimentos. Por su parte, todos los parámetros, a excepción de la temperatura del medio de cultivo, que hace las veces de perturbación, son calculados mediante ecuaciones constitutivas o de valoración, siendo abordadas en la siguiente sección junto con los parámetros funcionales y el acotamiento de los parámetros para identificación. Vale aclarar que las condiciones iniciales de los estados *x(14)* y *x(15)*, es decir, las concentraciones iniciales en el biorreactor de BIO y GLU, son las entradas del proceso (*u*). En el caso de las constantes, sus valores numéricos se dan en el **Anexo A**.

Tabla 3-2: Variables, parámetros y constantes del modelo matemático

Tipo de Término	Descripción	Cantidad	Total
Variable	Fracción molar de los compuestos intracelulares (X_k^I) (x)	13	19
	Moles de compuestos en el medio de cultivo (N_k^{III}) (x) (y)	3	
	Temperatura en citoplasma y membrana-pared (T^I, T^{II})(x)	2	
	Temperatura en el medio de cultivo (T^{III}) (d)	1	
Parámetro	Flujos molares específicos de compuestos ($\overline{n}_k$)	7	24
	Velocidad específica de las reacciones intracelulares ($\overline{r_n}$)	12	
	Velocidad de muerte celular (r_d)	1	
	Masa de sistemas de proceso (M^I, M^{II})	2	
	Flujos de calor entre sistemas de proceso ($\dot{Q}_1, \dot{Q}_2$)	2	
Constante	Coeficiente estequiométrico - compuesto por reacción ($\sigma_{k,n}$)	77	98
	Capacidad calorífica compuestos puros ($\overline{C}_{p,k}$)	7	
	Capacidad calorífica de sistemas de proceso (C_p^I, C_p^{II})	2	
	Entalpía de reacción ($\Delta\overline{H}_{r_n}^0$)	12	

3.4 Ecuaciones constitutivas y de valoración - Estructura extendida (Paso 7)

La estructura extendida del modelo hace referencia al conjunto de ecuaciones constitutivas y de valoración que permiten dar valor a los parámetros de la estructura primaria del modelo en cualquier nivel de especificación. Es decir, se definen mediante una o varias ecuaciones, las cuales dependen de valores llamados parámetros funcionales. Las ecuaciones constitutivas o de valoración son ecuaciones arbitrarias que dependen del conocimiento particular del que se dispone a la hora de definir los parámetros. En esta sección se dan los criterios bajo los cuales se proponen dichas ecuaciones y se definen los parámetros funcionales del modelo. Estos son: los flujos molares específicos de compuestos, las velocidades específicas de las reacciones, la velocidad de muerte celular, la masa de los sistemas de proceso y los flujos de calor entre sistemas. Para cada grupo de ecuaciones se da una explicación conceptual de los argumentos para su selección y al finalizar esta sección se organizan en las **Tablas 3-3** y **3-4**.

3.4.1 Flujos molares específicos

El modelo cuenta con un total de siete compuestos que se trasportan entre la célula y el medio de cultivo, estos son: GLU, ACE, NH_3, Pi, H_2O, O_2 y CO_2. Sus respectivos flujos molares, desde o hacia el microrganismo, se definen a partir de las ecuaciones diferenciales igualadas a cero de la **Sección 3.1**, a partir de las cuales se redefinen como ecuaciones algebraicas. Estos flujos dependen únicamente de la demanda o producción por parte de la célula en las reacciones metabólicas. Así, para cada uno de estos siete compuestos *k*, el flujo se define en función de las reacciones *n* que lo consumen o generan:

$$\bar{n}_k = \sum_{n=1}^{12} \sigma_{k,n} \cdot \bar{r}_n \quad [=] \quad \frac{mmol_k}{mol_{BlO} \cdot s}$$

3.4.2 Velocidades específicas de reacción

Las velocidades de las reacciones metabólicas se calculan mediante una cinética de reacción enzimática. Estas pueden ser deducidas teóricamente si se conoce el tipo de enzima, los sustratos y productos de la reacción que cataliza, si es o no reversible, su regulación, los tipos de inhibición que presenta y el mecanismo general de la reacción. Las deducciones teóricas pueden llegar a ser complejas incluso para una única enzima, además, una ecuación cinética detallada tiene gran cantidad de parámetros, aumentando la dificulta de ajuste del modelo. El modelo propuesto plantea reacciones metabólicas que involucran varios sustratos y diferentes tipos de enzimas, por lo que no es posible usar cinéticas basadas únicamente en deducciones teóricas. Es por esto que para cada proceso se formula una cinética empírica con base en la descripción bioquímica de la ruta que engloba y en la cual se emplea la cinética de Michaelis-Menten para reacciones enzimáticas, la ecuación de Arrhenius para la dependencia de la velocidad de reacción de la temperatura y una constante de afinidad que representa los efectos regulatorios del metabolismo. Así, para todas las velocidades específicas de reacción se propone la siguiente forma general:

$$\bar{r} = \frac{\bar{r}_{\max} \cdot \prod X_n}{\bar{K}_m + \prod X_n}$$
$$\bar{r}_{\max} = f(T)$$
$$\bar{K}_m = f(k_a)$$

donde X_n es la fracción molar de cada uno de los sustratos que participan en la reacción y que dependen de la descripción bioquímica. La constante específica de Michaelis-Menten (K_m) es un valor fijo para reacciones sin regulación alostérica. En reacciones con regulación alostérica, este valor es función de la constante de afinidad (k_a) y de los metabolitos que inhiben o estimulan dicha afinidad. En las reacciones con múltiples sustratos no se considera una afinidad diferente para cada sustrato, es decir, la cinética se opera con un único valor para la constante de K_m que es representativo de una afinidad global.

Para el caso de las dos reacciones reversibles (3 y 9), la reversibilidad se expresa dentro del numerador del término cinético mediante una diferencia entre las concentraciones de reactivos y productos. Se sigue una estructura similar a la de una cinética de Michaelis-Menten reversible, en la cual se emplea el término de la constante de equilibrio de la reacción (K_{eq}) y una constante de reversibilidad (k_r) (Keleti, 1986; Miller & Alberty, 1958). Cuando se agrupan varias reacciones entre las cuales hay algunas que son reversibles y otras que no lo son, la reacción global se toma como irreversible. A continuación, se enuncia la descripción bioquímica de la ruta que engloba cada una de las 12 reacciones. Se enfatiza que al finalizar la sección se tabulan las formulaciones, varias de las cuales se inspiran en las cinéticas empleadas en los modelos de (Chassagnole et al., 2002), (Maria, 2015) y (Jahan et al., 2016).

- Transporte activo de glucosa mediante el sistema Pts ($\bar{r}_1$). El sistema de fosfotransferasa (Pts), es un sistema enzimático bacteriano usado para el transporte activo de azúcar extracelular al citoplasma mediante una serie de reacciones. La fuente de energía del proceso es el PEP, el cual transfiere un grupo fosfato al azúcar que se trasporta, liberando PYR como producto. Debido a la carga negativa del fosfato, el azúcar no puede abandonar la célula, garantizando que no se pierde el sustrato trasportado (Nelson & Cox, 2008). El sistema enzimático es poco específico, por lo que participa en el transporte de diferentes tipos de pentosas y hexosas (Clore & Venditti, 2013). En el trasporte activo de GLU, esta es tomada del exterior de la célula y liberada en forma de G6P en el citoplasma. Desde un punto de vista dinámico, la dependencia de esta reacción del PEP la acopla, a manera de retroalimentación, a la última reacción de la glucólisis, cumpliendo con funciones de catálisis y regulación del proceso (Deutscher et al., 2014). Este sistema de reacciones, visto como uno global (una única reacción), no es reversible y la reacción no posee regulación alostérica.

- Glucólisis fase de consumo de ATP ($\bar{r}_2$). Este paso engloba dos reacciones: la isomerización de la G6P a F6P y la adición de un fosfato a la F6P para producir FBP con consumo de ATP. La primera no tiene regulación alostérica, es de carácter reversible y es catalizada por la enzima glucosa_6 fosfato isomerasa (Pgi). La segunda reacción es catalizada por la enzima fosfofructoquinasa (Pfk), es irreversible y posee regulación alostérica (Mathews et al., 2013). El global se toma como una reacción irreversible que depende de la regulación alostérica de la Pfk. Esta es una enzima sensible a la disponibilidad de energía en forma de ATP, así como a la concentración de intermediarios metabólicos. En general, la actividad de la enzima aumenta cuando falta ATP y disminuye cuando hay abundancia de este. Además, la fosfofructoquinasa bacteriana tiene lugares alostéricos para el PEP como inhibidor y ADP como activador.
- Glucólisis fase de producción de ATP parte 1($\bar{r}_3$). Este paso engloba seis reacciones en la glucólisis, todas poco exergónicas, reversibles y, por lo tanto, poco reguladas. En condiciones estándar el global de las reacciones es no espontánea, no obstante, la elevada concentración intracelular de FBP las vuelven favorables (Bennett et al., 2009).
- Glucólisis fase de producción de ATP parte 2 ($\bar{r}_4$). Esta reacción representa el último paso de la glucólisis, es decir, la conversión de PEP a PYR con generación de ATP por parte de la enzima piruvato quinasa (Pk). Esta reacción es irreversible y fuertemente exergónica, siendo otro punto de regulación metabólica importante de la glucólisis. Concentraciones elevadas de ATP reducen la afinidad aparente de la Pk por el PEP, mientras la FBP activa la acción de la enzima. Este mecanismo garantiza que todo carbono que supere el primer punto de regulación complete la glucólisis en un efecto conocido como activación anterógrada (Mathews et al., 2013).
- Metabolismo piruvato por parte del sistema Pdh ($\bar{r}_5$). En esta reacción se da la conversión de PYR a AcCoA por parte del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (Pdh) en un proceso llamado descarboxilación del piruvato. Esta enzima contribuye a unir la ruta de la glucólisis con el ciclo de Krebs. Es una reacción de cinco pasos en la que intervienen tres enzimas y cinco coenzimas, siendo exergónica e irreversible (Mathews et al., 2013). El complejo enzimático se inhibe competitivamente por la AcCoA y por el NADH. De esta forma, cuando los productos de la reacción no se eliminan continuamente por los procesos metabólicos posteriores, este proceso de inhibición por productos permite al microorganismo controlar el flujo de carbono al ciclo de Krebs (Mathews et al., 2013).

- Ciclo de Krebs ($\bar{r}_6$). El ciclo del ácido cítrico es el proceso mediante el cual se catabolizan todos los sustratos metabólicos de forma aerobia. En este se reducen los transportadores electrónicos que van a la ruta de la fosforilación oxidativa, donde luego son oxidados para generar ATP. El ciclo completo que cataliza la conversión del AcCoA a CO2 y CoA está constituido por ocho reacciones, la mayoría de ellas irreversibles y que sumadas son exergónicas. A pesar de que el ciclo cuenta con regulación alostéricas, las concentraciones de los sustratos desempeñan un papel crucial debido a la naturaleza reversible de algunas de las reacciones del ciclo. El factor más relevante que regula este ciclo es la disponibilidad de energía bioquímica, por ejemplo, la isocitrato deshidrogenasa (Idh), una de las enzimas del ciclo, es activada por el ADP e inhibida por el NADH y el ATP (Mathews et al., 2013).
- Pentosas fosfato fase oxidativa ($\bar{r}_7$). A pesar de ser un proceso catabólico, la ruta de las pentosas fosfato tiene la finalidad de proporcionar equivalentes reductores en forma de NADPH para los procesos anabólicos, además de R5P para la síntesis de biomasa. La ruta como un global es irreversible y se diferencia de la glucólisis en que no es regulada por la disponibilidad de energía en forma de ATP, el flujo a través de la ruta de las pentosas fosfato únicamente depende de la relación NADP/NADPH del citoplasma (Mathews et al., 2013).
- Pentosas fosfato fase no oxidativa ($\bar{r}_8$). En esta ruta metaboliza R5P para la producción de diferentes azúcares y que finaliza con una realimentación de carbohidratos sobre la ruta de la glucólisis (Kruger & von Schaewen, 2003). En esta ruta se presentan tres tipos de enzimas en cinco reacciones reversibles, en las que participan seis tipos diferentes de azúcares. Este proceso se agrupa en una única reacción irreversible que tiene como productos G6P y PEP y no posee regulación alostérica.
- Metabolismo del acetato ($\bar{r}_9$). En proceso fermentativos, *E. coli* produce una mezcla de ácidos orgánicos como lactato, succinato, acetato e incluso etanol. La cantidad de cada ácido depende de la relación entre el metabolismo aerobio y el anaerobio, y de la maquinaria regulatoria de la célula. El acetato es el principal ácido orgánico producido por *E. coli* y como tal es el único producto celular considerado en el modelo. En este proceso el AcCoA se convierte en ACE por la actividad de fosfotransacetilasa (Pta) y acetatoquinasa (Ack) (Förster & Gescher, 2014). Ambas reacciones son reversibles y moderadamente exergónicas en condiciones estándar. No hay reportada actividad alostérica en estas dos enzimas. La producción de acetato bajo condiciones aerobias se

atribuye a un desbalance entre los flujos de carbono proveniente de glucólisis y el ciclo de Krebs. Debido a que la segunda ruta es más lenta, se da una acumulación de AcCoA, el cual se transforma en acetato (De Anda et al., 2006).

- Fosforilación oxidativa ($\bar{r}_{10}$). En este proceso se da la oxidación de equivalentes electrónicos reducidos para generar ATP. Esta es la fase final de la oxidación aerobia de los sustratos. En *E. coli* esta ruta implica la acción de seis complejos enzimáticos que dependen del equilibrio de diversas sustancias en la membrana citoplasmática y un gran número de reacciones acopladas, siendo la mayoría de naturaleza irreversible y exergónicas (Erhardt et al., 2014). El control de la fosforilación oxidativa no se da por regulación alostérica sino por la presencia de cantidades adecuadas de sustrato (Mathews et al., 2013). La baja disponibilidad de ADP, NADH u O_2 limitan la velocidad del proceso, evidenciando la estrecha relación entre la síntesis de ATP y la respiración.
- Energía para mantenimiento ($\bar{r}_{11}$). El consumo energético para mantenimiento de las células depende principalmente de la temperatura (Tijhuis et al., 1993). El requisito mínimo de energía está relacionado con procesos inevitables de desnaturalización de los polímeros que componen la biomasa, así como la filtración de iones a través de las membranas celulares. Las células consumen energía para sintetizar proteínas desnaturalizadas y mantenimiento de gradientes osmóticos en estado estacionario. La temperatura modifica las ratas de desnaturalización de polímeros y cambia dichos gradientes, modificando las demandas energéticas de la célula. Tijhuis et al. (1993) proponen una ecuación tipo Arrhenius para expresar la dependencia del consumo energético de la temperatura en *E. coli*. En el presente trabajo se modifica dicha expresión bajo la suposición de que toda esa energía se obtiene por hidrólisis del ATP a través de una reacción de primer orden.
- Síntesis de biomasa ($\bar{r}_{12}$). Este proceso se vale de un gran número de reacciones y enzimas para usar metabolitos de la ruta central del carbono como precursores para sintetizar las moléculas que conforman la biomasa de la célula. En *E. coli*, el metabolismo central del carbono aporta doce metabolitos precursores (Murrell, 1991), de los cuales el modelo considera cinco precursores y a NH_3 como fuente de nitrógeno. Además de estos, se requiere hidrolizar ATP para aportar la energía que vuelve favorable el proceso y la reducción de NADPH que da los equivalentes electrónicos necesarios (Mathews et al., 2013; Noor et al., 2010). Por otra parte, el acetato extracelular tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la biomasa (Lara, 2011).

3.4.3 Velocidad de muerte celular

La velocidad de muerte celular (r_d) es la relación a la cual pierden viabilidad la biomasa debido a las condiciones ambientales en el biorreactor. Esta velocidad depende del número inicial de células y a diferencia de las velocidades específicas de las reacciones intracelulares, se define por una cinética de primer orden respecto a la concentración de biomasa (Doran, 2013). Para el presenta trabajo se incluye en la ecuación de muerte celular el efecto de la temperatura ambiental sobre la biomasa mediante una constante de muerte celular (k_d). Esta constante se define a su vez como función de tipo Arrhenius dependiente de la temperatura. Dichas ecuaciones poseen la siguiente forma general:

$$r_d = f(k_d) \cdot N_{BIO}^{III}$$
$$k_d = f(T)$$

3.4.4 Masa total de los SdeP

En los balances de energía se tienen como incógnitas la masa total del citoplasma y de la membrana-pared. Estos balances están definidos para todas las células en el biorreactor, por lo tanto, es necesaria una expresión que relacione el número de moles de biomasa en el medio de cultivo con la masa del citoplasma y de la membrana-pared en todo el biorreactor:

$$M^{I} = f(N_{BIO}^{III})$$

Al igual que la composición química, la masa y la morfología de los microorganismos varía según su estado en el ciclo vital y las condiciones ambientales. Sin embargo, estas variaciones no son muy significativas por lo que es común definir estas variables con valores promedio. Experimentalmente, se ha determinado que la masa promedio de una célula de *E. coli* (M_{cel}) es de 9.50×10^{-13} g, de los cuales 0.42×10^{-13} g son los componentes de la membrana-pared (M^{II}_{cel}) y 9.08×10^{-13} g son agua y los componentes del citoplasma (M^{I}_{cel}) (Neidhardt, 1996). Con estos valores es posible generar una relación lineal entre las moles en el biorreactor y la masa de cada SdeP.

3.4.5 Flujos de calor entre SdeP

El modelo cuenta con dos flujos de calor entre sistemas de proceso, los cuales se determinan mediante la ley de enfriamiento de Newton (Cengel & Ghajar, 2011), la que tiene la siguiente forma general:

$$\dot{Q} = A_s \cdot h \cdot (T_\infty - T^l)$$

donde T^l es la temperatura del SdeP l en el cual se realiza el balance de energía y T_∞ simboliza la temperatura del SdeP con el que se da la transferencia de calor. Nótese que la diferencia de temperatura se encuentra invertida a la manera tradicional, esto para mantener la congruencia de signos con los balances de energía del capítulo anterior. En esta expresióntanto el área de trasferencia (A_s) como el coeficiente de trasferencia de calor (h) deben ser definidos. Para el primer caso se emplea una ecuación en función de la cantidad de biomasa en el reactor:

$$A_s^l = f(N_{BIO}^{III})$$

Siguiendo la descripción morfológica de *E. coli* realizada en la **Sección 2.1.1**, en la que se establecen que una célula individual posee forma aproximada a un esfero-cilindro con radio (R_a) y longitud promedio (L) de $8x10^{-5}$ cm y $2x10^{-4}$ cm, se tiene que el área superficial de una célula es:

$$A_s = 2\pi R_a (2R_a + L)$$

Adicionalmente, mediciones experimentales han determinado el espesor de la membrana-pared celular en un promedio de $2.87x10^{-7}$ cm (Hobot et al., 1984). Por lo que el área superficial promedio del citoplasma de una única célula de *E. coli* ($A^I_{s,cel}$) es de $1.78x10^{-7}$ cm^2 y el área superficial de la membrana-pared de una única célula de *E. coli* ($A^{II}_{s,cel}$) es de $1.81x10^{-7}$ cm^2. Al igual que con la masa de cada SdeP, es posible generar una relación lineal entre las moles en el biorreactor y el área de cada uno de los sistemas de proceso por célula. Cabe resaltar que el área superficial no es una función lineal, por lo que esta relación proporcional tiene asociado un pequeño error. Sin embargo, es necesaria esta aproximación debido a que, a escala microscópica, la biomasa no crece como un continuo sino en forma discreta.

En el caso de los coeficientes de trasferencia de calor (h_1 y h_2), estos son considerados parámetros constantes y dependientes de las condiciones de operación en el biorreactor Para su deducción se usan las dos analogías propuestas y un trabajo de cálculo más extenso, por lo que se deja un aparte en el **Anexo B** donde se explica de forma detallada la obtención de estos dos parámetros. En las **Tablas 3-3** y **3-4** se enumeran cada una de las ecuaciones constitutivas o de valoración que comprende la estructura extendida del modelo, estas están agrupadas en primer y segundo nivel de especificación respectivamente. En ambas tablas se continúa con la numeración empleada en la **Tabla 3-1**. Nótese que todas las ecuaciones son algebraicas y la mayoría de carácter no lineal.

Tabla 3-3: Estructura extendida del modelo. Primer nivel de especificación

N°	Ecuación	Unidades
19	$\overline{n}_{GLU} = \sigma_{GLU,1} \cdot \overline{r}_1$	$\frac{mmol_{GLU}}{mol_{BIO} \cdot s}$
20	$\overline{n}_{ACE} = \sigma_{ACE,9} \cdot \overline{r}_9$	$\frac{mmol_{ACE}}{mol_{BIO} \cdot s}$
21	$\overline{n}_{NH_3} = \sigma_{NH_3,12} \cdot \overline{r}_{12}$	$\frac{mmol_{NH_3}}{mol_{BIO} \cdot s}$
22	$\overline{n}_{Pi} = \sigma_{Pi,3} \cdot \overline{r}_3 + \sigma_{Pi,6} \cdot \overline{r}_6 + \sigma_{Pi,9} \cdot \overline{r}_9 + \sigma_{Pi,10} \cdot \overline{r}_{10} - \sigma_{Pi,11} \cdot \overline{r}_{11} - \sigma_{Pi,12} \cdot \overline{r}_{12}$	$\frac{mmol_{Pi}}{mol_{BIO} \cdot s}$
23	$\overline{n}_{H_2O} = -\sigma_{H_2O,3} \cdot \overline{r}_3 + \sigma_{H_2O,6} \cdot \overline{r}_6 + \sigma_{H_2O,7} \cdot \overline{r}_7 - \sigma_{H_2O,10} \cdot \overline{r}_{10} + \sigma_{H_2O,11} \cdot \overline{r}_{11} + \sigma_{H_2O,12} \cdot \overline{r}_{12}$	$\frac{mmol_{H_2O}}{mol_{BIO} \cdot s}$
24	$\overline{n}_{O_2} = \sigma_{O_2,10} \cdot \overline{r}_{10} + \sigma_{O_2,12} \cdot \overline{r}_{12}$	$\frac{mmol_{O_2}}{mol_{BIO} \cdot s}$
25	$\overline{n}_{CO_2} = \sigma_{CO_2,5} \cdot \overline{r}_5 + \sigma_{CO_2,6} \cdot \overline{r}_6 + \sigma_{CO_2,7} \cdot \overline{r}_7 + \sigma_{CO_2,12} \cdot \overline{r}_{12}$	$\frac{mmol_{CO_2}}{mol_{BIO} \cdot s}$
26	$\overline{r}_1 = \frac{\overline{r}_{\max 1} \cdot \left(\frac{x(15) \cdot x(3)}{x(4)} \right)}{\overline{K}_{m1} + \left(\frac{x(15) \cdot x(3)}{x(4)} \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
27	$\overline{r}_2 = \frac{\overline{r}_{\max 2} \cdot \left(x(1) \cdot x(7) \right)}{\overline{K}_{m2} + \left(x(1) \cdot x(7) \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
28	$\overline{r}_3 = \frac{\overline{r}_{\max 3} \cdot \left(x(2) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \cdot x(10) - \frac{k_{r3} \cdot x(3) \cdot x(7) \cdot x(11)}{K_{eq3}} \right)}{\overline{K}_{m3} + \left(x(2) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \cdot x(10) \right) + \left(\frac{k_{r3} \cdot x(3) \cdot x(7) \cdot x(11)}{K_{eq3}} \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$

Continuación tabla 3-3: Estructura extendida del modelo. Primer nivel de especificación

