

**ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUXES (FBA) DE LA PRODUCCIÓN DE 1,3-
PROPANODIOL POR CLOSTRIDIUM BUTYRICUM A PARTIR DE GLICEROL**

**KEVIN ANDRÉS BLANCO MANTILLA
EDITH JOHANA DÍAZ CAÑAS**

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

2017

**ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUXES (FBA) DE LA PRODUCCIÓN DE 1,3-
PROPANODIOL POR CLOSTRIDIUM BUTYRICUM A PARTIR DE GLICEROL**

**KEVIN ANDRÉS BLANCO MANTILLA
EDITH JOHANA DÍAZ CAÑAS**

Trabajo de Grado para optar por el título de Ingeniero Químico

**Director:
CARLOS EDUARDO GARCÍA SÁNCHEZ
PhD. en Ingeniería Química**

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

2017

DEDICATORIA

A Dios por iluminarme en esta larga y hermosa experiencia y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres Alix y Omar por ser siempre el motor que impulsaba cada uno de mis esfuerzos, por formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.

A mi hermana Marly que siempre ha estado junto a mí, brindándome su apoyo y ayudándome a salir adelante ante todas las dificultades.

A mis tíos que hicieron que este logro fuera posible Ligia, Alirio, Nelly y Jose Luis Mantilla, quienes siempre estuvieron pendientes y han sabido guiarme para culminar mi carrera profesional.

A María José Mantilla que creció a mi lado y es como una hermanita para mí.

A mi novia Hildreth y a mis amigos que gracias a Dios son muchos que siempre estuvieron a mi lado en los mejores y peores momentos.

A mi compañera Edith, gracias a ella y a nuestros grandes esfuerzos logramos concluir con éxito esta investigación, de igual manera a nuestro director Carlos, gracias por sus enseñanzas, correcta instrucción y paciencia.

Kevin Blanco Mantilla.

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi baluarte, mi fortaleza y mi todo.

A mis padres, Blanca Aurora y Aureliano, por ser el motivo de cada paso que doy
en la vida.

A mis hermanos, Liz y Alejandro, por impulsar mi vida a ser cada vez mejor.

A Aracely Mora, por ser un ángel en el camino, apoyarme en cada momento difícil
y acogerme en su casa como parte de la familia.

A Camilo Jara, por su interminable paciencia, su amor y su apoyo incondicional.

A Brayan Moreno, por acompañarme en éste recorrido, ser mi mejor amigo y
enseñarme tanto de la vida. En tu compañía la vida siempre es alegría

A Mayra Muñoz, Paola Plata y Daniel Rincón, por ser mis amigos, confidentes y
concejeros.

A Kevin Blanco, mi compañero de lucha en éste trabajo.

Edith Díaz Cañas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander, por procurar el bienestar de los estudiantes, mediante subsidios, comedores, apoyo psicosocial y académico a través de PAMRA. Gracias a ésto nos fue posible esta meta.

A la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander por procurar una excelente formación académica y contribuir con nuestro crecimiento personal.

Al Centro Desarrollo Tecnológico del Gas (CDT de Gas) y de igual manera a nuestro director Carlos Eduardo García por su paciencia, confianza y disponibilidad para llevar a cabo este trabajo.

A nuestros familiares y amigos quienes nos apoyaron y motivaron para sacar adelante este trabajo.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa o indirectamente a la realización de este proyecto.

A Dios por ser nuestro soporte y fortaleza.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. GENERALIDADES	20
1.1. MODELAMIENTO METABÓLICO CELULAR	20
1.2. MODELO ESTEQUIOMÉTRICO	21
2. ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUX (FBA)	25
2.1. MODELO METABÓLICO DE CLOSTRIDIUM BUTYRICUM	28
2.1.1. GLICEROL.....	28
2.1.2. 1,3-Propanodiol (1,3-PD).	29
2.1.3. Producción de 1,3-Propanodiol por Clostridium butyricum.	30
3. METODOLOGÍA	34
3.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	35
3.2 SELECCIÓN DEL MODELO METABÓLICO Y FUNCIONES OBJETIVO	35
3.3 SELECCIÓN DE RESTRICCIONES.....	36
3.4 SELECCIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES.....	36
3.5 SELECCIÓN DE SOFTWARE	37
3.6. COMPARACIÓN DE FUNCIONES OBJETIVO	38
3.7. EVALUACIÓN DE DELECCIONES GENÉTICAS	38
3.8 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y ESCRITURA DEL INFORME	39
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	40

4.1. RED METABÓLICA DE CLOSTRIDIUM BUTYRICUM.....	40
4.2 MATRIZ ESTEQUIOMÉTRICA	40
4.3. FORMULACIÓN DE LA PROGRAMACIÓN LINEAL	43
4.4. EVALUACIÓN DEL ERROR EN LAS PREDICCIONES	43
4.5. RESULTADO DE LAS DELECCIONES GENÉTICAS.....	46
4.6 ANÁLISIS.....	48
5. CONCLUSIONES	51
6. RECOMENDACIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS.....	66

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ejemplo de un esquema de reacción metabólica	22
Figura 2. Representación de una red de reacciones y el Análisis del Balance de Flujos (FBA).	27
Figura 3. Representación gráfica del metabolismo central de Clostridium butyricum	32
Figura 4. Diagrama de bloques. Descripción metodológica	34
Figura 5. Modelo estequiométrico central de Clostridium butyricum.	40
Figura 6. Diferencias evaluadas de las diferentes funciones objetivo en FBA para la Clase 1 de datos	44
Figura 7. Diferencias evaluadas de las diferentes funciones objetivo en FBA para la Clase 3 de datos	45
Figura 8. Diferencias evaluadas de las diferentes funciones objetivo en FBA para la Clase 4, de datos.	45
Figura 9. Diferencias evaluadas en FBA para las Clases de datos implementando las deleciones genéticas.	47

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tipo de restricciones más frecuentes	24
Tabla 2. Abreviaciones metabólicas	42

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A: Conjunto de datos experimentales reportados.....	66
ANEXO B: Matriz Estequiométrica.....	68
ANEXO C: Nombre de las reacciones.	69
ANEXO D: Vectores C utilizados en los diferentes fluxes.....	70
ANEXO E: Diferencias Euclidianas.....	71
ANEXO F: Resultados Deleciones.....	72

RESUMEN

TÍTULO: ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUXES (FBA) DE LA PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL POR *Clostridium butyricum* A PARTIR DE GLICEROL*

AUTORES: KEVIN ANDRÉS BLANCO MANTILLA, EDITH JOHANNA DÍAZ CAÑAS**

PALABRAS CLAVE: Flux metabólico, modelamiento estequiométrico, FBA, función objetivo, *Clostridium butyricum*.

El Análisis de Balance de Flux (Flux Balance Analysis - FBA) busca predecir cuantitativamente el comportamiento de los fluxes en un microorganismo. La eficacia de los análisis en el comportamiento metabólico celular de la especie en estudio depende del modelo metabólico, de la función objetivo y de la calidad de los datos experimentales disponibles.

En este trabajo, se evaluó la capacidad predictiva del FBA por medio de la selección de la mejor función objetivo, entre varias funciones objetivos propuestas, para *Clostridium butyricum* con glicerol como sustrato. Como dato de entrada para analizar la eficacia del FBA en este microorganismo se utilizó únicamente la ingesta de glicerol. Como base del análisis comparativo para el poder predictivo del FBA, se emplearon 23 experimentos reportados en la literatura, en los cuales se determinaron valores de ingesta y excreción de diversos metabolitos en el crecimiento de *Clostridium butyricum*.

El resultado del estudio computacional de los fluxes metabólicos evaluados en este trabajo arrojó que la mejor función objetivo es “optimización de 1,3-Propanodiol”. Este resultado se obtuvo por medio del análisis de las diferencias euclidianas entre los valores predichos por la técnica y una serie de datos experimentales reportados en la literatura, y usando un modelo de metabolismo central. Adicionalmente, se evaluó el efecto de varias modificaciones genéticas propuestas para incrementar la producción de 1,3-Propanodiol, usando las funciones objetivo “optimizar 1,3-propanodiol” y “optimizar producción de biomasa”. Se evidenció que las delecciones propuestas conducían a idénticos resultados del FBA respecto al caso base (sin delecciones).

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director Carlos Eduardo García Sánchez PhD.

ABSTRACT

TITLE: FLUX BALANCE ANALYSIS (FBA) OF PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL BY *Clostridium butyricum* FROM GLYCEROL.

AUTHOR: KEVIN ANDRÉS BLANCO MANTILLA, EDITH JOHANNA DÍAZ CAÑAS **

KEYWORDS: Metabolic fluxes, modeling stoichiometric, FBA, objective function, *Clostridium butyricum*.

The Flux Balance Analysis (FBA) seeks to quantitatively predict the behavior of fluxes in a microorganism. The efficacy of the analyzes on the cellular metabolic behavior of the species under study depends on the metabolic model, the objective function and the quality of the available experimental data.

In this work, the predictive capacity of FBA was evaluated by selecting the best objective function, among several objective functions proposed, for *Clostridium butyricum* with glycerol as substrate. As input data to analyze the efficacy of FBA in this microorganism was used only the intake of glycerol. As a basis of the comparative analysis for the predictive power of the FBA, 23 experiments reported in the literature were used, in which values of ingestion and excretion of several metabolites in the growth of *Clostridium butyricum* were determined.

The result of the computational study of the metabolic fluxes evaluated in this work showed that the best objective function is "optimization of 1,3-Propanediol". This result was obtained by analyzing the Euclidean differences between the values predicted by the technique and a series of experimental data reported in the literature, and using a central metabolism model. Additionally, the effect of several proposed genetic modifications to increase the production of 1,3-Propanediol was evaluated using the objective functions "optimize 1,3-propanediol" and "optimize biomass production". It was evidenced that the proposed deletions led to identical FBA results with respect to the base case (no deletions).

* Grade Work

** Faculty of Physical-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director Carlos Eduardo García Sánchez PhD.

INTRODUCCIÓN

Debido al incremento de conciencia respecto al impacto de las actividades humanas, existe un interés generalizado por fomentar las producciones sostenibles y sustentables (Carrillo González, 2013). La biotecnología industrial tiene gran potencial para transformar la producción de energía, reduciendo los gases de efecto de invernadero, el uso de combustibles petroquímicos y desarrollando industrias más limpias y ecoeficientes (Montoya Castaño & Aragón Caycedo, 2010).

Las cadenas de aceite y azúcar son las mejor posicionadas actualmente respecto a la producción de biocombustibles, siendo el bioetanol y el biodiésel sus productos más representativos. Por lo anterior, surge la necesidad de investigar diversas mejoras en la cadena de producción de biodiésel. La conversión de biomasa y el uso de microorganismos en la producción de biodiésel son alternativas promisorias que generarían beneficios ambientales y ganancias energéticas para las cuales existe abundante materia prima (Yazdani & Gonzalez, 2007).

La industria del biodiésel, como fuente de energía alternativa y sustentable, ha venido en aumento gracias a que disminuye la contaminación ambiental, porque a mayor mezcla de aceite con diésel es menor la emisión de CO₂, CO e hidrocarburos (CH₄)-metano, butano, benceno, benzopireno y óxidos de nitrógeno (Cucaita Vasquez, 2010). El biodiesel es obtenido a través de una transesterificación catalizada entre aceites vegetales (triglicéridos) y un alcohol (usualmente etanol), y origina glicerol como principal subproducto. Se producen alrededor de 10 libras de glicerol por cada 100 libras de biodiésel (Wen, Pyle, & Athalye, 2009). El glicerol obtenido del proceso de biodiesel presenta un alto

contenido de contaminantes, como cenizas, metanol, agua y ácidos grasos. En Colombia, purificar el glicerol económicamente no es viable, debido al alto costo que representa realizar procesos como la absorción de carbono activado, cromatografía de exclusión de iones y cationes, cromatografía de intercambio de aniones y cationes, tren de evaporización relámpago y evaporación de circulación forzada. Una alternativa de solución al problema estaría en el desarrollo de la química del glicerol, que sería una estrategia sostenible que abriría camino a nuevas biorefinerías en la industria (Montoya Castaño & Aragón Caycedo, 2010).

Entre las alternativas de uso del glicerol como fuente de carbono, está la producción de 1,3-propanodiol (1,3-PD). El 1,3-propanodiol es de gran interés a nivel industrial, gracias a sus potenciales propiedades a escala comercial (Leja, Czaczyk, & Myszka, 2011) (Chen, Liu, & Liu, 2011), particularmente para producir monómeros de plásticos con propiedades especiales, como lo es el co-polímero (politri-metilentereftalato) (PTT) y el (etileno tereftaleno) (PET), además es usado como intermedio químico en la síntesis de compuestos para las industrias químicas, farmacéuticas y de alimentos (Domingues Ferreira, 2013) (Cho, Jang, Moon, Lee, & Lee, 2015).

