



Diseño *in silico* de una plataforma biosintética que permita la valoración del gas de síntesis mediante su conversión en etileno, implementando herramientas de ingeniería metabólica.

Leslie Astrid Avendaño Montoya

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia
2019

Diseño *in silico* de una plataforma biosintética que permita la valoración del gas de síntesis mediante su conversión en etileno, implementando herramientas de ingeniería metabólica

Leslie Astrid Avendaño Montoya

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director:

Ph.D Camilo Alberto Suárez Méndez

Línea de Investigación:

Diseño Racional de Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Flujos Reactivos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía

Ciudad, Colombia

2019

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme haber llegado hasta este punto, por llenar mi vida de personas maravillosas y por iluminar mi camino de una u otra manera cuando no sabía qué dirección tomar.

Quiero agradecer a mi familia. A mis padres por su apoyo incondicional, que a pesar de las dificultades siempre me han ayudado a cumplir mis sueños y me enseñaron que puedo lograr lo que me proponga con amor y disciplina. Les agradezco todos los esfuerzos, noches en vela, cuidados y amor. Sin su compañía, consejos y enseñanzas no habría sido posible llegar hasta este punto. A mis hermanos por su cariño y por ser la razón que me impulsa cada día a ser no solo el mejor ejemplo sino una mejor persona. También agradezco a familiares y amigos que siempre me han acompañado en este proceso de aprendizaje y crecimiento.

A Jaime, por haber hecho parte de este proceso, por haber creído en Mi cuando me encontré en medio de dificultades, por su apoyo, compañía en los momentos difíciles, por escuchar mis problemas y por tener la paciencia de ayudarme cuando el cansancio no me permitía ver los errores y haber aportado significativamente en este trabajo.

Agradezco a mi tutor, el profe Camilo Suárez, por haber confiado en mí y haberme ayudado a dar el primer paso en medio de la incertidumbre. Por su apoyo y guía que me permitieron crecer tanto académica como personalmente. A Laura y Daniel, con quienes pude compartir días de trabajo y discusiones que enriquecieron mi aprendizaje. Así como a los demás miembros del grupo *Bioprocess Intensification and Rational Design - BIRD* por sus aportes y generar siempre un ambiente colaborativo para compartir conocimiento.

Resumen

El etileno es una materia prima importante en la industria petroquímica. Para su producción mediante craqueo de combustibles fósiles se usan altas temperaturas y presiones. Además del gasto energético se libera una cantidad alta de gases con efecto invernadero, por lo que su impacto ambiental resulta alto. Con el fin de evitar estos efectos adversos es necesario usar un proceso alternativo, con temperaturas y presiones más bajas, y que además use materia renovable. En Colombia, hay una alta oferta de biomasa que podría ser usada para generar este producto con valor agregado. Sin embargo, con el fin de no competir con la industria alimenticia, la biomasa disponible deberá provenir de residuos, los cuales han de tener un pretratamiento. Tradicionalmente, se han usado procesos termoquímicos como la hidrólisis, sin embargo, esto genera desventajas para el proceso ya que representa un gasto energético y puede generar un sustrato con compuestos tóxicos para las células. Como alternativa para este pretratamiento, en este trabajo se evaluó la fermentación de syngas proveniente de residuos agroindustriales colombianos.

Debido a que en la naturaleza aún no se han identificado microorganismos que realicen el proceso de fijación de gas para sintetizar etileno, el objetivo de este estudio fue desarrollar una plataforma biosintética para la bioconversión del syngas en etileno, implementando herramientas de ingeniería metabólica y termodinámicas. Para ello se utiliza un enfoque de diseño racional, construyendo inicialmente un modelo de *black box*, seguido de un modelo de escala genómica, además de implementar la evaluación del potencial económico. Aunque el proceso es energéticamente costoso para la célula, resultaría viable si se implementan reacciones de la ruta de Wood-Ljungdahl y de producción de etileno de manera anaeróbica. Además, se hace económicamente factible si se usa un syngas que contenga más del 50% del contenido de sustrato útil y su precio sea menor a 0.09 USD/kg.

Palabras clave: Syngas, Etileno, FBA, Herbert-Pirt, Microorganismo chasis, Ruta de Wood-Ljungdahl, Potencial económico.