29	$\bar{r}_4 = \frac{\bar{r}_{\max 4} \cdot \left(x(3) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \right)}{\bar{K}_{m4} + \left(x(3) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
30	$\bar{r}_5 = \frac{\bar{r}_{\max 5} \cdot \left(x(4) \cdot x(10) \cdot x(9) \right)}{\bar{K}_{m5} + \left(x(4) \cdot x(10) \cdot x(9) \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
31	$\bar{r}_6 = \frac{\bar{r}_{\max 6} \cdot \left(\frac{x(5) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \cdot x(10)}{x(11)} \right)}{\bar{K}_{m6} + \left(\frac{x(5) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \cdot x(10)}{x(11)} \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
32	$\bar{r}_7 = \frac{\bar{r}_{\max 7} \cdot \left(\frac{x(1) \cdot x(12)}{x(13)} \right)}{\bar{K}_{m7} + \left(\frac{x(1) \cdot x(12)}{x(13)} \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
33	$\bar{r}_8 = \frac{\bar{r}_{\max 8} \cdot x(6)}{\bar{K}_{m8} + x(6)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
34	$\bar{r}_9 = \frac{\bar{r}_{\max 9} \cdot \left(x(5) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I - \frac{k_{r3} \cdot x(16) \cdot x(7) \cdot x(9)}{K_{eq8}} \right)}{\bar{K}_{m9} + \left(x(5) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \right) + \left(\frac{k_{r3} \cdot x(16) \cdot x(7) \cdot x(9)}{K_{eq8}} \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
35	$\bar{r}_{10} = \frac{\bar{r}_{\max 10} \cdot \left(x(11) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \cdot X_{O_2}^I \right)}{\bar{K}_{m10} + \left(x(11) \cdot x(8) \cdot X_{Pi}^I \cdot X_{O_2}^I \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
36	$\bar{r}_{11} = \bar{r}_{\max 11} \cdot x(7) \cdot k_{ATP}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
37	$\bar{r}_{12} = \frac{\bar{r}_{\max 12} \cdot \left(\frac{x(1) \cdot x(6) \cdot x(3) \cdot x(4) \cdot x(5) \cdot X_{NH_3}^I \cdot x(7) \cdot x(13)}{x(16)} \right)}{\bar{K}_{m12} + \left(\frac{x(1) \cdot x(6) \cdot x(3) \cdot x(4) \cdot x(5) \cdot X_{NH_3}^I \cdot x(7) \cdot x(13)}{x(16)} \right)}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
38	$r_d = k_d \cdot x(14)$	$\frac{mmol_{BIO}}{s}$
39	$M^I = x(14) \cdot MW_{BIO} \cdot \frac{\bar{M}_{cel}^I}{\bar{M}_{cel}}$	mg
40	$M^{II} = x(14) \cdot MW_{BIO} \cdot \frac{\bar{M}_{cel}^{II}}{\bar{M}_{cel}}$	mg
41	$\dot{Q}_1 = h_1 \cdot A_s^I \cdot \left(x(18) - x(17) \right)$	$\frac{J}{s}$
42	$\dot{Q}_2 = h_2 \cdot A_s^{II} \cdot \left(d - x(18) \right)$	$\frac{J}{s}$

Tabla 3-4: Estructura extendida del modelo. Segundo de especificación

N°	Ecuación	Unidades
45	$\bar{r}_{\max 3} = A_3 \cdot e^{-\frac{Ea_3}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
46	$\bar{r}_{\max 4} = A_4 \cdot e^{-\frac{Ea_4}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
47	$\bar{r}_{\max 5} = A_5 \cdot e^{-\frac{Ea_5}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
48	$\bar{r}_{\max 6} = A_6 \cdot e^{-\frac{Ea_6}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
49	$\bar{r}_{\max 7} = A_7 \cdot e^{-\frac{Ea_7}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
50	$\bar{r}_{\max 8} = A_8 \cdot e^{-\frac{Ea_8}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
51	$\bar{r}_{\max 9} = A_9 \cdot e^{-\frac{Ea_9}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
52	$\bar{r}_{\max 10} = A_{10} \cdot e^{-\frac{Ea_{10}}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
53	$\bar{r}_{\max 11} = \frac{5 \cdot e^{\frac{-69.4}{R}\left(\frac{1}{x(17)} - \frac{1}{298}\right)}}{174}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
54	$\bar{r}_{\max 12} = A_{12} \cdot e^{-\frac{Ea_{12}}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{1}{mol_{BIO} \cdot s}$
55	$k_d = A_d \cdot e^{-\frac{Ea_d}{R \cdot d}}$	$\frac{1}{s}$
56	$A_s^I = M^I \cdot \frac{\bar{A}_{s,cel}^I}{\bar{M}_{cel}^I}$	cm^2
57	$A_s^{II} = M^{II} \cdot \frac{\bar{A}_{s,cel}^{II}}{\bar{M}_{cel}^{II}}$	cm^2
58	$\bar{K}_{m1} = k_{a1}$	$\frac{mol_{GLU} \cdot mmol_{PEP}}{mmol_{PYR}}$
59	$\bar{K}_{m2} = \frac{k_{a2} \cdot x(3)}{x(8)}$	$\frac{mmol_{G6U} \cdot mmol_{ATP}}{mol_{BIO}^2}$
60	$\bar{K}_{m3} = k_{a3}$	$\frac{mmol_{FBP} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi} \cdot mmol_{NAD}}{mol_{BIO}^4}$
61	$\bar{K}_{m4} = \frac{k_{a4} \cdot x(7)}{x(2)}$	$\frac{mmol_{PEP} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi}}{mol_{BIO}^3}$
62	$\bar{K}_{m5} = k_{a5} \cdot x(11) \cdot x(5)$	$\frac{mmol_{PYR} \cdot mmol_{NAD} \cdot mmol_{CoA}}{mol_{BIO}^3}$
63	$\bar{K}_{m6} = k_{a6} \cdot x(7)$	$\frac{mmol_{AcCoA} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi} \cdot mmol_{NAD}}{mol_{BIO}^3 \cdot mmol_{NADH}}$

Continuación tabla 3-4: Estructura extendida del modelo. Segundo de especificación

64	$\bar{K}_{m7} = k_{a7}$	$\frac{mmol_{G6P} \cdot mmol_{NADP}}{mol_{BIO} \cdot mmol_{NADPH}}$
65	$\bar{K}_{m8} = k_{a8}$	$\frac{mmol_{R5P}}{mol_{BIO}}$
66	$\bar{K}_{m9} = k_{a9}$	$\frac{mmol_{AcCoA} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi}}{mol_{BIO}^3}$
67	$\bar{K}_{m10} = k_{a10}$	$\frac{mmol_{NADH} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi} \cdot mmol_{O_2}}{mol_{BIO}^4}$
68	$\bar{K}_{m12} = k_{a12}$	$\frac{\left(mmol_{G6P} \cdot mmol_{R5P} \cdot mmol_{PEP} \cdot mmol_{PYR} \cdot mmol_{AcCoA} \cdot mmol_{NH_3} \cdot mmol_{ATP} \cdot mmol_{NADPH}\right)}{mol_{BIO}^7 \cdot mmol_{ACE}}$
69	$K_{eq3} = e^{\frac{-\Delta G'^m_{r3}}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{mmol_{PEP} \cdot mmol_{ATP} \cdot mmol_{NADH} \cdot mol_{BIO}}{mmol_{FBP} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi} \cdot mmol_{NAD}}$
70	$K_{eq9} = e^{\frac{-\Delta G'^m_{r9}}{R \cdot x(17)}}$	$\frac{mmol_{ACE} \cdot mmol_{ATP} \cdot mmol_{CoA}}{mmol_{AcCoA} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi}}$

3.5 Especificación de parámetros funcionales del modelo

Los parámetros funcionales son todos los valores necesarios para calcular las ecuaciones constitutivas o de valoración. Estos son valores constantes para el modelo que se obtienen a partir de referencias bibliográficas o mediante identificación paramétrica. En las **Tablas 3-5 y 3-6** se listan respectivamente estos dos grupos de parámetros funcionales. Nuevamente se resalta que, en el primer grupo, los coeficientes de trasferencia de calor (*h*), se definen mediante una deducción más extensa que se desarrolla en detalle en el **Anexo B**.

Tabla 3-5: Parámetros funcionales especificados de bibliografía

Descripción	Cantidad
Constante universal de gases ideales (R)	1
Energía libre de Gibbs ($\Delta G'^m_r$)	2
Área superficial de célula promedio ($\bar{A}^I_{s,cel}, \bar{A}^{II}_{s,cel}$)	2
Masa de célula promedio ($\bar{M}^I_{cel}, \bar{M}^{II}_{cel}$)	2
Coeficientes de transferencia de calor (h_1, h_2)	2

Tabla 3-6: Parámetros funcionales para identificación

Descripción	Cantidad	Acotamiento
Energía de activación (Ea)	11	40 - 80 kJ/mol (Sizer, 1943)
Energía de activación en muerte celular (Ea_d)	1	170 – 400 kJ/mol (Sizer, 1943)
Pre-exponencial de Arrhenius (A)	11	$1x10^{-5}$ – $1x10^{15}$
Pre-exponencial de Arrhenius en muerte celular (A_d)	1	$1x10^{1}$ – $1x10^{25}$
Constante de afinidad (k_a)	11	Orden de magnitud de la concentración de sustratos (Doran, 1995)
Constantes de reversibilidad (k_r)	2	$1x10^{-5}$ – $1x10^{5}$
Constante de ATP (k_{ATP})	1	$1x10^{-3}$ – $1x10^{3}$
Total	38	

Los valores numéricos para todos los parámetros pueden ser consultados en el **Anexo A**. Es de notar que en la **Tabla 3-6** los parámetros funcionales para identificación cuentan con un rango de acotamiento, es decir, un intervalo para el cual los valores poseen sentido lógico, generado a partir de revisión bibliográfica. Como se verá en el siguiente capítulo, los pre-exponenciales de Arrhenius son los parámetros por identificar con mayor rango de acotamiento y por ende son los más difíciles de identificar.

Con esta sección se da por finalizado el tercer capítulo de la tesis, el cual describe el modelo matemático propuesto. En el siguiente capítulo se continúa con la metodología MSBF desarrollando los tres últimos pasos con los que se llega al modelo computacional y se comparan las simulaciones con datos experimentales obtenidos mediante revisión bibliográfica.

4. Ajuste y simulación del modelo

En el presente capítulo se realizan los tres últimos pasos de la metodología MSBF y se desarrolla la discusión de los resultados obtenidos y la naturaleza autorregulatoria del proceso estudiado. El capítulo da inicio con el conteo de grados de libertad del modelo, el cual está directamente relacionado a la identificación de los parámetros que permanecen como incógnitas desde el capítulo anterior. Dicha identificación se realiza en dos etapas, primero empleando un algoritmo de optimización computacional y luego realizando ajuste fino de forma manual. Una vez definidos los parámetros se cierra el conteo de grados de libertad y se procede a dar una breve descripción del modelo computacional. El capítulo finaliza con la validación del modelo mediante comparación con datos experimentales obtenidos de revisión bibliográfica y la discusión sobre los procesos autorregulatorios.

4.1 Conteo de grados de libertad e identificación de parámetros (Paso 8)

Como se vio en el **Capítulo 3** el modelo cuenta con 18 ecuaciones estructurales que permiten calcular los 18 estados que el modelo predice. No obstante, como se aprecia en la **Tabla 3-6**, las 52 ecuaciones constitutivas y de valoración que permiten definir los parámetros estructurales del modelo generan 38 parámetros que requieren ser identificados, dando como resultado un conteo negativo de -38 grados de libertad. Para cerrar el problema, en esta sección se describe la metodología empleada para dicha identificación. Vale aclarar que el conteo de grados de libertad y la identificación de parámetros son dos procesos iterativos. Es decir, cada que se definen o identifican un grupo de parámetros se realiza de nuevo el conteo hasta llegar a cero grados de libertad.

Los 38 parámetros a identificar son parámetros cinéticos, que suelen ser desconocidos porque las concentraciones absolutas y las actividades de las enzimas asociadas no se han determinado *in vivo* (Jahan et al., 2016). Además, los valores provenientes de mediciones

reales no son siempre los más apropiados para una simulación computacional que hace uso de reacciones globales y cinéticas sin deducción teórica. Es por esto que, para la reducción de grados de libertad del presente modelo, resulta indispensable el uso de un método de optimización computacional. En una optimización, de manera general, a mayor número de parámetros se requieren algoritmos más elaborados y mayor potencia de cómputo (Maeda, Fukano, Yamamichi, Nitta, & Kurata, 2011). En particular, la identificación de 38 parámetros cinéticos en un modelo de 18 ecuaciones diferenciales no lineales resulta ser un problema extremadamente complejo para un computador personal.

La metodología mostrada a continuación simplifica el problema de optimización al hacer uso de valores promedio para algunos de los parámetros a identificar y volviendo constantes algunos de los estados del modelo ($\dot{x} = 0$). Posterior a la optimización, los parámetros con valor promedio son susceptibles de modificaciones mediante ajuste manual y los balances de los estados con valor constante son progresivamente activados ($\dot{x} \neq 0$). La sección da inicio con las consideraciones para la simplificación del problema de optimización, después de las cuales quedan como únicas incógnitas los pre-exponenciales de Arrhenius. Seguidamente, se realiza la optimización computacional que permite determinar estos últimos valores. Finalmente, se vuelve sobre las primeras consideraciones y se realiza el ajuste manual, que cierra de manera definitiva el conteo de grados de libertad.

4.1.1 Consideraciones iniciales para la identificación de parámetros

Los parámetros por identificar con mayor intervalo de acotamiento son los valores pre-exponenciales en la ecuación de Arrhenius. A pesar de que esta expresión posee interpretación para su disposición matemática, es considerada una relación de carácter empírico (Connors, 1990), y como tal, dificulta la especificación para los parámetros funcionales que la componen y afecta su interpretabilidad (Lema Perez, Munoz-Tamayo, Garcia Tirado, & Alvarez, 2018). El factor pre-exponencial se interpreta como la frecuencia con que las moléculas participantes en la reacción chocan entre sí en una orientación adecuada a concentración de 1 molar (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2014). Esta es, por lo tanto, una medida a escala molecular, en la que existen rangos muy amplios para diferentes tipos de reacciones.

Es debido a estas características que los pre-exponenciales de Arrhenius son seleccionados como el único grupo de parámetros que se ajusta mediante optimización computacional. Los parámetros restantes son definidos, en un principio, mediante una serie de consideraciones que simplifican la solución numérica y facilitan la optimización mediante un algoritmo genético. Se aclara al lector que en la **Sección 4.1.3**, todos los parámetros son luego reajustados manualmente considerado todos los aspectos relevantes del proceso. A continuación se listan las consideraciones que permiten reducir el conteo a -10 grados de libertad:

- No se tiene en cuenta muerte celular, es decir, tanto la energía de activación como el pre-exponencial de Arrhenius en muerte celular son iguales cero ($Ea_d = 0$; $A_d = 0$).
- Siguiendo el rango de acotamiento dado por Sizer (1943), las energías de activación en las reacciones enzimáticas se toma un valor promedio de 60 kJ/mol.
- Las constantes de afinidad se definen como una unidad multiplicado por el orden de magnitud de la productoria de los sustratos que participan en la reacción (Doran, 1995). El valor de productoria se determina de las concentraciones intracelulares en fase de crecimiento reportadas por Bennett et al. (2009).
- Las constantes de reversibilidad en las reacciones 3 y 9 se definen con valores de uno y cero respectivamente ($k_{r3} = 0.1$; $k_{r9} = 1$). Así mismo, los coeficientes estequiométricos de O_2 y CO_2 en la reacción 12 son igualados a cero ($\sigma_{O2,12} = 0$; $\sigma_{CO2,12} = 0$).
- La reacción de consumo de energía en forma de ATP para el mantenimiento celular se limita a una reacción de orden cero ($r_3 = r_{max,3}$).
- Los valores iniciales para los 13 estados intracelulares son los mismos valores de concentraciones intracelulares reportado Bennett y et al. (2009).
- Dado la alta interconectividad que poseen el ATP y el ADP, sus derivadas son igualadas a cero ($\dot{x}_{(7)} = 0$; $\dot{x}_{(8)} = 0$), lo que restringe la no linealidad del modelo.

4.1.2 Identificación de pre-exponenciales de Arrhenius

Existen diferentes tipos de algoritmos de optimización empleados en la identificación de parámetros de modelos dinámicos. De manera general, estos métodos se clasifican en dos grandes grupos: de optimización local y de optimización global. Los primeros se subdividen a su vez en basados en gradiente y sin uso de gradiente. Por su parte, los métodos de

optimización global se subdividen en determinísticos y estocásticos. Para mayor detalle se recomienda consultar a (Saa & Nielsen, 2017). En el presente trabajo se opta por usar un algoritmo genético, un método de optimización global de tipo estocástico sin uso de gradiente que ha demostrado ser eficiente para el ajuste de modelos metabólicos (Jahan et al., 2016; Khodayari et al., 2014).

Groso modo, el uso de un algoritmo genético para solucionar un problema de identificación de parámetros consiste en la siguiente secuencia de pasos: se genera aleatoriamente un conjunto de valores para los parámetros que se quieren encontrar dentro de su intervalo de acotamiento. A este grupo de valores se le llama población inicial y con estos se soluciona el modelo, comparan luego los valores de las salidas del modelo contra el conjunto de valores experimentales. Para la comparación, se emplea un funcional de costos que arroja un error ponderado en forma escalar que surge de la diferencia entre valores experimentales y simulados. Si este valor es grande, se busca minimizarlo mediante variaciones cuasi aleatorias sobre los individuos de la población, generando una nueva población de parámetros. Estos a su vez se usan para solucionar el modelo y son evaluados mediante el funcional de costo. Este proceso iterativo se repite hasta que se obtiene un conjunto de valores para los parámetros (una población) con bajo error. La **Figura 4-1** muestra de forma esquemática la serie de pasos que conforman el algoritmo genético usado para identificar los pre-exponenciales de Arrhenius del modelo.

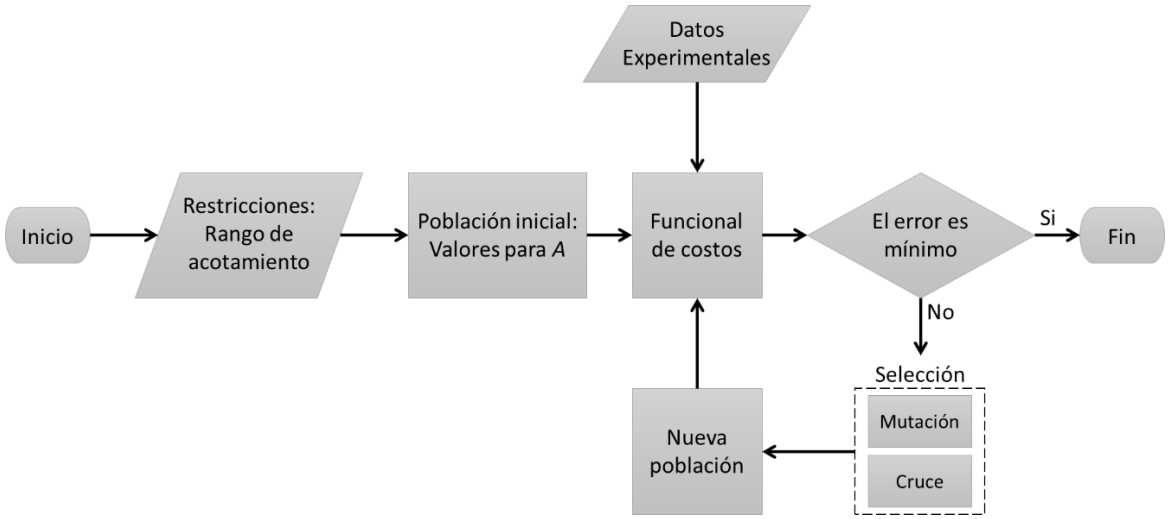

Figura 4-1: Diagrama de flujo simplificado del algoritmo genético.

La característica que diferencia al algoritmo genético de otros métodos de optimización heurística es la manera como se realizan las variaciones cuasi aleatorias en los individuos de la población. En este se usan coeficientes de cruzamiento, mutación y selección inspirados en la forma como se da la evolución de las poblaciones biológicas. Para mayor detalle en la aplicación de este tipo de algoritmos se recomienda consultar a Conn et al. (1997) y Goldberg & Holland (1988).

Para la implementación del algoritmo genético se usó el software comercial Matlab® versión R2014b licenciado por la Universidad Nacional de Colombia. Este software cuenta con una función nativa con dicho algoritmo, facilitando su ejecución. Para el funcional de costo se emplearon los datos experimentales de concentraciones extracelulares de BIO, GLU y ACE reportados por Toya et al. (2010) para *E. coli* K12 cepa BW25113. Los datos fueron obtenidos en un biorreactor de tanque agitado de 2 L operado por lotes con 1.2 L de volumen de trabajo. El microorganismo fue cultivado a 37°C en medio sintético con 4 g/L de GLU inicial, pH 7 y flujo de aire de 1L/min. A lo largo del experimento se controlaron las variables de pH y temperatura en el biorreactor. En la **Figura 4-2** se muestra el ajuste preliminar logrado mediante el algoritmo genético para las tres salidas del modelo

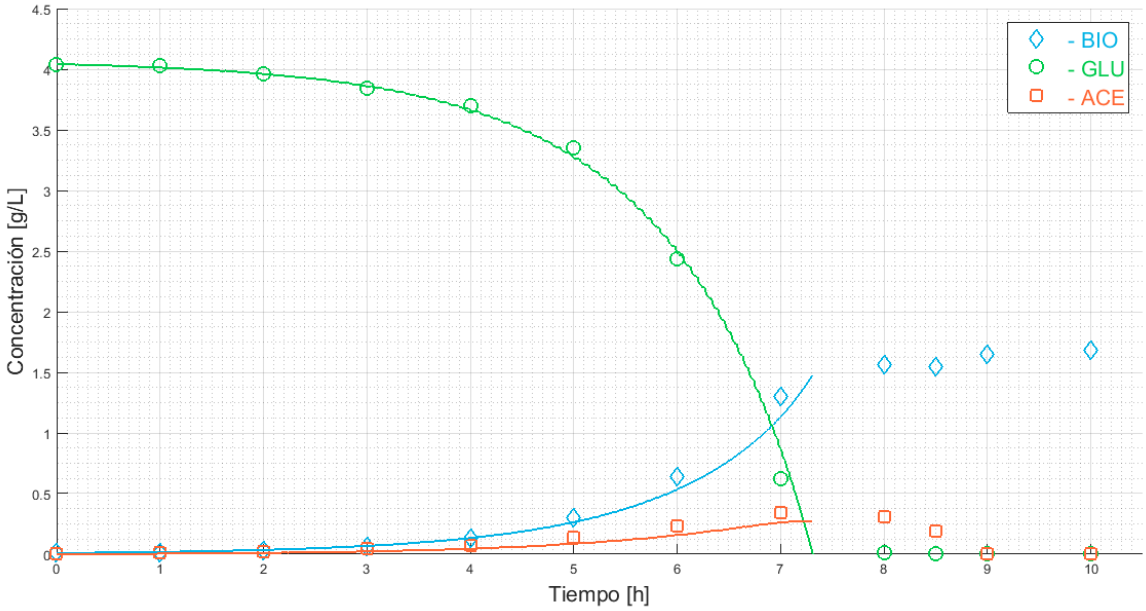

Figura 4-2: Simulación de concentraciones de las salidas del modelo. Ajuste preliminar

En la **Figura 4-2** las formas geométricas (rombo, círculo y cuadrado) marcan los datos cinéticos reportados por Toya et al. (2010) y las líneas continuas indican las predicciones realizadas por el modelo propuesto. Los valores de los 38 parámetros para esta versión se encuentran en la **Tabla A-5** del **Anexo A** y las condiciones iniciales de la simulación se encuentran en el **Tabla A-7** del mismo anexo. Se resalta que no se realizó una única optimización, el proceso fue repetido varias veces modificando valores para la población inicial y el rango de acotamiento, hasta llegar al resultado mostrado.

Como se puede notar, bajo este conjunto de parámetros preliminar el modelo describe con éxito la fase de crecimiento del microorganismo, pero carece de capacidad para seguir la fase estacionaria. Esto ocurre porque al agotarse la glucosa, el tamaño de paso que exige el método de numérico para continuar la solución del modelo es inferior a la capacidad del ordenador usado, y la simulación se detiene. Sin embargo, se considera relevante presentar esta versión preliminar, ya que como se muestra en la **Figura 4-3,** para las concentraciones intracelulares de G6P y PEP, el modelo logra reproducir oscilaciones amortiguadas de los metabolitos de la glucólisis.

