

**PLANTEAMIENTO DE UN MODELO ESTEQUIOMÉTRICO BASADO EN
RESTRICCIONES BIOQUÍMICAS DE LA RUTA METABÓLICA PARA LA
PRODUCCIÓN DE n-BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA UTILIZANDO
Clostridium Acetobutylicum ATCC 824**

**YOELIS ADRIANA AMAYA GÓMEZ
EVELYN ZARETH ARIAS PATERNINA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

**PLANTEAMIENTO DE UN MODELO ESTEQUIOMÉTRICO BASADO EN
RESTRICCIONES BIOQUÍMICAS DE LA RUTA METABÓLICA PARA LA
PRODUCCIÓN DE n-BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA UTILIZANDO
Clostridium Acetobutylicum ATCC 824**

**YOELIS ADRIANA AMAYA GÓMEZ
EVELYN ZARETH ARIAS PATERNINA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de:
Ingenieras Químicas**

Director

Ph. D Luis Javier López Giraldo

Codirector

Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida de la mejor manera a mi familia, especialmente a mi madre Cecilia Gómez por su incondicional apoyo a mis hermanos Yenelis, Yohanis y Jose Carlos, y a mi padre José Luis Amaya, a mis Tios, especialmente a María Inés y Yimmy, abuelos y primos. Gracias por demostrarme una vez más lo importante que soy en sus vidas. Este logro lo dedico principalmente a ustedes que siempre fueron el motor me movía cada uno de mis esfuerzos.

A mis profesores, José Andrés y Luis Javier, por todo el conocimiento transmitido y por la paciencia con la que nos orientaron a lo largo de la ejecución de este trabajo.

A mis amigos que gracias a Dios son muchos: Jaines, Brillith, Evelyn, Ludy, Yaritza, Edinsson, Norida, Erika, Marlys, Lizeth, Luis Eider, Adriana, Monica, Lina, Liana, Sussan, Rodrigo, Silvia, Lorena, Andrés, Catherine, Yohanna, Oscar, Angel, Greicy, Maria C, Yuli y demás personas que tuve la oportunidad de conocer. Gracias a ustedes este trabajo fue una realidad, pues su apoyo siempre fue incondicional y llegaba en el momento oportuno sus consejos, amistad y complicidad es el mejor recuerdo que me llevo de mi vida universitaria.

A todo el cuerpo docente y administrativo de la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander, Gracias por la excelente labor que realizan al brindarnos sus conocimientos y sabiduría y contribuir a nuestra formación como Ingenieros Químicos.

GRACIAS

Yoelis Adriana Amaya Gómez

DEDICATORIA

A mi padre Hernando Arias por su confianza, amor, apoyo incondicional y por haberme brindado todo su conocimiento empírico en ingeniería química. A mi madre Emperatriz Paternina y a mi hermana Liana Lizeth por su compañía, paciencia, comprensión, amor y cariño, los quiero mucho, este logro también es de ustedes. Gracias por creer en mí y estar conmigo siempre.

A mis tíos Martha, sagrario, Lorena y en especial a mis tíos Bertha y Omar que son como unos padres para mí. Gracias por su apoyo. A mis primos Omar, Alonso, Andrea, Clara, Jota y Bertha por acompañarme en este camino.

A mis amigos que son como mis hermanos Yoelis, Jaines, Brillith, Norida, Adriana, Ludy, Edinson, Caterine, Oscar Leonardo, Oscar Javier, Erika, Marlys, Nadia, Susan, Luis Eyder y Olimpo por estar cuando más los necesite, por brindarme su amistad y por hacer parte de este logro.

A mis directores de proyecto José Andrés Pérez Mendoza y Luis Javier López Giraldo por su colaboración incondicional, por los conocimientos brindados y por la orientación académica, profesional y moral.

Evelyn Gareth Arias Paternina

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander por su apoyo a través del proyecto 54-52.

Al grupo de investigación CICTA, y de manera especial a nuestros directores de proyecto Luis Javier López Giraldo y José Andrés Pérez Mendoza por su disponibilidad y colaboración para llevar a cabo este trabajo.

A la Universidad Industrial de Santander y en especial a la escuela de ingeniería química por brindarnos una excelente formación académica y humana.

A nuestros familiares, amigos y a cada una de las personas que hicieron parte de nuestra formación como ingenieras químicas.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	17
1.2 METABOLISMO DEL <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> ATCC 824.....	20
2. METODOLOGÍA.....	25
2.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	25
2.2 SELECCIÓN DE LAS PRINCIPALES REACCIONES INDIVIDUALES DE LA RUTA METABÓLICA.....	26
2.3 MODELO ESTEQUIOMÉTRICO.....	26
2.3.1 Sistema de reacciones.....	28
2.3.2 Reacción general de la ruta metabólica.....	29
2.3.3 Restricciones bioquímicas	30
2.4 BALANCES ELEMENTALES.....	34
2.5 OPTIMIZACIÓN	36
2.6 FUNCIÓN OBJETIVO.....	36
2.7 RESTRICCIONES	36
2.8 SOFTWARE	37
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	38
3.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39
4. CONCLUSIONES.....	42

5. RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Comparación de propiedades termofísicas del butanol, gasolina y etanol.	18
Tabla 2. Comparación de las ventajas del butanol frente al etanol.....	18
Tabla 3. Nomenclatura de metabolitos intracelulares y productos.....	23
Tabla 4. Intervalos de posibles valores para los coeficientes estequiométricos. ...	33
Tabla 5. Valores óptimos de coeficientes estequiométricos	38
Tabla 6. Rendimientos óptimos.....	40
Tabla 7. Comparación de valores experimentales con el valor teórico máximo calculado.....	40

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ruta metabólica de la cepa <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 en la fermentación ABE, con glucosa como fuente de carbono.	22
Figura 2. Esquema metodológico	25
Figura 3. Singularidades presentes en la ruta metabólica por la producción y reasimilación de Ácidos acético y butírico R22 y R24.....	58

LISTADO DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Reacciones individuales de la ruta metabólica.....	48
Anexo B. Simplificaciones de la ruta metabólica.....	58
Anexo C. Cálculo de coeficientes con ayuda de los rendimientos termodinámicos teóricos máximos.	65

RESUMEN

TITULO: PLANTEAMIENTO DE UN MODELO ESTEQUIOMÉTRICO BASADO EN RESTRICCIONES BIOQUÍMICAS DE LA RUTA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE n-BUTANOL A PARTIR DE GLUCOSA UTILIZANDO *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824.*

AUTORES: Evelyn Zareth Arias Paternina, Yoelis Adriana Amaya Gomez.**

PALABRAS CLAVE: Acetona – Butanol – Etanol Fermentacion, *Clostridium Acetobutylicum*, Modelo estequiométrico, Rendimiento teórico.

Se analizó la ruta metabólica del *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824 y se plantearon las reacciones individuales que la describe. Se desarrollo un modelo estequiométrico y se calculo el rendimiento teórico máximo del n-butanol a partir de glucosa. La determinación del rendimiento teórico máximo de n-butanol requirió del planteamiento de un modelo estequiométrico basado en restricciones bioquímicas el cual se desarrolló mediante un análisis de flujos metabólicos utilizando balances de masa. Para la solución de este modelo fue necesario aplicar principios de optimización no lineal empelando el software GAMS en su versión 23.9.1. y el servidor NEOS versión 5.0.

Como resultado se obtuvo un rendimiento máximo de n-butanol de 0.607 mol/mol de glucosa en donde se encontró que para alcanzar este máximo valor es necesario que el sustrato no se consuma para la síntesis de otros metabólicos extracelulares. Posteriormente este resultado fue comparado con datos experimentales reportados en la literatura de rendimientos obtenidos para el n-butanol en la fermentación ABE y se determino el porcentaje de mejora y eficiencia de los procesos estableciendo limites superiores de productividad.

Este trabajo es parte del proyecto de áreas estratégicas “Escalamiento de procesos en la producción de bio-alcoholes y procesamiento de los subproductos de la producción de biocombustibles por fermentación” código 5452, apoyados por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander, con la participación del grupo de investigación en bioquímica y biotecnología y el centro de investigación de ciencia y tecnología de los alimentos- CICTA.-

1

*Proyecto de Grado

**Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Luis Javier López Giraldo. Codirector: José Andrés Pérez Mendoza Gallego Químico M Sc.

ABSTRACT

TITLE: PROPOSING A STOICHIOMETRIC MODEL BASED ON THE METABOLIC PATHWAY BIOCHEMICAL RESTRICTIONS FOR THE PRODUCTION OF n-BUTANOL FROM GLUCOSE BY USING *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824. *

AUTHORS: Evelyn Zareth Arias Paternina, Yoelis Adriana Amaya Gomez**

KEYWORDS: Acetone – Butanol – Ethanol Fermentation - *Clostridium Acetobutylicum* – Stoichiometric Model – Theoretical Performance.

The *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824 metabolic pathway was analyzed and the individual reactions describing it were proposed. A stoichiometric model was developed and the n-butanol maximum theoretical performance from glucose was calculated. For determining the n-butanol maximum theoretical performance from glucose proposing a stoichiometric model based on biochemical restrictions was required; a model developed through the analysis of metabolic fluxes by using mass balances. For solving this model applying non-linear optimization principles was necessary, using GAMS 23.9.1 Software and NEOS 5.0 Server.

As a result, a 0.607 mol/mol of glucose n-butanol maximum performance was obtained, and also, for reaching these levels, it is absolutely necessary for the substrate not to be completely consumed in order to guarantee the synthesis of other extracellular metabolic substances. Then, this result was compared to experimental data reported by literature in obtained performances for n-butanol in ABE fermentation, and the process improvement and efficiency percentage was determined, establishing higher productivity limits. This work is part of the project of strategic areas “Scaling processes bio – alcohols production and processing by-products from biofuel production by fermentation” code 5452, supported by the Vicerrectoría de Investigación y Extensión of Universidad Industrial de Santander, with the participation of the research group in biochemistry and biotechnology and the research center for science and food technology –CICTA–

* Research Project

** Physical – Chemical Engineering College. Chemical Engineering Department. Advisors: Ph.D. Luis Javier López Giraldo and Ing. Qco. José Andrés Pérez Mendoza.

1. INTRODUCCIÓN

El biobutanol (alcohol butílico o n-butanol) llamado así cuando se produce biológicamente, es un alcohol primario de fórmula molecular $C_4H_{10}O$; es un líquido incoloro, inflamable, con un olor característico, su vapor irrita las membranas mucosas produciendo un efecto narcótico a altas concentraciones. Es miscible en solventes orgánicos comunes y parcialmente miscible en agua [1].

A partir del butanol pueden obtenerse diversos compuestos, entre los que destacan la butilamina, los ésteres de butilo y el butadieno [2]. Además, el butanol se emplea como disolvente en la fabricación de pinturas y barnices, como plastificante en la fabricación de diversos polímeros, resinas y caucho sintético. Recientemente, se ha propuesto como sustituto y/o aditivo de la gasolina [1].