El 1,3-propanodiol es producido por vía química mediante dos métodos (hidratación de acroleína e hidroformilación de óxido de etileno) y por vía biotecnológica utilizando el glicerol como sustrato para la bioconversión bacteriana (Zeng & Biebl, 2002). Dentro de los organismos capaces de sintetizarlo, se encuentran los géneros *Clostridium*, *Klebsiella* y *Citobacter* (Biebl, Menzel, Zeng, & Deckwer, 1999). La obtención de 1,3-propanodiol desde el glicerol es natural y no hay registros de otras conversiones anaeróbicas a partir de otros sustratos orgánicos (Nakamura & Whited, 2003) (Biebl, Menzel, Zeng, & Deckwer, 1999).

El conocimiento de la fisiología y metabolismo celular ha contribuido a mejorar la producción de 1,3-PD, mediante la bioingeniería enfocada a los cultivos bacterianos (Stephanopoulos, Aristidou, & Nielsen, 1998). Los métodos computacionales juegan un importante papel en el entendimiento de las complejas interacciones bioquímicas que ocurren dentro de la célula. Herramientas de modelamiento matemático, como el Análisis de Balance de Flux (FBA) han sido probadas efectivamente en el análisis de redes metabólicas (Gong, Liu, Feng, & Zhang, 2009). Una de las razones para el éxito del FBA es que se basa en el modelamiento estequiométrico, que evita las dificultades presentadas en el desarrollo de modelos dinámicos. El modelado estequiométrico comprende los análisis basados en la representación de la red metabólica por medio de una matriz estequiométrica, la cual surge de asumir que el metabolismo se encuentra en estado estacionario, y por consiguiente que las tasas de cambio de las concentraciones de los diferentes metabolitos son cero, de modo que en vez de tener un sistema de ecuaciones diferenciales lineales se tiene un sistema de ecuaciones lineal (Llaneras & Picó, 2008) (Raman & Chandra, 2009).

El éxito de las predicciones obtenidas por un FBA depende altamente de cuatro factores: la correcta definición del sistema metabólico, la función objetivo que se use, el modelo metabólico desarrollado y las restricciones del sistema (las capacidades del metabolismo celular) (Llaneras & Picó, 2008).

Este trabajo busca realizar un aporte a los estudios sobre el FBA, por medio de un análisis computacional de los fluxes metabólicos de la producción de 1,3-Propanodiol por *Clostridium butyricum* creciendo en glicerol. Se propone un modelo del metabolismo central de *Clostridium butyricum*, incluyendo las rutas de ingesta de glicerol y de producción de 1,3-Propanodiol. Se selecciona por medio de comparación con datos experimentales hallados en la literatura, entre varias funciones objetivo propuestas para el FBA aquella que mejor represente el crecimiento de *Clostridium butyricum* en glicerol, y por último se analiza las

restricciones internas de la red metabólica y se sugiere deleciones genéticas que podrían incrementar la producción de 1,3-Propanodiol.

1. GENERALIDADES

1.1. MODELAMIENTO METABÓLICO CELULAR

El metabolismo es el conjunto de las reacciones químicas que tienen lugar dentro de cada célula que forma un organismo. El metabolismo provee la energía necesaria para los procesos vitales, así como los compuestos con los que se sintetizan las diferentes estructuras y materiales que requiere el organismo. Las miles de reacciones químicas catalizadas por enzimas en el interior de la célula se encuentran organizadas en muchas secuencias de reacciones diferentes, llamadas rutas o vías, en las que el producto de una reacción pasa a ser el reactivo de la siguiente (Nelson & Cox, 2005).

Los sistemas metabólicos se caracterizan porque presentan variables que hacen que las concentraciones de los metabolitos puedan cambiar en pequeños intervalos de tiempo; y parámetros como las constantes cinéticas pueden presentar cambios dentro del tiempo de evolución del mismo. (Ebenhöh & Heinrich, 2000).

Los avances recientes permiten la producción (y la codificación computacional) de modelos de redes metabólicas, reconstruidas a partir de secuencias genómicas, y están incrementando la convergencia entre el número de metabolitos estimados por vía genómica y los resultados medidos experimentalmente. Este tipo de enfoques permiten ahora entender la génesis de los biomarcadores metabólicos, el progreso de enfermedades y sus modos de acción, eficacia y efectos de toxicidad de los medicamentos farmacéuticos y el rendimiento en las producciones industriales por vías biológicas (Kell, 2006).

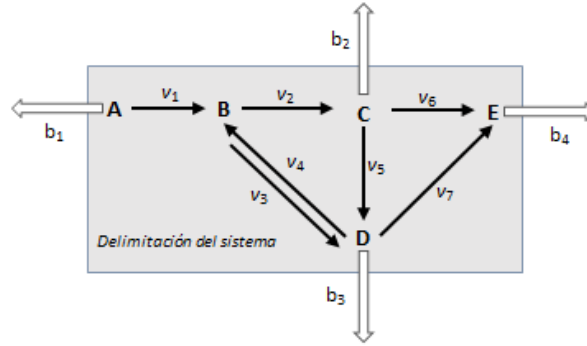
Una clasificación simple de las técnicas de modelamiento podría ser: a) basadas en interacciones, con las que se obtiene una representación basada en grafos para representar la red metabólica (modelos estáticos), b) basadas en restricciones que involucran el modelado estequiométrico (modelos estáticos), y c) modelos mecanísticos, que involucran tanto parámetros cinéticos como estequiométricos (modelos dinámicos) (Raman & Chandra, 2009).

1.2. MODELO ESTEQUIOMÉTRICO

”Modelado estequiométrico” es un término utilizado para agrupar los métodos basados en la representación del metabolismo celular que comparten dos características: el aprovechamiento de la estructura detallada de los modelos, y la asunción de estado estacionario para los metabolitos internos, con lo cual no se considera la cinética de las reacciones intracelulares (Llaneras & Picó, 2008)

Una red metabólica está definida por un conjunto de componentes (nodos) y un conjunto de fluxes que conectan algunos compuestos con otros (flechas) (ver Figura 1). La información estequiométrica incluida en una red metabólica con m metabolitos y n reacciones puede ser representada por una matriz estequiométrica, en donde las filas corresponden a los metabolitos y las columnas a las reacciones. Los valores numéricos que se incluyen en la matriz representan la información de cada reacción en la columna respectiva, indicando la cantidad consumida o producida del metabolito representado en la fila; el consumo se representa con signo negativo y la producción con signo positivo. Esta matriz es de gran importancia porque representa la traducción del conocimiento biológico a términos matemáticos (Llaneras y pico. 2007).

Figura 1. Ejemplo de un esquema de reacción metabólica



La Figura 1 representa 5 metabolitos y 11 *fluxes* (7 *fluxes* internos y 4 *fluxes* externos), en donde los nodos representan los metabolitos o sustancias que se consumen y/o producen, y la magnitud de las flechas representa los *fluxes* que dan lugar a la transformación de unos metabolitos a otros. Adaptado de (Schilling, Edwards, Letscher, & Palsson, 2000).

La definición de la matriz estequiométrica parte del balance de masa de todos los metabolitos, que se puede representar matemáticamente por medio de un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias (Raman & Chandra, 2009)

$$\frac{dc}{dt} = S \cdot v - \mu \cdot c \quad [1]$$

Donde la derivada de izquierda de la ecuación representa el cambio de la concentración de los metabolitos a través del tiempo; **c** es el vector de la concentración de metabolitos intracelulares, **v** es el vector de flux (entendiéndose como velocidad de reacción en cada ruta metabólica), y **μ** es la tasa de crecimiento específico de la célula, que puede considerarse como la velocidad con la que un microorganismo crece en un tiempo determinado. En los modelos estequiométricos se desprecia el comportamiento dinámico intracelular, suponiendo que existe estado estacionario para los metabolitos internos. Esta asunción esta soportada en la observación de que la dinámica intracelular es más

rápida que la extracelular. Adicionalmente $\mu.c$ también es despreciado porque este es mucho más pequeño que los fluxes que afectan el mismo metabolismo (Stephanopoulos, Aristidou, & Nielsen, 1998).

El balance de masa de la red metabólica en estado estacionario puede ser descrito por la siguiente ecuación general (Llaneras y Picó, 2007):

$$S \cdot v = 0 \quad [2]$$

Puesto que, por lo general, hay más reacciones que metabolitos ($n > m$), el sistema es sub-determinado (con $n-m$ grados de libertad), entonces es necesaria la imposición de restricciones adicionales para obtener una solución válida de la distribución de flux en estado estacionario, o el planteamiento de una función objetivo para aprovechar los grados de libertad positivos convirtiendo el problema en uno de optimización (Raman & Chandra, 2009).

Las restricciones pueden ser fisicoquímicas, topológicas, medioambientales, regulatorias, etc. Las restricciones fisicoquímicas se enmarcan dentro de las leyes físicas como la conservación de la masa y la energía, las topológicas representan restricciones del espacio de los metabolitos dentro de los compartimientos celulares y las restricciones ambientales se circunscriben a la disponibilidad, de nutrientes, PH, temperatura, etc., que varían con el tiempo y el espacio (Infante Jaime, y otros, 2014; Raman & Chandra, 2009).

Las restricciones mencionadas anteriormente pueden ser de dos tipos: no ajustables (invariantes) y ajustables (Ver tabla 1). La primera es la restricción en un tiempo invariable en el hipotético comportamiento de la célula, mientras que el segundo depende de las condiciones ambientales y pueden cambiar a través de la evolución y variar individualmente de una célula a otra (Edwards, Covert, & Palsson, 2002)

Tabla 1. Tipo de restricciones más frecuentes

Restricción	Tipo	Formulación Matemática
Sistema estequiométrico	No ajustable	$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = 0$ (Ecuación general)
Irreversibilidad de los fluxes	No ajustable	$v > 0$
Enzimas	No ajustable	$v < v_{\text{máx}}$
Fluxes medidos	Ajustable	$v < v_m$ o $v < v_{m,\text{min}} < v < v_{m,\text{máx}}$
Restricciones regulatorias	Ajustable	Ejemplo: $v_1 = 0$ si ($v_2 \neq 0$)
Constantes Cinéticas	Ajustable	$v = k \cdot C_m$

C_m , Concentración medida. Adaptado de (Llaneras & Picó, 2008)

2. ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUX (FBA)

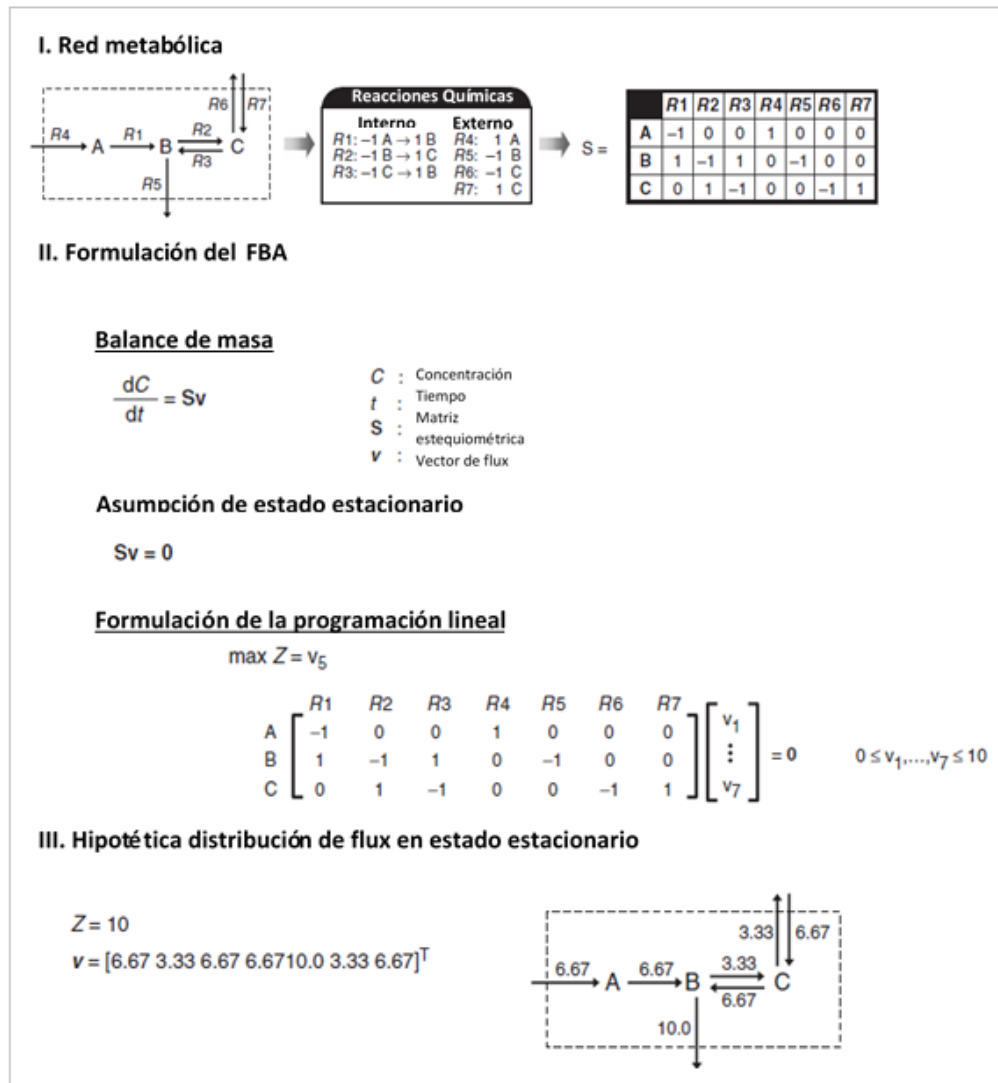
El Análisis de Balance de Flux (*Flux Balance Analysis* - FBA) es una herramienta de modelamiento matemático, utilizada por la biología de sistemas para simular cuantitativamente los fluxes del metabolismo celular (Lee, Gianchandani, & Papin, 2006).