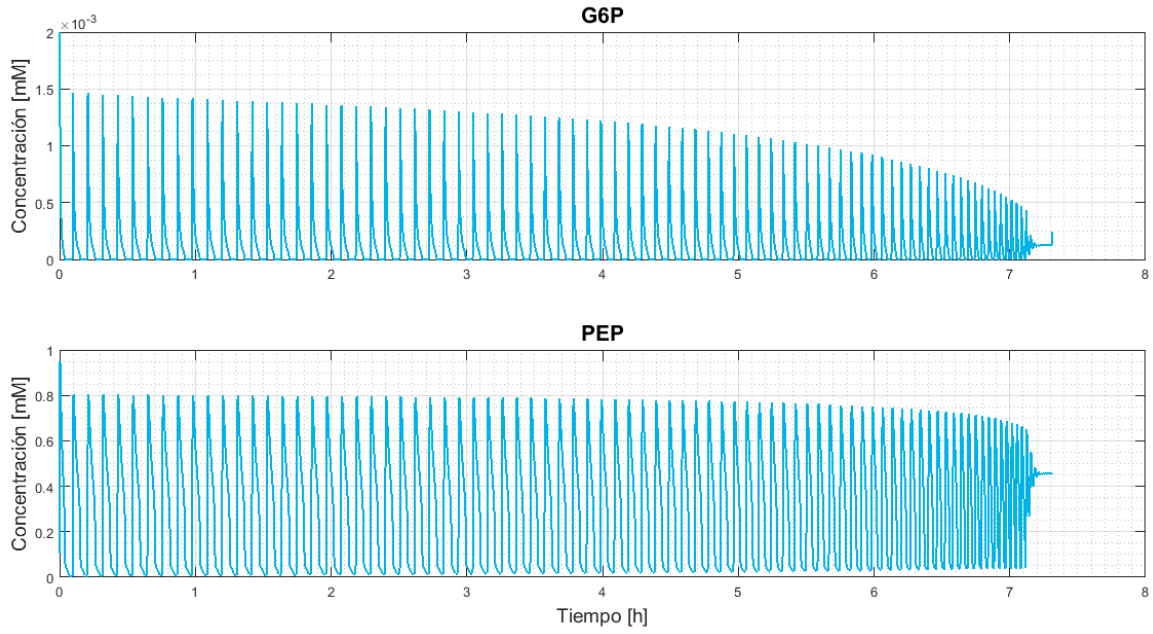

Figura 4-3: Simulación de concentraciones intracelulares de G6P y PEP. Ajuste preliminar.

El periodo de las oscilaciones es de alrededor de 6 min, valor que se encuentra en el rango reportado en la bibliografía (Chuang & Chiou, 2006; Diaz Ricci, 2000; Maria, 2015; Sowa, Baldea, & Contreras, 2014). Además, el periodo de oscilación puede ser alterado manipulando los valores cinéticos de la reacción de la Pts ($\bar{r}_1$), tal y como lo indica (Levering, Kummer, Becker, & Sahle, 2013). En el estado del arte consultado, no se ha encontrado a la fecha ningún modelo capaz de describir comportamientos oscilatorios intracelulares a la vez que se ajusta variables extracelulares en simulaciones operando en cultivos por lotes. Esto le da valor a este primer ajuste, así no logre reproducir eficientemente la última parte del cultivo.

4.1.3 Supresión de las restricciones y ajuste final

En esta sección se busca, mediante ajuste manual, lograr la descripción de la fase estacionaria del microorganismo sin ninguna de las restricciones del apartado anterior. Para esto se modifican los diferentes parámetros cinéticos alrededor de los valores hallados previamente. En la **Figura 4-4** se expone el ajuste final logrado para las tres salidas del modelo. Nuevamente se compara la simulación con los datos cinéticos reportados por Toya et al. (2010). Los valores de los 38 parámetros para esta versión se encuentran en la **Tabla A-6** del **Anexo A** y de las condiciones iniciales de la simulación se encuentran en el **Tabla A-7** del mismo anexo. Con este conjunto de parámetros se cierran a cero los grados de libertad del modelo.

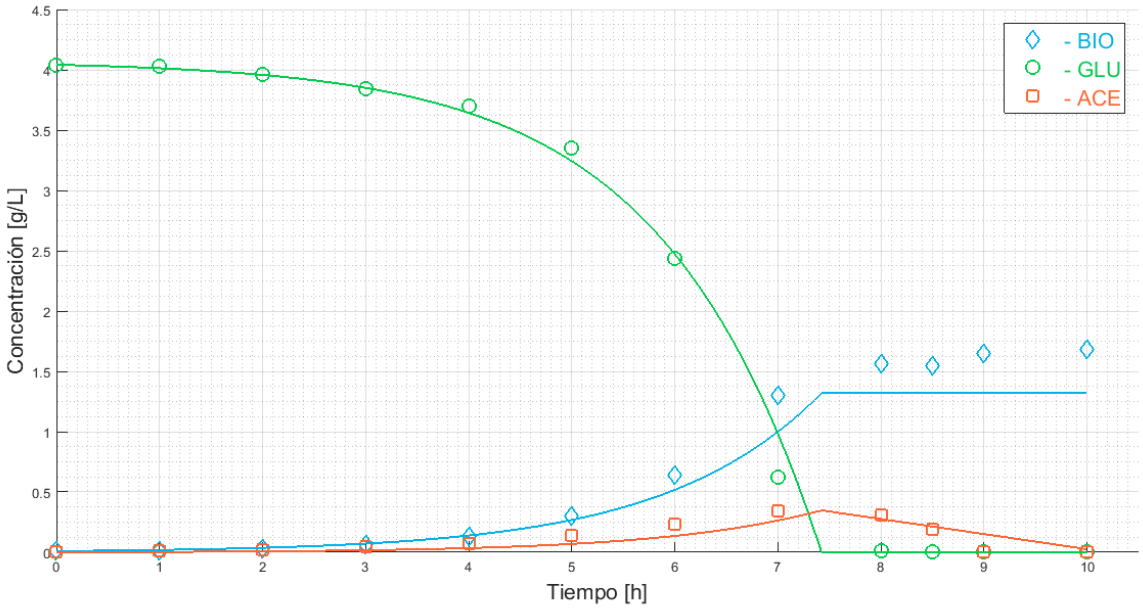

Figura 4-4: Simulación de concentraciones de las salidas del modelo. Ajuste final.

Al comparar la **Figura 4-4** con los resultados del ajuste preliminar, se observa que el modelo es capaz de describir todas las fases para el crecimiento de *E. coli* en cultivo por lotes para las tres salidas del modelo. En la **Figuras 4-5** se muestran los resultados en las concentraciones intracelulares de los compuestos del metabolismo central del carbono considerados. Esta simulación se obtiene bajo las mismas condiciones del experimento de Toya et al. (2010). Para este conjunto de parámetros no se presentan oscilaciones intracelulares, pero todos los compuestos se encuentran dentro de los intervalos experimentales reportados en bibliografía. Esto a pesar de un sobre pico inicial en algunos valores que se discute en la **Sección 4.3.2**.

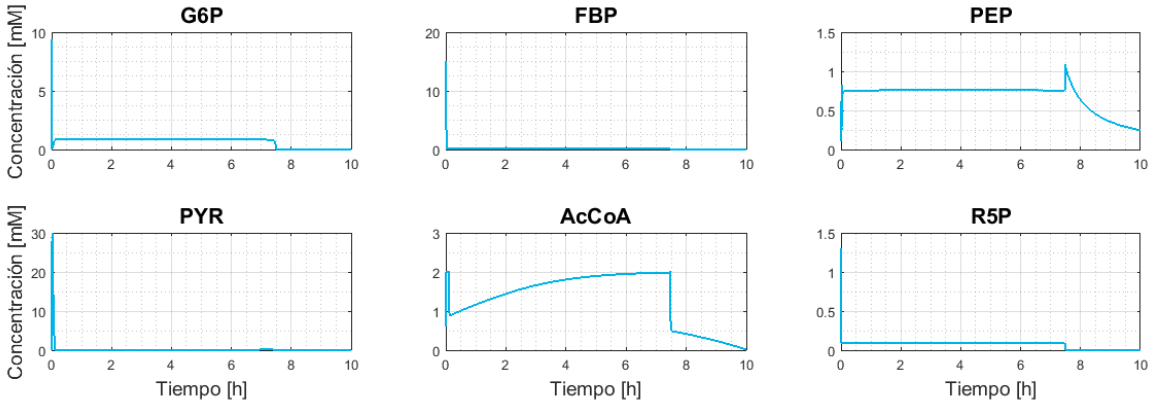

Figura 4-5: Simulación de concentraciones intracelulares de compuestos del metabolismo central del carbono. Ajuste final.

4.2 Modelo computacional (Paso 9)

Al igual que con la optimización de parámetros, la versión computacional del modelo se desarrolló en Matlab® versión R2014b, licenciado por la Universidad Nacional de Colombia. El modelo computacional resuelve el sistema de ecuaciones diferenciales que componen el modelo matemático para diferentes volúmenes de trabajo y concentraciones iniciales de GLU y BIO. Esta versión del modelo permite simular variaciones dinámicas en la temperatura del medio cultivo, graficando y tabulando los cambios temporales de los 16 estados que componen en el modelo, así como los flujos de calor y nutrientes entre el microrganismo y el medio de cultivo. En el presente documento no se encuentran disponibles los archivos que componen el modelo computacional, ni los códigos para la programación del mismo. Esto se realiza para mantener reserva de los resultados finales con miras a una publicación científica en revista indexada, sobre la que se está trabajando en la actualidad.

4.3 Validación del modelo (Paso 10)

La validación es el paso final de la metodología MSBF y consiste en la comparación de los resultados que arroja el modelo con datos del proceso real. Para esta es posible usar datos experimentales propios, datos de la revisión bibliográfica, o incluso, modelos reportados para el mismo proceso. En este documento se usan las dos últimas aproximaciones, analizando las variables del proceso en seis grupos: compuestos extracelulares, compuestos del metabolismo central de carbono, coenzimas, flujos respiratorios, variación de los estados en función de la temperatura y flujo de calor con el entorno. Para los dos primeros se hace de nuevo uso de los datos experimentales de Toya et al. (2010) y se incluye en la discusión la comparación con el modelo metabólico de Kurata y Sugimoto (2018). Para las coenzimas, los flujos respiratorios y las variaciones en función de la temperatura, se analiza que la respuesta del modelo esté dentro los rangos lógicos. Finalmente, para el flujo de calor con el entorno se compara el modelo con los datos experimentales de (Marison & von Stockar, 1986).

4.3.1 Compuestos extracelulares

En la revisión del estado del arte se encontraron diferentes modelos metabólicos para *E. coli* (**Tabla 1-1**), siendo uno de los más completos el desarrollado por Kurata y Sugimoto (2018). Este modelo cuenta con 46 reacciones, detalla los estados de 51 compuesto y tiene la capacidad de representar el comportamiento de diferentes cepas mutantes de *E. coli* BW25113. El modelo de Kurata y Sugimoto (2018) se enfoca fuertemente en la descripción de los flujos metabólicos y el ajuste de gran cantidad de metabolitos intracelulares, por lo cual, dicho modelo es un excelente punto de comparación para validar los datos intracelulares y extracelulares del modelo propuesto.

En la comparación se usan de nuevo los datos experimentales de Toya et al. (2010), y bajo las mismas condiciones iniciales de BIO y GLU, se confrontan las predicciones del modelo propuesto con las del modelo de Kurata y Sugimoto (2018). La **Figura 4-6** muestra las tres variables extracelulares de interés para un cultivo *E. coli* operado por lotes, con 1.2 L de volumen de trabajo, 37°C y concentraciones iniciales de GLU y BIO de 4.0 y 0.1 g/L respectivamente. Los rombos negros representan los puntos experimentales de Toya et al. (2010), las líneas naranja las simulación del modelo de Kurata y Sugimoto (2018) y las líneas azules son las simulaciones del modelo propuesto.

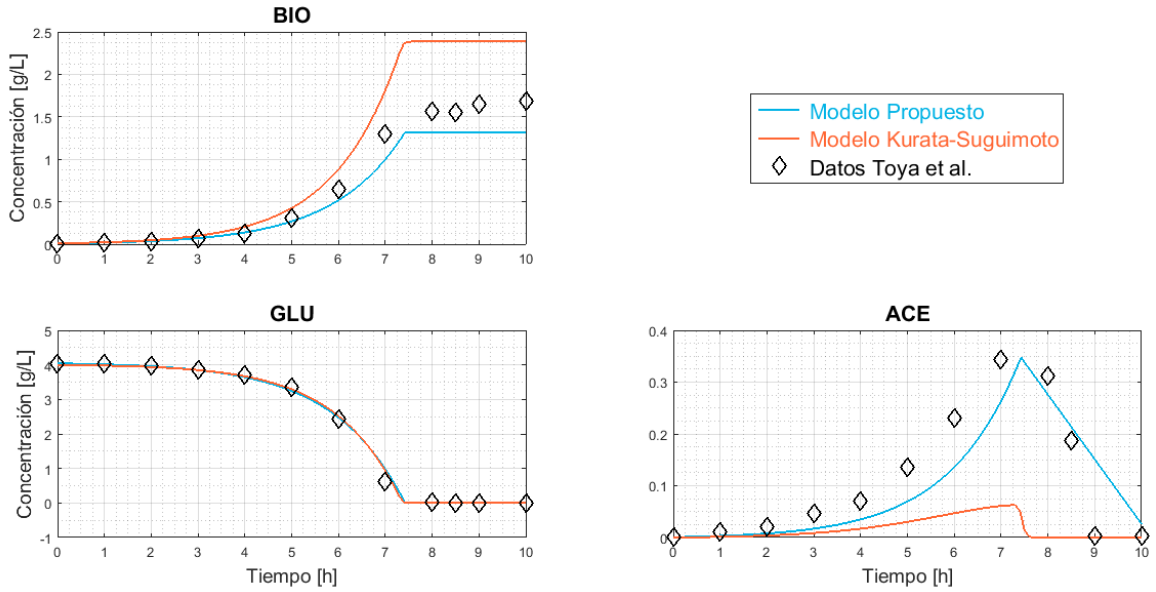

Figura 4-6: Comparación de resultados de las salidas del modelo.

Como se puede apreciar el modelo propuesto subestima ligeramente la producción de BIO, mientras el modelo de Kurata y Sugimoto (2018) la sobreestima un poco más. En el caso del consumo de GLU ambos se comportan de manera similar. Finalmente en el caso del ACE, el modelo propuesto logra una aproximación mucho mejor a los datos de Toya et al (2010). Este resultado es remarcable, pues la concentración extracelular de ACE ha demostrado ser una variable de difícil ajuste en modelos bioquímicamente estructurados complejos. Por ejemplo, el modelo de Ortega et al. (2018) logra un mejor ajuste de esta variable respecto a los datos reportados por Jahan et al. (2016) al considerar los efectos de la trasferencia de masa a través de la membrana-pared del microorganismo.

En la **Figura 4-7** se muestra un diagrama de barras con el error cuadrático medio que compara el modelo de Kurata y Suguimoto y el modelo propuesto respecto a los datos experimentales y se pueden observar de forma más precisa las diferencias. El error cuadrático medio (ECM) es un estimador del error promedio de los resultados predichos por un modelo respecto a un conjunto de datos experimentales. A medida que el valor del ECM se acerca más a cero, indica que la predicción del modelo para una determinada variable es más acertada. El ECM se define médiate la siguiente expresión:

$$ECM = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} \left(Y_{\exp} - Y_{sim} \right)^2$$

donde Y_{sim} es la variable de salida del modelo, Y_{exp} es el respetivo valor experimental con el que se compara y n es el número de puntos experimentales con los cuanta a lo largo de la cinética. Nótese que el ECM se calcula de forma similar a la varianza estadística.

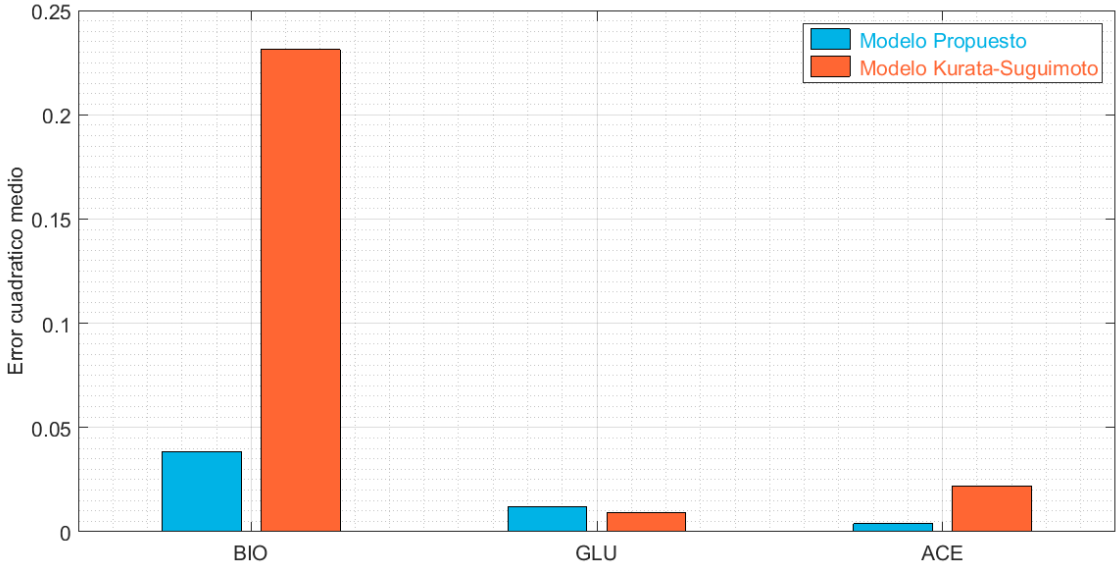

Figura 4-7: Error cuadrático medio de las salidas del modelo.

En este punto es necesario aclarar que, si bien el modelo parece ser mejor que el de Kurata y Sugimoto en las concentraciones extracelulares, ambos modelos se están comparando bajo una única condición. Por ejemplo, si la comparación se realiza para diferentes cepas mutantes de *E. coli* BW25113, el modelo de Kurata y Sugimoto siempre dará una mejor descripción del proceso. Mientras que, si la comparación se realiza para diferentes condiciones de temperatura como la **Sección 4.4**, el modelo propuesto siempre será mejor. Es decir, cada modelo se enfoca en describir un aspecto diferente de la compleja biología del microorganismo y por ende cada uno tiene sus fortalezas y debilidades.

4.3.2 Compuestos del metabolismo central de carbono

Siguiendo la metodología del apartado anterior, la **Figura 4-8** muestra las simulaciones para los seis compuestos del metabolismo central del carbono considerados en el presente en el modelo propuesto y los compara con los datos de Toya et al. (2010) y con las simulaciones del modelo de Kurata y Suguimoto (2018). Debido a que Toya et al. no reportan datos experimentales para AcCoA, en la **Figura 4-8** solo presenta los resultados de las dos

simulaciones para esta variable. Por su parte, en la **Figura 4-9** se presenta el diagrama de barras con el error cuadrático medio de ambos modelos respecto a los datos experimentales, nuevamente aclarando la ausencia datos para comparar las simulaciones de AcCoA.

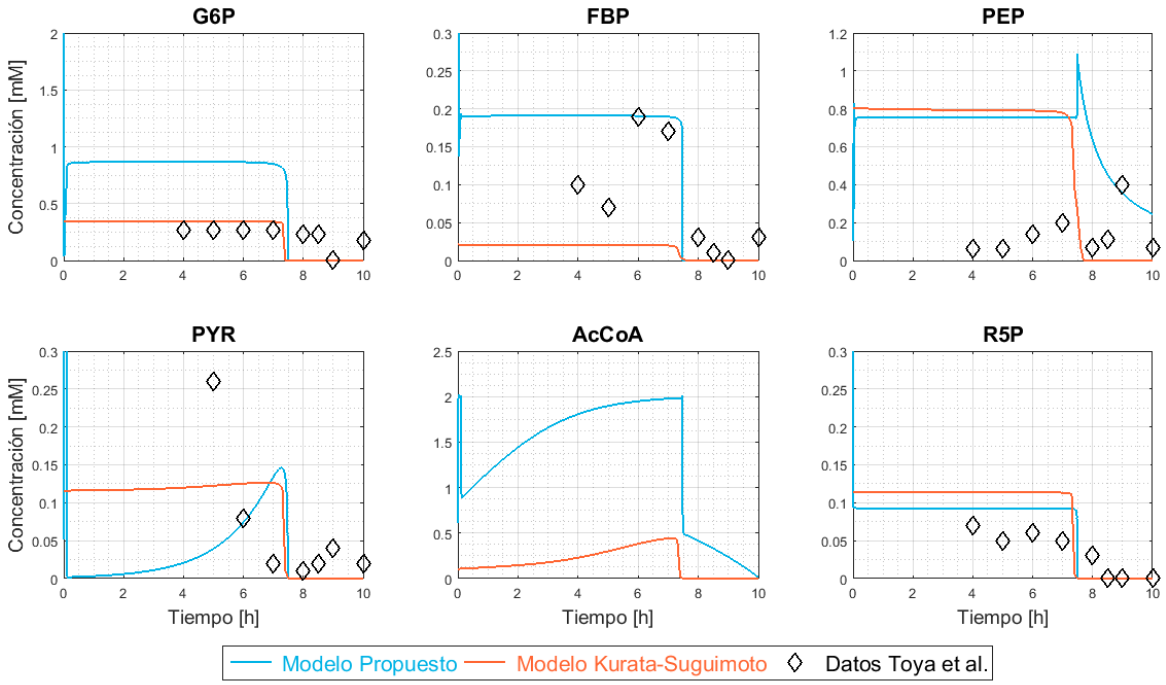

Figura 4-8: Comparación de resultados de las salidas del modelo.

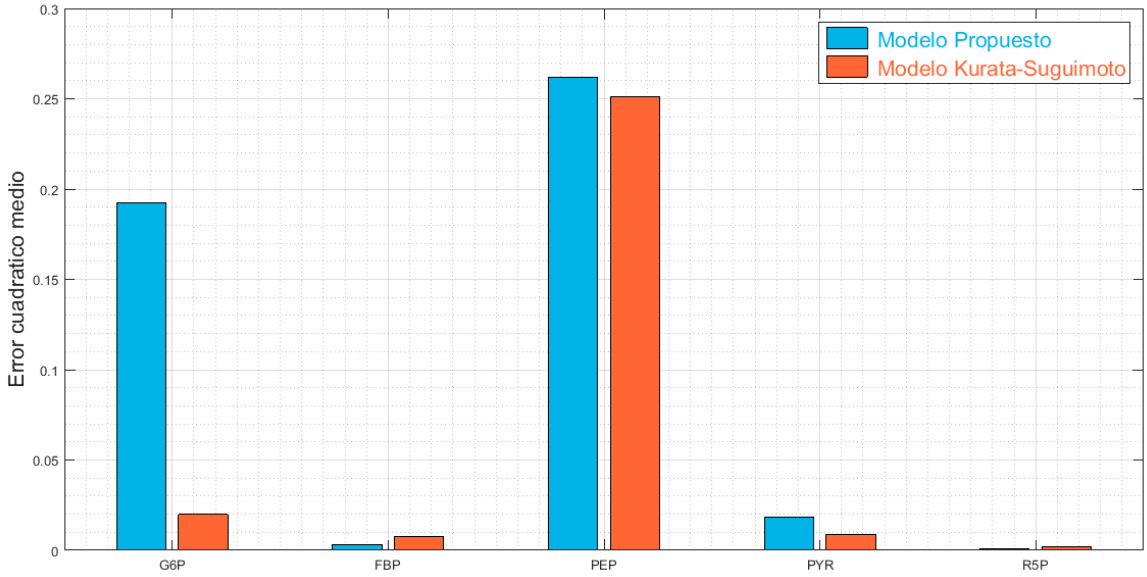

Figura 4-9: Error cuadrático medio de las salidas del modelo.

Nótese que para todas las variables intracelulares consideradas se tienen resultados comparables entre los dos modelos. Resultado que es de remarcar debido a la elevada complejidad metabólica del modelo de Kurata y Sugimoto. Mientras el modelo propuesto cuenta con 12 reacciones y 13 metabolitos intracelulares, el modelo de Kurata y Sugimoto cuenta con 46 reacciones y 48 metabolitos intracelulares. La complejidad de un modelo es deseable en situaciones en las que se busca una descripción más detallada de las interacciones del proceso, por ejemplo, una descripción metabólica más precisa. Por otro lado, una modelo más simple es deseable cuando se necesitan soluciones numéricas más rápidas, por ejemplo, en implementaciones para sistemas de control.