El butanol puede ser producido biológicamente, en un proceso conocido con el nombre de fermentación ABE (acetona-butanol- etanol), que ya ha sido desarrollado a nivel industrial durante la Primera Guerra Mundial para la producción de acetona y butanol [3].

La fermentación ABE llegó a ser la segunda en importancia (por volumen) después de la del etanol. Aún en el año 1945, un 65% de la producción mundial de butanol (y un 10% de la de acetona) era producida mediante fermentación [2]. Sin embargo, entre los años 1950-1960 la producción microbiológica de butanol fue perdiendo competitividad debido al alto costo de materias primas y poco a poco fue remplazada por la síntesis petroquímica [4].

Biocombustibles como el butanol han despertado gran interés en la comunidad científica debido a que en el último siglo se ha incrementado el consumo de energía a nivel mundial, además de otros factores como el crecimiento industrial. Este

crecimiento ha traído consigo un aumento de las emisiones contaminantes asociadas con el alto consumo del petróleo y sus derivados lo que exige la búsqueda urgente de nuevas alternativas viables y económicas para sustituir, o por lo menos disminuir, el uso y el impacto ambiental de combustibles fósiles.

El interés por el butanol para ser usado como aditivo o sustituto de la gasolina se debe a que sus propiedades termofísicas son similares a las de la gasolina (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de propiedades termofísicas del butanol, gasolina y etanol.

Propiedad	Butanol	Gasolina	Etanol
Densidad de energía (MJ/L)	29,2	32	19,6
Proporción aire-combustible	11,2	14.6	9
Calor de vaporización (MJ/Kg)	0,43	0,36	0,92
Valor energético (Btu/gal)	110.000	114.000	76.100
Número de octanos en investigación	96	91-96	129
Número de octanos en motor	78	81-89	102

Fuente: Producción Microbiológica de Butanol [1]

Además, el biobutanol tiene otras ventajas cuando es usado como biocombustible bien sea puro o en mezcla (gasolina y diesel), entre las que se pueden destacar las siguientes propiedades que se presentan en la *tabla 2*.

Tabla 2. Comparación de las ventajas del butanol frente al etanol.

Propiedades	Butanol	Etanol
Solubilidad en agua:	Baja	Higroscópico
Presión de Vapor:	Baja	Alta (se evapora fácilmente)
Trasporte:	En tuberías mezclado directamente con la gasolina.	No se puede enviar directamente por tuberías.
Corrosión:	Menos corrosivo	Más corrosivo

Fuente: Análisis de la producción de bio-butanol en la fermentación con *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564 [5]

Gracias a su versatilidad y a sus propiedades químicas y termofísicas, existe un gran interés en producir butanol, bien sea por síntesis química o biotecnológica. Sin embargo, el alcance de este trabajo sólo hará una discusión desde el punto de vista fermentativo debido a que su procedencia promete una alternativa energética limpia hacia el futuro.

Las investigaciones direccionadas al entendimiento de las rutas metabólicas de los procesos fermentativos empleando microorganismos del género *Clostridium*, constatan que, a pesar de su incuestionable utilidad, una de las mayores limitaciones de la producción de butanol por vía fermentativa es la relativamente baja concentración de productos obtenibles; esto se traduce en bajos rendimientos que reducen la viabilidad económica del proceso [6].

Son varios los reportes e investigaciones que abordan la fermentación ABE catalizada con *Clostridium acetobutylicum*. A continuación se describen las generalidades de éstas últimas.

1.1 CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM

El *Clostridium acetobutylicum* es un bacilo Gram-positivo que comúnmente vive en el suelo, aunque se ha encontrado en muchos entornos (sedimento de agua de pozo, en el intestino de almejas, en diferentes tipos de heces que incluyen las heces humanas, bovinas y caninas); es mesófilo, sacarolítico y tiene una alta capacidad de producir una amplia gama de productos de interés industrial; notablemente acetona, etanol y butanol. Es capaz de asimilar diferentes fuentes de carbono como la glucosa, galactosa, celobiosa, malosa, xilosa y arabinosa. [1,7]. El *C. acetobutylicum* requiere condiciones anaeróbicas con el fin de crecer, además sólo puede sobrevivir unas pocas horas en condiciones aeróbicas [8].

Actualmente la cepa más estudiada es la *C. acetobutylicum* ATCC 824, cuyo genoma indica que ésta es la cepa modelo para bacterias productoras de disolventes [9]. En el presente se llevan a cabo modificaciones genéticas con el fin de aumentar la eficiencia en la producción de solventes [10].

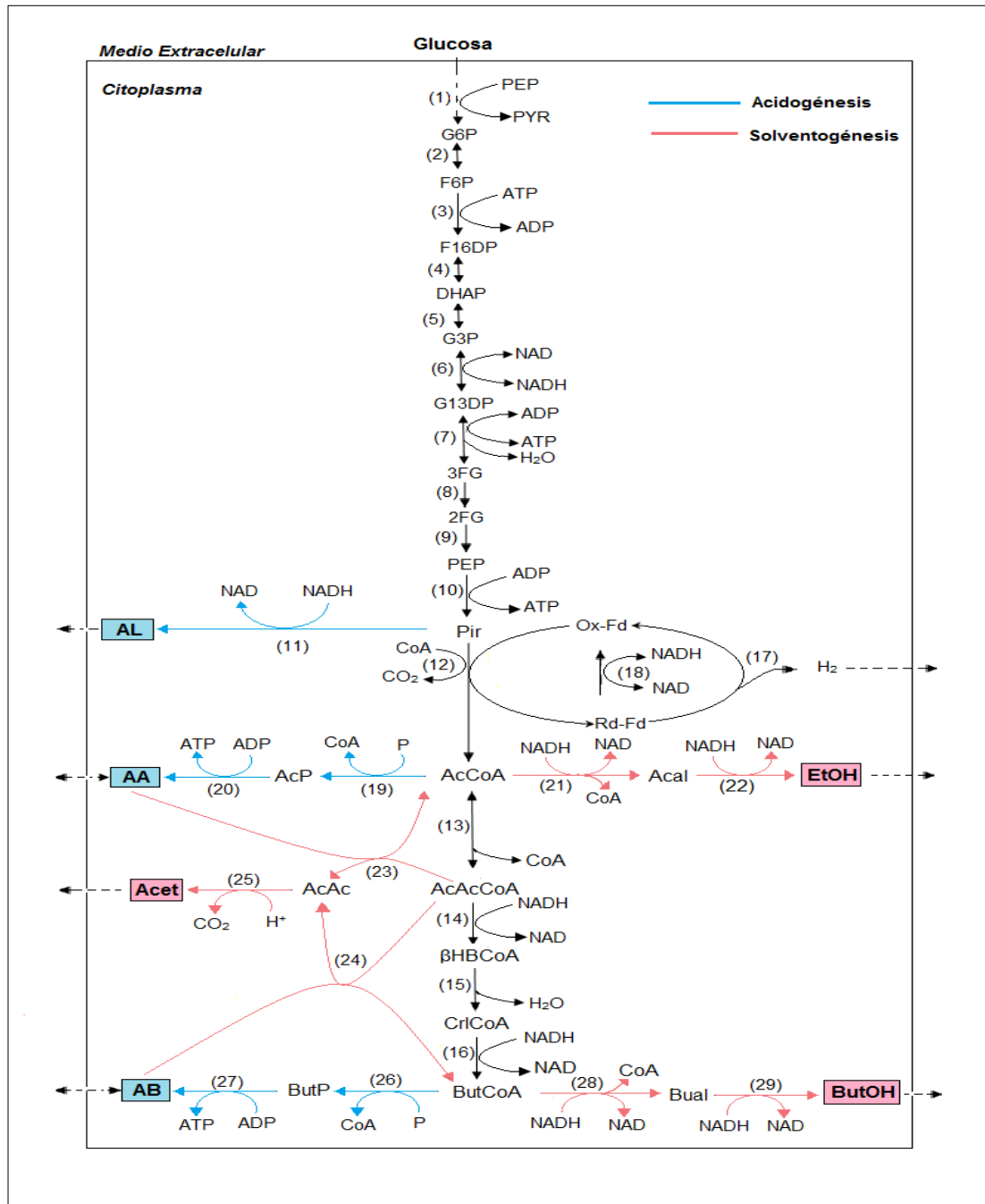
1.2 METABOLISMO DEL *C. ACETOBUTYLICUM* ATCC 824

Durante la fermentación ABE se pueden distinguir claramente dos fases. En la primera de ellas (acidogénesis) se lleva a cabo la producción de ácidos, mientras que en la segunda los ácidos son re-asimilados produciéndose los solventes (solvatogénesis) (Ver figura 1).

- **Acidogénesis:** En esta fase, las células crecen de manera exponencial, la glucosa o fuente de carbono, es metabolizada a través de la vía glucolítica para formar ácido pirúvico y acetil-CoA, con la liberación de CO₂ y H₂ [8]. Esta fase se completa con la liberación de ácidos carboxílicos como láctico acético y butírico que disminuyen el pH del medio [9]. Durante esta fase, la fijación de nitrógeno también tiene lugar [11].
- **Solvatogénesis:** En ésta, los ácidos son reasimilados y actúan como co-sustratos para la biosíntesis de solventes (butanol, acetona y etanol). En este punto, la producción de biomasa y de ácidos cesa generándose un ligero incremento del pH [9,11]. Según los reportes bibliográficos, la concentración final en butanol es de cerca de 12 g/l con un rendimiento (Y_{ps}) del 30% y relaciones másicas acetona:butanol:etanol de 3:6:1 [12,2]. Al finalizar la fermentación la concentración de solventes puede llegar a niveles inhibitorios y detener el metabolismo [7].

La separación de los productos del caldo de cultivo, puede ser realizada por medio de métodos de destilación o utilizando membranas, estas últimas tienen la gran ventaja de ser extremadamente selectivas, por lo que este método resulta ser altamente eficiente, aunque una de sus principales desventajas que evitan que sean ampliamente utilizadas para la recuperación de productos es su alto costo [26].

Figura 1. Ruta metabólica de la cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 en la fermentación ABE, con glucosa como fuente de carbono.



Fuente: Autores

Tabla 3. Nomenclatura de metabolitos intracelulares y productos.