Abstract

Ethylene is an important building block in the petrochemical industry. The production process by cracking use high temperatures and pressures. In addition to this energy cost, it releases a high amount of greenhouse gases posing a high impact on the environment. In order to avoid these adverse effects, it is necessary to use an alternative process, at lower temperatures and pressures, and preferably using renewable feedstocks. In Colombia, there is a high supply of biomass, which could be used to generate this product with added value. However, in order to prevent competition with the food industry, the available biomass should come from waste that may require some pretreatments. Traditionally, thermochemical processes such as hydrolysis have been used, however, it represents disadvantages for the process due to the energy expenditure and toxic compounds for the cells that the final substrate could contain. With the purpose of studying an alternative process to the traditional pretreatment, in this work we explore syngas fermentation of Colombian agroindustrial waste.

There are no yet known microorganisms that naturally carry out the gas fixing process to synthesize ethylene. Therefore, the objective of this study was to develop a biosynthetic platform for the bioconversion of syngas into ethylene, implementing metabolic engineering and thermodynamic tools. Using a rational design approach, we obtained a *black box* model, followed by a genome scale model, as well as an economic evaluation. This indicates that the process, although it is energetically expensive for the cell, it may become feasible if reactions of the Wood-Ljungdahl route and ethylene production are implemented. In addition, it becomes economically feasible if the syngas used contains more than 50% of the useful substrate and its price is lower than 0.09 USD / kg.

Keywords: Syngas, Ethylene, FBA, Herbert-Pirt, Chassis microorganism, Wood-Ljungdahl pathway, Economic potential

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	1
1. Marco teórico	5
1.1 Gas de síntesis.....	5
1.2 Etileno	6
1.3 Microorganismo hospedero.....	8
1.4 <i>Escherichia coli</i>	9
1.5 FBA	10
1.6 Homología de secuencias.....	12
1.7 Precio del etileno y costo de producción del syngas	13
1.7.1 Precio del etileno.....	13
1.7.2 Precio del syngas o gas de síntesis.	16
2. Problema de investigación y objetivos	19
2.1 Planteamiento del problema	19
2.2 Hipótesis.....	19
2.3 Objetivos.....	19
2.3.1 Objetivo general.	19
2.3.2 Objetivos específicos.	20
3. Materiales y métodos	21
3.1 Construcción del modelo de caja negra	21
3.2 Evaluación económica	24
3.3 Reconstrucción del modelo metabólico a escala genómica	27
3.4 Determinación de la presencia o ausencia de los genes codificantes para las enzimas necesarias en las nuevas reacciones implementadas.	28
3.5 Evaluación termodinámica	29
3.6 FBA (<i>Flux Balance Analysis</i>).....	30
4. Resultados y discusión	31
4.1 Determinación de los parámetros del modelo <i>black box</i>	31

4.1.1	Coeficientes estequiométricos de la reacción catabólica	31
4.1.2	Coeficientes estequiométricos de la reacción anabólica	33
4.1.3	Coeficiente de mantenimiento.....	39
4.1.4	Expresiones cinéticas de velocidad consumo o producción de metabolitos	41
4.2	Evaluación del potencial económico de la producción de etileno a partir de syngas	46
4.2.1	Comparación de costos	46
4.3	Reconstrucción de la red metabólica en el microorganismo chasis <i>E. coli</i>	51
4.4	Determinación de la presencia o ausencia de los genes codificantes para enzimas involucradas en nuevas reacciones implementadas.	57
4.5	FBA.....	60
4.5.1	Consistencia del modelo.....	60
4.5.2	Caso de estudio.....	64
4.6	Evaluación termodinámica de las reacciones metabólicas del catabolismo... ..	72
4.7	Optimización de la composición de syngas	75
4.7.1	Análisis de diferentes composiciones	75
4.7.2	Optimización de la composición del syngas.....	78
5.	Conclusiones y recomendaciones	83
5.1	Conclusiones.....	83
5.2	Recomendaciones.....	86
Bibliografía		89

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Fluctuación del precio del etileno entre 2008 y 2018. Tomado de (ICIS, 2018).	14
Figura 1-2. Fluctuación del precio del etileno a) entre mayo de 2017 y marzo de 2018. Tomado de (ICISb, 2018). b) entre febrero de 2017 y febrero de 2018. Tomado de (Global-Platts, 2018).	15
Figura 3-1. Diagrama de la metodología implementada para la evaluación económica .	26
Figura 4-1. Velocidades de consumo o producción vs la velocidad de crecimiento para los 3 casos establecidos en el modelo <i>black box</i>	44
Figura 4-2. Diagrama global del proceso de producción de etileno a partir de syngas...	46
Figura 4-3. Inversión en syngas necesaria para obtener un mol de etileno, de acuerdo a la composición del gas proveniente de diferentes procesos de gasificación.....	49
Figura 4-4. Energía libre de Gibbs para la reacción R00212 (<i>formate C-acetyltransferase</i> , E.C. 2.3.1.54) respecto a la concentración de piruvato.....	56
Figura 4-5. Esquema de las reacciones implementadas en el modelo metabólico.....	56
Figura 4-6. Producción de etileno para diferentes composiciones de syngas	77
Figura 4-7. Cantidad de gas desperdiciado para las diferentes composiciones de syngas.	77