Los fluxes metabólicos son las velocidades de las distintas reacciones de cada ruta metabólica. El flux es regulado por las enzimas involucradas en dicha ruta. En las células, la regulación del flux es de vital importancia para todas las rutas metabólicas porque de ello depende la actividad de la ruta involucrada en condiciones ambientales diferentes (Voet, Voet, & Pratt, 2013).

El FBA asume que las redes metabólicas alcanzarán un estado estacionario restringido por la estequiometría de la red metabólica. Estas restricciones estequiométricas conducen a un sistema indeterminado, donde hay más reacciones químicas que metabolitos. Es posible desarrollar una solución asignando una función objetivo, que puede ser maximizar o minimizar los fluxes a través de una reacción o una combinación de reacciones dentro del metabolismo del microorganismo, o algún otro tipo de consideración fisicoquímica (Gong, Liu, Feng, & Zhang, 2009). Esto hace que la determinación de los fluxes metabólicos se convierta en un problema de optimización, que al ser resuelto arroja un valor para cada flux de la red metabólica. Estos valores pueden utilizarse para analizar la importancia de diferentes rutas, predecir la capacidad de la red metabólica, evaluar el efecto de deleciones genéticas y determinar objetivos de ingeniería metabólica, entre otras finalidades (Schilling, Edwards, Letscher, & Palsson, 2000).

En la figura 2, se presenta un ejemplo de la construcción de una matriz estequiométrica, y del resultado obtenido al aplicar FBA. **I.** La red metabólica tiene A, B, C, componentes (metabolitos). R1, R2...R7, representan los fluxes (internos y externos según corresponda). La red metabólica es representada mediante una matriz estequiométrica (**S**). **II.** Se realiza el balance de masa para cada componente; la información cinética no es viable para muchas reacciones, aun así, el FBA es aplicable si se asume que la red alcanza el estado estacionario. Después de establecer las restricciones y la función objetivo, se realiza la programación lineal. **III.** Por último, se realiza la evaluación y análisis del FBA hipotético (Edwards, Covert, & Palsson, 2002).

Figura 2. Representación de una red de reacciones y el Análisis del Balance de Flujos (FBA).



Fuente: Adaptado de (Lee, Gianchandani, & Papin, 2006).

2.1. MODELO METABÓLICO DE CLOSTRIDIUM BUTYRICUM

2.1.1. GLICEROL. El glicerol es una fuente de carbono que puede ser fácilmente asimilada por numerosos microorganismos eucariotas y procariotas. Este compuesto es degradado por fermentación microbiana (George, 2009). Sin embargo, por muchos años éste proceso tuvo un alto costo debido a la tendencia de purificar el glicerol antes de su degradación; la cantidad de contaminantes que el glicerol presenta como subproducto del biodiesel incluye, cenizas, metanol, agua y ácidos grasos. En Colombia, purificar el glicerol económicamente no es viable, debido al alto costo del procesamiento requerido. (Montoya Castaño & Aragón Caycedo, 2010).

Aun así, la producción de glicerol ha aumentado debido a la gran demanda de biodiésel. En Colombia se produjeron más de 540000 toneladas de biodiésel en el 2014 (fedebiocombustibles, 2015), generando 54000 toneladas de glicerol (Wen, Pyle, & Athalye, 2009), cantidades que ningún mercado es capaz de consumir sin previo tratamiento (Domingues Ferreira, 2013). Lo que ha conducido a buscar soluciones para el uso del exceso de glicerol. En los últimos años se han desarrollado procesos para la bioconversión del glicerol, una alternativa es utilizarla directamente como un sustrato de fermentación para la producción de diversos productos químicos intermediarias de alto valor agregado (Domingues Ferreira, 2013).

En la actualidad se están investigando diversos procesos de fermentación que aprovechan la diversidad metabólica de diferentes especies de bacterias para obtener una gran variedad de productos como, etanol, butanol, hidrógeno, ácido succínico y polihidroxicanoatos (Montoya Castaño & Aragón Caycedo, 2010).

Bajo condiciones anaeróbicas el glicerol puede ser usado como sustrato para diferentes microorganismos. Adicionalmente, es conocido desde hace más de 50

años que el glicerol puede ser convertido por bacterias facultativas anaeróbicas a 1,3-propanodiol, etanol, 2,3-butanodiol y ácido acético (Deckwer, 1995).

2.1.2. 1,3-Propanodiol (1,3-PD). Hacia 1995, Shell anuncia la comercialización de un nuevo poliéster llamado CORTERRA™ PTT compuesto por ácido Tereftálico y 1,3-PD. Químicamente, Dupont lo produce a partir de la acroleína para producir hidroxipropionaldehído (HPA), el cual es posteriormente hidrogenado hasta 1,3-PD (Comba González, 2011). Dow Chemical es uno de los principales productores de 1,3-PD como refrigerante en el mundo y ha anunciado el aumento del precio de este producto, que podría deberse a su gran demanda o a que escasea por ser un derivado del petróleo (Ávila, 2012).

La demanda del 1,3-PD va en aumento, considerando que es un monómero usado en la industria textil, empaques de alimentos y medicina; es biodegradable, presenta alta estabilidad y solubilidad. En el 2012, la demanda global de 1,3-PD fue de 60 200 toneladas con un valor en el mercado de 2,61 dólares el kilogramo. Para el 2019, se espera que la demanda global alcance las 150000 toneladas y el precio de 1,3-PD se estima sobre los 3,73 dólares por kilogramo (Betina Tabah, 2016) .

La síntesis química del 1,3-PD se da por dos caminos. El primero, desarrollado por Shell, requiere de alta presión para la obtención del compuesto con rendimientos de aproximadamente el 80%. El segundo, patentado por DuPont y conocido como Degussa, se basa en la hidrólisis de acroleína, otorgando rendimientos por debajo del 65%. Los dos procesos producen residuos tóxicos, requieren de un paso de reducción bajo altas presiones de hidrógeno y manejan altas temperaturas, lo cual representa altos costos de producción (Cucaita Vasquez, 2010).

Por vía biológica, el glicerol se transforma en 1,3-PD por el camino reductivo, el glicerol primero es deshidratado a 3-hidroxipropionaldehído, para luego ser

reducido a 1,3-PD bajo el consumo de potenciales de reducción de (NADH_2). Los potenciales de reducción son generados en el metabolismo oxidativo del glicerol, que hace uso de la mayor cantidad de reacciones de glicólisis y resulta en la formación de subproductos como ácido acético, etanol, butanol (Zeng y Bielb, 2002).

2.1.3. Producción de 1,3-Propanodiol por *Clostridium butyricum*. Dentro de los microorganismos estudiados para la producción de 1,3-PD a partir de glicerol, las cepas de *Clostridium butyricum* y *Klebsiella pneumoniae* son las que mayor rendimiento han reportado, con alrededor de los 60 g/l de 1,3-PD producidos (Chen, Liu, & Liu, 2011) Aun así, la *Clostridium butyricum*, presenta mejores reportes en la producción de 1,3-PD, debido a que esta cepa es independiente de la coenzima B12, lo que es relevante en términos de costos para los procesos de fermentación (Comba González, 2011).

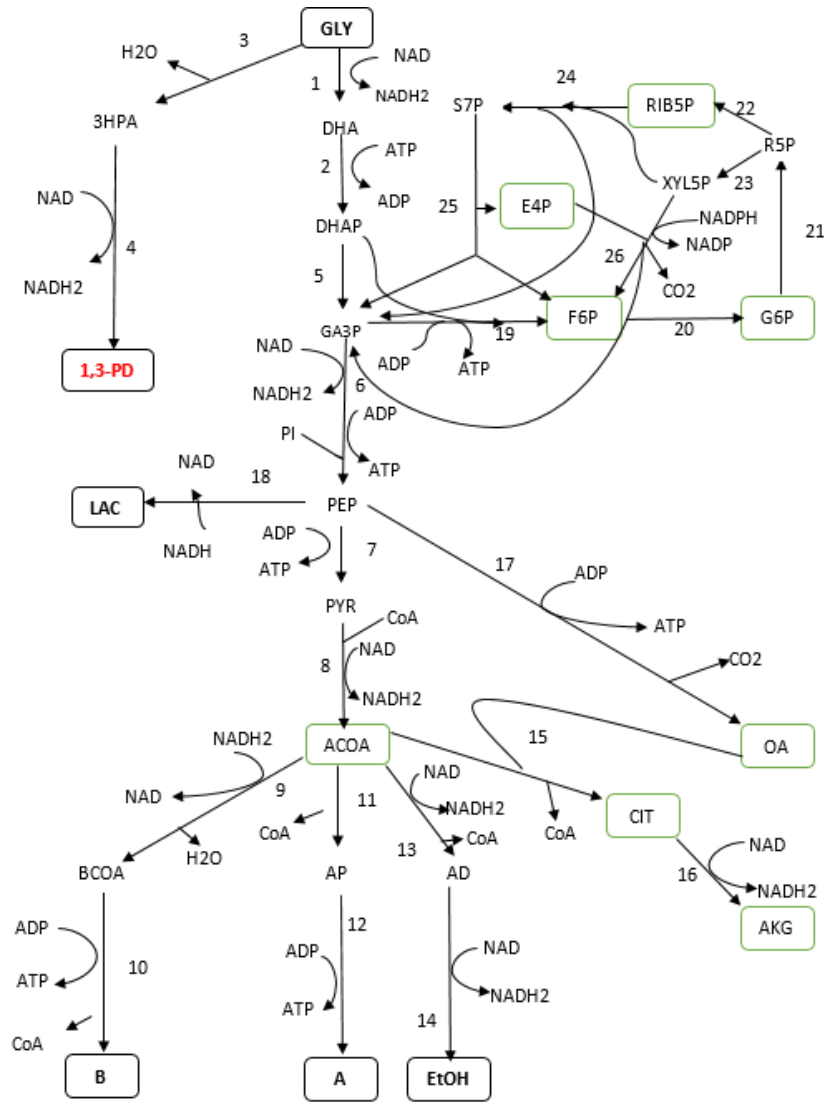
Las cepas de *Clostridium sp.*, son estrictamente anaeróbicas, espora formadoras y hacen parte de un grupo heterogéneo de bacilos Gram positivos usualmente metabolizan glicerol a 1,3-PD, acetato, butirato, dióxido de carbono, e hidrógeno molecular. Es uno de los géneros más grandes de procariotas, casi todos son móviles y poseen flagelos peritricos, además del glicerol, pueden metabolizar una gran cantidad de azúcares (Cucaita Vasquez, 2010).

El glicerol es fermentado por *Clostridium butyricum* en un proceso que involucra dos caminos: el oxidativo y el reductivo. La ruta oxidativa involucra la transformación de glicerol deshidrogenasa (GHD) a dihidroxiacetona (DHA), donde este es fosforilado por una dihidroxiacetona quinasa (DHAK) (Quilaguy-Ayure, Montoya Solano, & Suárez Moreno, 2010) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), un metabolito de vía glicolítica (Domingues Ferreira, 2013).

La ruta reductiva involucra la conversión de glicerol deshidratasa a 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA), luego éste es reducido a 1,3-PD por 1,3-PD deshidrogenasa, también llamado 1,3-propanodiol oxidoreductasa (1,3-PDOR) (Quilaguy-Ayure, Montoya Solano, & Suárez Moreno, 2010.; Cárdenas, Pulido, & Aragón, 2006). Las dos rutas son importantes, porque por la ruta oxidativa se produce ATP y piruvato, importantes para las reacciones internas de la célula. El papel fisiológico del 1,3-PD es la formación de equivalentes de reducción (como el NADH_2) (Zeng A. -P., 1995).

En la Figura 3, se presenta un bosquejo que representa la ruta metabólica de la *Clostridium butyricum*, que muestra los diferentes metabolitos y las rutas que los conectan. Los datos que se obtiene experimentalmente son los fluxes de 1,3-PD, butirato, acetato, lactato y etanol; esta última se desprecia en algunas ocasiones, al ser muy pequeña comparada con los otros metabolitos (Kubiak, y otros, 2012) (Zhang, Teng, Sun, Xiu, & Zeng, 2008).