ABREVIATURA	NOMBRE	FORMULA MOLECULAR
Glucosa	Glucosa	$C_6H_{12}O_6$
G6P	Glucosa-6- fosfato	$C_6H_{11}O_6 (PO_3^{-2})$
F6P	Fructosa-6-fosfato	$C_6H_{11}O_6 (PO_3^{-2})$
F16DP	Fructosa-1,6-Difosfato	$C_6H_{10}O_6 (PO_3^{-2})_2$
DHAP	Dihidrixiacetona-fosfato	$C_3H_5O_3 (PO_3^{-2})$
G3P	Gliceraldehido-3-Fosfato	$C_3H_5O_3 (PO_3^{-2})$
G13DP	1,3-Difosforo-glicerato	$C_3H_4O_3 (PO_3^{-2})(PO_4^{-2})$
3FG	3-Fosforo glicerato	$C_3H_4O_4 (PO_3^{-2})$
2FG	2-Fosforo glicerato	$C_3H_4O_4 (PO_3^{-2})$
PEP	Fosfoenol piruvato	$C_3H_2O_3 (PO_3^{-2})$
Pir	Piruvato	$C_3H_4O_3$
AL	Acido Lactico	$C_3H_6O_3$
AcCoA	AcetilCoA	$C_2H_5O_5CoA-SH$
CoA	CoA-SH	$C_{21}H_{35}N_7O_{16}P_3-SH$
AA	Ácido acético	$C_2H_4O_2$
AcAc	Acetoacetato	$C_4H_6O_3$
AcAcCoA	AcetoacetilCoA	$C_4H_5O_2CoA-SH$
AB	Acido Butírico	$C_4H_8O_2$
ButCoA	ButirilCoA	$C_4H_7OCoA-SH$
BP	Butiril-Fosfato	$C_4H_7O(PO_4^{-2})$
EtOH	Etanol	C_2H_6O
Acet	Acetona	C_3H_6O
Acal	Acetaldehido	C_2H_4O
AcP	Acetilfosfato	$C_2H_3O(PO_4^{-2})$
β HBCoA	β -H-ButirilCoA	$C_4H_7O_2CoA-SH$
CrI CoA	Crotonil-CoA	$C_4H_5OCoA-SH$
Bual	Butiraldehido	C_4H_8O
ButP	Butiril-fosfato	$C_4H_7O(PO_4^{-2})$
ButOH	Butanol	$C_4H_{10}O$

Fuente: Autores

Las limitaciones por baja concentración de productos obtenibles en la producción de butanol se deben a que estos actúan como componentes tóxicos para las células, lo que conduce a que la conversión de los ácidos producidos en la primera etapa del proceso sea incompleta y permanezca en el medio [2]. Con el fin de mejorar la productividad y rendimiento de las fermentaciones se han propuesto diferentes estrategias, entre las que se destacan la modificación genética de la cepa y la hibridación de procesos [3,10]. Sin embargo, son pocos los reportes que buscan determinar las máximas concentraciones estequiométricas que podrían obtenerse de un sistema en particular.

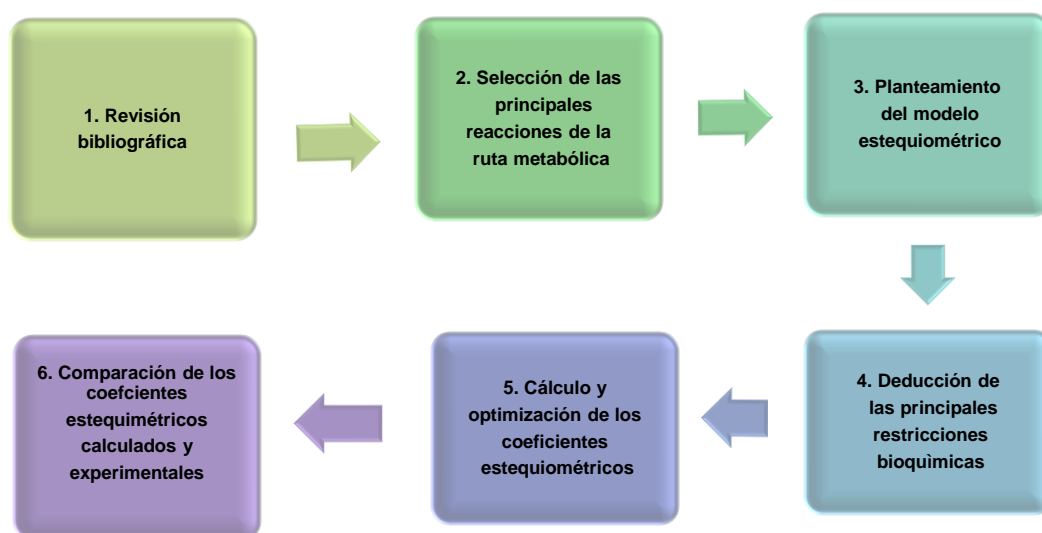
Concientes de estas limitantes, este trabajo de investigación busca proponer y aplicar estrategias que permitan determinar los máximos obtenibles desde el punto de vista estequiométrico. Para ello el proyecto se dividirá en dos actividades principales. La primera consiste en el planteamiento de un modelo estequiométrico que permita comprender el comportamiento metabólico complejo del *C. Acetobutylicum* ATCC 824. Y la segunda está relacionada con la determinación de los máximos coeficientes estequiométricos que se pueden llegar a obtener mediante el establecimiento de las limitaciones termodinámicas y bioquímicas que determinan el mayor rendimiento teórico de cada producto. Para este fin se utilizarán principios de optimización.

Sin duda alguna el conocimiento del máximo rendimiento teórico de butanol será de gran importancia ya que permitirá conocer cuál es la máxima cantidad desde el punto de vista teórico que podrá ser alcanzada en la fermentación ABE estableciendo así los límites superiores de la productividad, que a su vez pueden ser utilizados como una guía en los estudios de factibilidad [13].

2. METODOLOGÍA

A continuación se presenta de manera general un esquema de las seis etapas consideradas en este trabajo.

Figura 2. Esquema metodológico



Fuente: Autores

2.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Con el fin de adquirir las bases teóricas necesarias para el desarrollo del proyecto, en la primera fase se efectuó la búsqueda de información relacionada con la fermentación ABE (trabajos de modelamiento metabólico y estequiométrico, bioquímica de reacciones metabólicas, y optimización de ecuaciones de fermentación).

2.2 SELECCIÓN DE LAS PRINCIPALES REACCIONES INDIVIDUALES DE LA RUTA METABÓLICA

Primero se realiza una descripción detallada de las 29 reacciones individuales, incluyendo la vía glucolítica que comprende un sistema de reacciones que están ampliamente estudiadas en la literatura, al final de la cual se obtienen relaciones molares 1:2 de glucosa y ácido pirúvico respectivamente [14]. A partir de la formación del piruvato no se tiene certeza de las cantidades reaccionantes del mismo y de los metabolitos que se forman en las siguientes reacciones consecutivas, por lo que se le asignan letras (a, b, c, d, f, g, l, h, i, j, k, q) a estas cantidades (moles), y también se aprovecha la conservación de las relaciones estequiométricas para plantear el modelo.

Las ecuaciones de cada una de las reacciones de la ruta metabólica obedecen a las limitaciones impuestas por la termodinámica y la topología bioquímica del crecimiento y la formación de productos [15].

Dentro de esta ruta encontramos la producción de algunos metabolitos intermediarios claves como es el caso del piruvato, acetil-CoA, butiril-CoA, NADH y Fd-Rd (ferredoxina), los cuales cumplen una función muy importante a la hora de realizar la síntesis de productos extracelulares y biomasa. La deducción de cada una de estas reacciones se muestra con detalle en el ANEXO A.

2.3 MODELO ESTEQUIOMÉTRICO

Diversas técnicas han sido desarrolladas para tratar de entender el metabolismo celular. Dentro de los primeros trabajos podemos citar, el desarrollo de la teoría del control metabólico (MCA), en el que la información sobre la cinética enzimática se utiliza para desarrollar un modelo global del metabolismo celular.

Infortunadamente, la falta de información acerca de la cinética enzimática de la mayoría de los sistemas biológicos hace que esta alternativa sea poco práctica [16].

Para enfrentar este problema se planteó un enfoque alternativo, el cual se basa en el análisis de flujos metabólicos (AMF, por sus siglas en inglés). Éste utiliza los balances de masa de la ruta metabólica para desarrollar un modelo del metabolismo celular; Papoutsakis (1984) [16] fue el primero en plantear un método general para el cálculo de la estequiometría de *Clostridios*, y en proponer un modelo estequiométrico para la red metabólica llamado “ecuación de fermentación” [13,17]. El desarrollo de este modelo se basa en una supuesta producción en exceso de ATP, y la bioquímica de formación de productos de fermentación [15].

El modelo estequiométrico toma la forma de un sistema de ecuaciones lineales obtenidas al realizar los balances de masa de los metabolitos intracelulares. Este sistema de ecuaciones es típicamente indeterminado y presenta singularidades por lo que es necesario hacer algunas aproximaciones sobre los metabolitos intermediarios para reducir la naturaleza subdeterminada del sistema [16,13].

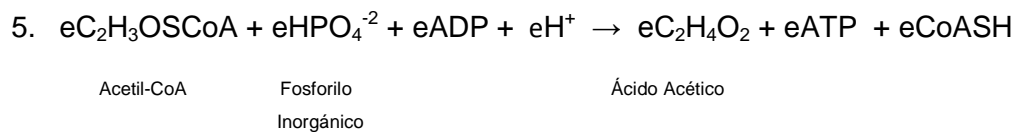
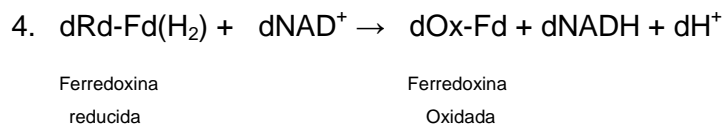
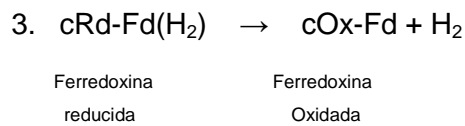
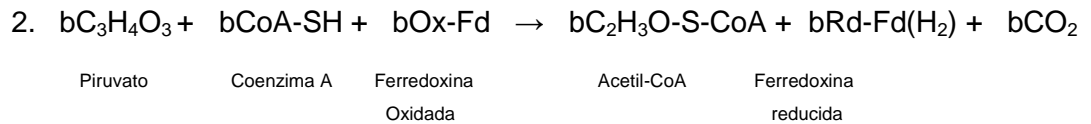
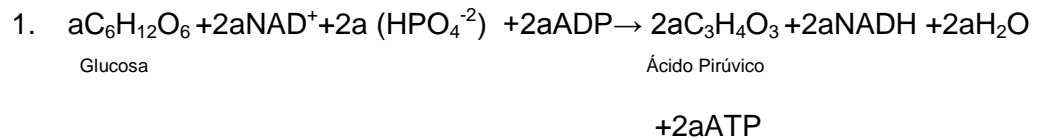
La bibliografía reporta que la vía metabólica del *C. acetobutilycum* cuenta con la presencia de algunas singularidades que han impedido el cálculo de algunos flujos críticos por el método general que plantea Papoutzakis (1984). Se ha responsabilizado a la formación y consumo de ácido acético, al igual que a la producción y consumo de ácido butírico por la presencia de estas singularidades [16], en este trabajo se realizan algunas simplificaciones las cuales se presentan en el ANEXO B.