El modelo propuesto logra un mejor ajuste de las variables extracelulares, mientras el modelo de Kurata y Sugimoto logra un mejor ajuste de a variables intracelulares. En el caso de AcCoA, donde no se tiene datos experimentales, ambas simulaciones poseen la misma tendencia y se encuentran en el mismo orden de magnitud reportado para concentraciones celulares en fase de crecimiento para el microorganismo estudiado (Bennett et al., 2009). La única diferencia significativa del modelo propuesto frente al modelo de Kurata y Suguimoto (2018) es la presencia de sobre-picos al inicio de la simulación. Esto se aprecia en la **Figura 4-5**, pero no se observan en la **Figura 4-8**, pues en esta última se acorta el eje vertical para poder observar en detalle ambos modelos respecto a los resultados experimentales. Los sobre picos tienen una duración de 1 a 5 minutos y se atribuyen a la sensibilidad numérica del modelo a las condiciones iniciales. No se considera relevante extender una discusión sobre estos sobre-picos ya que no cuenta con datos experimentales intracelulares para la fase latencia.

4.3.3 Coenzimas

Durante el desarrollo de un modelo metabólico se pueden tomas diferentes consideraciones sobre las coenzimas, al respecto se distinguen dos aproximaciones: modelos que consideran las concentraciones de coenzimas como parámetros, es decir, valores constantes durante toda la simulación, y modelos que consideran las coenzimas como estados. Por ende, son variables del proceso con su respectiva ecuación diferencial. Sin tener en cuenta la cantidad de metabolitos que describe un modelo, la segunda aproximación es siempre más compleja de desarrollar ya que este tipo de moléculas participan en múltiples reacciones catabólicas y anabólicas. A medida que aumenta la cantidad de interacciones entre estados, aumenta la complejidad del sistema y dificulta su solución (Khalil, 1996).

En el presente trabajo se optó por describir el comportamiento de las coenzimas como estados del proceso, principalmente, porque estos compuestos participan estrechamente en las reacciones de generación de energía celular. La **Figura 4-10** muestra el comportamiento dinámico de las siete coenzimas consideradas para una simulación con las mismas condiciones iniciales utilizadas en la sección anterior.

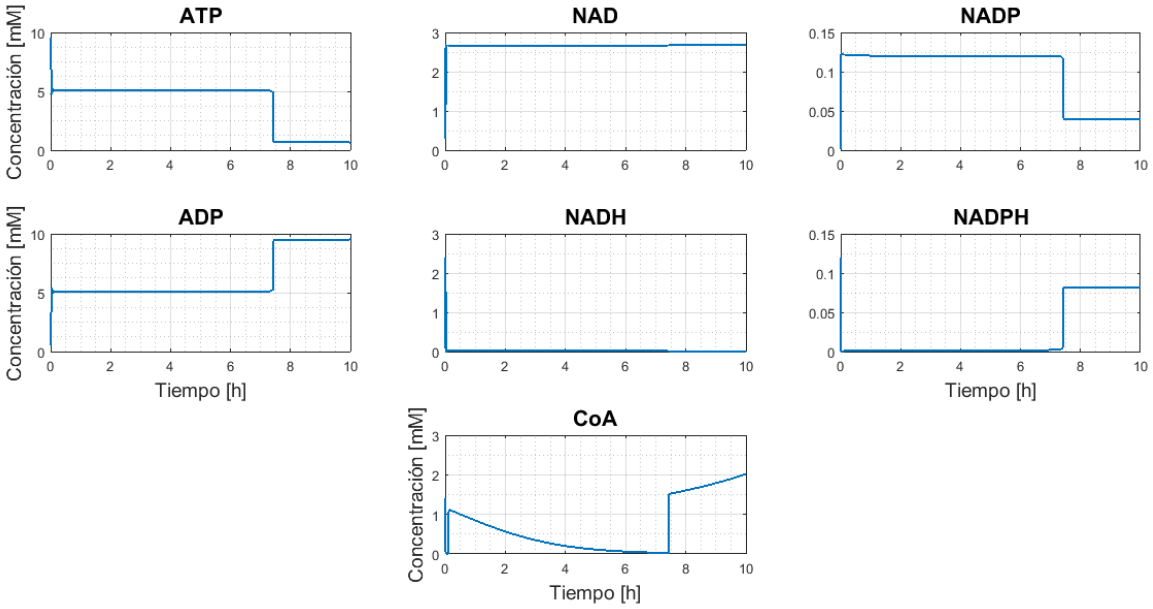

Figura 4-10: Simulación de concentraciones intracelulares coenzimas.

La mayoría de los modelos encontrados en la revisión bibliográfica utilizan la concentración de coenzimas intracelulares como valores constantes, es decir se defienden como parámetros del modelo. De la revisión del estado del arte (**Tabla 1-1**), sólo los modelos de Khodayari et al. (2014) y Peskov et al. (2012) cuentan con balances para las siete coenzimas consideradas en el presente trabajo. Siendo el modelo de Khodayari et al., el más completo en términos de comportamiento dinámico de coenzimas (Lima et al., 2016). Desafortunadamente, para efecto de comparación no se pudo implementar una simulación satisfactoria de ninguno de los dos modelos mencionados. El modelo de Khodayari está disponible en línea, pero su versión computacional carece de comentarios y nomenclatura por lo que resulta muy difícil manipularlo para lograr simulaciones. Por su parte, el modelo Peskov no se encuentra siponible en linea. Luego para validar los resultados obtenidos en la **Figura 4-10** se opta por una aproximación diferente.

En la **Tabla 4-1** se comparan los valores predichos por el modelo propuesto cuando el microorganismo se encuentra a la mitad de la fase de crecimiento (hora 6) con datos no dinámicos de concentraciones intracelulares de coenzimas para *E. coli* en fase de crecimiento. Específicamente, se compara la simulación por las concentraciones experimentales obtenidas por Bennett et al. (2009) para *E. coli* K12 cepa NCM3722 cultiva por lotes, en medio sintético y con 4 g/L de glucosa inicial. Los valores reportados por Bennett et al. son los mismos valores usados como parámetros constantes en el modelo de Kurata y Suguimoto (2018).

Tabla 4-1: Concentración intracelular de coenzimas en fase de crecimiento [mM].

Coenzima	Valor Simulado	Valor reportado por Bennett et al. (2009)
ATP	5.089	9.600
ADP	5.074	0.560
NAD	2.667	2.600
NADH	0.017	0.083
NADP	0.120	0.002
NADPH	0.002	0.120
CoA	0.062	1.400

Comparar datos dinámicos con un único valor experimental puede generar elevados porcentajes de error, es por esto que en esta sección no se da el error cuadrático medio de las concentraciones de coenzimas. Sin embargo, se obtiene las siguientes conclusiones:

- Tanto NAD como NADH poseen valores muy similares, además, el ATP se encuentra en el mismo orden de magnitud que el reportado por Bennett et al. Este resultado indica que, en el modelo, las velocidades de producción de equivalentes reductores en glucólisis y ciclo de Krebs se encuentran bien acopladas con las velocidades de consumo en la fosforilación oxidativa.
- El ADP se encuentra un orden de magnitud sobre el valor reportado por Bennett, lo que puede atribuirse a que el modelo no considera otras formas de la de adenosina, como, por ejemplo, adenosín monofosfato (AMP).

- Los valores de NADP y NADPH se encuentran trastocados, es decir, la simulación del NADP alcanza el valor experimental del NADPH y la simulación del NADPH alcanza el valor experimental de NADP. Esto indica que, si bien tanto las reacciones de consumo como las de generación están bien acopladas en el modelo, la velocidad producción de equivalentes reductores para la formación de biomasa es más lenta de lo que debería. Esto puede atribuirse a las consideraciones tomadas en las reacciones de la fase no oxidativa de las pentosas fosfato, la cual genera acumulación de R5P si no se mantienen velocidades bajas para formación de NADPH.
- La concentración de CoA se encuentra en un valor bajo, esto debido a que, como se mostró en la **Sección 4.3.2**, la concentración de AcCoA es más alta que en el modelo de Kurata y Suguimoto (2018).

Es importante tener en cuenta que, en el modelo propuesto, las coenzimas solo se transforman entre sus estados oxidados y reducidos, es decir, no hay reacciones para la producción de precursores de coenzimas, como si ocurre en un organismo vivo. A pesar de esto, el modelo propuesto logra describir valores constantes para estas variables que aumentan la no linealidad del sistema y dificultan la solución del problema numérico. La mayoría de los modelos dinámicos de metabolismo reportados para *E. coli*, toman las concentraciones intracelulares de coenzimas como parámetros y no como variables (Lima et al., 2016). Que el modelo propuesto logre una solución estable con siente coenzimas operando como estados, le da un plus en términos del detalle de las interacciones metabólicas.

4.3.4 Flujos respiratorios

El consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono son parámetros importantes que describen el estado metabólico en que se encuentra un organismo. Mientras el consumo de oxígeno se asocia directamente a la producción de ATP en la fosforilación oxidativa, la producción de dióxido de carbono se encuentra asociada a las reacciones catabólicas del metabolismo del carbono (Mathews et al., 2013). En esta sección se analiza la respuesta del modelo propuesto respecto del consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, al compararla con datos reportados en la bibliografía. La **Figura 4-11** muestra la simulación de las velocidades específicas de consumo de O_2 y producción CO_2 para un cultivo por lotes con las mismas condiciones iniciales usadas en los aparatados anteriores. En la parte superior de **Figura 4-11** se indica el cociente respiratorio (RQ) de la simulación.

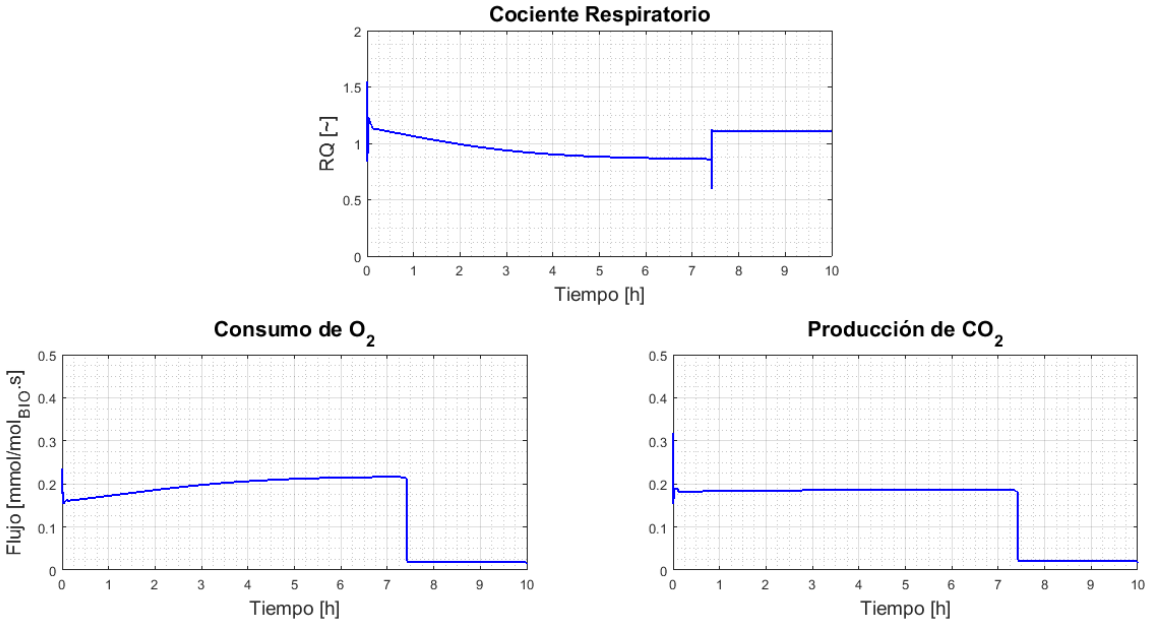

Figura 4-11: Simulación de las velocidades respiratorias específicas del microorganismo.

El cociente respiratorio es un número adimensional que se obtiene de la división entre las moles de dióxido de carbono producidas y las moles de oxígeno consumido. Esta relación es ampliamente utilizada en bioprocesos, pues da un indicio directo del estado metabólico del microorganismo y es un importante parámetro para la solución de balances estequiométricos en descripciones macroscópicas de crecimiento microbiano (Doran, 2013). El valor de RQ depende del tipo de microorganismo, si es aerobio o anaerobio, la fuente de carbono, la fase de crecimiento y condiciones ambientales como la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto (Baez & Shiloach, 2013; Clifton & Logan, 1939; Soini et al., 2005).

Para *E. coli*, en condiciones aerobias, medio con el mínimo de nutrientes necesarios para el crecimiento, 37°C y con glucosa como fuente de carbono, se reporta un cociente respiratorio de 1.01 ± 0.10 a lo largo de la fase de crecimiento (Andersen & von Meyenburg, 1980). Los resultados de la **Figura 4-11** muestran que el RQ de la simulación se encuentra dentro del intervalo reportado. Según Meyer et al. (1984), la continua acumulación lineal de acetato de entre 0 a 4.5 g/L está directamente relacionada con un disminución lineal del RQ de 1.2 a 0.9 para cultivos de *E. coli* K12. Nótese que durante la fase de crecimiento la simulación presenta este mismo fenómeno, con una progresiva disminución del RQ con valores de 1.1 al inicio de la fase de crecimiento y 0.9 a inicio de la fase estacionaria.

La discrepancia de las predicciones del modelo respecto a los resultados experimentales se da durante la fase estacionaria, justo cuando el microorganismo se encuentra consumiendo el ACE acumulado. Según Andersen y et al. (1980), para *E. coli* con ACE como única fuente de carbono, se obtiene un RQ de 1.01±0.04. Si se observa la simulación en la **Figura-4-11,** para estas condiciones se alcanza un cociente respiratorio de 1.2, valor que se encuentra por fuera del rango reportado por Andersen et al. Esta discrepancia se da porque *E. coli* con ACE como única fuente de carbono, activa la ruta de la gluconeogénesis (Oh, Rohlin, Kao, & Liao, 2002) la cual depende de reacciones que van en contra flujo a la glucólisis. Con se menciona en la **Sección 2.2.1**, el modelo propuesto no considera ninguna de estas reacciones.

4.3.5 Respuesta a la temperatura

Como se mencionó en la **Sección 2.1.3**, dependiendo de la temperatura ambiental se desencadenan diferentes respuestas a nivel metabólico que se ven directamente reflejadas en el crecimiento del microorganismo. En esta sección se analiza la respuesta del modelo propuesto a diferentes valores de temperatura ambiental, verificando que las simulaciones concuerden con lo reportado en la bibliografía. Inicialmente se comparan los cambios en la curva de crecimiento del microorganismo para diferentes condiciones de temperatura ambiental y a continuación se analizan los cambios en los metabolitos intracelulares ante las mismas variaciones. El modelo propuesto permite evaluar condiciones constantes temperatura del medio de cultivo, así como cambios dinámicos en la misma.

La **Figura 4-12** muestra la simulación del modelo para el crecimiento de *E. coli* ante cinco condiciones constantes de temperatura ambiental y una concentración inicial de glucosa de 4g/L. *E. coli* puede desarrollarse entre 20 y 43°C obteniendo una máxima producción de BIO a 37°C (Jones et al., 1987; Marr et al., 1964). Valores cercanos a los 30°C evidencian velocidades de crecimiento lentas (Soini et al., 2005), mientras valores superiores a los 45°C generan un incremento rápido de la velocidad de muerte celular (Van Derlinden et al., 2008). Como se aprecia en la **Figura 4-12**, el modelo predice a una temperatura de 45°C un crecimiento del microorganismo prácticamente nulo, mientras para valores superiores a 43°C e inferiores a 30°C la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve disminuida. Los resultados obtenidos concuerdan con la descripción cualitativa del crecimiento de *E. coli*. Sin embargo, es importante señalar que entre 38 y 43°C la BIO el modelo alcanza los valores de la fase estacionaria, pero lo hace a una velocidad mayor a lo esperado (resultado no mostrado).

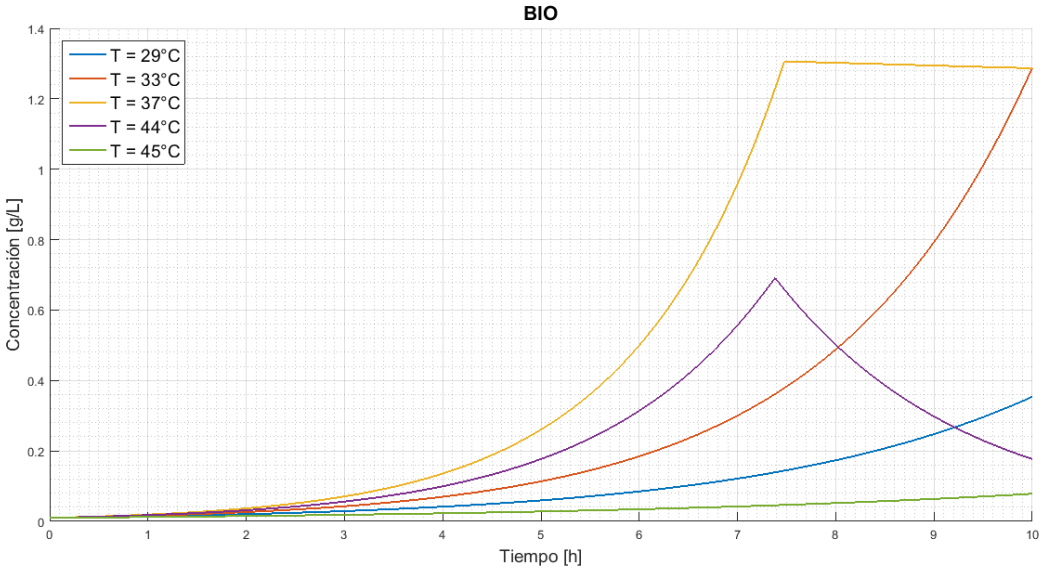

Figura 4-12: Simulación de la curva crecimiento del microorganismo a diferentes condiciones de temperatura ambiental.

En la **Figura 4-13** se muestran las simulaciones para las concentraciones intracelulares de los metabolitos de la glucólisis considerados en el modelo ante cinco condiciones constantes diferentes de temperatura ambiental.

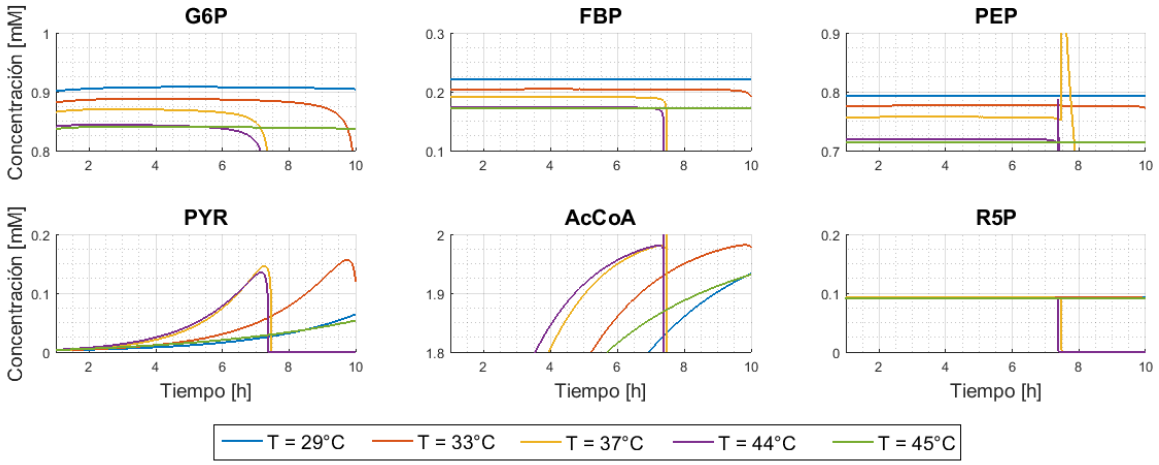

Figura 4-13: Simulación de los metabolitos de la glucólisis a diferentes condiciones de temperatura ambiental.

En la **Figura 4-13** se aprecia una disminución de las concentraciones intracelulares de G6U, FBP y PEP a medida que se incrementa la temperatura en el medio de cultivo. Por su parte, la R5P permanece constante, mientras PYR y AcCoA tienden a los mismos valores máximos, pero con un aumento en la velocidad de acumulación. Las simulaciones para G6U, FBP y PEP concuerdan de forma cualitativa con las mediciones reportadas por Jozefczuk et al. (2010). En contraste, las predicciones para R5P no concuerda con los datos de este mismo autor que indica que la concentración intracelular de este metabolito debería disminuir ante un aumento de temperatura. Este resultado se le atribuye a las consideraciones tomadas para la descripción de la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato en la **Sección 2.4**. En el caso de PYR y AcCoA no se disponen de mediciones directas ante variaciones de temperatura, no obstante, se ha reportado que a medida que se incrementa la temperatura se da un aumento de los aminoácidos para los cuales PYR y AcCoA precursores (Ye et al., 2012).

Con la finalidad de analizar la respuesta del modelo ante cambios dinámicos en la temperatura ambiental, en la **Figura 4-14** muestra la simulación para el crecimiento de *E. coli* ante un aumento progresivo de la temperatura ambiental de 37 a 53°C a una razón de 3.25°C por hora, con una concentración inicial de glucosa de 4g/L.

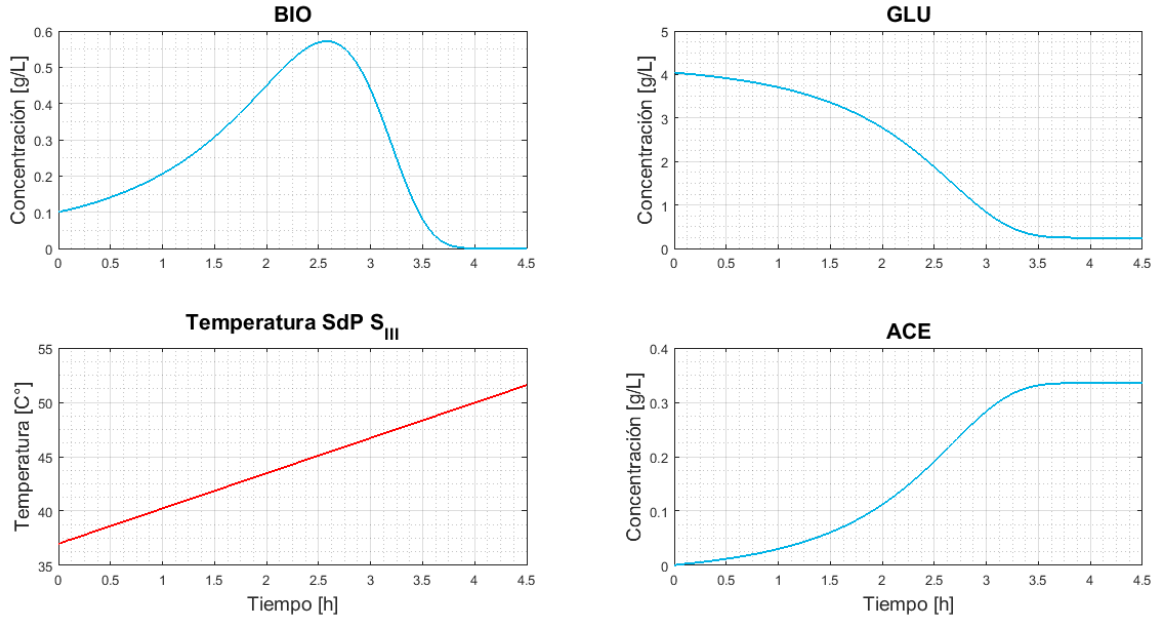

Figura 4-14: Simulación de las salidas del modelo ante un aumento progresivo de la temperatura ambiental.

En la **Figura 4-14** se observa como la curva de crecimiento se ve afectada ante un incremento progresivo de la temperatura. Particularmente, es interesante observar como al pasar del umbral de 45°C, justo a las 2.5 horas de la simulación, el microorganismo pasa de fase de crecimiento a fase de muerte celular. Así mismo, justo antes de las 4 horas, cuando la BIO llega a cero, se detiene por completo el consumo de GLU y la producción de ACE. Respecto a este aumento dinámico de la temperatura en el medio de cultivo, es necesario resaltar que el modelo solo es capaz de simular cambios de temperatura de manera pausada, es decir, el modelo no es capaz de simular, por ejemplo, un cambio en escalón. Esto ocurre porque ante un cambio ambiental brusco, se da un incremento muy rápido del flujo de calor en el balance de energía, al punto que la producción de calor por parte del microorganismo alcanza valores extremadamente altos y la simulación se detiene por dificultades numéricas asociadas con el paso del método de solución. Esto puede ser un indicio de que el coeficiente h_2 calculado en el **Anexo B** posee un valor muy alto.