Figura 3. Representación gráfica del metabolismo central de *Clostridium butyricum*



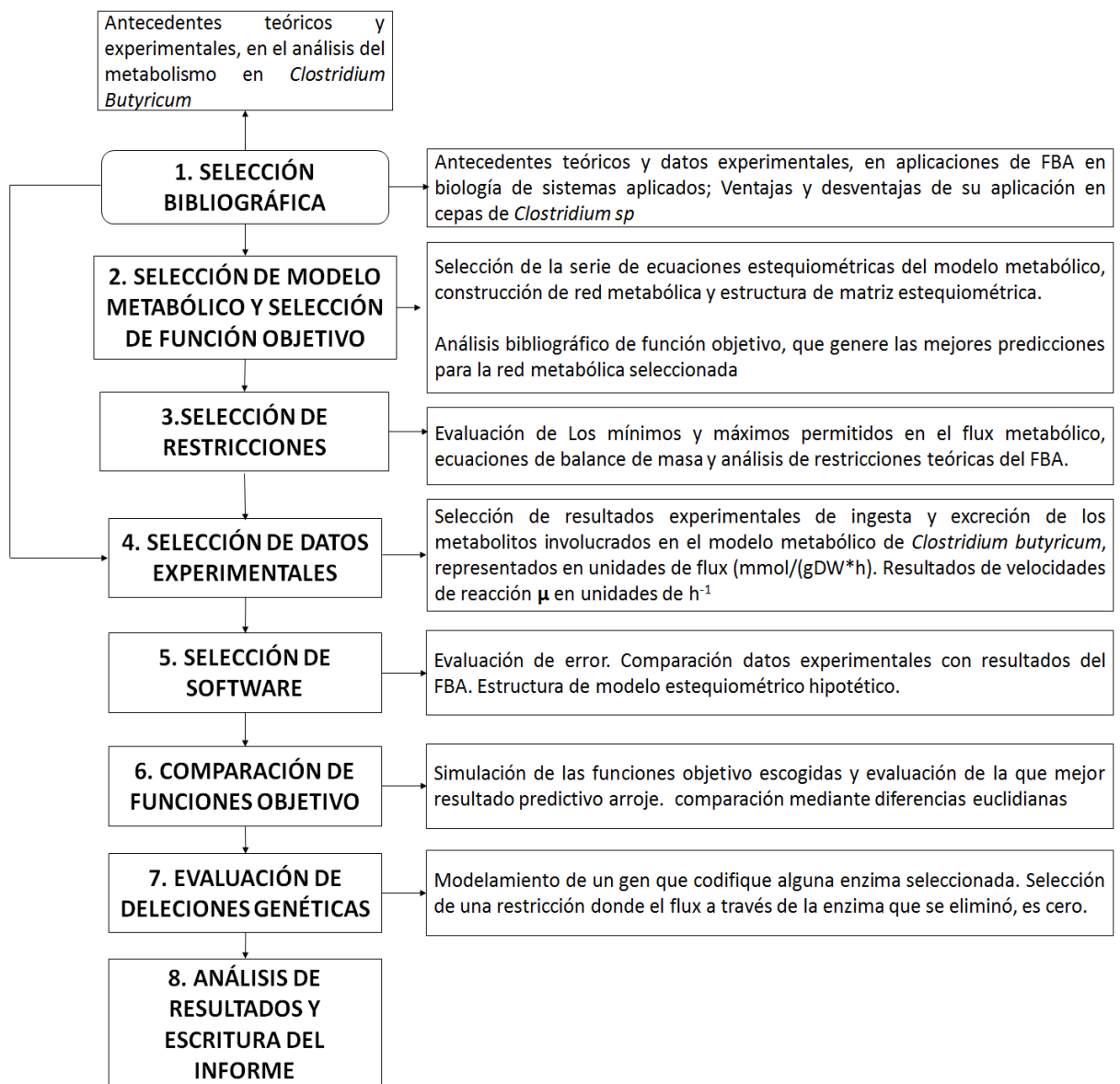
Las cajas representan metabolitos, las flechas las reacciones químicas que conforman la red metabólica y la magnitud de las flechas representa los fluxes que dan lugar a la transformación de unos metabolitos a otros. GLY: Glicerol; 3HPA: 3-Hidroxipropionaldehído; 1,3-PD: 1,3-Propanodiol; DHA: Dihidroxiacetona; DHAP: Dihidroxiacetona Fosfato; PEP: Fosfoenol Piruvato; PYR: Piruvato; LAC: Lactato; COA: Coenzima-A; ACOA: Acetil-CoA; ACTCOA: Acetoacetil-CoA; AD: Acetaldehído; EtOH: Etanol; A: Acetato; AP: Acetil-fosfato; BCOA: Butiril-Coa; B:

Butirato; CIT: Citrato; G6P: Glucosa-6-fosfato; F6P: Fructosa-6-fosfato; RIB5P: Ribululosa -5-fosfato; E4P: Eritosa-4-fosfato; AKG: α -Ketoglutarato; OA: Oxaloacetato; XYL5: Xilulosa-5-fosfato; R5P: Ribosa-5-fosfato; S7P: Sedoheptolulosa-5-fosfato; GA3P: Gliceraldehído-3-fosfato. Adaptado de (Amans, Girbal, Andrade, Ahrens, & Soucaille, 2001)

3. METODOLOGÍA

A continuación, se presenta un esquema general de las etapas consideradas en éste trabajo:

Figura 4. Diagrama de bloques. Descripción metodológica



3.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la primera etapa se realizó la búsqueda de bases teóricas. Con el fin de adquirir la mayor información posible, respecto al modelo metabólico, avances tecnológicos y técnicas existentes, relacionadas con la producción de 1,3-Propanodiol a partir de glicerol. Se buscó la cepa más estudiada en Latinoamérica para la producción de 1,3-PD a partir de glicerol, con el fin de dar un aporte investigativo adicional a la región. Se encontró la *Clostridium butyricum*, se opta por este microorganismo teniendo en cuenta además de su estudio geográfico, las ventajas mencionadas en el apartado 2.1.3. Se procede a recopilar la información requerida sobre el metabolismo central del microorganismo elegido.

3.2 SELECCIÓN DEL MODELO METABÓLICO Y FUNCIONES OBJETIVO

Se partió de la información más detallada sobre el metabolismo de la *Clostridium butyricum* en la producción de 1,3-PD a partir de glicerol. Se construyó un modelo de metabolismo central compuesto de 35 reacciones individuales y 29 metabolitos basándose en información existente en la literatura. Se representó el modelo metabólico mediante una matriz estequiométrica (S).

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, se estableció la siguiente selección de posibles funciones objetivo:

1. Optimización de Acetil CoA
2. Optimización de Butiril CoA
3. Optimización de Biomasa
4. Optimización 1,3-Propanodiol
5. Optimización Acetil Fosfato
6. Optimización de Acetaldehído

7. Optimización de Lactato
8. Optimización de Xilolulosa-5-fosfato
9. Optimización de Oxaloacetato

Una función objetivo es el resultado de un intento de expresar un objetivo biológico en términos matemáticos para ser usado en decisiones de análisis metabólicos o estudios de optimización (Feist & Palsson, 2010); en este caso, buscar la función objetivo que mejor predicción realice sobre la producción de 1,3-PD a partir de glicerol.

3.3 SELECCIÓN DE RESTRICCIONES

De acuerdo con la literatura, se asumen las restricciones teóricas del análisis de un FBA (sección 3.2). Adicionalmente, se consideran algunas restricciones encontradas en la bibliografía para los valores máximos y mínimos de los metabolitos a evaluar en el análisis de fluxes.

Las restricciones utilizadas en el modelo propuesto en este trabajo se pueden ver en el Anexo D.

3.4 SELECCIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES

De la literatura se tomó una cantidad de 23 conjuntos de datos experimentales, que permiten estudiar a la *Clostridium butyricum* en diferentes condiciones de crecimiento. Esta variedad de resultados experimentales incrementa la confiabilidad del análisis efectuado.

Se seleccionó los conjuntos de datos de cultivos en continuo, porque esto permitió asumir estado estacionario de una forma más eficaz que en cultivos por lotes, en los cuales se tendría que hacer una aproximación promedio de fluxes en las series de cultivos, generando mayor incertidumbre en el análisis de los datos.

En el Anexo A se muestra los datos experimentales seleccionados y utilizados en este trabajo, los 23 conjuntos de datos con sus respectivas fuentes bibliográficas; como también la cantidad de glicerol consumido, los fluxes medidos en cada experimento seleccionado y sus respectivas tasas de crecimiento específico.

3.5 SELECCIÓN DE SOFTWARE

El lenguaje de programación utilizado es MATLAB® (Matrix Lab) interface de cuarta generación, versión R2013b, desarrollado por *The Mathworks*.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó **Cobra Toolbox**, este es un paquete de **MATLAB®** para implementación de métodos COBRA (COntstraint-Based Reconstruction and Analysis). Como se mencionó en la sección 3.4, el método COBRA ha sido exitosamente empleado en el campo de la ingeniería metabólica microbiana (Schellenberger, y otros, 2012).

Para el modelamiento de la red metabólica planteado en este trabajo, se utilizó CellDesigner versión 4.4., que es un editor de diagramas de proceso para las redes metabólicas ampliamente conocido, basado en tecnología estandarizada y con gran facilidad de transporte a otras aplicaciones compatibles con SBML (Funahashi, Morohashi, & Kitano, 2003).

Para importar, exportar, validar y modificar el modelo planteado en este trabajo, se utilizó el complemento para MATLAB® SBML (*Systems Biology Markup Language*) Toolbox versión 4.1.0. (Keating, Bornstein, Finney, & Hucka, 2006)

El paquete de optimización utilizado fue GUROBI OPTIMIZER versión 6.5 para MATLAB®, software desarrollado por Gurobi Optimization, Inc.

3.6. COMPARACIÓN DE FUNCIONES OBJETIVO

Las 9 funciones objetivo se evaluaron por medio de la comparación de los resultados obtenidos por el FBA contra los valores reportados experimentalmente, para cada uno de los 23 conjuntos de datos de la literatura. La comparación se efectuó mediante diferencias euclidianas, y se seleccionó la función objetivo que mejores datos predictivos arrojó.

3.7. EVALUACIÓN DE DELECCIONES GENÉTICAS

Se realizó una restricción del flux del gen que codifica las enzimas principales de tres metabolitos importantes para la producción de 1,3-PD, eliminándolas (haciéndolas iguales a cero) por medio del modelamiento del gen borrado, se hizo posteriormente una evaluación del efecto de las deleciones genéticas de estos 3 metabolitos.

En el FBA, el resultado obtenido se logró restringiendo dichos fluxes al valor de 0, fijando la producción de ATP a partir de ADP en una relación 1:2 según literatura, para garantizar la supervivencia de la bacteria y utilizando dos funciones objetivo: maximizar 1,3-propanodiol y maximizar la producción de biomasa, para todas las ingestas reportadas en la literatura.

3.8 ANÁLISIS DE RESULTADOS Y ESCRITURA DEL INFORME

Para cuantificar la cercanía de los resultados obtenidos en este trabajo con los resultados reportados en la literatura se midió la distancia euclidiana (Ver Anexo F), que es una manera de medir la diferencia entre dos vectores, de acuerdo a la siguiente expresión (Pielou,1984):

$$D = \sqrt{\sum_{i=0}^n (X_{ij} - X_{ik})^2}$$

En donde X_{ij} y X_{ik} identifican a los valores e los atributos de la especie i en las estaciones j y k que se comparan. Los conjuntos de valores de las diferencias correspondientes a cada función objetivo se presentan por medio de diagramas de caja y bigotes, debido a la variedad de ingestas en cada una de los experimentos o clases y a que son una manera ventajosa de representar gráficamente los grupos de datos a través de cuartiles. Las separaciones entre las diferentes partes de la caja indican el grado de dispersión y la asimetría en los datos, y los puntos por fuera de la caja muestran valores atípicos (McGill, Tukey, & Larsen, 1978).

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. RED METABÓLICA DE CLOSTRIDIUM BUTYRICUM

Después de solucionar el FBA como se menciona en la metodología en el capítulo 3, se calcularon los *fluxes* para distintos valores de ingesta de glicerol reportados por algunos autores que satisfacen cada una de las restricciones impuestas.

La red metabólica fue construida de acuerdo a referencias bibliográficas donde el enfoque de estudio fue el análisis del metabolismo central de la *Clostridium butyricum*. La red metabólica obtenida está representada en la figura 3.

4.2 MATRIZ ESTEQUIOMÉTRICA

De la red metabólica obtenida en la sección 4.1 se realiza el modelo del metabolismo central de la *Clostridium butyricum*; la estructura no incluye cofactores y las reacciones incluidas en el modelo se presentan en la figura 5. (Zeng A.-P. , 1996) (Cai, Jin, Saint, & Monis, 2010) (Zhang, Teng, Sun, Xiu, & Zeng, 2008). Modificado.

Figura 5. Modelo estequiométrico central de *Clostridium butyricum*.