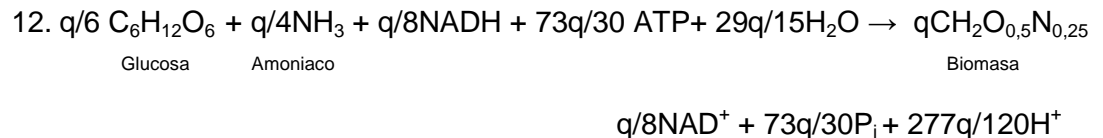
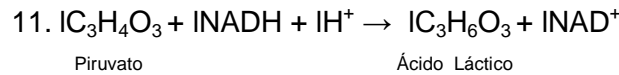
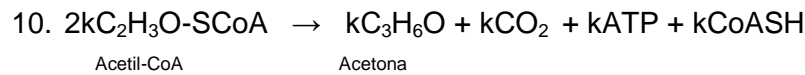
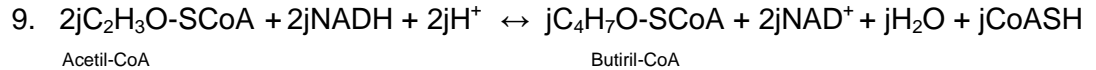
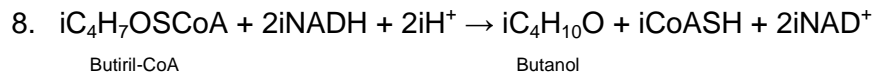
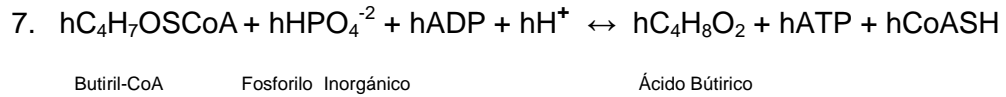
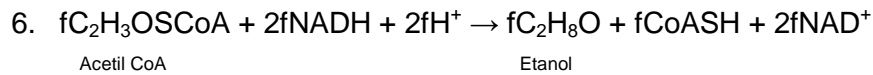
Para resolver el problema de las singularidades en el modelo es necesario introducir principios de optimización global utilizando técnicas de programación lineal [16], de esta forma, calcular el rendimiento máximo teórico de butanol.

El método general descrito anteriormente fue el utilizado en este trabajo para calcular la ecuación general de la ruta metabólica del *C. acetobutilycum* ATCC 824.

2.3.1 Sistema de reacciones

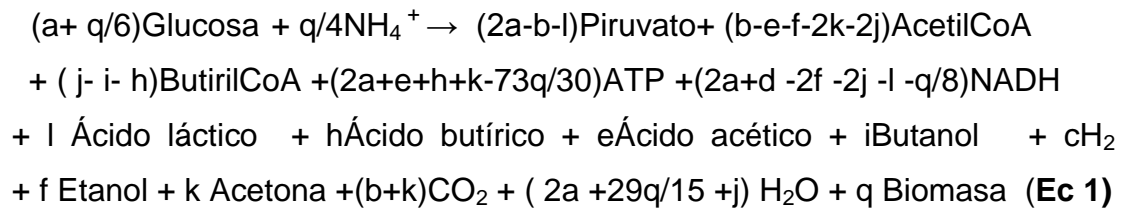
El balance estequiométrico para las 12 reacciones que se consideran para el planteamiento del modelo puede ser escrito como sigue:





2.3.2 Reacción general de la ruta metabólica

El concepto de acoplamiento de reacciones es utilizado para deducir las 12 reacciones mencionadas anteriormente y obtener el modelo estequiométrico que se muestra a continuación en la Ecuación 1:



Para obtener una mayor aproximación a la reacción general de la ruta metabólica se utilizan algunas restricciones bioquímicas, las cuales facilitan el entendimiento de la dinámica del metabolismo celular y brindan cierta ayuda a la hora de resolver el problema de optimización.

2.3.3 Restricciones bioquímicas

Las restricciones que se declaran a continuación son el resultado de una ardua revisión bibliográfica y fueron consideradas con el fin de simplificar el modelo.

- Se supone un estado pseudo–estacionario para los metabolitos intermediarios, ya que no se acumulan en cantidades significativas y se puede considerar que se consumen completamente en las reacciones, por lo tanto, sus coeficientes estequiométricos en la ecuación global de fermentación deben ser iguales a cero [13,16].

Por otra parte, el mecanismo de las reacciones intracelulares es muy complejo y todavía no es muy bien comprendido. Por esta razón en el modelamiento estequiométrico se puede ignorar el comportamiento de la dinámica intracelular con base en un supuesto estado pseudo estacionario para metabolitos internos. Esta suposición es apoyada por la observación que afirma que; “la dinámica intracelular es mucho mas rápida que la dinámica extracelular y llega al estado pseudo estacionario instantáneamente, por lo

que se puede prescindir del comportamiento transitorio para estos metabolitos intermedarios” [16].

A continuación se presentan las ecuaciones del balance de masa para los metabolitos intermedarios (mol/L).

$$\text{Cantidad Producida} - \text{Cantidad Reaccionante} = \text{Cantidad Acumulada} \quad (\text{Ec 2})$$

Balance de Ácido Pirúvico o piruvato

$$2a - b - l = 0 \quad (\text{Ec 3})$$

Balance de Acetil-CoA

$$b - e - f - 2k - 2j = 0 \quad (\text{Ec 4})$$

Balance de Butiril-CoA

$$j - i - h = 0 \quad (\text{Ec 5})$$

Cabe resaltar que el supuesto de un estado pseudo estacionario no implica que la naturaleza dinámica del proceso entero sea ignorada, porque la dinámica del proceso extracelular, es decir; consumo de sustratos y formación de productos aún es considerada en el modelo.

- El piruvato resultante de la glicólisis se rompe por la enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) en presencia de la coenzima-A para producir dióxido de carbono y acetil-CoA. En este proceso ocurre la conversión simultánea de ferredoxina oxidada a su forma reducida al transferir los electrones al NAD^+ [7,14].

La enzima ferredoxin NAD^+ reductasa tiene un comportamiento doce veces mayor que la NADH ferredoxin oxidasa. Por esta razón, se puede decir que la

reacción ocurre sólo en una dirección y se favorece en mayor medida la producción de ferredoxina oxidada. Además esta gran actividad enzimática es atribuida a la alta demanda de NADH en la solventogénesis [7].

- El NADH y Ferredoxina se utilizan como únicos transportadores de electrones en las reacciones individuales planteadas en la ruta metabólica, aunque se sabe que también se utiliza en algunas reacciones de la solventogénesis NADPH. Esta simplificación se puede justificar ya que la conversión de NADH a NADPH por transhidrolasas requiere muy poca energía en forma de ATP [15].

El NADH se produce y consume totalmente dentro de la ruta metabólica debido a su naturaleza cíclica al igual que el NAD^+ [18]. Los coeficientes del NAD^+ y NADH son iguales debido a que son metabolitos precursores uno del otro, por lo que sólo se considerará la restricción para uno de los dos metabolitos.

Balance de NADH

$$2a + d - 2f - 2j - 2i - l - \frac{q}{8} = 0 \quad (\text{Ec 6})$$

- Los coeficientes estequiométricos de los productos extracelulares tales como etanol, ácido acético, acetona, ácido butírico, butanol, dióxido de carbono, hidrógeno y agua deben ser mayores que cero [15]. En el ANEXO C se calculan los valores máximos que pueden llegar tener los coeficientes de algunos productos extracelulares por mol de glucosa con ayuda de los rendimientos termodinámicos máximos teóricos. Como se puede observar en la tabla 4 estos son los límites superiores del intervalo de posibles valores para los coeficientes estequiométricos de los metabolitos extracelulares.

Tabla 4. Intervalos de posibles valores para los coeficientes estequiométricos.

Productos extracelulares	Intervalos de posibles valores
Ácido láctico	$0 \leq l < 2$
Ácido acético	$0 < e < 3$
Ácido butírico	$0 < h < 1,2$
Acetona	$0 < k < 1,5$
Etanol	$0 < f < 2$
Butanol	$0 < i < 1$
Dióxido de carbono (CO ₂)	$0 < b+k < 6$
Hidrógeno (H ₂)	$0 < c < 6$
Biomasa	$0 < q < 5,65$

Fuente: Autores

- La observación detallada de la ruta metabólica del *C. acetobutilycum* ATCC 824 muestra que en la fermentación ABE se produce una cantidad en exceso de ATP, debido a la síntesis del mismo en la vía glucolítica y la producción de los ácidos acético y butírico respectivamente. Se sabe también que una cantidad relativamente pequeña se utiliza para la producción de biomasa y la mayoría es hidrolizada a ADP en la glucólisis [13].

Balance de ATP

$$2a + e + h + k - \frac{73q}{30} \geq 0 \quad (\text{Ec 7})$$

En la literatura se encontró la relación matemática entre la cantidad de ácido acético y butírico que son reasimilados para la síntesis de acetona y la cantidad extracelular remanente que es expulsada al medio [16]. Esta simplificación se realiza por la practicidad requerida para el cálculo de los coeficientes óptimos, por lo que es posible suponer que si las relaciones

estequiométricas se conservan las cantidades reasimiladas de ambos ácidos son las mismas ANEXO B.

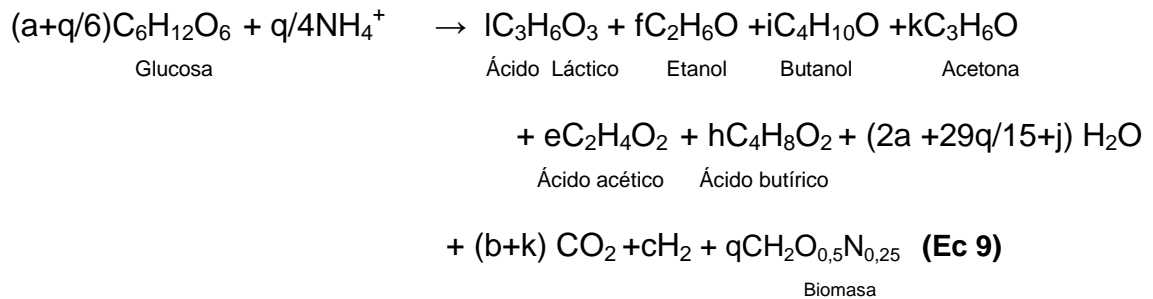
$$\frac{\text{Cantidad reasimilada de Ácido butírico}}{\text{Cantidad reasimilada de Ácido acético}} = 0,315 \left(\frac{h}{f}\right)$$

$$\left(\frac{f}{h}\right) = 0,315 \quad (\text{Ec 8})$$

- El CO₂ producido también puede ser utilizado para fijar carbono en la biomasa y/o productos de fermentación. Sin embargo, estudios previos (Papautsakís 1984) han estimado que estas contribuciones son insignificantes a condiciones normales de fermentación [13,4].

2.4 BALANCES ELEMENTALES

Las simplificaciones hechas a la ecuación general de la ruta metabólica debido a las restricciones mencionadas anteriormente se pueden resumir en la siguiente reacción.