En la **Figura 4-15** se muestran las simulaciones para las concentraciones intracelulares de los metabolitos de la glucólisis considerados en el modelo ante un aumento progresivo de la temperatura ambiental de 37 a 53°C a una razón de 3.25°C por hora. Nótese que la respuesta obtenida es similar a la obtenida con las simulaciones de la variación estática de temperatura de la **Figura 4-13**. A medida que se incrementa la temperatura ambiental se da una disminución de las concentraciones intracelulares de G6P, FBP y PEP, mientras la R5P permanece constante y el PYR y el AcCoA aumentan su razón de cambio.

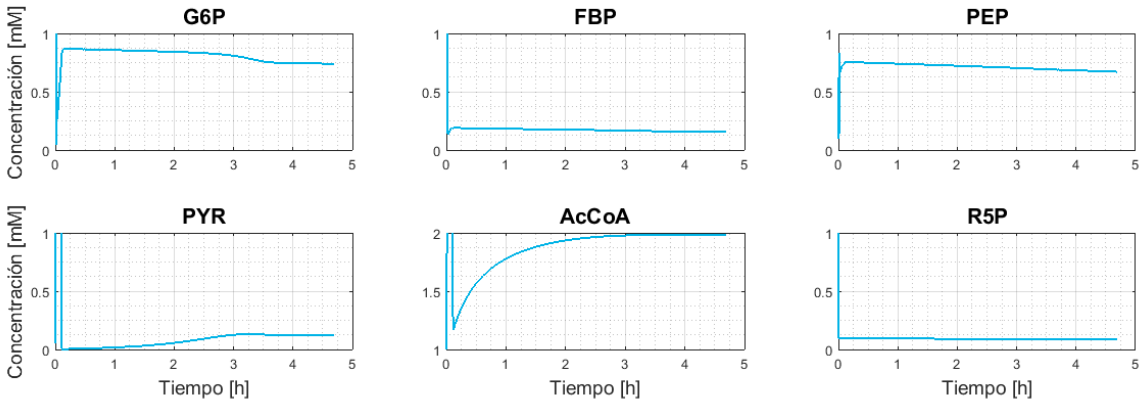

Figura 4-15: Simulación de los metabolitos de la glucólisis ante un aumento progresivo de la temperatura ambiental.

Nótese que hasta el momento no se ha discutido los efectos de la temperatura sobre las concentraciones intracelulares de coenzimas. Esa discusión se deja para la **Sección 4.4** donde se analiza la naturaleza autorregulatoria del fenómeno modelado.

4.3.6 Flujo de calor con el entorno

El modelo propuesto tiene la capacidad de predecir dos flujos de calor: el que se da entre el citoplasma y la membrana-pared ($\dot{Q}_1$) y el que se da entre la superficie de la membrana-pared y el medio de cultivo ($\dot{Q}_2$). De estos, sólo el segundo es un dato validable respecto a resultados experimentales, pues es el equivalente al calor total producido por el microorganismo, aunque con signo contrario debido a la convención asumida en el balance de energía (-$\dot{Q}_2$). En un cultivo por lotes la curva de producción de calor de un microorganismo tiene una forma particular que se asocia con la fase de crecimiento en la que se encuentra del microorganismo. La **Figura 4-16** exhibe cómo se asocia una curva de producción de calor de un microorganismo son su respectiva curva de crecimiento en un cultivo por lotes.

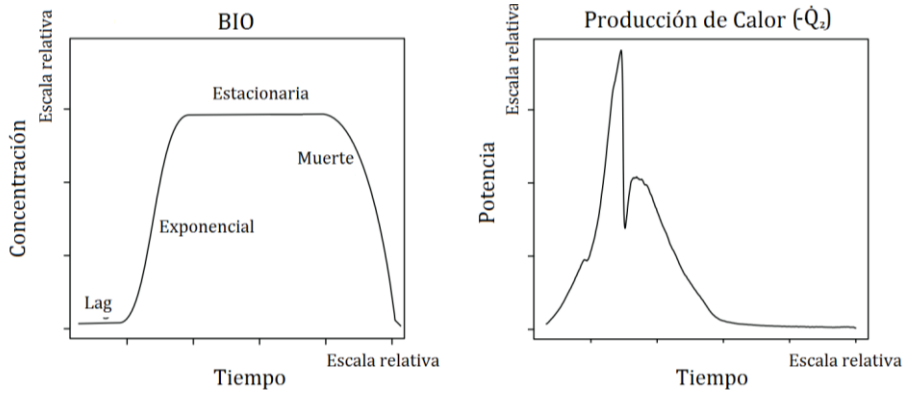

Figura 4-16: Curva característica de crecimiento y producción de calor para un microorganismo cultivado por lotes. Adaptado de Braissant et al. (2013).

A medida que crece la BIO se da un aumento rápido de la producción de calor, para luego tener una caída rápida al alcanzar la fase estacionaria. Es de resaltar que, si bien ambas variables están asociadas, el calor producido no depende exclusivamente del crecimiento, este también depende del estado metabólico del microorganismo. Por ejemplo, una disminución de la producción de calor no implica necesariamente que el microorganismo haya alcanzado la fase estacionaria. Esto puede significar también un cambio de fuente de carbono (Braissant et al., 2013), o un cambio de aceptor de electrones (U. von Stockar & Birou, 1989). Es decir, un

cambio en la producción de calor por parte del microrganismo puede tener múltiples causas, pero todas ellas manifiestas y comprendidas. La curva de producción de calor actúa como una huella característica de cada microorganismo, así como de su estado metabólico (Boling, Blanchard, & Russell, 1973; Chang-Li et al., 1988; Maskow et al., 2010; Maskow & Paufler, 2015). Esto es particularmente interesante para el campo del control de procesos biológicos, en el cual el monitoreo de las variables del proceso, implica en la mayoría de las ocasiones mediciones fuera de línea, mientras las medidas calorimétricas pueden realizarse en línea.

La **Figura 4-17** muestra una simulación realizada con el modelo propuesto para la concentración de BIO y producción de calor de *E. coli* cultivada por lotes con 4 g/L de GLU inicial. Como se puede apreciar la simulación sigue la misma tendencia de las curvas características mostradas en la **Figura 4-16**. Es decir, un incremento en la producción de calor conforme incrementa la concentración de BIO y una caída rápida de la producción calor al alcanzar la fase estacionaria. La capacidad del modelo para simular la producción de calor por parte del microorganismo es uno de los resultados más remarcables del presente trabajo ya que en la revisión bibliográfica realizada, a la fecha no se ha realizado ningún reporte con un modelo bioquímicamente estructurado capaz de describir esta variable para cultivos de *E. coli*.

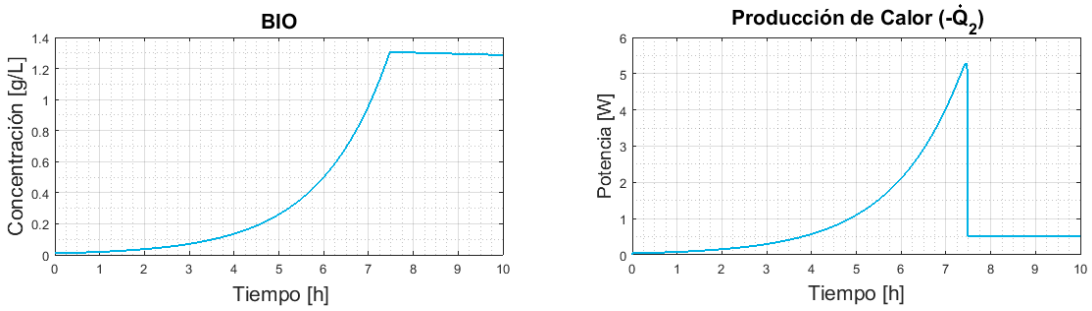

Figura 4-17: Simulación de la curvas de crecimiento y producción de calor para *E. coli*.

Para finalizar esta sección, en la **Figura 4-18** se muestra la simulación de diferentes curvas de producción de calor *en E. coli* para seis temperaturas ambientales constantes. En esta la producción de calor por parte del microorganismo sigue el mismo patrón reportado por (Chang-Li et al., 1988), donde, al aumentar la temperatura del medio de cultivo, aumenta la velocidad de producción de calor. Obviamente al alcanzar temperaturas donde comienza a ser significativa la velocidad de muerte celular dicha producción de calor se ve fuertemente disminuida.

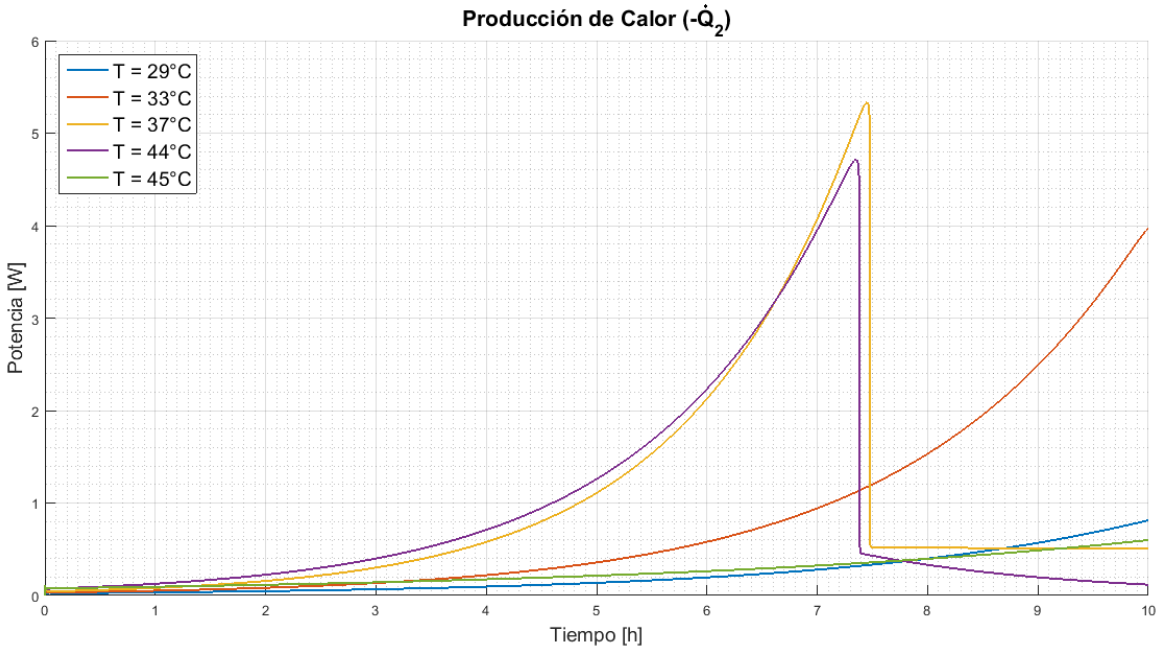

Figura 4-18: Simulación de curvas de producción de calor en *E. coli* para a diferentes temperaturas ambientales.

Es de notar que hasta este punto todas las comparaciones de las simulaciones del modelo se han realizado para las mismas condiciones iniciales de BIO, GLU y ACE. El verdadero reto para todo modelo determinista es lograr reproducir el comportamiento de un sistema en condiciones diferentes a las cuales se realizó el ajuste paramétrico. Con este proceso de comparación conocido como validación cruzada se finaliza esta sección, comparando las predicciones del modelo contra un conjunto de datos experimentales reportado por Marison y von Stockar (1986). En este experimento se analizaron las concentraciones de BIO, GLU y ACE, así como la producción de calor para *E. coli* cepa W cultivada por lotes, pH 7, 37°C, y 1.2 L de volumen de trabajo. Las concentraciones iniciales para el experimento son 0.08 g/L de BIO, 1.87 g/L de GLU y 0.02 g/L de ACE.

La **Figura 4-19** muestra los datos experimentales de Marison y von Stockar y las predicciones del modelo bajo las mismas condiciones. Como se puede apreciar, el modelo es capaz de reproducir la producción de calor por parte del microorganismo con precisión, siendo este el objetivo central de la presente tesis. Según la revisión bibliográfica realizada, a la fecha no se ha realizado ningún reporte con un modelo bioquímicamente estructurado capaz de describir esta variable en *E. coli*. Lo que hace a este modelo el primero en su tipo.

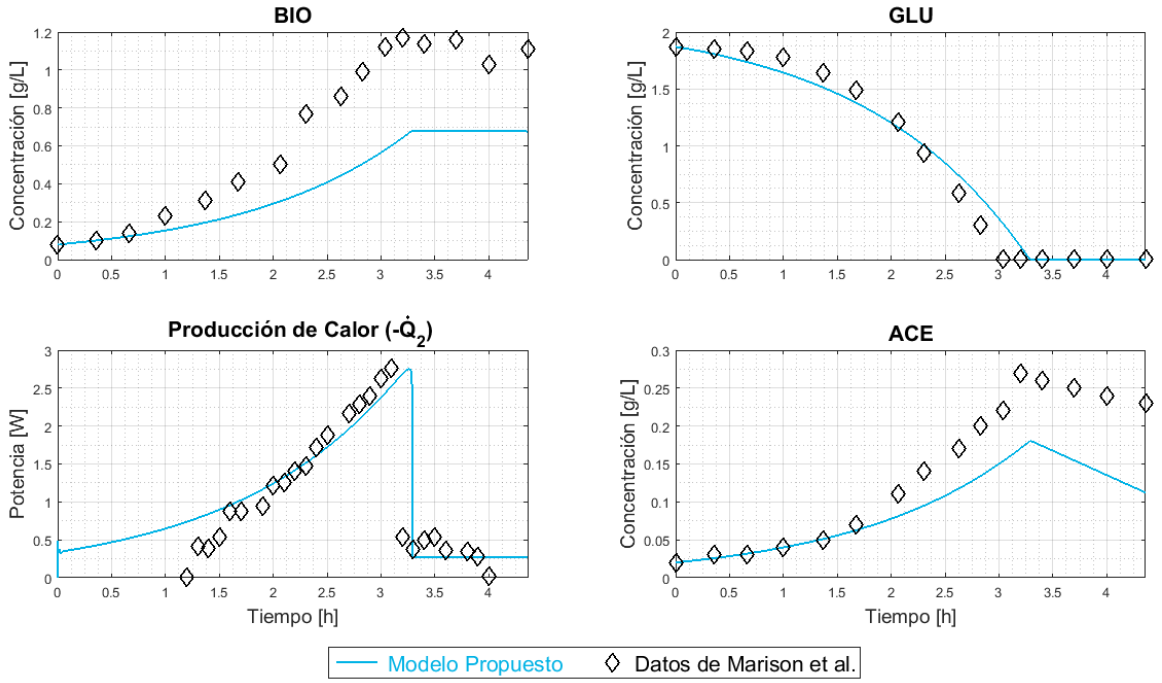

Figura 4-19: Comparación de las salidas del modelo y la producción de calor con los datos experimentales de Marison et al. (1986)

La **Figura 4-20** presenta el cálculo del error cuadrático medio de la simulación del modelo respecto a los datos experimentales de Marison y von Stockar (1986).

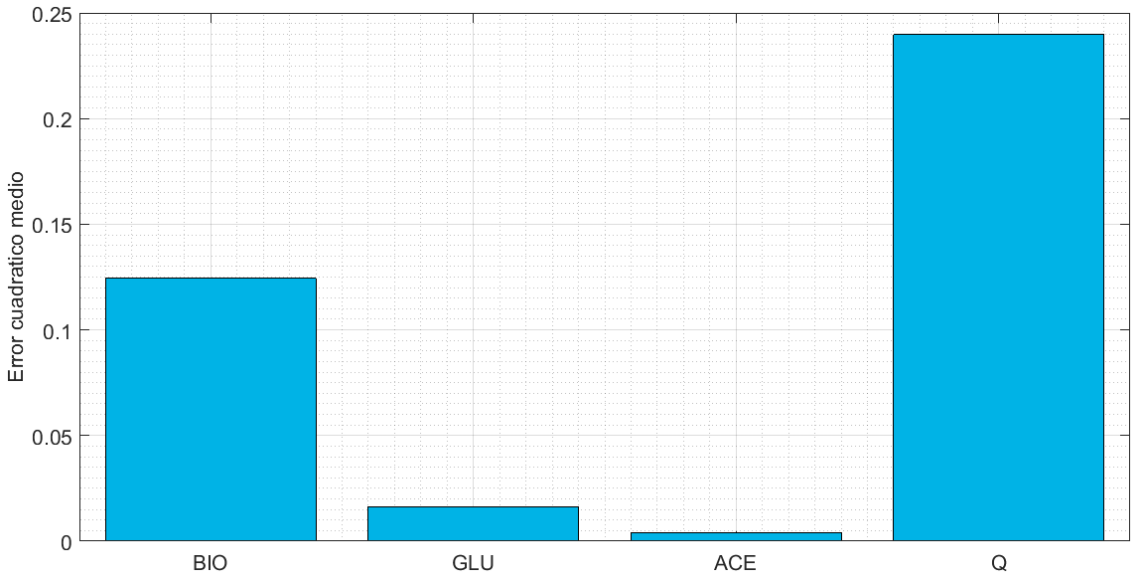

Figura 4-20: Error cuadrático medio del modelo respecto a datos de Marison et al. (1986)

El cálculo del ECM muestra que las predicciones del modelo para GLU y ACE son muy acertadas, mientras los datos de BIO y la producción de calor poseen pequeñas desviaciones. Al igual que con las simulaciones de la **Sección 4.3.1** el modelo propuesto da una subestimación de la concentración de BIO en la fase estacionaria y la producción de calor presenta las mayores desviaciones durante la segunda hora de cultivo. Sin embargo, para estas dos variables el ECM es inferior a 0.25, lo cual es un valor aceptable dado lo mostrado al comparar con el modelo de Kurata y Suguimoto en la **Sección 4.3.2**.

Es de resaltar que el experimento de Marison y von Stockar se emplea una cepa diferente de *E. coli* lo que acarrea de por si un error en la comparación, sin embargo, no se encontró en la revisión bibliográfica un mejor conjunto de datos experimentales. Hay disponibilidad de información experimental de producción de calor para la *E. coli* K12 pero en diferentes condiciones de cultivo, las cuales afectan la curva de producción de calor del microorganismo de manera más significativa que el tipo de cepa. Por ejemplo, hay reportes de curvas de producción de calor para *E. coli* en quimiostato (Leiseifer, 1989), con variación temporal en la concentración de oxígeno disuelto (Johansson & Wadsö, 1999), con fuente de nitrógeno como sustrato limitante (Birou, Marison, & Stockar, 1987) y para cultivos en medio complejo (Braissant, Bachmann, & Bonkat, 2015). El modelo propuesto no ve estas condiciones particulares y por lo tanto estos datos no se pueden comparar.

Con esta sección se completa el último paso de la metodología MSBF para el desarrollo del modelo matemático para el proceso de autorregulación térmica de *Escherichia coli*. A continuación, se realiza una discusión sobre la naturaleza autorregulatoria del modelo propuesto y en el siguiente capítulo se realizan las conclusiones del trabajo realizado y se proponen algunos posibles caminos para futuras investigaciones en el tema. Al final del documento se encuentran los respectivos anexos y la bibliografía utilizada.

4.4 Discusión sobre el proceso autorregulación térmica

Los sistemas biológicos poseen control local de sus procesos metabólicos, esta característica les garantiza su integridad y les da el rasgo de ser procesos autorregulados. Como se menciona en la S**ección 1.4.4**, dicho control local se traduce en *feedbacks* o realimentaciones en las rutas metabólicas. Estas pueden ser positivas o negativas, las realimentaciones positivas tienden a desestabilizar el sistema y las realimentaciones negativas tienden a estabilizarlo.

Una única reacción enzimática puede entenderse por sí sola como un lazo de control realimentado en el cual la velocidad de la reacción está controlada por la concentración de los reactivos. Como se observa en la **Figura 4-21**, la realimentación negativa se aprecia en la ecuación dinámica de la concentración intracelular, justo en el término donde la derivada temporal de la concentración de un compuesto A (dC_A/dt) depende negativamente de la concentración del compuesto mismo (C_A).

$$\frac{dC_A}{dt} = -kC_A$$

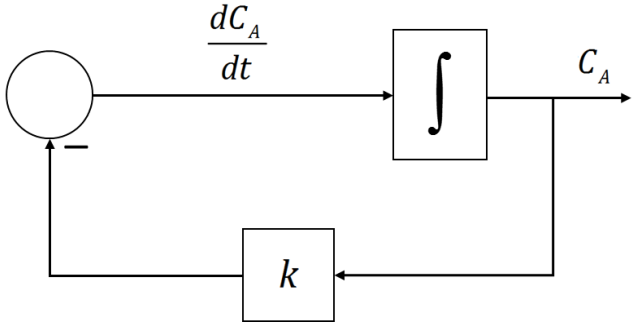

Figura 4-21: Lazo de control inherente a una reacción. Adaptado de (Cobelli & Carson, 2008)

Nótese que cuando la concentración del compuesto A disminuye (C_A), su velocidad de consumo (dC_A/dt) también decrece. De igual forma cuando C_A aumenta su dC_A/dt se incremente, adjudicando estabilidad al sistema. Por su parte, el parámetro cinético k, hace las veces de parámetros de sintonía del lazo de control. Esta forma de control proporcional realimentado no es más que la ley de acción de masas y se aplica en principio para cualquier reacción química (Voit, Martens, & Omholt, 2015). Esta es la forma más básica para describir la autorregulación metabólica y se espera que todo modelo de bioprocesos estable tenga ecuaciones de esta forma. Como se puede apreciar en el **Capítulo 3**, las ecuaciones cinéticas del modelo propuesto confieren a la estructura matemática de estas realimentaciones.

En un sistema autorregulado como el descrito en la **Figura 4-21**, la temperatura aparece como una perturbación que afecta el valor del parámetro cinético. Como se mostró en la **Sección 3.4**, los parámetros cinéticos de las 12 reacciones consideradas en el modelo son dependientes de la temperatura.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En el presente trabajo se logró implementar con éxito la Metodología de Modelado Semifísico de Base Fenomenológica (MSBF) para desarrollar un modelo metabólico de *Escheria coli* que incluye los fenómenos de transferencia de calor con el medio. El modelo se encuentra ajustado a datos experimentales de cultivo en tanque agitado operado por lotes y es capaz de describir el crecimiento del microorganismo para diferentes temperaturas ambientales. De acuerdo a la revisión bibliográfica, el modelo presentado es el primero en su tipo, pues incluye balances de energía térmica que permiten cuantificar el flujo de calor que se da entre el microorganismo y el entorno.

Además de lo anterior, se obtuvieron los siguientes resultados en pro del desarrollo del modelo:

- A partir de restricciones termodinámicas se generó una ecuación estequiométrica para la síntesis de biomasa partiendo de los metabolitos intracelulares. La expresión obtenida es congruente con la descripción cualitativa del proceso.
- Basados en las analogías propuestas se lograron calcular los coeficientes de trasferencia de calor a nivel celular para cultivos en tanque agitado. Los coeficientes obtenidos poseen valores razonables y la capacidad del modelo para cuantificar el calor que genera el microorganismo así lo avala.
- Para las cinéticas enzimáticas de los procesos metabólicos globales se emplearon ecuaciones simplificadas, las cuales reducen significativamente la cantidad de parámetros cinéticos del modelo. Estas ecuaciones no están respaldadas por deducciones teóricas, pero demuestran ser efectivas para describir las concentraciones de metabolitos intracelulares del microorganismo.

- Se logró el ajuste paramétrico del modelo a partir de una secuencia de pasos propuesta, no obstante, en este tópico aún se depende en gran medida de la generación de conocimiento procedimental a partir de ensayos del tipo prueba y error. No hay metodologías fuertemente establecidas, y las pocas que se tienen dependen en gran medida de la capacidad de cómputo.