1. $GLY + NAD \rightarrow DHA + NADH_2$
2. $DHA + ATP \rightarrow DHAP + AD$
3. $GLY \rightarrow 3HPA + H_2O$
4. $3HPA + NADH_2 \rightarrow 1,3PD + NAD$
5. $DHAP \rightarrow GA3P$
6. $GA3P + NAD + PI + ADP \rightarrow PEP + ATP + NADH_2 + H_2O$

7. $PEP + ADP \rightarrow PYR + ATP$
8. $PYR + CoA + NAD \rightarrow ACoA + CO_2 + NADH_2$
9. $ACoA + 2 NADH_2 \rightarrow BCoA + 2 NAD + H_2O$
10. $BCoA + ADP \rightarrow B + CoA + ATP$
11. $ACoA \rightarrow AP + CoA$
12. $AP + ADP \rightarrow A + ATP$
13. $ACoA \rightarrow AD + CoA$
14. $AD + 2 NADH_2 \rightarrow EtOH + 2 NAD + CoA$
15. $ACoA + OA \rightarrow CIT + CoA$
16. $CIT + NAD \rightarrow AKG + NADH_2 + CO_2$
17. $PEP + ADP + CO \rightarrow OA + ATP$
18. $PYR + NADH_2 \rightarrow LAC + NAD$
19. $GA3P + DHAP + ADP \rightarrow F6P + ATP$
20. $F6P \rightarrow G6P$
21. $G6P + 2 NADP + H_2O \rightarrow R5P + CO_2 + 2 NADPH$
22. $R5P \rightarrow RIB5P$
23. $R5P \rightarrow XYL5P$
24. $RIB5P + XYL5P \rightarrow S7P + GA3P$
25. $S7P + GA3P \rightarrow E4P + F6P$
26. $XYL5P + E4P \rightarrow F6P + GA3P$
27. $A \rightarrow A_{ext}$
28. $B \rightarrow B_{ext}$
29. $LAC \rightarrow LAC_{ext}$
30. $1,3PD \rightarrow 1,3PD_{ext}$
31. $EtOH \rightarrow EtOH_{ext}$
32. $0.35 G6P + 0.523 F6P + 0.952 RIB5P + 0.407 E4P + 0.383 PEP + 3.13 PYR +$
 $1.346 AKG + 1.6 OA + 1.13 ACoA + 16.3 ATP + 6.75 NAD + 17.8 NADPH \rightarrow$
 $101 BM + 16.3 ADP + 6.75 NADH_2 + 17.8 NADP$
33. $BM \rightarrow BM_{ext}$

34. *GLY_ext* → *GLY*

35. *ADP* → *2ATP*

Las abreviaturas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Abreviaciones metabólicas

SIGLA	NOMBRE DEL	FÓRMULA
GLY	Glicerol	$C_3H_6O_3$
3-HPA	3-Hidroxipropionaldehido	$C_3H_6O_2$
1,3-PD	1,3-Propanodiol	$C_3H_8O_2$
DHA	Dihidroxiacetona	$C_3H_6O_3$
DHAP	Dihidroxiacetona Fosfato	$C_3H_7O_6P$
PEP	Fosfoenol Piruvato	$C_3H_5O_6P$
PYR	Piruvato	$C_3H_4O_3$
LAC	Lactato	$C_3H_6O_3$
ACOA	Acetil-CoA	$C_{23}H_{34}N_7O_{17}P_3S$
H ₂	Hidrógeno	H_2
EtOH	Etanol	C_2H_6O
A	Acetato	$C_2H_4O_2$
AP	Acetil-fosfato	$C_2H_5O_5P$
B	Butirato	$C_4H_8O_2$
CO ₂	Dióxido de Carbono	CO_2
CIT	Citrato	$C_6H_8O_7$
G6P	Glucosa-6-fosfato	$C_6H_{13}O_9P$
F6P	Fructosa-6-fosfato	$C_6H_{13}O_9P$
RIB5P	Ribululosa -5-fosfato	$C_5H_{11}O_8P$
E4P	Eritosa-4-fosfato	$C_4H_9O_7P$
AKG	α-Ketoglutarato	$C_5H_6O_5$
OA	Oxaloacetato	$C_4H_4O_5$
XYL5P	Xilulosa-5-fosfato	$C_5H_{11}O_8P$
R5P	Ribosa-5-fosfato	$C_5H_{11}O_8P$
S7P	Sedoheptolulosa-5-fosfato	$C_7H_{15}O_{10}P$
GA3P	Gliceraldehído-3-fosfato	$C_3H_7O_6P$
ATP	Adenosin Trifosfato	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$
ADP	Adenosin Difosfato	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$
NAD	Nicotinamida adenina	$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$
NADPH	Nicotinamida adenina	$C_{21}H_{28}N_7O_{14}P_2$
NADH ₂	Nicotinamida adenina	$C_{21}H_{29}N_7O_{14}P_2$
NADP	Nicotinamida adenina	$C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$
GA3P	Gliceraldehído 3-Fosfato	$C_3H_7O_6P$

La matriz estequiométrica **S** se construye utilizando el modelo metabólico anterior, y realizando el balance de materia para cada una de las reacciones incluidas en el modelo; tal y como se describe en la sección 2, siguiendo los pasos para el FBA referido en la sección 3.2. En el anexo B se presenta la matriz estequiométrica del presente problema.

4.3. FORMULACIÓN DE LA PROGRAMACIÓN LINEAL

Después de solucionar el FBA, como se menciona en la sección anterior, se calcularon los fluxes para distintos valores de ingesta de glicerol reportados por algunos autores que satisfacen cada una de las restricciones impuestas y posteriormente se calculó el error de los fluxes de intercambio.

Los datos experimentales fueron clasificados en 4 clases según el tipo de cultivo empleado (ver Anexo A); cultivo continuo con reciclo celular (11 conjuntos de datos) en el que se debe resaltar que se reportan fluxes relativamente mayores a las demás clases, cultivo continuo en condiciones estériles (1 conjunto de datos), cultivo continuo en condiciones no estériles (4 conjuntos de datos) y cultivo continuo en quimiostato (7 conjuntos de datos).

Los resultados se obtuvieron para todas las clases, se utilizaron 9 diferentes vectores para 9 funciones objetivo distintas (ver Anexo D).

4.4. EVALUACIÓN DEL ERROR EN LAS PREDICCIONES

Obtenidos los resultados para cada una de las ingestas reportadas se procedió a evaluar la confiabilidad de las predicciones obtenidas en los resultados del FBA midiendo la exactitud, que es la cercanía a un valor considerado como verdadero.

Para la interpretación de este tipo de gráfico, primero obtenemos la mediana de la tabla de frecuencias en general y se distribuyen los datos en cuartiles; los bigotes, (las líneas que se extienden desde la caja) se despliegan hasta los valores mínimos y máximos cada serie (ver Anexo E).

La caja “All” reúne todas las diferencias de toda la clase, es decir, que la caja es una relación directa entre los valores mínimos y máximos alcanzados en las mediciones, así como también la mediana de los mismos; ésta caja permite una visión global del comportamiento de los datos analizados para así realizar una comparación individual de cada función objetivo respecto al comportamiento global de las mediciones.

Figura 6. Diferencias evaluadas de las diferentes funciones objetivo en FBA para la Clase 1 de datos

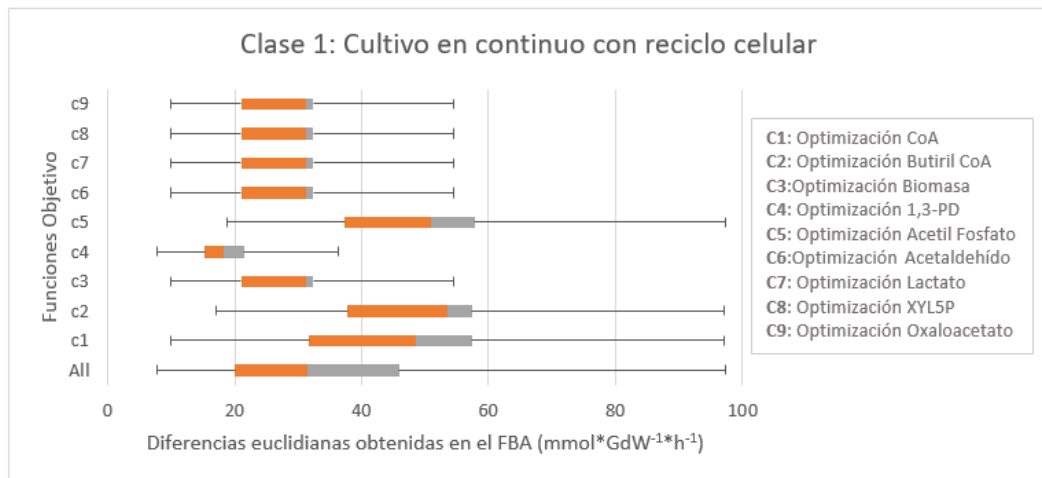


Figura 7. Diferencias evaluadas de las diferentes funciones objetivo en FBA para la Clase 3 de datos

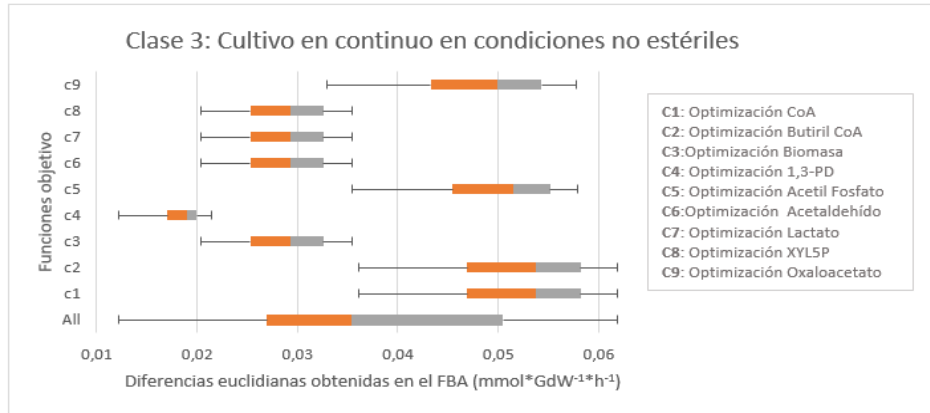
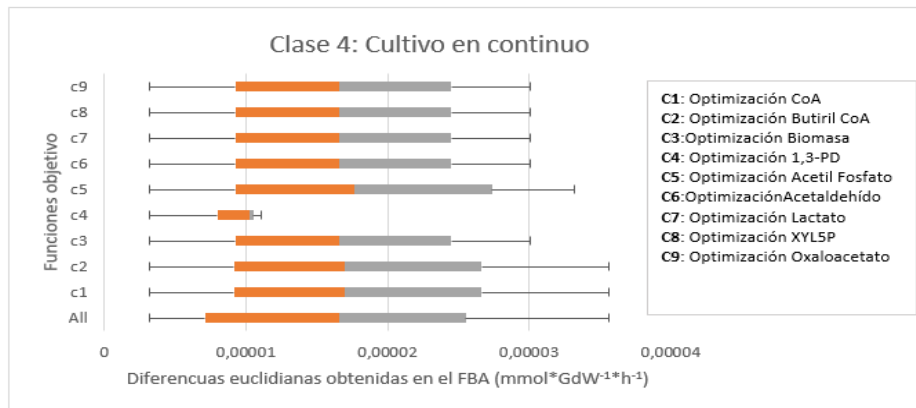


Figura 8. Diferencias evaluadas de las diferentes funciones objetivo en FBA para la Clase 4, de datos.



En la figura 6, se representa la Clase 1 y se puede observar que las funciones objetivo c6 a C9 arrojan resultados idénticos, pues se obtuvieron los mismos valores de excreción con todas ellas. Con respecto a la caja *All* se puede decir que el 50% de los datos se encuentran entre 20 y 45 mmol*gdw⁻¹*h⁻¹, lo que indica que la técnica empleada se desvía de los datos reportados en la literatura y que ninguna de las funciones objetivo probada obtiene buenas estimaciones.

Clase 2 (ver Anexo F): no se representó gráficamente porque de ésta clase sólo se tenía un conjunto de datos. Se encontraron diferencias euclidianas entre 0,01008 y 0,02332 $\text{mmol} \cdot \text{gDw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, siendo la mínima diferencia la obtenida por la función objetivo C4 y la máxima diferencia la obtenida por C5. Las funciones objetivo C1 y C2 obtuvieron diferencias iguales, de igual manera las funciones objetivo C6, C7 y C8, lo que también indica que las diferentes funciones objetivo propuestas excretaron los mismos valores en los productos. Este mismo fenómeno se presentó en la clase 3.

En la figura 7, correspondiente a los datos de la Clase 3, se observa según la caja *All* que el 50 % de las diferencias se encuentra entre 0,150 y 0,269 $\text{mmol} \cdot \text{gDw}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, lo que indica que para ésta clase de datos la ingesta tiene un orden de 10^{-1} .

En la figura 8, que muestra los resultados en la Clase 4, se puede apreciar que, salvo por la función objetivo C4 y C5, encontramos gran similitud en las cajas para las funciones objetivo propuestas, esto es debido a que se obtuvieron diferencias similares y del orden de 10^{-6} para las diferentes funciones objetivo e ingestas.