Balance de carbono

$$6a = 3l + 2f + 4i + 4k + 2e + 4h + b \quad (\text{Ec 10})$$

Balance de Hidrógeno

$$8a = 6l + 6f + 10i + 6k + 4e + 8h + \frac{58q}{15} + 2j + 2c \quad (\text{Ec 11})$$

Balance de Oxígeno

$$4a + \frac{43q}{30} = 3l + f + i + 3k + 2b + 2e + 2h + j \quad (\text{Ec 12})$$

Balance de electrones

$$\begin{aligned} (6) \left(a + \frac{q}{6} \right) \Psi_{Glucosa} + \frac{q}{4} \Psi_{NH_4^+} \\ = q\Psi_{Biomasa} + 3l\Psi_{AL} + 2e\Psi_{\text{Ácido Acético}} + 3k\Psi_{Acetona} + 4h\Psi_{\text{Ácido Butírico}} \\ + 2f\Psi_{Etanol} + 4i\Psi_{Butanol} + 2c\Psi_{H_2} + \left(2a + \frac{29q}{15} + j \right) \Psi_{H_2O} + (b + k) \Psi_{CO_2} \end{aligned}$$

El cálculo de los grados de reducción (Ψ) para cada uno de los compuestos que intervienen en la reacción global se muestra con detalle en el ANEXO C.

$$\begin{aligned} (6) \left(a + \frac{q}{6} \right) \Psi_{Glucosa} = \\ q\Psi_{Biomasa} + 3l\Psi_{AL} + 2e\Psi_{\text{Ácido Acético}} + 3k\Psi_{Acetona} + \\ 4h\Psi_{\text{Ácido Butírico}} + 2f\Psi_{Etanol} + 4i\Psi_{Butanol} + 2c\Psi_{H_2} \end{aligned}$$

$$24a = 0,25q + 12l + 8e + 16k + 20h + 12f + 24i + 4c \quad (\text{Ec 13})$$

2.5 OPTIMIZACIÓN

El modelado estequiométrico generalmente establece un vínculo entre cada una de las reacciones involucradas en la ruta metabólica y solo considera las restricciones estequiométricas para llegar a una solución particular. Por lo tanto, la imposición de las restricciones conduce a un espacio de solución factible para los máximos valores alcanzados por los coeficientes cuando se optimiza la producción de n-butanol [18].

2.6 FUNCIÓN OBJETIVO

Para el problema de optimización anteriormente planteado se ha encontrado en la literatura que se puede utilizar como función objetivo (FOBJ) el balance de carbono. La elección está fundamentada en el hecho que lo que se desea al final, es determinar la mayor cantidad de carbono que es utilizado para la formación de productos y esta ecuación muestra de forma clara la relación existente entre el sustrato y cada uno de los productos extracelulares.

$$FOBJ: 6a = 3l + 2f + 4i + 4k + 2e + 4h + b \quad (Ec 10)$$

2.7 RESTRICCIONES

Dentro de este conjunto de ecuaciones encontramos expresiones que describen el comportamiento en estado pseudo estacionario de los metabolitos intermediarios, los máximos valores que pueden alcanzar los coeficientes de productos extracelulares, producción en exceso de ATP y por último, la relación que existe entre la producción de ácido acético y butírico.

Los balances de hidrógeno y oxígeno no se tienen en cuenta en el modelo debido a que no proporcionan información adicional, debido a que la cantidad de agua que se produce en la ruta metabólica no es medible pues el medio de fermentación se encuentra en solución [13].

2.8 SOFTWARE

Para la solución del modelo estequiométrico planteado en este trabajo, se utilizó GAMS (*General Algebraic Modeling System*) versión 23.9.1. Este último es un software desarrollado por A. Brooke, D. Kendrick y A. Meeraus [19].

El servidor utilizado para la ejecución de la optimización fue NEOS versión 5.0, un “solver” desarrollado por el centro de tecnología y optimización de la Universidad de Wisconsin [20].

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Después de realizar la optimización utilizando métodos de programación no lineal se obtuvieron los siguientes valores óptimos que satisfacen cada una de las restricciones impuestas por la bioquímica y la estequiometría de la ruta metabólica.

El sustrato total utilizado para los cálculos es 1,05 mol, cabe resaltar que un mol se consume para la producción de metabolitos extracelulares y 0,05 moles restantes forman biomasa. Esta consideración es válida debido a que, según la topología bioquímica de la ruta fermentativa y por practicidad del sistema, no es recomendable sintetizar tanto productos como biomasa a partir de un mol de sustrato [13].

Tabla 5. Valores óptimos de coeficientes estequiométricos

	Coeficientes estequiométricos óptimos (mol)
Ácido butírico	0,163
Ácido acético	0,058
Acetona	0,139
Butanol	0,607
Etanol	0,084
Ácido Láctico	0
H ₂	1
CO ₂	2,139
Biomasa ³	0,3

Fuente: Autores

³ La cantidad máxima producida de biomasa es 0,3 moles, para esta cantidad sólo es necesario 0,05 moles de glucosa. Los cálculos de este valor se muestran en el ANEXO B.

El coeficiente estequiométrico máximo de n-butanol es 1 mol cuando se utiliza el principio de los rendimientos termodinámicos máximos como se muestra en el ANEXO C. En este se hace la consideración de que todo el sustrato es utilizado para la síntesis de este producto, es decir, sin la producción de otros metabolitos involucrados en la ruta fermentativa. A partir de la aproximación realizada en este trabajo se obtuvo un valor de 0,607 mol para este coeficiente, incluyendo la producción de los demás metabolitos extracelulares.

De otro lado con el análisis de los datos obtenidos en la tabla 5, es notable que, para el caso particular del ácido láctico, el coeficiente estequiométrico que hace que la cantidad de n-butanol se maximice es cero. Este resultado se puede explicar si se considera que su producción está regulada principalmente por la actividad enzimática del complejo lactato deshidrogenasa que por lo general tiende a ser muy baja [7]. Además, las condiciones de fermentación en lo que a pH se refiere (4,3 - 5,5) [21], no son las apropiadas para que se registre la máxima actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, que según la literatura se logra a un pH = 5,8 [22].

Finalmente, los resultados de la tabla 5 muestran que el valor máximo del coeficiente estequiométrico del butanol es mayor que el de los ácidos acético y butírico. Esta tendencia sugiere que una cantidad de los ácidos mencionados anteriormente con reasimilados para contribuir a la mayor formación de acetona y n-butanol respectivamente.

3.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la *tabla 6* Se obtiene del valor de los rendimientos óptimos que maximizan la producción de butanol, teniendo en cuenta que para la síntesis de productos se utiliza una mol de sustrato.

Tabla 6. Rendimientos óptimos

Ácidos y solventes	Rendimientos óptimos (mol/mol glucosa)
Ácido butírico	0,163
Ácido acético	0,058
Acetona	0,139
Butanol	0,607
Etanol	0,084
Ácido Láctico	0
H ₂	1
CO ₂	2,139

Fuente: Autores

En el análisis de resultados se compara el valor del rendimiento teórico máximo de butanol (*tabla 6*) obtenido en este trabajo (0,607 mol/mol glucosa que es independiente de las condiciones de cultivo y medio de fermentación, ya que solo describe la estequiometría) con valores encontrados en la literatura de la fermentación ABE por *C. acetobutylicum* (*ver tabla 7*). Seguidamente se calcula qué tan alejados están los valores experimentales de butanol del óptimo. Por último, se compara la influencia de las diferentes condiciones del cultivo en cada uno de los trabajos experimentales citados.

Tabla 7. Comparación de valores experimentales con el valor teórico máximo calculado.

	Rojas y Gonzales ⁴	Meyer ⁵	Mutsumi ⁶	Optimización
Butanol [mol/mol glucosa]	0,1499	0,366	0,486	0,607

Fuente: Autores

⁴ Rojas y Gonzales (2011) [23]

⁵ Meyer (1987) [24]

⁶ Mutsumi (1998) [25]

Los datos obtenidos por Rojas y Gonzales [23] se registraron a un pH de 5 adquiriéndose un rendimiento de butanol de 0,1499 mol/mol glucosa (*ver tabla 7*), apenas un 25% de valor máximo obtenible según la optimización planteada en este trabajo.

Los datos obtenidos por Meyer [24] en su estudio, se llevan a cabo a un pH de 4,5 y a una tasa de dilución de $0,24 \text{ h}^{-1}$, a estas condiciones se tiene para el butanol un rendimiento de 0,366 mol/mol glucosa (*ver tabla 7*), es decir, que el valor experimental aunque mejora con relación al trabajo de Rojas y Gonzales, sigue existiendo un margen de mejora de aproximadamente del 40% en lo que se refiere a la obtención de n-butanol.

Finalmente, en el estudio publicado por Matsumi [25] se registra el rendimiento experimental más alto para el butanol comparado con los datos experimentales reportados por los demás autores. Esta fermentación se realiza a un pH de 5 en donde se adicionó al cultivo metil vilógeno a una concentración de 0,5 mM con el fin de obtener un alto nivel de productividad de butanol [25], lográndose un rendimiento de 0,486 mol/mol glucosa, estando a un 20% del valor máximo calculado. Debido a que este valor experimental se acerca más al valor teórico reportado en este trabajo de 0,607 mol/mol glucosa se puede decir que la adición de metil viológeno puede usarse como estrategia para aumentar la productividad del butanol.

La función del metil viológeno consiste en actuar como un intermediario electrónico, aumentando así la generación de NADH, que favorece un alto nivel de productividad de n-butanol. Este comportamiento puede ser explicado con el hecho de que existe una relación lineal entre ambos metabolitos como se ha encontrado reportado en la literatura [25].

4. CONCLUSIONES

Se plantearon las reacciones que hacen parte de la ruta metabólica respetando las relaciones estequiométricas y considerando las reacciones de oxido-reducción, formación y consumo de energía en forma de ATP, con objeto de deducir la ecuación general de la ruta metabólica, que es una herramienta muy útil a la hora de realizar una estimación de las cantidades que se obtienen de los productos extracelulares.

Se determinó un modelo estequiométrico de la ruta fermentativa del *C. acetobutylicum* ATCC 824, que permitió por medio de la implementación de principios de optimización calcular el máximo rendimiento teórico posible de n-butanol, el valor de este rendimiento brinda una ayuda a la hora de comparar el diseño o la posibilidad de mejora de los procesos y la factibilidad de estos.

Se encontró que para alcanzar el rendimiento máximo de butanol de 0,607 mol/mol glucosa es necesario que no se consuma sustrato para la producción de otros metabolitos extracelulares como es el caso del ácido láctico.

5. RECOMENDACIONES

La reasimilación de los ácidos acético y butírico se da a condiciones de pH estrictos, haciéndose necesario un control de esta variable. Esto contribuye en gran medida a que se maximice la producción de n-butanol.

Es posible aumentar la productividad de n-butanol utilizando metil viologeno como intermediario electrónico, por lo que es recomendable investigar más acerca de este agente con el fin de incrementar los rendimientos de n-butanol al utilizarlo como un componente del medio de cultivo.