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Resumen del Precio del etileno desde octubre de 2017 y febrero de 2018. Tomado de (Global-Platts, 2018).	16
Tabla 1-2. Costos de gasificación para diferentes procesos, según el país y material gasificado.....	17
Tabla 4-1 Energía libre de Gibbs de formación estándar, bajo condiciones celulares corregidas por temperatura (298 K) y pH (7). ($\Delta fG'^{\circ}$) y energía libre de Gibbs en condiciones celulares corregida por concentración (1mM).	32
Tabla 4-2 Energía de reacción para la formación de etileno a partir de syngas	32
Tabla 4-3. Coeficientes de la reacción de producción de biomasa, para los dos casos planteados, teniendo CO o CO ₂ como sustrato.	36
Tabla 4-4. Energía libre de Gibbs necesaria para sintetizar un mol de biomasa aG , según la fuente de carbono.	37
Tabla 4-5. Valores de $aG/\Delta catG$ para el coeficiente a de la ecuación Herbert-Pirt	38
Tabla 4-6. Reacciones anabólicas para la producción de biomasa a partir de diferentes fuentes de carbono (CO y CO ₂).	39
Tabla 4-7. Coeficientes de mantenimiento celular para los tres diferentes casos de catabolismo propuestos.	40
Tabla 4-8. Ecuaciones de velocidad de consumo o producción de metabolitos en términos de la velocidad de crecimiento μ (para la composición de la biomasa a $\mu = 0.1h - 1$)	41
Tabla 4-9. Reacciones anabólicas para la producción de biomasa a partir de diferentes fuentes de carbono (CO y CO ₂) con la composición de biomasa correspondiente a la velocidad de crecimiento $0.3 h^{-1}$	43
Tabla 4-10. Ecuaciones de velocidad de consumo o producción de metabolitos en términos de la velocidad de crecimiento μ (para la composición de la biomasa a $\mu = 0.3h - 1$)	43

Tabla 4-11. Precio del syngas, composición y rendimiento para la producción de etileno	47
Tabla 4-12. Rendimiento y composición ideal para que el bioproceso de producción de etileno a partir de syngas sea económicamente viable.....	50
Tabla 4-13. Modificaciones del modelo metabólico para <i>E. coli</i> reportado por Taymaz (2010).....	52
Tabla 4-14. Reacciones de componentes celulares y biomasa implementados en el modelo	53
Tabla 4-15. Reacciones adicionadas al modelo a escala genómica para la producción de etileno a partir de syngas	55
Tabla 4-16. Resultados del alineamiento BLAST para las nuevas enzimas implementadas en el modelo metabólico.....	57
Tabla 4-17. Comparación entre las velocidades de consumo y producción de metabolitos del modelo <i>black box</i> y <i>fluxes</i> [mol/C-molX*h] extracelulares del modelo metabólico obtenidos mediante FBA	61
Tabla 4-18. Comparación entre el análisis FBA para el modelo 1 (0.1 h ⁻¹) y el modelo 2 (0.3 h ⁻¹) usando las mismas restricciones para el espacio solución.....	62
Tabla 4-19. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente mezclas de carbón y de biomasa residual (cáscara de café, aserrín y cáscara de arroz) en porcentajes de 6% y 15%.....	65
Tabla 4-20. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de biomasa residual (caña y carbón)	66
Tabla 4-21. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de pirolisis de biomasa residual (bagazo de caña de azúcar, cascara de arroz y cáscara de almendra de palma)	68
Tabla 4-22. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de gasificación de biomasa residual (bagazo de caña de azúcar, cáscara de arroz y cáscara de almendra de palma)	68
Tabla 4-23. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de biomasa residual del sector floricultor del oriente antioqueño.	69
Tabla 4-24. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de biomasa residual del sector floricultor	71
Tabla 4-25. Energía libre de Gibbs de las reacciones del modelo metabólico involucradas en el catabolismo, bajo condiciones celulares a 1 M ($\Delta rG'^{\circ}$) y 1mM ($\Delta rG'_{m}$).....	73

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
a	Coefficiente de crecimiento Herbert-Pirt
a_G	Energía necesaria para la formación de biomasa
b	Coefficiente de producto Herbert-Pirt
m_G	Coefficiente de mantenimiento Herbert-Pirt
m_S	Coefficiente de mantenimiento Herbert-Pirt
q_i	Velocidad de consumo o producción del metabolito i
R	Constante universal de los gases
T	Temperatura