5.2 Recomendaciones para futuras investigaciones

Se señalan tres posibles caminos para dar continuidad a los resultados obtenidos en el presente trabajo:

- En un trabajo previo del grupo de investigación se logró desarrollador un modelo metabólico para *E. coli* que incluye los fenómenos de trasferencia de masa entre el microorganismo y su entorno (Ortega et al., 2018). Por lo tanto, el paso próximo en la línea de investigación es el desarrollo de un modelo que incluya tanto los fenómenos de trasferencia de calor como los de masa. La propuesta no es simple de abordar, ya que se ha demostrado una relación directa entre la temperatura y la composición y estabilidad de la membrana celular en *E. coli* (Marr et al., 1964; Mejía, Gómez-Eichelmann, & Fernández, 1995; Yuk & Marshall, 2003). Esto podría traer consigo una modificación significativa de los coeficientes de trasferencia de masa del microorganismo con su entorno en función de la temperatura (procesos acoplados).
- El modelo propuesto ha demostrado tener la capacidad de realizar predicciones de los fenómenos térmicos que se dan entre el microorganismo y su entorno, para cultivos en medio líquido. Por esto resultaría interesante implementar el modelo para el diseño de sistemas de control de temperatura en biorreactores de tanque agitado. Un trabajo de este tipo debe retomar el modelo desde la ecuación del balance de energía térmica para el SdeP S_{III} (**Sección 3.1.5**) y realizar las modificaciones pertinentes sobre está, definiendo la acción del actuador y las posibles perturbaciones sobre el sistema.
- Es posible emplear el modelo desarrollado como base para crear un modelo para la producción de proteínas recombinantes mediante choque térmico. Para esto se debe adicionar la proteína de interés como un segundo producto del proceso y generar una ecuación estequiométrica para la producción de esta a partir de metabolitos intracelulares. Además, se debe extender la reacción para consumo de energía de mantenimiento (r_{11}), para incluir el ATP destinado a biosíntesis de dichas proteínas.

A. Anexo: Especificación de valores constantes del modelo

Tabla A-1: Coeficientes estequiométricos [mmol]. Calculado según Sección 2.4, basados en (Clore & Venditti, 2013) y (Mathews et al., 2013).

Coef.	Valor	Coef.	Valor	Coef.	Valor	Coef.	Valor
$\sigma_{GLU,1}$	1	$\sigma_{CoA,5}$	1	$\sigma_{PEP,8}$	2	$\sigma_{PEP,12}$	0.0002
$\sigma_{PEP,1}$	1	$\sigma_{NAD,5}$	1	$\sigma_{R5P,8}$	1	$\sigma_{PYR,12}$	0.0008
$\sigma_{G6P,1}$	1	$\sigma_{AcCoA,5}$	1	$\sigma_{AcCoA,9}$	1	$\sigma_{AcCoA,12}$	0.482
$\sigma_{PYR,1}$	1	$\sigma_{NADH,5}$	1	$\sigma_{ADP,9}$	1	$\sigma_{NH_3,12}$	0.24
$\sigma_{G6P,2}$	1	$\sigma_{CO_2,5}$	1	$\sigma_{Pi,9}$	1	$\sigma_{NADPH,12}$	0.425
$\sigma_{ATP,2}$	1	$\sigma_{AcCoA,6}$	1	$\sigma_{ACE,9}$	1	$\sigma_{ATP,12}$	0.5
$\sigma_{FBP,2}$	1	$\sigma_{ADP,6}$	1	$\sigma_{ATP,9}$	1	$\sigma_{H_2O,12}$	0.075
$\sigma_{ADP,2}$	1	$\sigma_{Pi,6}$	1	$\sigma_{CoA,9}$	1	$\sigma_{O_2,12}$	0.2125
$\sigma_{FBP,3}$	1	$\sigma_{NAD,6}$	3.6	$\sigma_{NADH,10}$	1	$\sigma_{BIO,12}$	1
$\sigma_{ADP,3}$	2	$\sigma_{H_2O,6}$	2	$\sigma_{ADP,10}$	2.5	$\sigma_{CoA,12}$	0.482
$\sigma_{Pi,3}$	2	$\sigma_{CoA,6}$	1	$\sigma_{Pi,10}$	2.5	$\sigma_{Pi,12}$	0.51
$\sigma_{NAD,3}$	2	$\sigma_{ATP,6}$	1	$\sigma_{O_2,10}$	0.5	$\sigma_{NADP,12}$	0.425
$\sigma_{PEP,3}$	2	$\sigma_{NADH,6}$	3.6	$\sigma_{NAD,10}$	1	$\sigma_{ADP,12}$	0.5
$\sigma_{ATP,3}$	2	$\sigma_{CO_2,6}$	2	$\sigma_{ATP,10}$	2.5	$\sigma_{CO_2,12}$	0.018
$\sigma_{NADH,3}$	2	$\sigma_{G6P,7}$	1	$\sigma_{H_2O,10}$	3.5		
$\sigma_{H_2O,3}$	2	$\sigma_{NADP,7}$	2	$\sigma_{ATP,11}$	1		
$\sigma_{PEP,4}$	1	$\sigma_{H_2O,7}$	1	$\sigma_{H_2O,11}$	1		
$\sigma_{ADP,4}$	1	$\sigma_{R5P,7}$	1	$\sigma_{ADP,11}$	1		
$\sigma_{PYR,4}$	1	$\sigma_{NADPH,7}$	2	$\sigma_{Pi,11}$	1		
$\sigma_{ATP,4}$	1	$\sigma_{CO_2,7}$	1	$\sigma_{G6P,12}$	0.002		
$\sigma_{PYR,5}$	1	$\sigma_{R5P,8}$	3	$\sigma_{R5P,12}$	0.078		

Tabla A-2: Constantes termodinámicas.

Constante	Valor	Unidades	Referencia
R	0.008314	$J/(mmol \cdot K)$	(Levine, 2002)
$\bar{C}_{pGLU}$	0.21919	$J/(mmol \cdot K)$	(Boerio-Goates, 1991)
$\bar{C}_{pNH_3}$	0.08008	$J/(mmol \cdot K)$	(Chemical Engineering Research Information Center, 2018)
$\bar{C}_{pPi}$	0.1098	$J/(mmol \cdot K)$	(Chase Jr, 1998)
$\bar{C}_{pACE}$	0.13109	$J/(mmol \cdot K)$	(Green & Perry, 1973)
$\bar{C}_{pO_2}$	0.0293	$J/(mmol \cdot K)$	(David & Himmelblau, 1985)
$\bar{C}_{pCO_2}$	0.03647	$J/(mmol \cdot K)$	(David & Himmelblau, 1985)
$\bar{C}_{pH_2O}$	0.0754	$J/(mmol \cdot K)$	(Felder & Rousseau, 1986)
C_p^I	4.17x10^{-3}	$J/(mg \cdot K)$	(Felder & Rousseau, 1986)
C_p^{II}	2.27x10^{-3}	$J/(mg \cdot K)$	(Blume, 1983)
C_p^{III}	4.17x10^{-3}	$J/(mg \cdot K)$	(Felder & Rousseau, 1986)
k^I	6.15x10^{-3}	$J/(s \cdot cm \cdot K)$	(Touloukian, 1970)
k^{II}	2.5x10^{-3}	$J/(s \cdot cm \cdot K)$	(Nakano, Kikugawa, & Ohara, 2010)
k^{III}	6.15 x10^{-3}	$J/(s \cdot cm \cdot K)$	(Touloukian, 1970)
h_1	18.61	$J/(s \cdot cm^2 \cdot K)$	Deducción según **Anexo B**
h_1	55.39	$J/(s \cdot cm^2 \cdot K)$	Deducción según **Anexo B**

Tabla A-3: Entalpías y energías libres de Gibbs de reacción [J/mmol]. Calculados a partir de (Alberty, 2003, 2006) y (Flamholz, Noor, Bar-Even, & Milo, 2012).

Reacción	Entalpía ($\Delta\bar{H}^0$)	Energía libre ($\Delta G'^m$)	Reacción	Entalpía ($\Delta\bar{H}^0$)	Energía libre ($\Delta G'^m$)
r_1	9.08	-44.9	r_7	76.58	-29.3
r_2	-72.16	-12.4	r_8	-51.17	1731
r_3	87.69	21.3	r_9	-6.01	-3.7
r_4	31.63	-27.6	r_{10}	-190.96	-112.7
r_5	1.18	-35.2	r_{11}	-23.33	-43.5
r_6	141.24	9.1	r_{12}	-146.81	-65.8

Tabla A-4: Constantes morfológicas por célula. Calculado a partir de (Milo, Jorgensen, Moran, Weber, & Springer, 2009), (Neidhardt, 1996) y (Wang, Zhou, Ji, & Zhao, 2013).

Constante	Valor	Unidades
$\overline{A}^{I}_{s,cel}$	1.79x10^{-7}	cm^2
$\overline{A}^{II}_{s,cel}$	1.81x10^{-7}	cm^2
$\overline{M}^{I}_{cel}$	9.08x10^{-10}	mg
$\overline{M}^{II}_{cel}$	0.42x10^{-10}	mg
$\overline{M}^{T}_{cel}$	9.50x10^{-10}	mg
$\overline{V}^{T}_{cel}$	6.17x10^{-12}	cm^3

Tabla A-5: Concentraciones intracelulares asumidas como constantes [mmol/molBIO].

Metabolito	Valor	Referencia
X_{O_2}	0.17	20% de saturación en Agua (25°C, 1 Atm.)
X_{NH_3}	0.953	Calculado en exceso respecto a GLU
X_{Pi}	1.624	(Wanner, 1996)

Tabla A-6: Conjunto de parámetros identificados - **versión preliminar** del modelo.

Parámetro	Valor	Unidades
Ea_1	60	*J / mmol*
Ea_2	60	*J / mmol*
Ea_3	60	*J / mmol*
Ea_4	60	*J / mmol*
Ea_5	60	*J / mmol*
Ea_6	60	*J / mmol*
Ea_7	60	*J / mmol*
Ea_8	60	*J / mmol*
Ea_9	60	*J / mmol*
Ea_{10}	60	*J / mmol*
Ea_{12}	60	*J / mmol*
Ea_d	0	*J / mmol*

Continuación Tabla A-6: Conjunto de parámetros identificados - **versión preliminar**.

A_1	1.2x10^{11}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_2	1.7x10^{12}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_3	7.3x10^{12}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_4	5.7x10^{11}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_5	1.5x10^{9}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_6	1.0x10^{8}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_7	9.9x10^{13}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_8	1.4x10^{8}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_9	2.0x10^{12}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_{10}	2.9x10^{13}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_{12}	4.7x10^{13}	$1/mol_{BIO}\cdot s$
A_d	0	$1/mol_{BIO}\cdot s$
k_{a1}	1.0x10^{1}	$(mol_{GLU}\cdot mmol_{PEP})/mmol_{PYR}$
k_{a2}	1.0x10^{-1}	$\frac{mmol_{G6U}\cdot mmol_{ATP}\cdot mmol_{ADP}}{mol_{BIO}^2\cdot mmol_{PEP}}$
k_{a3}	1.0x10^{-1}	$(mmol_{FBP}\cdot mmol_{ADP}\cdot mmol_{Pi}\cdot mmol_{NAD})/mol_{BIO}^4$
k_{a4}	1.0x10^{-1}	$\frac{mmol_{PEP}\cdot mmol_{ADP}\cdot mmol_{Pi}\cdot mmol_{FBP}}{mol_{BIO}^3\cdot mmol_{ATP}}$
k_{a5}	1.0x10^{-1}	$\frac{mmol_{PYR}\cdot mmol_{NAD}\cdot mmol_{CoA}}{mol_{BIO}^3\cdot mmol_{NADH}\cdot mmol_{AcCoA}}$
k_{a6}	1.0x10^{-1}	$\frac{mmol_{AcCoA}\cdot mmol_{ADP}\cdot mmol_{Pi}\cdot mmol_{NAD}}{mol_{BIO}^3\cdot mmol_{NADH}\cdot mmol_{ATP}}$
k_{a7}	1.0x10^{-1}	$(mmol_{G6P}\cdot mmol_{NADP})/(mol_{BIO}\cdot mmol_{NADPH})$
k_{a8}	1.0x10^{-1}	$mmol_{R5P}/mol_{BIO}$
k_{a9}	1.0x10^{-2}	$(mmol_{AcCoA}\cdot mmol_{ADP}\cdot mmol_{Pi})/mol_{BIO}^3$
k_{a10}	1.0x10^{-4}	$(mmol_{NADH}\cdot mmol_{ADP}\cdot mmol_{Pi}\cdot mmol_{O_2})/mol_{BIO}^4$
k_{a12}	1.0x10^{-10}	$\frac{\left(\begin{matrix}mmol_{G6P}\cdot mmol_{R5P}\cdot mmol_{PEP}\cdot mmol_{PYR}\cdot \\ mmol_{AcCoA}\cdot mmol_{NH_3}\cdot mmol_{ATP}\cdot mmol_{NADPH}\end{matrix}\right)}{mol_{BIO}^7\cdot mmol_{ACE}}$
k_{r3}	1.0x10^{-1}	Adimensional
k_{r9}	0	Adimensional
k_{ATP}	0	$1/mmol_{ATP}$

Tabla A-7: Conjunto de parámetros identificados - **versión final** del modelo.

Parámetro	Valor	Unidades
Ea_1	60	$J / mmol$
Ea_2	60	$J / mmol$
Ea_3	60	$J / mmol$
Ea_4	60	$J / mmol$
Ea_5	60	$J / mmol$
Ea_6	60	$J / mmol$
Ea_7	60	$J / mmol$
Ea_8	60	$J / mmol$
Ea_9	60	$J / mmol$
Ea_{10}	60	$J / mmol$
Ea_{12}	60	$J / mmol$
Ea_d	521.65	$J / mmol$
A_1	$1.0x10^9$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_2	$8.0x10^8$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_3	$5.0x10^9$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_4	$9.0x10^9$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_5	$4.0x10^9$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_6	$1.4x10^8$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_7	$5.0x10^8$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_8	$8.0x10^8$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_9	$4.0x10^8$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_{10}	$4.0x10^9$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_{12}	$5.0x10^9$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
A_d	$1.2x10^{82}$	$1 / mol_{BIO} \cdot s$
k_{a1}	$1.0x10^{-1}$	$(mol_{GLU} \cdot mmol_{PEP}) / mmol_{PYR}$
k_{a2}	$1.0x10^{-1}$	$\frac{mmol_{G6U} \cdot mmol_{ATP} \cdot mmol_{ADP}}{mol_{BIO}^2 \cdot mmol_{PEP}}$
k_{a3}	$1.0x10^{-1}$	$\frac{mmol_{FBP} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi} \cdot mmol_{NAD}}{mol_{BIO}^4}$

Continuación Tabla A-7: Conjunto de parámetros identificados - **versión final** del modelo.

k_{a4}	1.0x10^{-1}	$\frac{mmol_{PEP} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi} \cdot mmol_{FBP}}{mol_{BIO}^3 \cdot mmol_{ATP}}$
k_{a5}	1.0x10^{-1}	$\frac{mmol_{PYR} \cdot mmol_{NAD} \cdot mmol_{CoA}}{mol_{BIO}^3 \cdot mmol_{NADH} \cdot mmol_{AcCoA}}$
k_{a6}	1.0x10^{-1}	$\frac{mmol_{AcCoA} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi} \cdot mmol_{NAD}}{mol_{BIO}^3 \cdot mmol_{NADH} \cdot mmol_{ATP}}$
k_{a7}	1.0x10^{-1}	$(mmol_{G6P} \cdot mmol_{NADP}) / (mol_{BIO} \cdot mmol_{NADPH})$
k_{a8}	1.0x10^{-1}	$mmol_{R5P} / mol_{BIO}$
k_{a9}	1.0x10^{-1}	$(mmol_{AcCoA} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi}) / mol_{BIO}^3$
k_{a10}	1.0x10^{-4}	$\frac{mmol_{NADH} \cdot mmol_{ADP} \cdot mmol_{Pi} \cdot mmol_{O_2}}{mol_{BIO}^4}$
k_{a12}	1.0x10^{-10}	$\frac{\left(\begin{array}{l} mmol_{G6P} \cdot mmol_{R5P} \cdot mmol_{PEP} \cdot mmol_{PYR} \cdot \\ mmol_{AcCoA} \cdot mmol_{NH_3} \cdot mmol_{ATP} \cdot mmol_{NADPH} \end{array}\right)}{mol_{BIO}^7 \cdot mmol_{ACE}}$
k_{r3}	1.0x10^{-3}	Adimensional
k_{r9}	1.0x10^{1}	Adimensional
k_{ATP}	1.0x10^{1}	$1 / mmol_{ATP}$

Tabla A-8: Condiciones iniciales para los estados del modelo computacional.

Estado	Valor	Unidades*	Referencia
$x(1)_i$	1.4291	$mmol_{G6P} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(2)_i$	2.4360	$mmol_{FBP} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(3)_i$	0.0292	$mmol_{PEP} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(4)_i$	0.0146	$mmol_{PYR} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(5)_i$	0.0991	$mmol_{AcCoA} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(6)_i$	0.2111	$mmol_{R5P} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(7)_i$	1.5590	$mmol_{ATP} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(8)_i$	0.0909	$mmol_{ADP} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(9)_i$	0.2274	$mmol_{CoA} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(10)_i$	0.4222	$mmol_{NAD} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(11)_i$	0.0135	$mmol_{NADH} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)
$x(12)_i$	0.0003	$mmol_{NADP} / mol_{BIO}$	(Bennett et al., 2009)

Continuación Tabla A-8: Condiciones iniciales para los estados del modelo computacional.

$x(13)_i$	0.0195	$mmol_{MADPH}$ / mol_{BIO}	(Bennett et al., 2009)
$x(14)_i$ **	0.48	$mmol_{BIO}$	(Toya et al., 2010)
$x(15)_i$ **	26.94	$mmol_{GLU}$	(Toya et al., 2010)
$x(16)_i$	0.01	$mmol_{ACE}$	Supuesto – cercano a cero
$x(17)_i$	$=d$	K	Supuesto – igual a la temperatura en el biorreactor
$x(18)_i$	$=d$	K	Supuesto – igual a la temperatura en el biorreactor

*La conversión de concentración mM a mmol/molBIO se da con el cálculo del volumen celular según las dimensiones dadas en la **Sección 2.1.1**

** Estas dos condiciones iniciales hacen las veces de entradas del modelo y pueden ser modificadas dependiente del experimento que se quiere simular ($x(14)=u_1$; $x(15)=u_2$).

B. Anexo: Cálculo de los coeficientes de transferencia de calor

El modelo matemático para el proceso de autorregulación térmica de *E. coli* requiere del cálculo de diferentes parámetros, siendo los coeficientes de trasferencia de calor por convección (*h*) dos de los más importantes. La convección es el modo de transferencia de energía entre una superficie sólida y un líquido en movimiento, y *h* es el principal parámetro que describe dicho fenómeno. Como se muestra en la **Figura 2-7**, en el presente trabajo se considera que la transferencia de calor por convección se lleva a cabo en dos superficies: entre la superficie interna de la membrana celular y el citoplasma (**Ecuación 41**), y entre la superficie externa de la pared celular y el medio de cultivo (**Ecuación 42**). Cada uno de estos posee su respectivo *h* asociado.

Dentro de la metodología MSBF, el cálculo de los coeficientes de trasferencia de calor por convección se ubica entre los pasos seis y siete. Sin embargo, mientras que el entendimiento de los fenómenos de transferencia de calor existe, los modelos matemáticos para calcular *h* bajo las condiciones del presente trabajo son incompletos. Dada la importancia de este parámetro para los objetivos del modelo, no se considera adecuado calcularlo por identificación paramétrica. Por esta razón en este anexo se discute la deducción de *h*.

Los coeficientes de trasferencia de calor dependen de diferentes factores, entre ellos, el tamaño, forma y densidad del sólido, la velocidad, viscosidad y densidad del fluido, y las propiedades térmicas tanto del fluido como del sólido. De manera general, un coeficiente de transferencia de calor se calcula a partir de la siguiente expresión (Cengel & Ghajar, 2011):

$$h = \frac{Nu \cdot k}{L_c}$$

donde, *Nu* es el número adimensional de Nusselt, *k* es la conductividad térmica del fluido y *Lc* es la longitud característica de la geometría implicada. Para el presente trabajo se considera que tanto la conductividad térmica del citoplasma como del medio de cultivo son valores constantes. En el caso de la longitud característica, existen diferentes formas para calcular, aquí se opta por utilizar la longitud más larga del SdP. Por su parte, para el número de Nusselt, es necesario usar una correlación empírica. Dichas correlaciones tienen la siguiente forma general (Barigou et al., 1998):

$$Nu = \alpha + \beta \cdot Re^{a} \cdot Pr^{b} \cdot \left(\frac{\mu_{\infty}}{\mu} \right)^{c} \quad [=] \text{ Adimensional}$$

donde, *Re* es el número adimensional de Reynolds y *Pr* es el número de Prandtl. *α, β*, *a*, *b* y *c* son coeficientes que se ajustan a datos empíricos y el último término representa la razón entre la viscosidad a la temperatura en el seno del fluido y la viscosidad del fluido a la temperatura de la superficie de transferencia. En este punto resulta de vital importancia valerse de las dos analogías propuestas en la **Sección 2.2.2**, para un adecuado cálculo del número de Nusselt. A continuación, se explica el cálculo para cada uno de los coeficientes de trasferencia de calor para el modelo:

Coeficiente de transferencia de calor entre el citoplasma y la membrana-pared (h_1)

Se toma de analogía al citoplasma como un reactor de tanque agitado en el cual se desarrollan las reacciones metabólicas (**Figura 2-9**). De este modo el coeficiente de transferencia de calor entre el citoplasma y la membrana pared se calcula como el coeficiente de transferencia de calor para un tanque agitado (Bondy & Lippa, 1983):

$$h_1 = \frac{Nu_1 \cdot k^{l}}{L_{c1}} \quad [=] \quad \frac{J}{s \cdot cm^{2} \cdot K}$$

Para es este cálculo se emplea como longitud característica a la diferencia entre la mayor longitud de una célula promedio de *E. coli* y el espesor de membrana-pared (**Sección 2.1.1**). Por su parte para el fluido, se asumen las propiedades térmicas y reológicas que el agua a 37°C. Al considerar el citoplasma como un medio perfectamente agitado y en la cual la trasferencia es la mejor posible, el número de Nusselt se determina mediante la correlación para tanques agitados con camisa en régimen turbulento propuesta por (Chilton, Drew, & Jebens, 1944):

$$Nu_1 = 0.36 \cdot Re_1^{2/3} \cdot Pr_1^{1/3} \quad [=] \text{ Adimensional}$$

En esta se desprecian los efectos térmicos sobre la viscosidad debido a la temperatura dada la poca diferencia de temperatura que se espera entre el citoplasma y la membrana-pared. El número Reynolds para el citoplasma (Re_1) se considera, por la escala microscópica, en régimen laminar y al número de Prandtl se calcula según la siguiente expresión:

$$Pr_1 = \frac{\mu^I \cdot C_p^I}{k^I} \quad [=] \text{ Adimensional}$$

Bajo las consideraciones mencionadas se tienen los siguientes valores para el cálculo del coeficiente de transferencia de calor entre el citoplasma y la membrana-pared:

$$L_{c1} = 1.99x10^{-4} \quad [=] \ cm$$
$$k^I = 6.15x10^{-3} \quad [=] \ J/(s \cdot cm \cdot K)$$
$$\mu^I = 6.92 \quad [=] \ mg/(cm \cdot s)$$
$$C_p^I = 4.17x10^{-3} \quad [=] \ J/(mg \cdot K)$$
$$Re_1 = 1 \quad [=] \text{ Adimensional}$$

Luego, el valor de coeficiente de transferencia de calor h_1 se determina como:

$$\boxed{h_1 = \ 18.61 \ [=] \ \frac{J}{s \cdot cm^2 \cdot K}}$$

Coeficiente de transferencia de calor entre la membrana-pared y el medio externo (h_2)

Bajo la analogía del *eddie* de Kolmogorov con flujo laminar por el cual se trasportan las célula de *E. coli* como cuerpos inmersos (**Figura 2-8**), es posible calcular el coeficiente de trasferencia de calor entre la célula y el medio de cultivo (h_2), como el coeficiente de transferencia de calor entre una partícula y el fluido que arrastra (Barigou et al., 1998):

$$h_2 = \frac{Nu_2 \cdot k^{III}}{L_{c2}} \quad [=] \ \frac{J}{s \cdot cm^2 \cdot K}$$

Para es este cálculo se emplea como longitud característica longitud mayor de una célula promedio de *E. coli* y para el medio de cultivo se asumen las propiedades térmicas y reológicas que el agua a 37°C. Al considerar la células como partículas en arrastre en una tubería, el número de Nusselt se determina mediante la correlación propuesta por Richter & Nikrityuk (2013). Esta correlación originada a partir de simulaciones por ordenador, está diseñada para partículas elípticas a una escala cercana a la de los microorganismos:

$$Nu = 1.59 + (0.640 \cdot Pr_2^{1/3} \cdot Re_2^{1/2}) - (0{,}039 \cdot Pr_2^{1/3} \cdot Re_2^{3/2}) \text{ [=] Adimensional}$$

En esta nuevamente se desprecian los efectos térmicos sobre la viscosidad debido a la temperatura, dado que se espera una poca diferencia de temperatura entre la membrana-pared y el medio de cultivo. Finalmente, el número Reynolds es el calculado para la bacteria en el microtorbellino y el número de Prandtl es determinado en función de las propiedades del medio de cultivo:

$$Re_2 = \frac{\rho^{III} \cdot v_{sl} \cdot L_{c2}}{\mu^{III}} \text{ [=] Adimensional}$$

$$Pr_2 = \frac{\mu^{III} \cdot C_p^{III}}{k^{III}} \text{ [=] Adimensional}$$

A diferencia del cálculo de h_1, no es posible asumir un número de Reynolds (Re_2) pues este depende de la velocidad de agitación del biorreactor. Siguiendo con la analogía propuesta, la velocidad de deslizamiento (v_{sl}) es la velocidad relativa entre *E. coli* y el medio circundante. Esta depende de la velocidad del *eddie* de Kolmogorov (v_K) y la velocidad y dirección de nado de la bacteria (v_{cel}). Según (Richter & Nikrityuk, 2013) el efecto del ángulo de aproximación es despreciable a bajos números de Reynolds, como los que caracterizan la escala de Kolmogorov. Dada la tendencia del microorganismo a buscar un medio con mayor contenido de nutrientes, se analiza el caso particular de velocidad de deslizamiento cuando el microorganismo se mueve en contra-corriente:

$$v_{sl} = v_K + v_{cel} \text{ [=] } \frac{cm}{s}$$

Resultados experimentales han mostrado que *E. coli* utiliza flagelos orientados axialmente para impulsarse a través de líquidos a bajo número de Reynolds a una velocidad promedio de 25 μm/s (0.0025 cm/s) (H. C. Berg, 1993, 2008; Swiecicki, Sliusarenko, & Weibel, 2013).