La realización de un trabajo experimental sería un gran complemento para este trabajo, por lo cual se sugiere corroborar los rendimientos teórico obtenidos en este trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] RODRÍGUEZ RUIZ José Alberto, *et al.* Producción Microbiológica de Butanol. En: BioTecnología. 2009. Vol. 13, no. 3.
- [2] Tendencias en el Uso de la Biotecnología en el Sector Químico, Centro Tecnológico de España 2008. Disponible en: <http://www.fedit.com/Spanish/DocumentosInformes/Portal/Publico/DocumentosEInformes/ObservatoriosIndustriales/Jornadas%20Difusi%C3%B3n%202009/OI-Qu%C3%ADmico.pdf>. Última consulta el 15 de julio 2012.
- [3] JARAMILLO OBANDO Juan Jacobo, CARDONA Carlos Ariel. Analysis of the production of biobutanol in the acetobutylc fermentation with clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 ATCC13564. En: Fac. Ingenieria Universidad de Antioquia. Octubre, 2010. No. 58, p. 36-45
- [4] SANG YUP Lee, *et al.* Fermentative Butanol Production by Clostridia. En: Biotechnol Bioeng. 2008. Vol. 101, no 2, p. 209-28.
- [5] JARAMILLO Juan. CARDONA Carlos. Análisis de la producción de biobutanol en la fermentación acetobutilica con *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564. En: Fac. Ing. Univ. Antioquia. Octubre, 2010. No. 58, p. 36-45.
- [6] GAPES J.R. The Economics of Acetone-Butanol Fermentation: Theoretical and Market Considerations. En: Microbiol. Biotechnol. 2000. Vol. 2, no. 1, p. 27-32.
- [7] GHESHLAGHI R, *et al.* Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. En: Biotechnology Advances. 2009. Vol. 27, p. 764 -781.

- [8] NOLLING J *et al.* Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. En: Journal of bacteriology. 2001. Vol. 186, no. 16, p. 4823–4838.
- [9] JONES, D. T., WOODS D. R. Acetone-butanol fermentation. En: Microbiological reviews. 1986. Vol. 50, no 4, p. 484-524.
- [10] SABATHE Fabrice, BELAICH Anne, SOUCAILLE Philippe. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. En: Microbiology Letters. 2002. Vol. 217, p.15-22.
- [11] CATO, E. P., FINEGOLD S. M. Genus *Clostridium*, Bergey's. En: Manual of Systematic Bacteriology, 1986. Vol. 2.
- [12] QURESHI Nasib, *et al.* Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. En: Bioresource Technology. 2008. Vol. 99, p. 5915-5922.
- [13] PAPOUTSAKIS, *et al.* Equations and calculation for fermentations of butyric acid bacteria. En: Biotechnol. Bioeng. 1984. Vol. 26, p. 174–187.
- [14] CAMPBELL Mary K., FARRELL Shawn O. Bioquímica. 4 ed. México: Thomson editores S.A, 2004.
- [15] HIDEAKI Shinto , YUKIHIRO Tashiro. Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production. En: Process Biochemistry. 2008. Vol. 43, p. 1452–1461.

- [16] DESAI Ruchir P., NIELSEN Lars K., PAPOUTSAKIS ELEFTHERIOS T. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints. En: Journal of Biotechnology. 1999. Vol. 71, p. 191–205.
- [17] TASHIRO Y., SONOMOTO K. Advances in butanol production by clostridia. En: Technology and education topics in applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2010. p. 1383-1394.
- [18] LLANERA Francisco, PICÓ Jesús. Stoichiometric modeling of cell metabolism. En: Journal of bioscience and bioengineering. 2008. Vol. 105, no. 1, p. 1-11.
- [19] MORA ESCOBAR Héctor. “GAMS, ejemplos introductorios” Disponible en: http://matematicas.unal.edu.co/hmora/gams_ejem.pdf. Última consulta el 01 de agosto 2012.
- [20] Entornos de optimización y servidor de NEOS. Disponible en: <http://www.neos-server.org/neos/>. Última consulta el 01 de agosto 2012.
- [21] FUCIÑOS V., PALLARES A. Selección de un modelo matemático y diseño de un sistema de control para la fermentación de glucosa empleando *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bucaramanga Santander: Universidad Industrial de Santander. Facultad Fisicoquímicas. 2011.
- [22] FREIERA D., GOTTSCHALK G. Lactate dehydrogenase of *Clostridium acetobutylicum* is activated by fructose-1,6-bisphosphate. En: Microbiology Letters. 1987. Vol. 43, no. 2, p. 229-233.
- [23] ROJAS C, GONZÁLES N. Diseño conceptual de un fermentador para la producción de n-butanol a partir de glucosa empleando *Clostridium acetobutylicum*

ATCC 824. Trabajo de grado Ingeniero Químico, Bucaramanga-Santander: Universidad Industrial de Santander. Facultad Fisicoquímicas. 2011.

[24] MEYER. C. The effect of bioreactor conditions on ATP supply and demand, electron flow, and product formation in the acetone/butanol fermentation. Tesis doctoral. Houston Texas. Estados Unidos: Rice University. 1987.

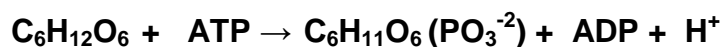
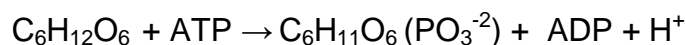
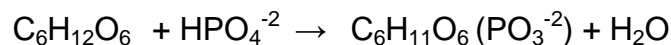
[25] SOMCHAI Chauvatcharin, *et al.* Metabolism Analysis and On-Line Physiological State Diagnosis of Acetone–Butanol Fermentation. En: Biotechnology and bioengineering. 1998. Vol. 58, no. 6, p. 561-571.

[26] Qureshi N, Meagher M, *et al.* Acetone butanol ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicalite–silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum*. En: Journal of Membrane Science. 2001. Vol. 187, p. 93–102.

Anexo A. Reacciones individuales de la ruta metabólica.

Glucólisis R1-R10

R1: Fosforilación de la glucosa catalizada por la enzima Hexoquinasa (fosforo transferasa).



Glucosa

Glucosa-6-Fosfato

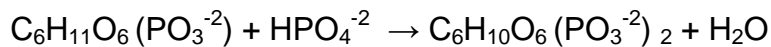
R2: Isomerización de la glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato catalizada por la enzima fosfohexosa isomerasa.



Glucosa-6-Fosfato

Fructosa-6-fosfato

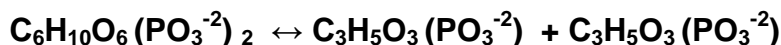
R3: Fosforilación de fructosa-6-fosfato catalizada por la enzima fosforo fructoquinaza.



Fructosa-6-fosfato

Fructosa-1,6-bifosfato

R4: Ruptura del anillo cíclico de la Fructosa-1,6-bifosfato catalizada por la enzima Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa.



Fructosa-1,6-bifosfato

Dihidroxi-acetona fosfato

Glicerandehído-3-fosfato

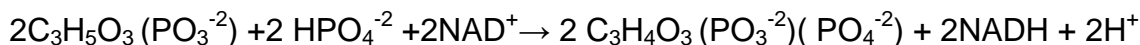
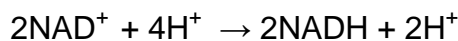
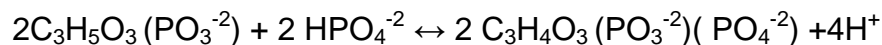
R5: Isomerización de Dihidroxi-acetona fosfato a Glicerandehído-3-fosfato catalizada por la enzima Triosa fosfato isomerasa.



Dihidroxi-acetona fosfato

Glicerandehído-3-fosfato

R6: Fosforilación del Glicerandehído-3-fosfato a 1,3-bifosforo glicerato catalizada por la enzima glicerandehído-3-fosfato deshidrogenasa.

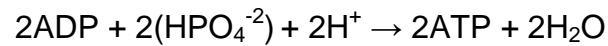
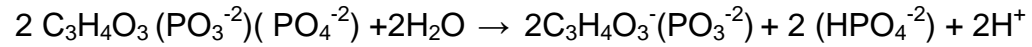


Glicerandehído-3-fosfato

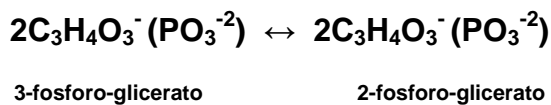
Fosforilo Inorgánico

1,3-bifosforo glicerato

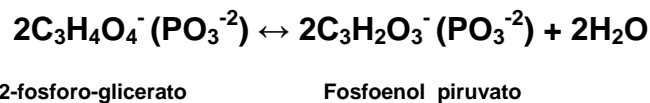
R7: Transferencia del grupo fosforilo al ADP catalizada por la enzima Fosfo-glicerato quinasa.



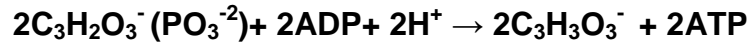
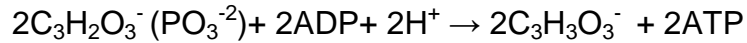
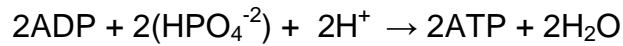
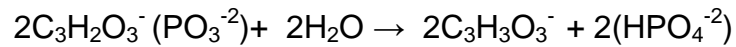
R8: Isomerización del 3-fosforo-glicerato al 2-fosforo-glicerato catalizada por la enzima fosforo glicerato quinasa.



R9: Deshidratación del 2-fosforo-glicerato a fosfoenol piruvato catalizado por enolasas.



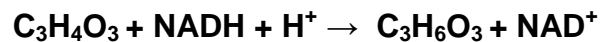
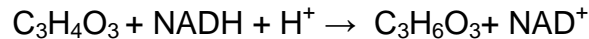
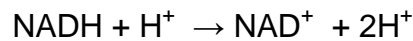
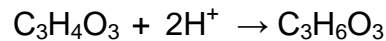
R10: Transferencia del grupo fosforilo desde el fosfoenol piruvato al ADP catalizada por piruvato quinasa.



Fosfoenol piruvato

Piruvato

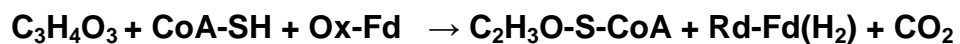
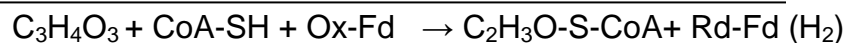
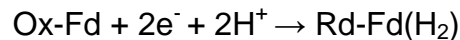
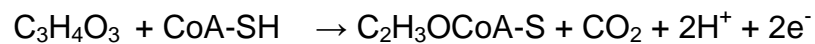
R11: Conversión de Piruvato a Lactato catalizado por la enzima lactato deshidrogenasa.



Piruvato

Ácido Láctico

R12: Formación de Acetil-CoA catalizada por la enzima piruvato ferredoxin oxidoreductasa.