4.5. RESULTADO DE LAS DELECCIONES GENÉTICAS

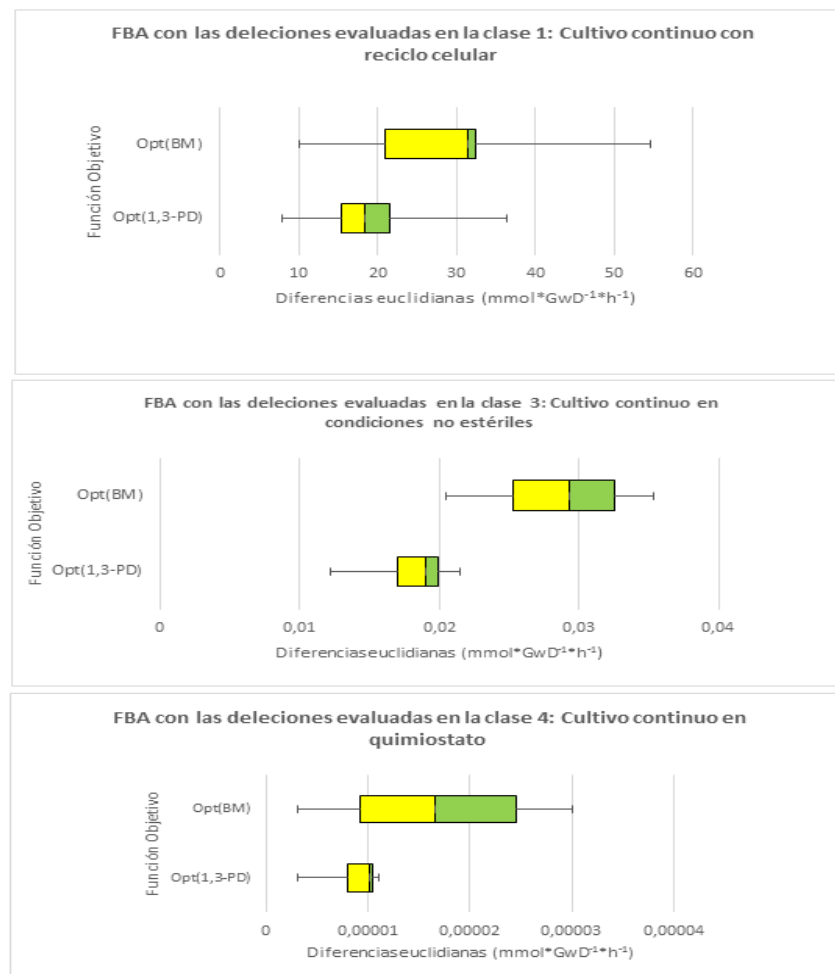
Cada paso de la ruta metabólica es catalizado por una enzima específica cuya producción es responsabilidad de un solo gen, (Lewin, 2008); bajo esta premisa, se deduce que, mediante delecciones genéticas en la bacteria es posible aumentar la producción de un compuesto deseado y eliminar la producción de compuestos indeseables.

Se evaluó una delección de tres genes, los cuales bloquean la producción de tres enzimas que hacen posible la producción de acetyl-fosfato, butiril-CoA y acetaldehído, éstos posteriormente se convertirán en tres productos indeseables:

acetato, butirato y etanol respectivamente. En el FBA estas deleciones se lograron simular restringiendo dichos fluxes a cero, esperando que aumentara la producción de 1,3-propanodiol y biomasa, para ésto se escogió las dos funciones objetivo que arrojaron los mejores resultados en el FBA propuesto en la sección anterior, 'optimizar 1,3-propanodiol' y 'optimizar biomasa', y se compararon los resultados de las deleciones con los resultados de la sección 4.4 con el fin de evaluar el aumento en el flux de 1,3-propanodiol.

Los resultados obtenidos fueron:

Figura 9. Diferencias evaluadas en FBA para las Clases de datos implementando las deleciones genéticas.



La Figura 9 representa los resultados de los análisis de las deleciones realizadas, se observa que, la mediana y la dispersión de los datos para las dos funciones objetivo propuestas permanecen bajo en el mismo rango con respecto a los resultados que se obtuvieron sin implementar las deleciones genéticas. Aunque se esperaba un aumento significativo en la producción de 1,3-propanodiol restringiendo los fluxes que más influyen en la excreción de sub-productos, los resultados fueron idénticos a los obtenidos al FBA propuesto sin deleciones.

4.6 ANÁLISIS

Los resultados del FBA reflejan fluctuaciones de acuerdo a la clase y la función objetivo; mientras la diferencia en la Clase 1 fue relativamente alta, en las Clases 3 y 4 se presentaron uniformidad en los resultados.

El modelado tiene falencias a la hora de predecir los fluxes, en especial cuando se intenta fijar la tasa de crecimiento específica, porque los valores de los fluxes se disparan a proporciones que no están dentro de la lógica. Lo anterior se debe a varios factores, entre los que se incluyen la simplicidad de la red metabólica y por ende de la matriz estequiométrica, la insuficiencia de información en la literatura acerca de posibles inhibiciones, y, en muchos casos, las aproximaciones existentes sobre las tasas de crecimiento específico reportados, que pueden ser valores aproximados experimentales o tomados de experimentos anteriores. También se debe considerar las diferentes limitaciones de las técnicas de medición empleadas, las suposiciones realizadas, las diferencias genéticas entre las poblaciones, la diferencia en evolución y demás factores que influyen en la toma de datos y su representación.

En todas las clases la función objetivo C4 obtuvo distribución de diferencias más cercanas a cero, lo que indica que la función objetivo optimizar 1,3-propanodiol es

la que mejor representa el metabolismo de la bacteria. Algunas funciones objetivo obtuvieron diferencias semejantes, aunque los metabolitos que se optimizaron no tenían relación alguna, esto, es debido a que no se tuvo en cuenta la genómica, condiciones como concentración inicial de los metabolitos, los detalles de la cinética del sistema y posibles inhibiciones.

En este trabajo se propuso la delección del gen *gap* que elimina la producción de gliceraldehído-3-fosfato, el cual indicaría que todo el glicerol consumido por la bacteria se convertiría en 1,3-propanodiol (Nakamura & Whitedy, 2003), pero esta delección bloqueó la producción de metabolitos que son esenciales para el crecimiento celular, por lo que se considera una delección letal. Una opción más viable fue buscar la eliminación de la producción de butiril-CoA, acetil-fosfato y acetaldehído que son los que posteriormente se convierten en butirato, acetato y etanol respectivamente, esto con el fin de obtener 1,3-propanodiol más puro y no afectar negativamente el crecimiento de la bacteria, si no por el contrario aumentarlo.

Respecto a las delecciones realizadas, los resultados no arrojaron diferencias respecto al modelado original, debido a la linealidad de la red metabólica, al optimizar 1,3-propanodiol, todo el valor de la ingesta se convierte en 1,3-propanodiol y al optimizar la producción de biomasa, todo el valor de la ingesta se destina para este objetivo. Biológicamente, según la literatura, se podría mejorar el bioproceso de producir 1,3-propanodiol a partir de glicerol, mediante estas delecciones genéticas, pero en la técnica utilizada en este trabajo, Flux Balance Analysis (FBA), no es posible. Los resultados se presentan en el anexo F.

Debido a los pocos datos que se reportan del flux de lactato en la literatura, solo fue posible comparar los resultados del modelo, con los resultados reportados en la segunda y tercera clase (5 conjuntos de datos), lo que nos ocasiona incertidumbre a la hora de confrontar el modelo con los datos experimentales.

Nótese que el valor de la distancia euclidiana se ve afectado por problemas de escala debido a atributos con altos y bajos valores, aunque esta propiedad podría ser ventajosa cuando se trata de datos donde la distancia recaerá fundamentalmente en varias especies dominantes, la distancia euclidiana es exagerada en ese sentido. (Herrera, 2000). Sobre todo, en la clase 4 en donde los atributos son muy pequeños debido a que la ingesta es también muy pequeña.

5. CONCLUSIONES

El estudio computacional de la *Clostridium butyricum* basado en el FBA, pudo llevarse a cabo por medio de la selección de varias funciones objetivo significativas en la célula (desde el punto de vista bioquímico) para la producción de 1,3-PD. Para ésta selección es necesaria una base datos experimental en diferentes condiciones de cultivo que respalden la base teórica seleccionada para la investigación.

Entre las funciones objetivo propuestas y con la red de metabolismo central utilizada, se observó que la función objetivo que mejor representa el crecimiento en glicerol de *Clostridium butyricum*, por medio del FBA, fue la de 'optimizar 1,3-Propanodiol'. Lo que permitió adquirir una mayor comprensión del comportamiento celular por medio de funciones objetivo que representen mejor el flux metabólico de una célula.

La comprensión del comportamiento metabólico de la célula es de vital importancia a la hora de analizar los resultados obtenidos por el FBA. Aunque este trabajo se limitó al modelamiento estequiométrico, fue importante reconocer que algunos metabolitos pueden inhibir al producto principal (1,3 PD, en éste caso) y de esta forma alterar los resultados del análisis computacional, afectando dramáticamente la capacidad predictiva del FBA.

6. RECOMENDACIONES

Es necesaria una mayor calidad de datos experimentales, en cuanto al análisis detallado de la ruta metabólica de la *Clostridium butyricum*, para analizar las posibles diferencias entre el modelo más adecuado de la función objetivo celular escogida en este trabajo y otras posibles funciones objetivo desarrolladas a futuro.

Las combinaciones de diferentes funciones objetivo para el FBA pueden ser usadas también, para analizar el comportamiento celular de la *Clostridium butyricum* aplicando alteraciones genéticas. Un posterior análisis computacional a nivel cinético de alteraciones en la producción de butirato y acetato, puede representar un mejor entendimiento entre la relación de objetivos celulares menores y el comportamiento del microorganismo ante alteraciones a nivel genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cárdenas, D., Pulido, C., & Aragón, Ó. L. (15 de Junio de 2006). Evaluación de laproducción de 1,3-propanodiol. Bogotá, Colombia: Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.

Feist, A., & Palsson, B. (2010). The Biomass Objective Function. *NIH autor manuscript*, 344-349.

Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K., & Soucaille, P. (2001). Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures. *Elsevier*, 1748-1754.

Ávila, A. D. (2012). 1,3-Propanodiol de origen petroquímico u obtenido vía catálisis química y/o bioquímica: Diferentes productos obtenidos por medio catalítico o un bioproceso. *Quimiart*, 1-9.

Betina Tabah, A. V. (2016). Production of 1,3-propanediol from glycerol via fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Green Chemistry*, 1-10.

Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.-P., & Deckwer, W. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 289-297.

Cai, G., Jin, B., Saint, C., & Monis, P. (2010). Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *Elsevier*, 6681-6690.

Carrillo González, G. (2013). La Ecología Industrial en México. En *El debate teórico de la ecología industrial* (págs. 19-41). México DF: UAM-X.

Chen, Z., Liu, H., & Liu, D. (2011). Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. *Elsevier*, 151-157.

Cho, C., Jang, Y.-S., Moon, H., Lee, J., & Lee, S. (2015). Metabolic engineering of clostridia for the production of chemicals. *Biofpr*, 221-225.

Comba González, N. B. (2011). *Evaluación de la expresión del proteoma intracelular de una cepa nativa colombiana de Clostridium sp. en condiciones de producción de 1,3-propanodiol*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Cucaita Vasquez, N. A. (10 de Agosto de 2010). Separación y caracterización bioquímica de la enzima 1,3-propanodiol oxidoreductasa proveniente de una cepa nativa *Clostridium spp* IBUN 158. *Tesis Doctoral*. Bogotá.

Deckwer, W. D. (1995). Microbial Conversion of glycerol to 1,3 propanodiol. *Elsevier*, 143-149.

Domingues Ferreira, F. (Junio de 2013). Bioconversao do glicerola 1,3-propanodiol para aplicacao na obtencaodo poli(tereftalato de trimetileno). *Tese de Doutorado*. Universidad Federal de Pernambuco, CTG.

Ebenhöh, O., & Heinrich, R. (2000). Evolutionary Optimization of Metabolic Pathways. Theoretical Reconstruction of the Stoichiometry of ATP and NADH Producing Systems. *Society For Mathematical Biology*, 21-55.

Edwards, J., Covert, M., & Palsson, B. (2002). Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. *Environmental Microbiology*, 133-140.

fedebiocombustibles. (01 de Julio de 2015). *Fedebiocombustibles*. Obtenido de <http://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-2190.htm>

Funahashi, A., Morohashi, M., & Kitano, H. (2003). CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *ScienceDirect*, 159-162.

Fundacion Mamonal Colombia;. (2014). *Fundacion Mamonal*. Recuperado el 22 de Septiembre de 2016, de https://issuu.com/dasiva87/docs/informe_de_gestion_2015

George, A. (2009). *Microbial Conversion of Raw Glicerol*. Nueva York: Nova science publishers, Inc.

Gong, Z., Liu, C., Feng, E., & Zhang, Q. (2009). Computational method for inferring objective function of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Elsevier*, 1-6.

Herrera, A. (2000). La clasificación Numérica y su aplicación a la ecología.

Infante Jaime , R. A., Hernandez , Hernandez Martinez, Z., Triana Dopico, J., Fosado Tellez, A., & Montagud Aquino, A. (2014). Herramienta para la optimización de flujos metabólicos de un sistema biológico. *Revista de operación organizacional*, 8.

Ishii, N., Robert, M., Nakayama, Y., Kanai, A., & Tomita, M. (2004). Toward large-scale modeling of the microbial cell for computer simulation. *Elsevier*, 281-294.