La velocidad de *eddie* se calcula mediante la siguiente ecuación donde, ε es la energía de disipación turbulenta y el número 100 es el factor de conversión para expresar el resultado en cm por segundo y que las unidades coincidan con las utilizadas a lo largo de todo el documento. Nótese que las unidades de ε están en sistema internacional para no alterar la forma generalizada de uso de las siguientes ecuaciones (Thomas, 1990):

$$v_K = \left(\frac{\mu^{III} \cdot \varepsilon}{\rho^{III}} \right)^{\frac{1}{4}} \cdot 100 \text{ [=] } \frac{cm}{s}$$

La energía de disipación turbulenta depende de las características del biorreactor, así como de las condiciones de agitación y el volumen de trabajo empleado durante el cultivo. ε puede ser calculado para el biorreactor como un promedio ($\bar{\varepsilon}$) para un tanque agitado con la siguiente ecuación, en la cual es indispensable ingresar la densidad y el volumen de medio de cultivo en unidades del sistema internacional (Kieran, Malone, & MacLoughlin, 2000):

$$\bar{\varepsilon} = \frac{P_i}{\rho^{III} \cdot V^{III}} \text{ [=] } \frac{J}{s \cdot kg}$$

donde, P_i es la potencia (J) que se requiere para hacer girar un impulsor con una velocidad determinada. En diferentes regiones de un tanque agitado, los valores de la tasa de disipación de energía varían. En las regiones cerca del impulsor, que comprenden entre el 1 y 5% del volumen total del medio de cultivo, la velocidad de disipación de energía puede ser 100 veces la tasa promedio del tanque (Zhou & Kresta, 1998), mientras en el resto del recipiente la tasa local de disipación de energía puede caer a un cuarto del promedio (Davies, 1972). Para determinar la potencia del impulsor se emplea la siguiente expresión que expresa la potencia en función de las medidas del tanque y el impulsor (Kieran et al., 2000):

$$P_i = \rho^{III} \cdot N_P \cdot N_i^3 \cdot D_i^5 \text{ [=] } \frac{J}{s}$$

En esta, N_i es la velocidad de rotación del impulsor (s^{-1}), D_i es el diámetro del impulsor (m), N_P es el número de potencia para el impulsor al valor predominante del número de Reynolds en el tanque. El número de potencia es un número adimensional que depende del tipo de

impulsor, la velocidad de agitación, la densidad y la viscosidad del fluido, la distancia del impulsor desde el fondo del tanque, la profundidad del líquido, las dimensiones de las placas deflectoras y si hay o no aireación del medio de cultivo (Doran, 2013; McCabe, Smith, & Harriott, 2002). Para el número de potencia en la literatura científica se encuentran reportados gran variedad de correlaciones empíricas para diferentes configuraciones de impulsores y tanques. La **Figura 4-2** muestra curvas para el calcular el N_P para tres tipos de turbinas sin inyección de aire a partir del Reynolds del impulsor (Re_i), el cual se calcula con la siguiente expresión, donde es necesario ingresar la densidad y la viscosidad del medio de cultivo en unidades del sistema internacional:

$$\mathrm{Re}_i = \frac{N_i D_i^2 \rho^{III}}{\mu^{III}}$$

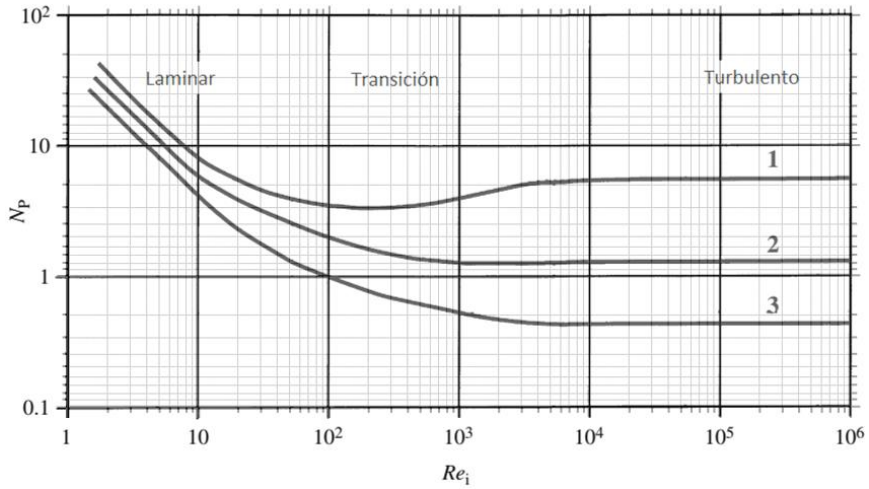

Figura B-1: Correlación entre el número de potencia y Reynolds del impulsor para diferentes tipos de agitadores. **1** Rushton. **2** Canaletes. **3** Propela. Adaptado de Doran (2013).

Finalmente, los tanques agitados en los que se inyecta gas tienen menores requerimientos de energía para la agitación y esto se da por dos razones. La primera es la presencia de burbujas que disminuye la densidad del fluido. La segunda es el hecho de que las burbujas crean cavidades de aire cerca del impulsor que disminuyen las fuerzas de arrastre generadas y reducen significativamente la resistencia a la rotación del impulsor, provocando una caída sustancial en la potencia requerida (Doran, 2013). Por lo tanto, es necesaria una corrección sobre los valores de potencia para tanques con inyección de gas. Una de las ecuaciones empíricas que relaciona el consumo de potencia en un tanque con y sin gas más usadas es la correlación de Hughmark (Hughmark, 1980), la cual se presenta en la siguiente expresión:

$$P_g = P_i \cdot 0.10\left(\frac{F_g}{N_i \cdot V^{III}}\right)^{-0.25} \cdot \left(\frac{N_i^2 \cdot D_i^4}{g \cdot W_i \cdot V^{III^{2/3}}}\right)^{-0.20} \quad [=] \ \frac{J}{s}$$

donde P_i es la potencia que se requiere para hacer girar un impulsor sin presencia de gas y P_g es la potencia requerida para el impulsor con gas. F_g es el caudal volumétrico de gas que ingresa al tanque (m^3/s). W_i es el ancho de las palas del impulsor (m). g es la aceleración de la gravedad (m/s^2) y V^{III} el volumen del medio de cultivo (m^3). Nótese que para cada experimento el coeficiente de transferencia de calor entre la membrana-pared y el medio externo (h_2) debe ser calculado, pero, siempre y cuando no se altere la velocidad de agitación y el volumen de trabajo en el biorreactor, este permanece constante a lo largo de todo el experimento.

Como caso particular, se calcula h_2 para un biorreactor de tanque agitado con 1,2 L de volumen de trabajo operando en configuración típica para cultivo aerobio de baja viscosidad (Doran, 2013). Estas son las mismas condiciones empleadas por Toya et al. (2010) en los datos usados en el ajuste y la validación del modelo. Bajo estas consideraciones se tienen los siguientes valores para el cálculo del coeficiente de transferencia de calor entre la membrana-pared y el medio de cultivo:

$$L_{c2} = 2.0x10^{-4} \ [=] \ cm$$
$$k^{III} = 6.15x10^{-3} \ [=] \ J/(s \cdot cm \cdot K)$$
$$\mu^{III} = 6.92 \ [=] \ mg/(cm \cdot s)$$
$$C_p^{III} = 4.17x10^{-3} \ [=] \ J/(mg \cdot K)$$
$$v_{cel} = 0.0025 \ [=] \ cm/s$$
$$\rho^{III} = 993.37 \ [=] \ mg/cm^3$$
$$V^{III} = 1200 \ [=] \ cm^3$$
$$N_i = 3.33 \ [=] \ s^{-1}$$
$$D_i = 0.0239 \ [=] \ m$$
$$W_i = 0.0048 \ [=] \ m$$
$$N_P = 9 \ [=] \ \text{Adimensional}$$
$$F_g = 1.67x10^{-5} \ [=] \ m^3/s$$

Luego el valor de coeficiente de transferencia de calor h_1 se determina como:

$$\boxed{h_1 = \ 55.39 \ [=] \ \frac{J}{s \cdot cm^2 \cdot K}}$$

Bibliografía

Alberty, R. A. (2003). *Thermodynamics of biochemical reactions*. Wiley Online Library.

Alberty, R. A. (2006). *Biochemical thermodynamics: applications of Mathematica* (Vol. 48). John Wiley & Sons.

Alvarez, H. D. (2011). *Balances de materia y energía. Formulación, solución y usos en Procesos Industriales. Corregida y aumentada.* Medellín, Colombia: Editorial Artbox Ltda.

Alvarez, H. D. (2012). Introducción al diseño simultáneo de proceso y control. In Editorial académica española (Ed.), *La controlabilidad de estado como restricción*. España.

Alvarez, H. D. (2017). *Efectos dinámicos en operaciones unitarias. Modelado de procesos para su análisis y control. Trabajo de año sabático*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Minas.

Álvarez, H. D., Gómez, L., & Botero, H. (2014). Abstracciones macroscópicas de la fenomenología para el modelado de procesos. *XXVII Congreso de Ingeniería Química*. Cartagena, Colombia.

Alvarez, H. D., Lamanna, R., Vega, P., & Revollar, S. (2009). Metodología para la Obtención de Modelos Semifísicos de Base Fenomenológica Aplicada a una Sulfitadora de Jugo de Caña de Azúcar. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI*, *6*(3), 10–20. https://doi.org/10.1016/S1697-7912(09)70260-2

Amako, K., & Umeda, A. (1977). Bacterial surfaces as revealed by the high resolution scanning electron microscope. *Microbiology*, *98*(1), 297–299.

Amillastre, E., Aceves-Lara, C. A., Uribelarrea, J. L., Alfenore, S., & Guillouet, S. E. (2012). Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in Saccharomyces cerevisiae. *Bioresource Technology*, *117*, 242–250. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.013

Andersen, K. B., & von Meyenburg, K. (1980). Are growth rates of Escherichia coli in batch cultures limited by respiration? *Journal of Bacteriology*, *144*(1), 114–123.

Ashby, W. R. (1961). *An introduction to cybernetics*. Chapman & Hall Ltd.

Atkinson, B. (1986). *Reactores bioquímicos*. Reverté.

Baez, A., & Shiloach, J. (2013). Escherichia coli avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase. *Microbial Cell Factories*, *12*(1), 23.

Bailey, N. T. J. (1964). *The elements of stochastic processes with applications to the natural sciences* (Vol. 1). New York: John Wiley.

Baldwin, W. W., Myer, R., Anderson, E., Koch, A. L., & Koch, A. L. (1995). Buoyant density of Escherichia coli is determined solely by the osmolarity of the culture medium. *Archives of Microbiology*, *164*(2), 155–157. https://doi.org/10.1007/s002030050248

Barigou, M., Mankad, S., & Fryer, P. J. (1998). Heat Transfer in Two-Phase Solid-Liquid Food Flows: A Review. *Food and Bioproducts Processing*, *76*(1), 3–29. https://doi.org/10.1205/096030898531710

Ben Yaghlene, H., Leguerinel, I., Hamdi, M., & Mafart, P. (2009). A new predictive dynamic model describing the effect of the ambient temperature and the convective heat transfer coefficient on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*, *133*(1–2), 48–61. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.014

Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J., & Rabinowitz, J. D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in Escherichia coli. *Nature Chemical Biology*, *5*(8), 593–599. https://doi.org/10.1038/nchembio.186

Berg, H. C. (1993). Random walks in biology. In *Guildford, Surrey: Princeton University Press Google Scholar*.

Berg, H. C. (2008). *E. coli in Motion*. Springer Science & Business Media.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2015). *Biochemistry* (8th ed.). New York: W.H. Freeman and Company.

Betz, A., & Chance, B. (1965). Influence of inhibitors and temperature on the oscillation of reduced pyridine nucleotides in yeast cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *109*(3), 579–584. https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90403-0

Bevan, J., & Boerio-Goates, J. (2000). Chemical Thermodynamics: Principles and Applications. *Chemical Thermodynamics: Principles and Applications*.

Bharucha-Reid, A. T. (1960). *Elements of the Theory of Markov Processes and their Applications*. New York: McGraw-Hill.

Bier, M., Bakker, B. M., & Westerhoff, H. V. (2000). How Yeast Cells Synchronize their Glycolytic Oscillations: A Perturbation Analytic Treatment. *Biophysical Journal*, *78*(March).

Birou, B., Marison, I. W., & Stockar, U. Von. (1987). Calorimetric investigation of aerobic fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, *30*(5), 650–660. https://doi.org/10.1002/bit.260300509

Blackman, F. (1905). Optima and limiting factors. *Annals of Botany*. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/43235278

Blume, A. (1983). Apparent Molar Heat Capacities of Phospholipids in Aqueous Dispersion. Effects of Chain Length and Head Group Structure. *Biochemistry*, *22*(23), 5436–5442. https://doi.org/10.1021/bi00292a027

Boeing, G. (2016). Visual Analysis of Nonlinear Dynamical Systems: Chaos, Fractals, Self-Similarity and the Limits of Prediction. *Systems*, *4*(4), 37. https://doi.org/10.3390/systems4040037

Boerio-Goates, J. (1991). Heat-capacity measurements and thermodynamic functions of crystalline α-D-glucose at temperatures from 10 K to 340 K. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, *23*(5), 403–409. https://doi.org/10.1016/S0021-9614(05)80128-4

Boling, E. A., Blanchard, G. C., & Russell, W. J. (1973, February 16). Bacterial identification by microcalorimetry [23]. *Nature*, Vol. 241, pp. 472–473. https://doi.org/10.1038/241472a0

Bondy, F., & Lippa, S. (1983). Heat transfer in agitated vessels. *Chemical Engineering (New York)*, *90*(7), 62–71. https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)85075-5

Braissant, O., Bachmann, A., & Bonkat, G. (2015). Microcalorimetric assays for measuring cell growth and metabolic activity: Methodology and applications. *Methods*, *76*, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.009

Braissant, O., Bonkat, G., Wirz, D., & Bachmann, A. (2013, March 10). Microbial growth and isothermal microcalorimetry: Growth models and their application to microcalorimetric data. *Thermochimica Acta*, Vol. 555, pp. 64–71. https://doi.org/10.1016/j.tca.2012.12.005

Briggs, G. E., & Haldane, J. B. S. (1925). A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical Journal*, *19*(2), 338.

Buchholz, A., Hurlebaus, J., Wandrey, C., & Takors, R. (2002). Metabolomics: Quantification of

intracellular metabolite dynamics. *Biomolecular Engineering*, *19*(1), 5–15. https://doi.org/10.1016/S1389-0344(02)00003-5

Caramihai, M., & Severin, I. (2013). Bioprocess modeling and control. In *Biomass Now-Sustainable Growth and Use*. InTech.

Cengel, Y. A., & Ghajar, A. J. (2011). *Tranferecia de Calor y Masa. Fundamentos y aplicaciones.* McGraw-Hill.

Ceric, S., & Kurtanjek, Z. (2006). Model identification, parameter estimation, and dynamic flux analysis of E. coli central metabolism. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *20*(3), 243–253.

Chang-Li, X., Hou-Kuhan, T., Zhau-Hua, S., Song-Sheng, Q., Yao-Ting, L., & Hai-Shui, L. (1988). Microcalorimetric study of bacterial growth. *Thermochimica Acta*, *123*(C), 33–41. https://doi.org/10.1016/0040-6031(88)80007-8

Chase Jr, M. W. (1998). NIST-JANAF thermochemical tables. *J. Phys. Chem. Ref. Data, Monograph*, *9*.

Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K., & Reuss, M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of Escherichia coli. *Biotechnology and Bioengineering*, *79*(1), 53–73. https://doi.org/10.1002/bit.10288

Chemical Engineering Research Information Center. (2018). Pure Component Properties. Retrieved April 28, 2018, from https://www.cheric.org/research/kdb/hcprop/cmpsrch.php

Chilton, J. H., Drew, J. B., & Jebens, R. H. (1944). Heat Transfer Coefficients in Agitated Vessels. *Ind.Eng.Chem.*, *36 N§6*(6), 510–516. https://doi.org/10.1021/ie50414a006

Chuang, G. S., & Chiou, M. S. (2006). Undamped oscillations in bacterial glycolysis models. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *23*(3), 419–427. https://doi.org/10.1007/BF02706744

Chubukov, V., Zuleta, I. A., & Li, H. (2012). Regulatory architecture determines optimal regulation of gene expression in metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(13), 5127–5132. https://doi.org/10.1073/pnas.1114235109

Clifton, C. E., & Logan, W. A. (1939). On the Relation between Assimilation and Respiration in Suspensions and in Cultures of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *37*(5), 523.

Clore, G. M., & Venditti, V. (2013, October). Structure, dynamics and biophysics of the cytoplasmic protein-protein complexes of the bacterial phosphoenolpyruvate: Sugar

phosphotransferase system. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 38, pp. 515–530. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.003

Cobelli, C., & Carson, E. (2008). *Introduction to modeling in physiology and medicine*. Elsevier.

Concari, S. B. (2001). Las teorías y modelos en la explicación científica: implicancias para la enseñanza de las ciencias. *Ciência & Educação (Bauru)*, *7*(1), 85–94.

Conn, A. R., Gould, N., & Toint, P. L. (1997). A globally convergent Lagrangian barrier algorithm for optimization with general inequality constraints and simple bounds. *Mathematics of Computation*, *66*(217), 261–289. https://doi.org/10.1090/S0025-5718-97-00777-1

Connors, K. A. (1990). *Chemical kinetics: the study of reaction rates in solution*. John Wiley & Sons.

Corradini, M. G., & Peleg, M. (2009). Dynamic model of heat inactivation kinetics for bacterial adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(8), 2590–2597. https://doi.org/10.1128/AEM.02167-08

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013, October 1). Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 26, pp. 822–880. https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13

Csonka, L. N., & Fraenkel, D. G. (1977). Pathways of NADPH formation in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, *252*(10), 3382–3391.

David, M. H., & Himmelblau, M. (1985). *Basic Principles and Calculations in Chemical Engineering*. Prentice Hall.

Davies, J. T. (1972). Turbulence phenomena at free surfaces. *AIChE Journal*, *18*(1), 169–173. https://doi.org/10.1002/aic.690180131

De Anda, R., Lara, A. R., Hernández, V., Hernández-Montalvo, V., Gosset, G., Bolívar, F., & Ramírez, O. T. (2006). Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of Escherichia coli for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metabolic Engineering*, *8*(3), 281–290. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.01.002

Degenring, D., Froemel, C., Dikta, G., & Takors, R. (2004). Sensitivity analysis for the reduction of complex metabolism models. *Journal of Process Control*, *14*(7), 729–745. https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2003.12.008

Deutscher, J., Aké, F. M. D., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Bouraoui, H., … Joyet, P. (2014). The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *78*(2), 231–256. https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-14

Diaz Ricci, J. C. (2000). ADP modulates the dynamic behavior of the glycolytic pathway of Escherichia coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *271*(1), 244–249. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2603

Doelle, H. W. (1969). Chemosynthesis—Pathways of Carbohydrate Breakdown. In *Bacterial Metabolism* (Vol. 61, pp. 129–198). https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3135-8.50007-2

Doran, P. M. (1995). Bioprocess Engineering Principles. In *Technology* (Vol. 9).

Doran, P. M. (2013). *Bioprocess engineering principles*. Elsevier/Academic Press.

Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., & Prenosil, J. E. (2003). *Biological reaction engineering: dynamic modelling fundamentals with simulation examples* (Vol. 2). Wiley Online Library.

Ederer, M., & Gilles, E. D. (2007). Thermodynamically feasible kinetic models of reaction networks. *Biophysical Journal*, *92*(6), 1846–1857. https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094094

Enjalbert, B., Millard, P., Dinclaux, M., Portais, J. C., & Létisse, F. (2017). Acetate fluxes in Escherichia coli are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Scientific Reports*, *7*(1), 42135. https://doi.org/10.1038/srep42135

Epstein, J. M. (2008). Why Model? *Journal of Artificial Societies and Social Simulation*, *11*(4), 12. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02382-4

Erhardt, H., Dempwolff, F., Pfreundschuh, M., Riehle, M., Schäfer, C., Pohl, T., … Friedrich, T. (2014). Organization of the Escherichia coli aerobic enzyme complexes of oxidative phosphorylation in dynamic domains within the cytoplasmic membrane. *MicrobiologyOpen*, *3*(3), 316–326. https://doi.org/10.1002/mbo3.163

Feist, A. M., Henry, C. S., Reed, J. L., Krummenacker, M., Joyce, A. R., Karp, P. D., … Palsson, B. (2007). A genome-scale metabolic reconstruction for Escherichia coli K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Molecular Systems Biology*, *3*, 121. https://doi.org/10.1038/msb4100155

Felder, R. M., & Rousseau, R. W. (1986). *Elementary principles of chemical processes*. Wiley NY

etc.

Flamholz, A., Noor, E., Bar-Even, A., & Milo, R. (2012). EQuilibrator - The biochemical thermodynamics calculator. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), 770–775. https://doi.org/10.1093/nar/gkr874

Förster, A. H., & Gescher, J. (2014). Metabolic Engineering of Escherichia coli for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *2*(16), 1–12. https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016

Fredrickson, A. G. (1976). Formulation of structured growth models. *Biotechnology and Bioengineering*, *18*(10), 1481–1486.

Fredrickson, A. G. (1991). Segregated, structured, distributed models and their role in microbial ecology: A case study based on work done on the filter-feeding ciliateTetrahymena pyriformis. *Microbial Ecology*, *22*(1), 139–159.

Fujikawa, H., Kai, A., & Morozumi, S. (2004). A new logistic model for Escherichia coli growth at constant and dynamic temperatures. *Food Microbiology*, *21*(5), 501–509. https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.007

Goldberg, D. E., & Holland, J. H. (1988). Genetic algorithms and machine learning. *Machine Learning*, *3*(2), 95–99.