Símbolos con letras griegas

C	Término
γ_p	Grado de reducción del producto
γ_s	Grado de reducción del sustrato
γ_x	Grado de reducción de la biomasa
ΔG	Energía libre de Gibbs
μ	Velocidad de crecimiento

Abreviaturas

Abreviatura	Compuesto
10fthf	<i>10-Formyltetrahydrofolate</i>
2kmb	<i>2-keto-4-methylthiobutyrate</i>
5mthf	<i>5-Methyltetrahydrofolate</i>

acald	<i>Acetaldehyde</i>
accoa	<i>Acetyl-CoA</i>
adp	ADP
athy	<i>Acetylene</i>
atp	ATP
cfesp	<i>Corrinoid iron sulfur protein</i>
Co	CO
co2	CO ₂
coa	<i>Coenzyme A</i>
dkmpp	<i>2,3-diketo-5-methylthio-1-phosphopentane</i>
ethe	<i>Ethylene</i>
fdxo_42	<i>Oxidized ferredoxin</i>
fdxr_42	<i>Reduced ferredoxin</i>
fgam	<i>N2-Formyl-N1-(5-phospho-D-ribosyl)glycinamide</i>
for	Formato
fpram	<i>2-(Formamido)-N1-(5-phospho-D-ribosyl) acetamidine</i>
Gln	<i>Glutamine</i>
glu-L	<i>L-Glutamate</i>
H	H ⁺
h2	H ₂
h2o	H ₂ O
mecfsp	<i>Methylcorrinoid iron sulfur protein</i>
methf	<i>5,10-Methenyltetrahydrofolate</i>
mlthf	<i>5,10-Methylenetetrahydrofolate</i>
nad	NAD ⁺
nadh	NADH
nadp	NADP ⁺
nadph	NADPH
oaa	<i>Oxaloacetate</i>
Pi	Fosfato inorgánico
Pyr	<i>Pyruvate</i>

Thf

5,6,7,8-Tetrahydrofolate

Introducción

Los microorganismos tienen capacidades bioquímicas diversas debido a las diferentes rutas metabólicas que poseen. Esto les permite asimilar diferentes compuestos desde dióxido de carbono hasta amonio para generar diferentes productos. Sin embargo, pocos compuestos se producen industrialmente a través de conversión microbiana debido a que los bioprocesos no siempre son económicamente rentables. Para lograr esto es necesario que los microorganismos utilizados generen preferiblemente altas productividades, concentraciones y altos rendimientos del compuesto de interés.

La ingeniería metabólica permite mejorar la eficiencia de los procesos fermentativos, además de expandir el espectro de productos que puede sintetizar un microorganismo. Esta herramienta junto con la biología de sistemas, toma importancia ya que hace posible el mejoramiento de microorganismos para lograr plataformas sostenibles que usen materias primas renovables tales como lignocelulosa o biomasa de desechos con el fin de generar productos de valor agregado. Esto es una alternativa para dar solución a los problemas que genera el uso de recursos fósiles en procesos petroquímicos, principalmente ambientales, por el gasto energético y emisiones contaminantes. Sin embargo, el diseño de cepas y su modificación no es una tarea sencilla, debido a que las rutas metabólicas propias de los sistemas biológicos han evolucionado mediante fuertes regulaciones que en la naturaleza les permiten ser sistemas robustos (Gu et al., 2019).

Uno de los procesos más contaminantes de la industria petroquímica es la producción de etileno, debido a su alto gasto energético y emisiones contaminantes. El etileno es un importante producto de la industria química. Es usado comúnmente como materia prima en diferentes procesos para sintetizar polietileno, glicol, vinil, entre otros (Flickinger, 2010). Sus derivados tienen múltiples aplicaciones en la industria automotriz, construcción,

agroquímicos, textiles, detergentes y empaques (Thiruvengkataswamy, Eljack, Roy, Mannan, & El-halwagi, 2016). Este producto químico destaca como uno de los más demandados, alcanzando una demanda global de 150 millones de toneladas al año. Cabe destacar que su demanda va en aumento debido a sus aplicaciones, por lo que se pronostica crecimiento en su mercado (Bernabé, Gallego, Haro, & Azapagic, 2018).