Izquierdo, J. F., Cunill, F., Tejero, J., Iborra, M., & Fité, C. (2004). Conceptos Fundamentales. En J. F. Izquierdo, F. Cunill, J. Tejero, M. Iborra, & C. Fité,

Cinética de las reacciones Químicas (págs. 11-13). Barcelona: Edicions de la Universitat de Barcelona .

Kauffman, K., Prakash, P., & Edwards, J. (2003). Advances in flux balance analysis. *Elsevier*, 491-496.

Keating, S., Bornstein, B., Finney, A., & Hucka, M. (2006). SBMLToolbox: an SBML toolbox for MATLAB users. *BIOINFORMATICS*.

Kell, D. (2006). Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Elsevier*, 1085-1092.

Kubiak, P., Leja, K., Mysza, K., Celińska, E., Sychała, M., Szymanowska-Powalowska, D., . . . Grajek, W. (2012). Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. *Elsevier*, 1308-1319.

Lee, J., Gianchandani, E., & Papin, J. (2006). Flux balance analysis in the era of metabolomics. *BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS*, 140-150.

Leja, K., Czaczyk, K., & Mysza, K. (2011). The use of microorganisms in 1,3-Propanediol production. *African Journal of Microbiology Research*, 4652-4658.

Lewin, B. (2008). *GENES IX*. Mexico D.F.: McGraw Hill.

Llaneras, F., & Picó, J. (2008). Stoichiometric Modeling of cell Metabolism. *Journal of biocience and bioengineering*, 11.

McGill R., Tukey J., & Larsen A. (1978). Variations of Box Plots Robert McGill, John W. Tukey and Wayne A. Larsen. *The American Statistician*, 12-16.

McGill, R., Tukey, J., & Larsen, W. (1978). Variations of Box Plots. *American Statistical Association Stable*, 12-16.

Montoya Castaño, D., & Aragón Caycedo, O. (2010). Bioprocesos aplicados a la valorización del glicerol residual en la producción de biodiésel. *Palmas*, 126-135.

Nakamura, C., & Whitedy, g. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *ELSEVIER*, 453-459.

Nakamura, C., Gatenby, A., Kuang-Hua Hsu, A., La Reau, R., Haynie, S., & Dial-Torres, M. (2000). *Estados Unidos Patente nº 6,013,494*.

Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Principios de la Bioquímica*. México: Palgrave Macmillan .

Quilaguy-Ayure, D. M., Montoya Solano, J. D., & Suárez Moreno, Z. R. (2010). Analysing the dhaT gene in Colombian Clostridium sp. (Clostridia) 1,3-propanediol-producing strains. *SCIENTIARUM*, 17-26.

Raman, K., & Chandra, N. (2009). Flux balance analysis of biological systems: Aplications and challenges. *Briefings in bioinformatics*, 16.

Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R., Thiele, I., Orth, J., Feist, A., . . . Palsson, B. (2012). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraintbased-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc*, 1290-1307.

Schilling, C., Edwards, J., Letscher, D., & Palsson, B. (2000). Combining Pathway Analysis with Flux Balance Analysis for the Comprehensive Study of Metabolic Systems. *ResearchGate*, 286-306.

Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., & Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering. Principles and methodologies*. San Diego, California: Elsevier Science.

Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. W. (2013). Biomoléculas. En *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 4th Edition* (pág. 288). New York: Hardcover.

Wen, Z., Pyle, D., & Athalye, S. (2009). Glycerol Waste from Biodiesel Manufacturing. En G. Aggelis, *Microbial Conversions of Raw Glicerol* (págs. 2-9). New York: Noval Biomedical Books.

Yazdani, S., & Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Elsevier*, 213-219.

Zeng, A. -P. (1995). A new balance equation of reducing equivalents for data consistency check and bioprocess calculation. *Elsevier*, 111-124.

Zeng, A.-P. (1996). Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Springer*, 169-175.

Zeng, A.-P., & bielb, H. (2002). Bulk chemicals from biotechnology: The case of 1,3-propanediol production and the new trends. En S. K, & Zeng.A.-P, *tools and Applications of Biochemical Engineering Science* (págs. 240-258). Berlin: Springer.

Zhang, Q., Teng, H., Sun, Y., Xiu, Z., & Zeng, A. (2008). Metabolic flux and robustness analysis of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Springer*, 127-135.

BIBLIOGRAFÍA

AMANS, S., GIRBAL, L., ANDRADE, J., AHRENS, K., & SOUCAILLE, P. on and Electron Flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 Grown on Glucose-Glycerol Mixtures. *Elsevier*, 1748-1754. 2001

ÁVILA, A. D. 1,3-Propanodiol de origen petroquímico u obtenido vía catálisis química y/o bioquímica: Diferentes productos obtenidos por medio catalítico o un bioproceso. *Quimiart*, 1-9. 2012

BETINA TABAH, A. V. Production of 1,3-propanediol from glycerol via fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Green Chemistry*, 1-10. 2016

BIEBL, H., MENZEL, K., ZENG, A.-P., & DECKWER, W. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 289-297. 1999

CAI, G., JIN, B., SAINT, C., & MONIS, P. Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *Elsevier*, 6681-6690. 2010

CÁRDENAS, D., PULIDO, C., & ARAGÓN, Ó. L. Evaluación de laproducción de 1,3-propanodiol. Bogotá, Colombia: Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 15 de Junio de 2006

CARRILLO GONZÁLEZ, G. La Ecología Industrial en México. En *El debate teórico de la ecología industrial* (págs. 19-41). México DF: UAM-X. 2013

CHEN, Z., LIU, H., & LIU, D. Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. *Elsevier*, 151-157. 2011

CHO, C., JANG, Y.-S., MOON, H., LEE, J., & LEE, S. Metabolic engineering of clostridia for the production of chemicals. *Biofpr*, 221-225. 2015

COMBA GONZÁLEZ, N. B. *Evaluación de la expresión del proteoma intracelular de una cepa nativa colombiana de Clostridium sp. en condiciones de producción de 1,3-propanodiol*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2011

CUCAITA VASQUEZ, N. A. Separación y caracterización bioquímica de la enzima 1,3-propanodiol oxidoreductasa proveniente de una cepa nativa *Clostridium* spp IBUN 158. *Tesis Doctoral*. Bogotá. 10 de Agosto de 2010

DECKWER, W. D. Microbial Conversion of glycerol to 1,3 propanodiol. *Elsevier*, 143-149. 1995

DOMINGUES FERREIRA, F. Bioconversao do glicerola 1,3-propanodiol para aplicacao na obtencao do poli(tereftalato de trimetileno). *Tese de Doutorado*. Universidad Federal de Pernambuco, CTG. Junio de 2013

EBENHÖH, O., & HEINRICH, R. Evolutionary Optimization of Metabolic Pathways. Theoretical Reconstruction of the Stoichiometry of ATP and NADH Producing Systems. *Society For Mathematical Biology*, 21-55. 2000

EDWARDS, J., COVERT, M., & PALSSON, B. Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. *Environmental Microbiology*, 133-140. 2002

FEDEBIO COMBUSTIBLES. *edebiocombustibles*. 01 de Julio de 2015 [en línea] disponible en: <http://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-2190.htm>

FEIST, A., & PALSSON, B. The Biomass Objective Function. *NIH autor manuscript*, 344-349. 2010

FUNAHASHI, A., MOROHASHI, M., & KITANO, H. CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *ScienceDirect*, 159-162. 2003

FUNDACION MAMONAL COLOMBIA;. *Fundacion Mamonal*. 2014 [en línea] Citado el 22 de Septiembre de 2016] disponible en: https://issuu.com/dasiva87/docs/informe_de_gestion_2015

GONG, Z., LIU, C., FENG, E., & ZHANG, Q. Computational method for inferring objective function of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Elsevier*, 1-6. 2009

HERRERA, A. La clasificación Numérica y su aplicación a la ecología. 2000

INFANTE JAIME , R. A., HERNANDEZ , HERNANDEZ MARTINEZ, Z., TRIANA DOPICO, J., FOSADO TELLEZ, A., & MONTAGUD AQUINO, A. Herramienta para la optimización de flujos metabólicos de un sistema biológico. *Revista de operación organizacional*, 8. 2014

ISHII, N., ROBERT, M., NAKAYAMA, Y., KANAI, A., & TOMITA, M. Toward large-scale modeling of the microbial cell for computer simulation. *Elsevier*, 281-294. 2004

IZQUIERDO, J. F., CUNILL, F., TEJERO, J., IBORRA, M., & FITÉ, C. Conceptos Fundamentales. En J. F. Izquierdo, F. Cunill, J. Tejero, M. Iborra, & C. Fité, *Cinética de las reacciones Químicas* (págs. 11-13). Barcelona: Edicions de la Universitat de Baelona . 2004

KAUFFMAN, K., PRAKASH, P., & EDWARDS, J. Advances in flux balance analysis. *Elsevier*, 491-496. 2003

KEATING, S., BORNSTEIN, B., FINNEY, A., & HUCKA, M. SBMLToolbox: an SBML toolbox for MATLAB users. *BIOINFORMATICS*. 2006

KELL, D. Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Elsevier*, 1085-1092. 2006

KUBIAK, P., LEJA, K., MYSZKA, K., CELIŃSKA,, E., SPYCHAŁA,, M., SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D., . . . GRAJEK, W. Physiological predisposition of various Clostridium species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. *Elsevier*, 1308-1319. 2012

LEE, J., GIANCHANDANI, E., & PAPIN, J. Flux balance analysis in the era of metabolomics. *BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS*, 140-150. 2006

LEJA, K., CZACZYK, K., & MYSZKA, K. The use of microorganisms in 1,3-Propanediol production. *African Journal of Microbiology Research*, 4652-4658. 2011

LEWIN, B. *GENES IX*. Mexico D.F.: McGraw Hill. 2008

LLANERAS , F., & PICÓ, J. Stoichiometric Modeling of cell Metabolism. *Journal of biociencia and bioengineering*, 11. 2008

MCGILL R., TUKEY J., & LARSEN A. Variations of Box Plots Robert McGill, John W. Tukey and Wayne A. Larsen. *The American Statistician*, 12-16. 1978

MCGILL, R., TUKEY, J., & LARSEN, W. Variations of Box Plots. *American Statistical Association Stable*, 12-16. 1978

MONTOYA CASTAÑO, D., & ARAGÓN CAYCEDO, O. Bioprocesos aplicados a la valorización del glicerol residual en la producción de biodiésel. *Palmas*, 126-135. 2010

NAKAMURA, C., & WHITEDY, g. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *ELSEVIER*, 453-459. 2003

NAKAMURA, C., GATENBY, A., KUANG-HUA HSU, A., LA REAU, R., HAYNIE, S., & DIAL-TORRES, M. *Estados Unidos Patente nº 6,013,494*. 2000

NELSON, D., & COX, M. *Principios de la Bioquímica* . México: Palgrave Macmillan . 2005

QUILAGUY-AYURE, D. M., MONTOYA SOLANO, J. D., & SUÁREZ MORENO, Z. R. Analysing the dhaT gene in Colombian Clostridium sp. (Clostridia) 1,3-propanediol-producing strains. *SCIENTIARUM*, 17-26. 2010

RAMAN, K., & CHANDRA, N. Flux balance analysis of biological systems: Applications and challenges. *Briefings in bioinformatics*, 16. 2009

SCHELLENBERGER, J., QUE, R., FLEMING, R., THIELE, I., ORTH, J., FEIST, A., . . . PALSSON, B. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraintbased-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc*, 1290-1307. 2012

SCHILLING, C., EDWARDS, J., LETSCHER, D., & PALSSON, B. Combining Pathway Analysis with Flux Balance Analysis for the Comprehensive Study of Metabolic Systems. *ResearchGate*, 286-306. 2000

STEPHANOPOULOS, G. N., ARISTIDOU, A. A., & NIELSEN, J. Metabolic Engineering. Principles and methodologies. San Diego, California: Elsevier Science. 1998

VOET, D., VOET, J., & PRATT, C. W. Biomoléculas. En *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 4th Edition* (pág. 288). New York: Hardcover. 2013

WEN, Z., PYLE, D., & ATHALYE, S. Glycerol Waste from Biodiesel Manufacturing. En G. Aggelis, *Microbial Conversions of Raw Glicerol* (págs. 2-9). New York: Noval Biomedical Books. 2009

YAZDANI, S., & GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Elsevier*, 213-219. 2007

ZENG, A. -P. A new balance equation of reducing equivalents for data consistency check and bioprocess calculation. *Elsevier*, 111-124. 1995

ZENG, A.-P. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Springer*, 169-175. 1996

ZENG, A.-P., & BIELB, H. Bulk chemicals from biotechnology: The case of 1,3-propanediol production and the new trends. En S. K, & Zeng.A.-P, *tools and Applications of Biochemical Engineering Science* (págs. 240-258). Berlin: Springer. 2002

ZHANG, Q., TENG, H., SUN, Y., XIU, Z., & ZENG, A. Metabolic flux and robustness analysis of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Springer*, 127-135. 2008

ANEXOS

ANEXO A: Conjunto de datos experimentales reportados.