Goldbeter, A. (2013, September 2). Oscillatory enzyme reactions and Michaelis-Menten kinetics. *FEBS Letters*, Vol. 587, pp. 2778–2784. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.031

Gómez, C., Calderón, Y., & Álvarez, H. (2008). Construcción de modelos semifísicos de base fenomenológica. Caso proceso de fermentación. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias*, *6*(2), 28–39.

Gómez, L., Amicarelli, A., Alvarez, H., & di Sciascio, F. (2004). El rol de los modelos en el diseño de equipos de procesos y sistemas de control. *VI Congreso Nacional de La Asociación Colombiana de Automática*.

Green, D. W., & Perry, R. H. (1973). *Perry's Chemical Engineers' Handbook/edición Don W. Green y Robert H. Perry.*

Hädicke, O., & Klamt, S. (2017). EColiCore2: A reference network model of the central metabolism of Escherichia coli and relationships to its genome-scale parent model. *Scientific Reports*, *7*, 39647. https://doi.org/10.1038/srep39647

Hangos, K., & Cameron, I. T. (2001). *Process modelling and model analysis*. Academic Press.

Hatzimanikatis, V., & Bailey, J. E. (1997). Effects of spatiotemporal variations on metabolic control: Approximate analysis using (log)linear kinetic models. *Biotechnology and Bioengineering*, *54*(2), 91–104. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970420)54:2<91::AID-BIT1>3.0.CO;2-Q

Heinzle, E., Biwer, A. P., & Cooney, C. L. (2007). *Development of sustainable bioprocesses: modeling and assessment*. John Wiley & Sons.

Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology*, *40*, 4–7. Retrieved from https://ci.nii.ac.jp/naid/10008305829/

Hobot, J. A., Carlemalm, E., Villiger, W., & Kellenberger, E. (1984). Periplasmic gel: New concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *Journal of Bacteriology*, *160*(1), 143–152. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207168

Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerves. *J. Physiol.*, *117*(4), 500–544. https://doi.org/10.1016/S0092-8240(05)80004-7

Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=-mmnQgAACAAJ

Hoyos, E., López, D., & Alvarez, H. (2016). A phenomenologically based material flow model for friction stir welding. *Materials & Design*, *111*, 321–330. https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.09.009

Hughmark, G. A. (1980). Power Requirements and Interfacial Area in Gas-Liquid Turbine Agitated Systems. *Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development*, *19*(4), 638–641. https://doi.org/10.1021/i260076a023

International Union of Pure and Applied Chemistry. (2014). *Compendium of Chemical Terminology. Gold Book*. Retrieved from http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf

Jahan, N., Maeda, K., Matsuoka, Y., Sugimoto, Y., & Kurata, H. (2016). Development of an accurate kinetic model for the central carbon metabolism of Escherichia coli. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 112. https://doi.org/10.1186/s12934-016-0511-x

Johansson, P., & Wadsö, I. (1999). An isothermal microcalorimetric titration/perfusion vessel equipped with electrodes and spectrophotometer. *Thermochimica Acta*, *342*(1–2), 19–29. https://doi.org/10.1016/S0040-6031(99)00299-3

Jones, P. G., VanBogelen, R. A., & Neidhardt, F. C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *169*(5), 2092–2095. https://doi.org/10.1128/JB.169.5.2092-2095.1987

Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A., Steinhauser, D., … Willmitzer, L. (2010). Metabolomic and transcriptomic stress response of Escherichia coli. *Molecular Systems Biology*, *6*(364), 364. https://doi.org/10.1038/msb.2010.18

Kadic, E., & Heindel, T. J. (2014). Stirred-Tank Bioreactors. *An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer*, 69–123. https://doi.org/10.1002/9781118869703

Kadir, T. A. A., Mannan, A. A., Kierzek, A. M., McFadden, J., & Shimizu, K. (2010). Modeling and simulation of the main metabolism in Escherichia coli and its several single-gene knockout mutants with experimental verification. *Microbial Cell Factories*, *9*(1), 88. https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-88

Kamerlin, S. C. L., & Warshel, A. (2009). On the energetics of ATP hydrolysis in solution. *Journal of Physical Chemistry B*, *113*(47), 15692–15698. https://doi.org/10.1021/jp907223t

Karplus, W. J. (1977). The spectrum of mathematical modeling and systems simulation. *Mathematics and Computers in Simulation*, *19*(1), 3–10. https://doi.org/10.1016/0378-4754(77)90034-9

Keleti, T. (1986). Two rules of enzyme kinetics for reversible Michaelis-Menten mechanisms. *FEBS Letters*, *208*(1), 109–112. https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81542-3

Khalil, H. K. (1996). Non linear systems. *Prentice-Hall, New Jersey*, *2*(5), 1–5.

Khodayari, A., Zomorrodi, A. R., Liao, J. C., & Maranas, C. D. (2014). A kinetic model of Escherichia coli core metabolism satisfying multiple sets of mutant flux data. *Metabolic Engineering*, *25*, 50–62. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.05.014

Kieran, P. M., Malone, D. M., & MacLoughlin, P. F. (2000). Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *67*, 139–177. https://doi.org/10.1007/3-540-47865-5_5

Kingsland, S. E. (1995). *Modeling nature*. University of Chicago Press.

Kolmogorov, A. N. (1941). The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, *30*(4), 299–303.

Kolmogorov, A. N. (1962). A refinement of previous hypotheses concerning the local

structure of turbulence in a viscous incompressible fluid at high Reynolds number. *Journal of Fluid Mechanics*, *13*(1), 82–85.

Konak, A. R. (2007). Derivation of a generalised monod equation and its application. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, *24*(8), 453–455. https://doi.org/10.1002/jctb.2720240805

Korn, G. A. (2003, January). An introduction to models. *Systems Analysis Modelling Simulation*, Vol. 43, pp. 111–120. https://doi.org/10.1080/0232929031000116371

Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(3), 236–246. https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00039-6

Kultz, D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology*, *206*(18), 3119–3124. https://doi.org/10.1242/jeb.00549

Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, *67*(1), 225–257. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635

Kumar, P., & Libchaber, A. (2013). Pressure and temperature dependence of growth and morphology of escherichia coli: Experiments and stochastic model. *Biophysical Journal*, *105*(3), 783–793. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.06.029

Kummer, U., & Olsen, L. (2005). No music without melody: How to understand biochemical systems by understanding their dynamics. *Systems Biology*, *13*(May), 81. https://doi.org/10.1007/b138740

Kurata, H., & Sugimoto, Y. (2018). Improved kinetic model of Escherichia coli central carbon metabolism in batch and continuous cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *125*(2), 251–257. https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2017.09.005

Lara, A. (2011). Producción de proteinas recombinantes en Escherichia coli. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, *10*(2), 209–223. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006

Lareo, C., Fryer, P. J., & Barigou, M. (1997). The Fluid Mechanics of Two-Phase Solid-Liquid Food Flows: A Review. *Food and Bioproducts Processing*, *75*(2), 73–105. https://doi.org/10.1205/096030897531405

Lee, S. Y. (2009). Preface. In *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9394-4

Leicester, H. M. (1951). Germain Henri Hess and the foundations of thermochemistry. *Journal of Chemical Education*, *28*(11), 581–583. https://doi.org/10.1021/ed028p581

Leiseifer, H. P. (1989). Heat Production and Growth Kinetics of E. coli K12 from Flow Calorimetric Measurements on Chemostat Cultures. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, *44*(11–12), 1036–1048. https://doi.org/10.1515/znc-1989-11-1226

Lema Perez, L., Munoz-Tamayo, R., Garcia Tirado, J. F., & Alvarez, H. (2018). On Parameter Interpretability of Phenomenological-Based Semiphysical Models. *BioRxiv*, 446583. https://doi.org/10.1101/446583

Levering, J., Kummer, U., Becker, K., & Sahle, S. (2013). Glycolytic oscillations in a model of a lactic acid bacterium metabolism. *Biophysical Chemistry*, *172*, 53–60. https://doi.org/10.1016/J.BPC.2012.11.002

Levine, I. N. (2002). *Physical chemistry*. Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=4GUvAQAAIAAJ

Lima, A. P., Baixinho, V., Machado, D., & Rocha, I. (2016). A Comparative Analysis of Dynamic Models of the Central Carbon Metabolism of Escherichia coli. *IFAC-PapersOnLine*, *49*(26), 270–276. https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.12.137

Link, H., Christodoulou, D., & Sauer, U. (2014). Advancing metabolic models with kinetic information. *Current Opinion in Biotechnology*, *29*(1), 8–14. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.015

Ljung, L. (1999). *System identification: Theory for the user*. New Jersey, USA: Prentice Hall, Upper Saddle River.

Lobo, I. (2008). Biological complexity and integrative levels of organization. *Nature Education*, *1*(1), 141. Retrieved from http://www.nature.com/scitable/topicpage/biological-complexity-and-integrative-levels-of-organization-468

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., … Martin, K. C. (2015). *Molecular Cell Biology* (8th ed.). New York: W. H. Freeman and Company.

Logan, S. R. (1982). The origin and status of the Arrhenius equation. *Journal of Chemical Education*, *59*(4), 279. https://doi.org/10.1021/ed059p279

Maeda, K., Fukano, Y., Yamamichi, S., Nitta, D., & Kurata, H. (2011). An integrative and practical evolutionary optimization for a complex, dynamic model of biological networks. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *34*(4), 433–446. https://doi.org/10.1007/s00449-010-0486-7

Málek, I. (1958). *Continuous Cultivation of Microorganisms: A Symposium*. Pub. House of the Czechoslovak Academy of Sciences.

Malthus, T. R. (1803). *An essay on the principle of population; a view of its past and present effects on human happiness; with an inquiry into our prospects respecting the future removal or mitigation of the evils which it occasions.*

Maria, G. (2015). In silico Derivation of a Reduced Kinetic Model for Stationary or Oscillating Glycolysis in Escherichia coli Bacterium. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal*, *28*(4), 509–529. https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2002

Marison, I. W., & von Stockar, U. (1986). The application of a novel heat flux calorimeter for studying growth of Escherichia coli W in aerobic batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, *28*(12), 1780–1793. https://doi.org/10.1002/bit.260281205

Maroto, M., & Monk, N. A. M. (2008). Cellular oscillatory mechanisms. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 641). https://doi.org/10.1007/978-0-387-09794-7

Marr, A. G., Ingraham, J. L., & Squires, C. L. (1964). Effect of the temperature of growth of Escherichia coli on the formation of beta-galactosidase. *Journal of Bacteriology*, *87*(2), 356–362. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14151057

Maskow, T. (2013). Miniaturization of calorimetry: strengths and weaknesses for bioprocess monitoring and control. In Urs von Stockar (Ed.), *Biothermodynamics* (pp. 223–242). Lausanne, Switzerland: EPFL Press.

Maskow, T., Kemp, R., Buchholz, F., Schubert, T., Kiesel, B., & Harms, H. (2010). What heat is telling us about microbial conversions in nature and technology: From chip- to megacalorimetry. *Microbial Biotechnology*, *3*(3), 269–284. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00121.x

Maskow, T., & Paufler, S. (2015). What does calorimetry and thermodynamics of living cells tell us? *Methods*, *76*, 3–10. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.035

Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. Pearson Education.

Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Appling, D. R., & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Biochemistry*.

Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=OmAjKQEACAAJ

McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriott, P. (2002). *Operaciones unitarias en ingeniería química*. Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=lVArPwAACAAJ

Mejía, R., Gómez-Eichelmann, M. C., & Fernández, M. S. (1995). Membrane fluidity of Escherichia coli during heat-shock. *BBA - Biomembranes*, *1239*(2), 195–200. https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00152-S

Meyer, H.-P., Leist, C., & Fiechter, A. (1984). Acetate formation in continuous culture of Escherichia coli K12 D1 on defined and complex media. *Journal of Biotechnology*, *1*(5–6), 355–358.

Michaelis, L., & Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z*, *49*(February), 333–369. https://doi.org/10.1021/bi201284u

Miller, W. G., & Alberty, R. A. (1958). Kinetics of the Reversible Michaelis–Menten Mechanism and the Applicability of the Steady-state Approximation. *Journal of the American Chemical Society*, *80*(19), 5146–5151. https://doi.org/10.1021/ja01552a034

Milo, R., Jorgensen, P., Moran, U., Weber, G., & Springer, M. (2009). BioNumbers The database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Research*, *38*(SUPPL.1), D750–D753. https://doi.org/10.1093/nar/gkp889

Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des Cultures Bactériennes*.

Murrell, J. C. (1991). Physiology of the bacterial cell — A molecular approach. *Trends in Genetics*, *7*(10), 341. https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90427-R

Nakano, T., Kikugawa, G., & Ohara, T. (2010). A molecular dynamics study on heat conduction characteristics in DPPC lipid bilayer. *The Journal of Chemical Physics*, *133*(15), 154705. https://doi.org/10.1063/1.3481650

Navas, J., Esteban, F. J., & Quesada, J. M. (2009). *Modelos Matemáticos en Biología*. Retrieved from http://matema.ujaen.es/jnavas/web_modelos/pdf_mmb08_09/texto completo.pdf

Neidhardt, F. C. (1996). Chemical composition of Escherichia coli. *Escherichia Coli and Salmonella*, 13–16.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. *Lehninger Principles of Biochemistry*, *4*, 521–559.

Newton, J. M., Schofield, D., Vlahopoulou, J., & Zhou, Y. (2016). Detecting cell lysis using viscosity monitoring in E. coli fermentation to prevent product loss. *Biotechnology Progress*, *32*(4), 1069–1076. https://doi.org/10.1002/btpr.2292

Noor, E., Eden, E., Milo, R., & Alon, U. (2010). Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Molecular Cell*, *39*(5), 809–820. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.031

Oh, M. K., Rohlin, L., Kao, K. C., & Liao, J. C. (2002). Global expression profiling of acetate-grown Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(15), 13175–13183. https://doi.org/10.1074/jbc.M110809200

Ortega, F., Álvarez, H. D., & Botero, H. (2017). Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de las metodologías de modelado. *Ión*, *30*(1), 73–90. https://doi.org/10.18273/revion.v30n1-2017006

Ortega, F., Álvarez, H. D., & Botero, H. (2018). *Modelado de Bioprocesos: relaciones matemáticas entre el medio ambiente y el material biológico*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Parolini, D. N., & Carcano, S. (2010). *A model for cell growth in batch bioreactors*. Master Thesis, Polytechnic University of Milan, Milan, Italy.

Peskov, K., Mogilevskaya, E., & Demin, O. (2012). Kinetic modelling of central carbon metabolism in Escherichia coli. *FEBS Journal*, *279*(18), 3374–3385. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08719.x

Phillips, R., Kondev, J., Theriot, J., Garcia, H., & Chasan, B. (2010). Physical Biology of the Cell. In *American Journal of Physics* (Vol. 78). https://doi.org/10.1119/1.3459039

Prigogine, I., & Nicolis, G. (1985). Self-Organisation in Nonequilibrium Systems: Towards A Dynamics of Complexity. In *Bifurcation Analysis* (pp. 3–12). https://doi.org/10.1007/978-94-009-6239-2_1

Purcell, E. M. (1977). Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics*, *45*(1), 3–11. https://doi.org/10.1119/1.10903

Ramkrishna, D., Fredrickson, A. G., & Tsuchiya, H. M. (1967). Dynamics of microbial propagation: models considering inhibitors and variable cell composition. *Biotechnology and Bioengineering*, *9*(2), 129–170.

Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., & Chandler, R. E. (1983). Model for bacterial growth throughout the entire biokinetic range. *Journal of Bacteriology*, *154*(3), 1222–1226. Retrieved from https://jb.asm.org/content/154/3/1222.short

Real Academia Española. (2014). *Diccionario de la lengua española* (23rd ed.). Retrieved from http://dle.rae.es/?w=diccionario

Richardson, L. F. (1922, August 15). Weather prediction by numerical process. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, Vol. 48, pp. 282–284. https://doi.org/10.1002/qj.49704820311

Richter, A., & Nikrityuk, P. A. (2013). New correlations for heat and fluid flow past ellipsoidal and cubic particles at different angles of attack. *Powder Technology*, *249*, 463–474. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.08.044

Rodrigues, A. E., & Minceva, M. (2005). Modelling and simulation in chemical engineering: Tools for process innovation. *Computers and Chemical Engineering*, *29*(6 SPEC. ISS.), 1167–1183. https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2005.02.029

Roels, J. A. (1980). Application of Marcoscopic Principles to Microbial Metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, *22*(12), 2457–2514. https://doi.org/10.1002/bit.260221202

Ruoff, P., Christensen, M. K., Wolf, J., & Heinrich, R. (2003). Temperature dependency and temperature compensation in a model of yeast glycolytic oscillations. *Biophysical Chemistry*, *106*(2), 179–192. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00191-1

Ruoff, P., Zakhartsev, M., & Westerhoff, H. V. (2007). Temperature compensation through systems biology. *FEBS Journal*, *274*(4), 940–950. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05641.x

Saa, P. A., & Nielsen, L. K. (2017, December 1). Formulation, construction and analysis of kinetic models of metabolism: A review of modelling frameworks. *Biotechnology Advances*, Vol. 35, pp. 981–1003. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.005

Schäfer, M., Höfken, M., & Durst, F. (1997). Detailed LDV Measurements for Visualization of the Flow Field Within a Stirred-Tank Reactor Equipped with a Rushton Turbine. *Chemical Engineering Research and Design*, *75*(8), 729–736. https://doi.org/10.1205/026387697524399

Schneider, W. R., & Doetsch, R. N. (1974). Effect of viscosity on bacterial motility. *Journal of Bacteriology*, *117*(2), 696–701. https://doi.org/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC285562/

Schügerl, K., & Bellgardt, K.-H. (2012). *Bioreaction engineering: modeling and control*. Springer Science & Business Media.

Schwiening, C. J. (2012). A brief historical perspective: Hodgkin and Huxley. *The Journal of Physiology*, *590*(11), 2571–2575. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230458

Sizer, I. W. (1943). Effects of temperature on enzyme kinetics. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (pp. 35–62). https://doi.org/10.1002/9780470122488.ch2

Sizer, I. W. (1944). Temperature activation and inactivation of the crystalline catalase-hydrogen peroxide system. *Journal of Biological Chemistry*, *154*(2), 461–473.

Sobie, E. A., Lee, Y.-S., Jenkins, S. L., & Iyengar, R. (2011). Systems Biology--Biomedical Modeling. *Science Signaling*, *4*(190), tr2–tr2. https://doi.org/10.1126/scisignal.2001989

Soini, J., Falschlehner, C., Mayer, C., Böhm, D., Weinel, S., Panula, J., … Neubauer, P. (2005). Transient increase of ATP as a response to temperature up-shift in Escherichia coli. *Microbial Cell Factories*, *4*(1), 9. https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-9

Solomon, J., Elson, T. P., Nienow, A. W., & Pace, G. W. (1981). Cavern Sizes in Agitated Fluids With a Yield Stress. *Chemical Engineering Communications*, *11*(1–3), 143–164. https://doi.org/10.1080/00986448108910992

Sowa, S. W., Baldea, M., & Contreras, L. M. (2014). Optimizing Metabolite Production Using Periodic Oscillations. *PLoS Computational Biology*, *10*(6), e1003658. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003658

Sperelakis, N. (2012). *Cell Physiology Sourcebook. Essentials of Membrane Biophysics* (4th ed.). Elsevier Inc.

Swiecicki, J.-M., Sliusarenko, O., & Weibel, D. B. (2013). From swimming to swarming: Escherichia coli cell motility in two-dimensions. *Integrative Biology*, *5*(12), 1490. https://doi.org/10.1039/c3ib40130h

Taymaz-Nikerel, H., Borujeni, A. E., Verheijen, P. J. T., Heijnen, J. J., & van Gulik, W. M. (2010). Genome-derived minimal metabolic models for Escherichia coli MG1655 with estimated in vivo respiratory ATP stoichiometry. *Biotechnology and Bioengineering*, *107*(2), 369–381. https://doi.org/10.1002/bit.22802

Termonia, Y., & Ross, J. (1981). Oscillations and control features in glycolysis: analysis of resonance effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(6), 3563–3566. https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3563

Thomas, C. (1990). *Chemical engineering problems in biotechnology* (M. A. Winkler, Ed.). Retrieved from http://www.springer.com/us/book/9781851664542

Tijhuis, L., Loosdrecht, M. C. M. Van, & Heijnen, J. J. (1993). A Thermodynamically Based

Correlation for Maintenance Gibbs Energy Requirements in Aerobic and Anaerobic Chemotrophic Growth. *Biotechnology and Bioengineering*, *42*(4), 509–519.

Touloukian, Y. S. (1970). Thermophysical properties of matter. *The TPRC Data Series*, *1*, 175.

Toya, Y., Ishii, N., Nakahigashi, K., Hirasawa, T., Soga, T., Tomita, M., & Shimizu, K. (2010). 13C-Metabolic flux analysis for batch culture of Escherichia coli and its pyk and pgi gene knockout mutants based on mass isotopomer distribution of intracellular metabolites. *Biotechnology Progress*, *26*(4), 975–992. https://doi.org/10.1002/btpr.420

Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2006). El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana De Microbiología*, *48*, 269–280. Retrieved from http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi063_4f.pdf

Usuda, Y., Nishio, Y., Iwatani, S., Van Dien, S. J., Imaizumi, A., Shimbo, K., … Matsui, K. (2010). Dynamic modeling of Escherichia coli metabolic and regulatory systems for amino-acid production. *Journal of Biotechnology*, *147*(1), 17–30. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.02.018

Valdez-Cruz, N. A., Ramírez, O. T., & Trujillo-Roldán, M. A. (2011). Molecular responses of Escherichia coli caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction. *Bioengineered Bugs*, *2*(2), 105–110. https://doi.org/10.4161/bbug.2.2.14316

Van Derlinden, E., Bernaerts, K., & Van Impe, J. F. (2008). Dynamics of Escherichia coli at elevated temperatures: Effect of temperature history and medium. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(2), 438–453. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03592.x

Verhulst, P.-F. (1838). Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. In J. Garnie & A. Quetelet (Eds.), *Correspondance mathématique et physique Vol 10* (pp. 113–121).

Voit, E. O. (2013). Biochemical Systems Theory: A Review. *ISRN Biomathematics*, *2013*, 1–53. https://doi.org/10.1155/2013/897658

Voit, E. O., Martens, H. A., & Omholt, S. W. (2015). 150 Years of the Mass Action Law. *PLoS Computational Biology*, *11*(1), e1004012. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004012

von Stockar, U., & Birou, B. (1989). The heat generated by yeast cultures with a mixed metabolism in the transition between respiration and fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, *34*(1), 86–101. https://doi.org/10.1002/bit.260340112

von Stockar, Urs. (2013). *Biothermodynamics. The Role of Thermodynamics in Biochemical Engineering* (Urs Von Stockar, Ed.). Lausanne, Switzerland: EPFL Press.

Walhout, M., Vidal, M., & Dekker, J. (2012). *Handbook of systems biology: concepts and insights*. Academic Press.

Wang, L., Zhou, Y. J., Ji, D., & Zhao, Z. K. (2013). An accurate method for estimation of the intracellular aqueous volume of Escherichia coli cells. *Journal of Microbiological Methods*, *93*(2), 73–76. https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2013.02.006

Wanner, B. L. (1996). Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, 2nd Ed. ASM Press, Washington, DC*, *41*, 1357–1381.

Weiss, P., & Kavanau, J. L. (1957). A model of growth and growth control in mathematical terms. *The Journal of General Physiology*, *41*(1), 1–47.

Welch, R. A. (2006). The Genus Escherichia. In *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations* (pp. 60–71). https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_3

Xiao, Y. N., Drengstig, T., & Ruoff, P. (2009). The control of the controller: Molecular mechanisms for robust perfect adaptation and temperature compensation. *Biophysical Journal*, *97*(5), 1244–1253. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.030

Ye, Y., Zhang, L., Hao, F., Zhang, J., Wang, Y., & Tang, H. (2012). Global metabolomic responses of escherichia coli to heat stress. *Journal of Proteome Research*, *11*(4), 2559–2566. https://doi.org/10.1021/pr3000128

Yuk, H. G., & Marshall, D. L. (2003). Heat adaptation alters Escherichia coli O157:H7 membrane lipid composition and verotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(9), 5115–5119. https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5115-5119.2003

Zhou, G., & Kresta, S. M. (1998). Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. *Chemical Engineering Science*, *53*(11), 2063–2079. https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00438-7

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(6), 1875–1881. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348228