Piruvato

Coenzima A

Ferredoxina
Oxidada

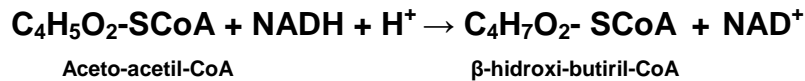
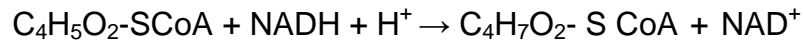
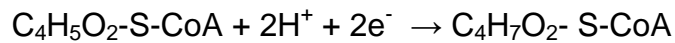
Acetil-CoA

Ferredoxina
reducida

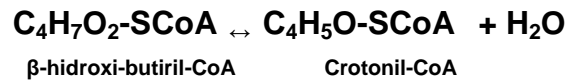
R13: Condensación de Acetil-CoA para la formación de Aceto-acetil-CoA catalizada por Acetil transferasas.



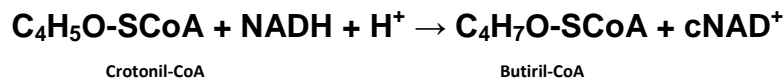
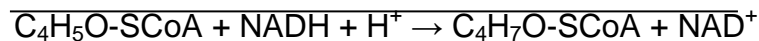
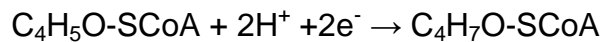
R14: Formación de β -hidroxi-butiril-CoA catalizada por β -hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa.



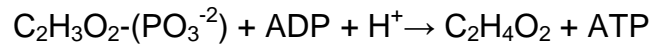
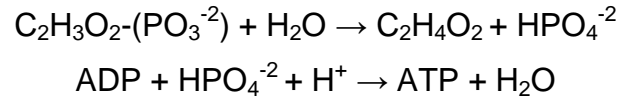
R15: Deshidratación del β -hidroxi-butiril-CoA para producir Crotonil-CoA, catalizada por crotonasa (hidratasa)



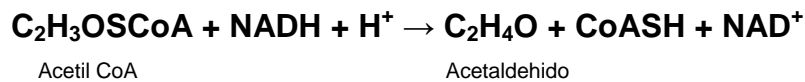
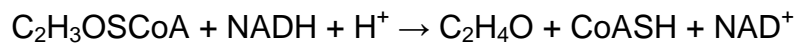
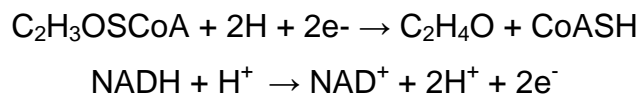
R16: Formación de Butiril CoA a partir de Crotonil CoA catalizada por Butiril-CoA deshidrogenasa



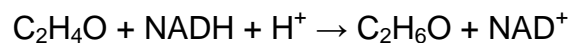
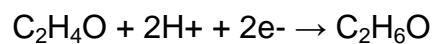
R20: Formación de Acetato a partir de Acetil fosfato catalizada por Fosfato quinasa

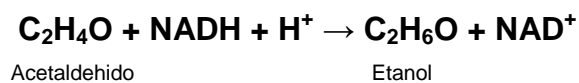


R21: Formación de Acetaldehído a partir de Acetil-CoA

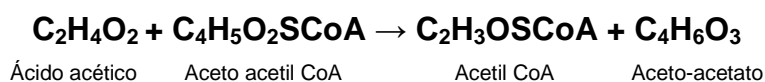


R22: Formación de Etanol a partir de Acetaldehído catalizada por Etanol deshidrogenasa

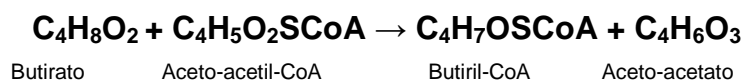




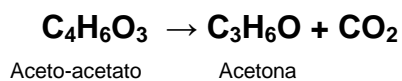
R23: Formación de Acetoacetato a partir de Acetato



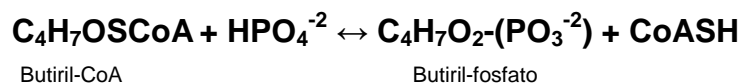
R24: Formación de Acetoacetato por reasimilación de Butirato



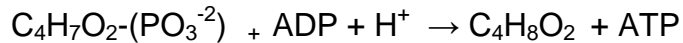
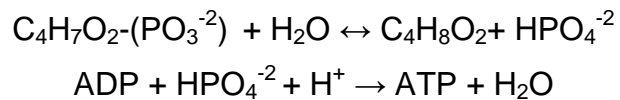
R25: Formación de Acetona a partir de Aceto-Acetato catalizada por Aceto-acetato descarboxilasa



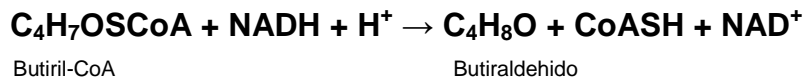
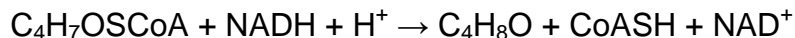
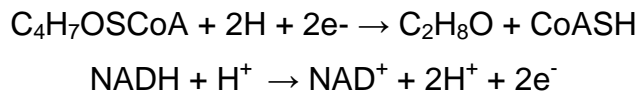
R26: Formación de Butiril fostato a partir de Butiril-CoA



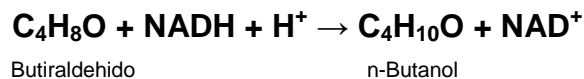
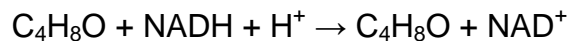
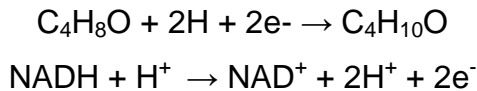
R27: Formación de butirato a partir de Butiril fostato catalizada por Butirato quinasa



R28: Formación de Butiraldehído a partir de Butiril-CoA catalizada por Butiraldehído deshidrogenasa



R29: Formación de n-Butanol a partir de Butiraldehído catalizada por Butanol deshidrogenasa



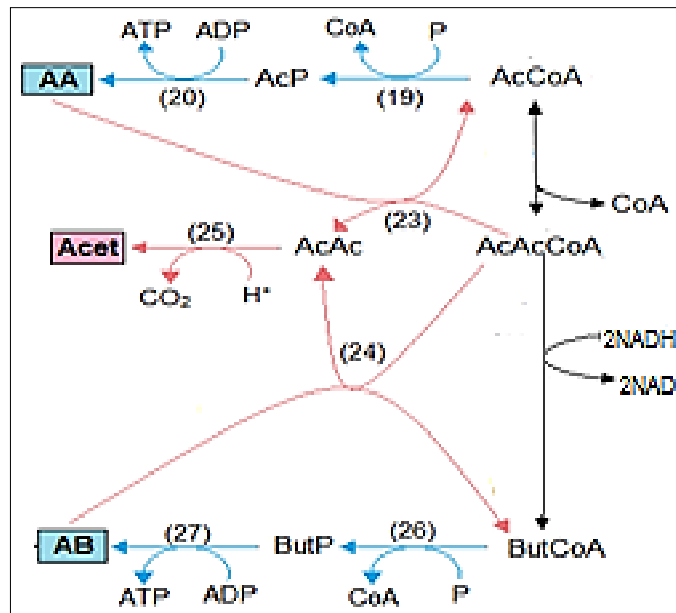
Anexo B. Simplificaciones de la ruta metabólica.

Para la deducción del modelo estequiométrico es necesario realizar una serie de simplificaciones para reducir en número de reacciones que estarán presentes en el mismo y eliminar las singularidades que anteriormente han sido reportadas en la literatura [16], sin embargo esto no quiere decir que la información aportada por algunas reacciones vaya a ser omitida. En la siguiente sección se muestran cada una de estas simplificaciones y se proporciona al lector el fundamento teórico por el cual son válidas.

SINGULARIDADES

La ruta metabólica tiene algunas singularidades que no permiten que obtenga un modelo estequiométrico al igual que lo hizo Papoutzakis (1984), solucionando el sistema de ecuaciones lineales utilizando técnicas basadas en matrices. En este modelo, cuando se intenta solucionar el sistema de ecuaciones se obtiene una matriz singular lo que significa que las soluciones pueden ser infinitas o no tener ninguna. Por tal motivo se realizó nuevamente una revisión bibliográfica y se pudo encontrar que los responsables de esta singularidad son la formación y reasimilación de los ácidos acético y butírico [16]. En la figura se muestran las reacciones que involucran los flujos de reasimilación y producción de los ácidos.

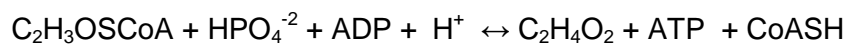
Figura 3. Singularidades presentes en la ruta metabólica por la producción y reasimilación de Ácidos acético y butírico R22 y R24.



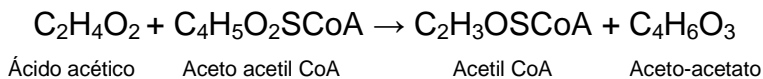
A continuación se realiza las simplificaciones pertinentes y se obtienen reacciones netas para la producción de acetona, que es la finalidad de la reasimilación de los ácidos, esta técnica de agrupación fue realizada por Papoutzakis (1984) para el desarrollo de una ecuación estequiométrica que describe la relación entre la formación de productos y biomasa en fermentaciones de *Clostridios*. [13]

Esta técnica ayuda a reducir las singularidades del modelo estequiométrico aunque desafortunadamente también contribuye a la pérdida de información concerniente a la fisiología de la reasimilación de lo ácidos debido a que no se conoce la cantidad exacta reasimilada de ambos [16]. Asumiendo que las relaciones estequiométricas se conservan, se llega a la suposición que la cantidad reasimilada de los ácidos es una mol.

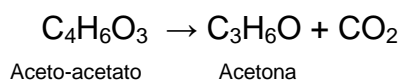
Producción (R19-R20) y reasimilación de Ácido acético (R23)



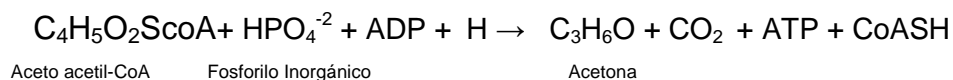
Acetil-CoA Fosforilo Inorgánico Ácido Acético



Ácido acético Aceto acetil CoA Acetil CoA Aceto-acetato

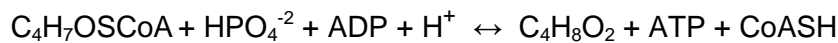


Aceto-acetato Acetona

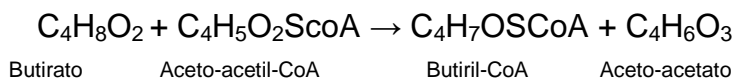


Aceto acetil-CoA Fosforilo Inorgánico Acetona

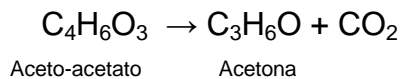
Producción (R26-R27) y reasimilación de Ácido butírico (R24)



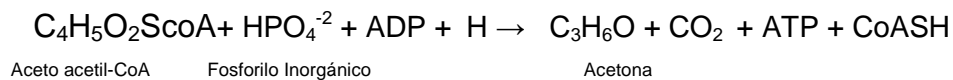
Butiril-CoA Fosforilo Inorgánico Ácido Bútrico



Butirato Aceto-acetil-CoA Butiril-CoA Aceto-acetato

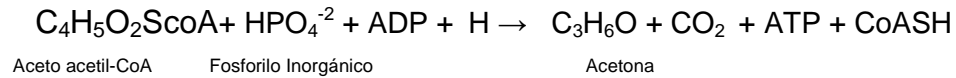


Aceto-acetato Acetona

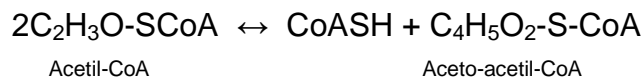


Aceto acetil-CoA Fosforilo Inorgánico Acetona

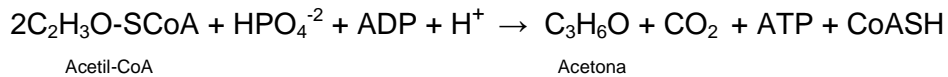
Reasimilación de ácidos butírico y acético se puede expresar como la siguiente reacción:



La cual puede ser acoplada directamente con la reacción de equilibrio que muestra la conversión de Acetil-CoA a Acetoacetil-CoA.