Tipo de cultivo	Sustrato	μ h ⁻¹	Ingesta	Biomasa	Fluxes de Salida [mmol gWd ⁻¹ h ⁻¹]					Referencia
			Glicerol	[g L ⁻¹]	1,3-PD	Lactato	Butirato	Acetato	Etan	
Continuo con Reciclo celular	Glicerol	0,3	46,15556	1,35	30,08148	NR	2,75556	8,26667	NR	Rieman, 1998
	Glicerol	0,3	16,85128	5,85	9,53846	NR	2,64957	0,90085	NR	Rieman
	Glicerol	0,4	22,53285	6,85	13,51971	NR	2,71825	2,28905	NR	Rieman
	Glicerol	0,7	38,77514	5,47	22,77879	NR	2,43144	5,88665	NR	Rieman
	Glicerol	0,9	49,13399	3,06	30,74837	NR	2,21895	8,55882	NR	Rieman
Continuo con Reciclo celular	Glicerol	0,2	53,52941	1,70	32,11765	NR	5,52941	3,76471	NR	Rieman
	Glicerol	0,3	30,62937	5,72	17,88462	NR	3,82867	1,15385	NR	Rieman
	Glicerol	0,5	44,59677	6,20	28,22581	NR	5,08065	1,77419	NR	Rieman
	Glicerol	0,7	49,82235	6,98	30,94556	NR	4,43553	3,30086	NR	Rieman
	Glicerol	0,9	57,25301	4,15	35,06747	NR	5,96386	4,05542	NR	Rieman
Glicerol	1,0	88,32685	5,14	53,50195	NR	7,58755	7,39300	NR	Rieman	
Continuo	Glicerol	0,0	0,02034	0,90	0,01156	0,0048	0,00069	0,00102	NR	Chatzifragkou,
Continuo en condiciones no	Glicerol	0,1	0,05305	0,70	0,03398	0,0068	0,00230	0,00678	NR	Chatzifragkou,
	Glicerol	0,0	0,04876	0,80	0,03075	0,0056	0,00138	0,00440	NR	Chatzifragkou
	Glicerol	0,0	0,04381	0,80	0,02622	0,0052	0,00112	0,00305	NR	Chatzifragkou
	Glicerol	0,0	0,03089	0,80	0,01978	0,0046	0,00109	0,00186	NR	Chatzifragkou
Continuo	Glicerol	0,0	1,55123E-	1,40	3,0978E-	NR	7,2168E-	4,8393E-	NR	Papanikolau,
	Glicerol	0,0	5,13315E-	1,10	6,9296E-	NR	1,5448E-	1,8477E-	NR	Papanikolau
	Glicerol	0,0	6,8254E-07	1,40	1,1190E-	NR	2,2963E-	2,9036E-	NR	Papanikolau

Tipo de cultivo	Sustrato	μ	Ingesta	Biomasa	Fluxes de Salida [mmol gWd ⁻¹ h ⁻¹]					Referencia
		h ⁻¹	Glicerol	[g L ⁻¹]	1,3-PD	Lactato	Butirato	Acetato	Etan	
	Glicerol	0,1	7,41725E-	1,30	1,6256E-	NR	2,8615E-	1,2508E-	NR	Papanikolau
	Glicerol	0,1	1,12261E-	1,30	2,1513E-	NR	3,8153E-	1,4592E-	NR	Papanikolau
	Glicerol	0,2	1,72059E-	1,10	2,6846E-	NR	2,8495E-	2,2635E-	NR	Papanikolau
	Glicerol	0,2	2,18007E-	1,30	2,9318E-	NR	2,5612E-	6,4233E-	NR	Papanikolau

Tipos de cultivo, tipo de sustrato empleado en el experimento, valores de los fluxes de intercambio medidos y la fuente del conjunto de datos utilizado para compararse con el modelo planteado en este trabajo. Los datos están reportados en la literatura en unidades de concentración C_i (Moles/Litro o gramos/Litro), y se pasa a unidades de flujo específico de formación (mmol/gWd.h) o flux con: (Pajuelo, Et)

$$flux = \frac{C_i \cdot \mu}{X}$$

NR: No hay información en la referencia acerca del valor de este flux.

gDw: Gramo por peso seco (Gram per Dry Weight).

ANEXO B: Matriz Estequiométrica

	'3	'4	'1	'2	'5	'6	'7	'8	'9	'10	'11	'12	'13	'14	'15	'16	'18	'17	'19	'20	'21	'22	'23	'24	'25	'26	'28	'29	'30	'31	'27	'BM	'33'	*	**				
'GLY'	-	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
'DHA'	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
'DHAP'	0	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
'GA3P'	0	0	0	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
'PEP'	0	0	0	0	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0			
'PYR'	0	0	0	0	0	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0		
'3HPA'	0	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
'1,3PD'	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0			
'ACOA'	0	0	0	0	0	0	0	1	-	0	-1	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0			
'BCOA'	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
'B'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
'AP'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
'A'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
'AD'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
'EtOH'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0		
'CIT'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
'AKG'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0		
'OA'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1.6	0	0		
'LAC'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
'F6P'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0		
'G6P'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0		
'R5P'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
'RIB5P'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	
'XYL5'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
'S7P'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
'E4P'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	
'BM'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	101	0	0	0		
'ATP'	0	-	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
'ADP'	0	1	0	0	-	-	-	0	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0

*Ingesta de glicerol

** Producción de ATP

ANEXO C: Nombre de las reacciones.

Nro	Nombre en Modelo	Reacción
1	'3'	Producción de Dihidroxialdehído (DHA)
2	'4'	Producción de Dihidroxialdehído Fosfato (DHAP)
3	'1'	Producción de 3-Dihidroxiopropionaldehído (3-HPA)
4	'2'	Producción de 1,3-Propanodiol (1,3-PD)
5	'5'	Producción de Glucosa-3-Fosfato (GA3P)
6	'6'	Producción de Fosfoenolpiruvato (PEP)
7	'7'	Producción de Piruvato (PYR)
8	'8'	Producción de Acetil-CoA (ACoA)
9	'9'	Producción de Butiril-CoA (BCoA)
10	'10'	Producción de Butirato (B)
11	'11'	Producción de Acetilfosfato (AP)
12	'12'	Producción de Acetato (A)
13	'13'	Producción de Acetaldehído (AD)
14	'14'	Producción de Etanol (EtOH)
15	'15'	Producción de Citrato (C)
16	'16'	Producción de α -Cetoglutarato (AKG)
17	'18'	Producción de Lactato (LAC)
18	'17'	Producción de Oxaloacetato (OA)
19	'19'	Producción de Fructosa-6-fosfato (F6P)
20	'20'	Producción de Glucosa-6-fosfato (G6P)
21	'21'	Producción de Ribosa-5-fosfato (R5P)
22	'22'	Producción de Ribolulosa-5-fosfato RIB5P
23	'23'	Producción de Xilolulosa-5-fosfato (XYL6P)
24	'24'	Producción de Sedoheptulosa-7-fosfato (S7P)
25	'25'	Producción de Eritrosa-4-fosfato (E4P)
26	'26'	Producción de (F6P) desde (XYL6P)
27	'28'	Salida de Acetato (A)
28	'29'	Salida de Butirato (B)
29	'30'	Salida de Lactato (L)
30	'31'	Salida de 1,3-Propanodiol (1,3-PD)
31	'27'	Salida de Etanol (EtOH)
32	'32'	Producción de BIOMASA
33	'33'	Salida de BIOMASA
34	'Ingesta'	Entrada de Glicerol
35	'ATP'	Producción de ATP

ANEXO D: Vectores C utilizados en los diferentes fluxes.

Flux	Función Objetivo (*)								
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
FLUX 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 4	0	0	0	1	0	0	0	0	0
FLUX 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 8	1	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 9	0	1	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 11	0	0	0	0	1	0	0	0	0
FLUX 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 13	0	0	0	0	0	1	0	0	0
FLUX 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 17	0	0	0	0	0	0	0	0	1
FLUX 18	0	0	0	0	0	0	0	1	0
FLUX 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 23	0	0	0	0	0	0	1	0	0
FLUX 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 26	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 27	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 29	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 33	0	0	1	0	0	0	0	0	0
FLUX 34	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FLUX 35	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) *Funciones Objetivo*: C1: opt(ACoA), C2: opt(BCoA), C3: opt(Biomass), C4: opt(1,3-PD), C5: opt(AP), C6: opt(AD), C7: opt(XYL5P), C8: opt(OA), C9: opt(LAC).

ANEXO E: Diferencias Euclidianas.

DIFERENCIAS EUCLIDIANAS												
INGEST A	46,15	16,85	22,53	38,77	49,13	53,53	30,62	44,59	49,82	57,25	88,33	0,0203
C1	31,31814	9,9405216	24,096486	43,294231	56,742723	57,876735	32,240789	48,593907	55,031689	62,263559	97,138816	0,0233225
C2	53,44897	17,131325	24,096486	43,294231	56,742723	57,876735	32,240789	48,593907	55,031689	62,263559	97,138816	0,0233225
C3	31,31814	9,9405216	13,978955	23,652438	31,9943651	32,8068721	18,326203	28,7342497	31,4356054	35,8014177	54,5406822	0,01258157
C4	18,28406	7,83001202	9,68841192	17,2176584	20,4011804	22,4323624	13,3573477	17,232791	19,669845	23,328357	36,4005635	0,01008715
C5	48,45674	18,772817	24,494548	40,0803936	50,9581242	59,4864958	34,6889698	51,5391377	56,0495374	63,9943643	97,3155571	0,02303297
C6	31,31814	9,94052167	13,9789553	23,652438	31,9943651	32,8068721	18,326203	28,7342497	31,4356054	35,8014177	54,5406822	0,01258157
C7	31,31814	9,94052167	13,9789553	23,652438	31,9943651	32,8068721	18,326203	28,7342497	31,4356054	35,8014177	54,5406822	0,01258157
C8	31,31814	9,94052167	13,9789553	23,652438	31,9943651	32,8068721	18,326203	28,7342497	31,4356054	35,8014177	54,5406822	0,01258157
C9	31,31814	9,94052167	13,9789553	23,652438	31,9943651	32,8068721	18,326203	28,7342497	31,4356054	35,8014177	54,5406822	0,01939845
DIFERENCIAS EUCLIDIANAS												
INGESTA	0,05305	0,04876	0,04381	0,03089	1,55E-08	5,13E-07	6,83E-07	7,42E-06	1,12E-05	1,72E-05	2,18E-05	
C1	0,06182775	0,0569372	0,05046521	0,03611775	3,1776E-06	7,0084E-06	1,1309E-05	1,6929E-05	2,28E-05	3,0528E-05	3,56506E-05	
C2	0,06182775	0,0569372	0,05046521	0,03611775	3,1776E-06	7,0084E-06	1,1309E-05	1,6929E-05	2,28E-05	3,0528E-05	3,5651E-05	
C3	0,03538923	0,03160514	0,02693613	0,02043623	3,1811E-06	7,1021E-06	1,1427E-05	1,6553E-05	2,1897E-05	2,7092E-05	3,0122E-05	
C4	0,02148074	0,01943406	0,01864068	0,01224024	3,166E-06	6,6022E-06	1,0759E-05	9,3742E-06	1,1068E-05	1,0304E-05	1,0214E-05	
C5	0,05785622	0,05428936	0,04876095	0,03545308	3,1809E-06	7,1073E-06	1,143E-05	1,762E-05	2,3932E-05	3,0856E-05	3,3205E-05	
C6	0,03538923	0,03160514	0,02693613	0,02043623	3,1811E-06	7,1021E-06	1,1427E-05	1,6553E-05	2,1897E-05	2,7092E-05	3,0122E-05	
C7	0,03538923	0,03160514	0,02693613	0,02043623	3,1811E-06	7,1021E-06	1,1427E-05	1,6553E-05	2,1897E-05	2,7092E-05	3,0122E-05	
C8	0,03538923	0,03160514	0,02693613	0,02043623	3,1811E-06	7,1021E-06	1,1427E-05	1,6553E-05	2,1897E-05	2,7092E-05	3,0122E-05	
C9	0,05782045	0,05314381	0,04674724	0,03292038	3,1811E-06	7,1021E-06	1,1427E-05	1,6553E-05	2,1897E-05	2,7092E-05	3,0122E-05	

ANEXO F: Resultados Delecciones

DE	Clase 1										
Opt(1,3-PD)	18,2840	7,830012	9,6884119	17,217658	20,40118	22,432362	13,357348	17,232791	19,669845	23,328357	36,4005635
Opt(BM)	31,3181	9,9405217	13,978955	23,652438	31,994365	32,806872	18,326203	28,73425	31,435605	35,801418	54,5406822

DE	Clase 2
Opt(1,3-PD)	0,0100872
Opt(BM)	0,0125816

DE	Clase 3			
Opt(1,3-PD)	0,0214807	0,0194341	0,01864068	0,0122402
Opt(BM)	0,0353892	0,0316051	0,02693613	0,0204362

DE	Clase 4						
Opt(1,3-PD)	3,166E-06	6,602E-06	1,07594E-05	9,37423E-06	1,10682E-05	1,03041E-05	1,02141E-05
Opt(BM)	3,181E-06	7,102E-06	1,14269E-05	1,65533E-05	2,18974E-05	2,70915E-05	3,01225E-05