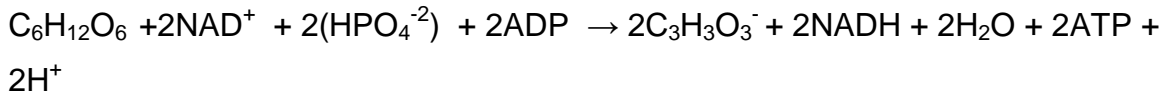


Y se obtiene la siguiente reacción neta para la producción de acetona :

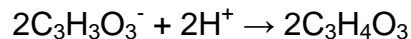


Las reacciones netas que reducen las singularidades son las siguientes:

- Reacción global de la vía glucolítica: acoplando las reacciones R1-R10



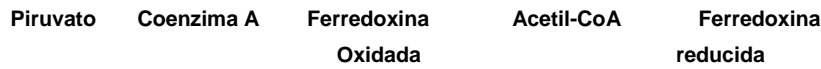
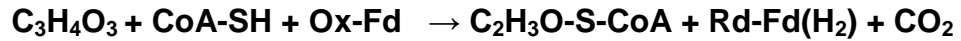
Por razones de simplicidad de toma el piruvato sintetizado en la glucólisis como ácido pirúvico.



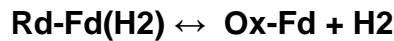
Se reescribe la reacción global de la glucólisis como sigue:



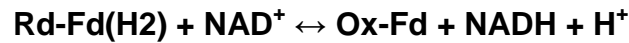
- La formación de Acetil-CoA a partir del piruvato esta dada por la siguiente reacción:



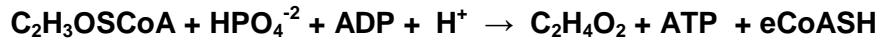
- Formación de hidrógeno: R17



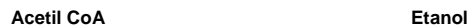
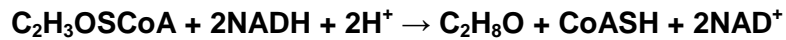
- Regeneración de Ferredoxina: R18



- Síntesis de Ácido acético: acoplamiento de R19 y R20



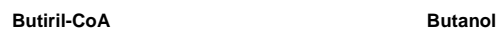
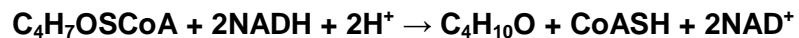
- Síntesis de Etanol: acoplamiento de R21 Y R22



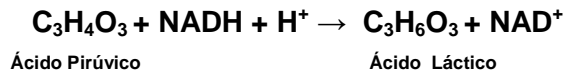
- Síntesis de Ácido butírico: Acoplamiento de R26 y R27



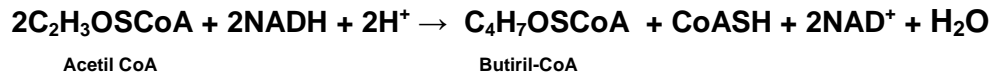
- Síntesis de Butanol: Acoplamiento de R28 y R29



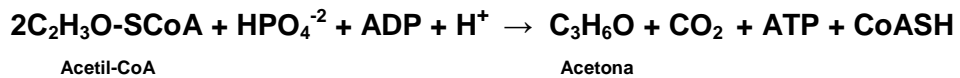
- Síntesis de Ácido láctico: R11



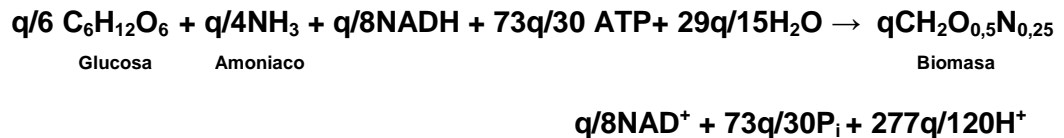
- Síntesis de Butiril-CoA



- Síntesis de acetona



- Síntesis de Biomasa



La ecuación que muestra la síntesis de biomasa se puede simplificar aún mas cuando se realiza un balance de carbono y se hace la suposición el nitrógeno incorporado en la biomasa proviene únicamente de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio que generalmente son; sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) y el extracto de levadura.

El literatura se ha encontrado que generalmente las la contribución de nitrógeno proveniente de ambas fuentes suele ser la misma [23, 24, 25].

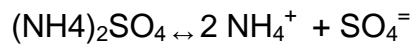
A continuación se calcula el aporte nitrógeno y se realiza un balance del mismo para calcular el valor máximo que puede alcanzar el coeficiente de la biomasa si se consume todo el nitrógeno para su síntesis.

El porcentaje presente de nitrógeno en el extracto de levadura es aproximadamente 12,5% p/p, en la composición del medio reportada en el trabajo de Rojas y Gonzáles (2011) la concentración utilizada es de 5g/L y 2g/L para el extracto de levadura y sulfato de amonio respectivamente. Por lo que se puede calcular la cantidad aportada de nitrógeno en forma de NH_4^+ por el extracto de levadura que es 0,0446 mol/L.

El cálculo para el sulfato de amonio es diferente, debido a que es una sal se debe tener en cuenta la disociación de la misma, a continuación se muestra el procedimiento de cálculo para la cantidad aportada de nitrógeno:

Se sabe que: $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 2\text{g/L} = 0,1515 \text{ mol/L}$

La reacción de disociación es la siguiente:



$$0,1515 \frac{\text{mol } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}{\text{L}} * \frac{2\text{mol } \text{NH}_4^+}{1\text{mol } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = 0,0303 \frac{\text{mol } \text{NH}_4^+}{\text{L}}$$

Sumando las dos contribuciones, se obtiene el valor total de la cantidad de nitrógeno en forma de NH_4^+ que se fija en la biomasa de 0,075 mol/L. Del coeficiente de la fuente de nitrógeno en la ecuación de la biomasa se puede calcular la cantidad máxima que se produce de biomasa:

$$\frac{q}{4} = 0,075 \frac{\text{mol}}{\text{L}} ; q = 0,3 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Anexo C. Cálculo de coeficientes con ayuda de los rendimientos termodinámicos teóricos máximos.

Para el cálculo de los rendimientos máximos se asume que todo el sustrato se utiliza para la formación de un único producto, o biomasa. Conociendo los grados de reducción de cada compuesto, se pueden calcular los coeficientes estequiométricos y el valor obtenido serán los límites superiores de los posibles valores que estos pueden llegar a tomar.

Grados de reducción

Es el número de moles de e- disponibles en un compuesto orgánico por mol de átomos de carbono para la oxidación (combustión) a CO₂ o H₂O y CO₂

$$\Psi = \frac{N^{\circ} \text{ de electrones disponibles}}{\text{Mol de átomo de carbono}}$$

$$\Psi_{Glucosa} = \frac{6(4) + 12(1) - 6(2)}{6} = 4$$

$$\Psi_{Lactato} = \frac{3(4) + 6(1) - 3(2)}{3} = 4$$

$$\Psi_{Biomasa} = \frac{1(4) + 2(1) - 0.5(2) - 0.25(3)}{1} = 4,25$$

$$\Psi_{Acetato} = \frac{2(4) + 4(1) - 2(2)}{2} = 4$$

$$\Psi_{Acetona} = \frac{3(4) + 6(1) - 1(2)}{3} = 5,33$$

$$\Psi_{Acido\ butirico} = \frac{4(4) + 8(1) - 2(2)}{4} = 5$$

$$\Psi_{Etanol} = \frac{2(4) + 6(1) - 1(2)}{2} = 6$$

$$\Psi_{Butanol} = \frac{4(4) + 10(1) - 1(2)}{4} = 6$$

$$\Psi_{H_2} = \frac{2}{1} = 2$$

Los grados de reducción de las sustancias de referencia son iguales a cero

$$\Psi_{CO_2} = 0 \quad \Psi_{H_2O} = 0 \quad \Psi_{Amoniac} = 0$$

Rendimientos termodinámicos teórico máximos

Si todos los electrones disponibles del sustrato se utilizan para la síntesis de un único producto es posible determinar los coeficientes máximo posibles.

$$1 = \frac{(\# \text{ atom de C de sust})(Coef Esteq de sust)(Grad de reducción del sust)}{(\# \text{ atom de C de prod})(Coef Esteq de prod)(Grad de reducción del prod)}$$

$$\begin{aligned} (1)(6)\Psi_{Glucosa} &= l(3)\Psi_{Ácido\ Láctico} \\ 6(4) &= 3(4)l \\ \mathbf{l} &= \mathbf{2} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (1)(6)\Psi_{Glucosa} &= h(4)\Psi_{Acido\ Butírico} \\ 6(4) &= (4h)(5) \\ \mathbf{h} &= \mathbf{1,2} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (1)(6)\Psi_{Glucosa} &= q(1)\Psi_{Biomasa} \\ 6(4) &= 1(4,25)q \\ \mathbf{q} &= \mathbf{5,65} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (1)(6)\Psi_{Glucosa} &= f(2)\Psi_{Etanol} \\ 6(4) &= (2f)(6)b \\ \mathbf{f} &= \mathbf{2} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (1)(6)\Psi_{Glucosa} &= e(2)\Psi_{Ácido\ Acético} \\ 6(4) &= 2(4)e \\ \mathbf{e} &= \mathbf{3} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (1)(6)\Psi_{Glucosa} &= i(4)\Psi_{Butanol} \\ 6(4) &= (4i)(6) \\ \mathbf{i} &= \mathbf{1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (1)(6)\Psi_{Glucosa} &= k(3)\Psi_{Acetona} \\ 6(4) &= 3k(5,33) \\ \mathbf{k} &= \mathbf{1,5} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (1)(6)\Psi_{Glucosa} &= c(2)\Psi_{H_2} \\ 6(4) &= (2c)(2) \\ \mathbf{c} &= \mathbf{6} \end{aligned}$$