El etileno se produce principalmente en la industria petroquímica mediante la pirolisis de nafta, donde se lleva a cabo un precalentamiento de la corriente de alimentación a temperaturas entre 750 y 850°C. El rendimiento del proceso depende fuertemente de la materia prima usada en el proceso, variando entre 35% y 80% (Mohsenzadeh, Zamani, & Taherzadeh, 2017). La producción de etileno es uno de los procesos químicos tradicionales con mayor demanda energética y emisión de gases con efecto invernadero (Ghanta, Fahey, & Subramaniam, 2013), además de usar materiales fósiles como materia prima. Debido a los impactos ambientales del proceso, el interés por el uso de materias primas renovables ha aumentado en las últimas décadas. (Mohsenzadeh et al., 2017)

La producción de bioetileno es una alternativa para modificar el proceso de síntesis tradicional. Debido a que la biomasa usada como sustrato es una fuente de carbono renovable, que se puede encontrar en diferentes formas y cantidades. Además, es posible recurrir a material lignocelulósico, así como a desechos agroindustriales para evitar la competencia con el mercado alimenticio. Sin embargo, no todos los microorganismos tienen capacidades metabólicas para usar estas fuentes de carbono como sustrato. Por esta razón, se llevan a cabo pretratamientos que liberen los azúcares fermentables. Durante este proceso se generan gastos energéticos y se generan inhibidores para el crecimiento de algunos microorganismos, además de que se desecha parte de los residuos por ser compuestos no fermentables (Daniell, Köpke, & Simpson, 2012). Con el fin de dar solución a esta problemática, es necesario contemplar alternativas de fermentaciones no convencionales.

La fermentación de gases es un proceso que ha ganado interés en los últimos años, pues permite la producción de diferentes combustibles y compuestos químicos. Esta tecnología aprovecha diferentes fuentes de carbono renovables desde materia orgánica gasificada hasta gases de desecho industrial. A diferencia de la fermentación de material lignocelulósico, donde se deja de aprovechar un 40% de la materia prima, la fermentación

gaseosa permite usar casi por completo la biomasa. La conversión del syngas se ha llevado a cabo durante décadas mediante el proceso de Fisher-Tropsch (FTP), a pesar de ser un proceso poco selectivo, de implementar costosos catalizadores, así como utilizar altas temperaturas y presiones. En el caso de los procesos biológicos la ventaja es evidente ya que los microorganismos son altamente selectivos por la presencia de catalizadores enzimáticos, además de verse poco influenciados por la proporción de los gases del sustrato, lo que es de vital importancia en el FTP. (Bengelsdorf, Straub, & Dürre, 2013)

Colombia es un país que cuenta con muchos recursos naturales que no solo se ven reflejados en biodiversidad, sino en biomasa disponible. Como se menciona en el Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia (Escalante, Oduz, Zapata, Cardona, & Duarte, 2011), anualmente se producen cerca de 17 millones de toneladas de residuos agrícolas, 207 millones de toneladas provenientes del sector pecuario y aproximadamente 400 toneladas del sector urbano. Estos residuos tienen un potencial energético de 538.000 TJ/año si se procesara la biomasa mediante combustión, pirolisis, gasificación, termólisis o digestión anaeróbica para generar calor o electricidad. Esta biomasa disponible debe tener un tratamiento adecuado, ya que además de desperdiciar esta fuente de carbono, una mala disposición generaría problemáticas ambientales.

Además de las alternativas propuestas en el atlas de la biomasa para el uso de este recurso, debe considerarse el uso de los gases para obtener productos de valor agregado. Diferentes microorganismos poseen la capacidad de fijar gases como monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno para generar productos como acetato, butanol, etanol, lactato, entre otros. Sin embargo, no son usados en la industria en procesos comerciales debido a sus bajos rendimientos. En este caso, es posible hacer uso de herramientas para el diseño de cepas, con el fin de modificar microorganismos robustos que se usen en la industria y puedan transformar estos gases en una gama más amplia de productos.

A pesar de que diferentes microorganismos tienen capacidades metabólicas para consumir syngas como sustrato o producir etileno, no se han reportado aún microorganismos con la maquinaria metabólica necesaria para realizar ambos procesos naturalmente. Por este motivo es necesario diseñar el proceso a diferentes escalas, especialmente un

microorganismo con capacidades metabólicas que le permitan integrar ambos procesos en su sistema bioquímico.

El objetivo principal de este trabajo es el diseño *in silico* de una plataforma biosintética para la producción de etileno a partir de syngas. Para ello se hará uso de herramientas de ingeniería metabólica y termodinámicas. Siguiendo un enfoque de diseño racional, se evaluará el proceso no sólo a nivel metabólico, sino que se determinarán los requerimientos energéticos usando modelos de caja negra. Además, se desea evaluar el potencial económico del proceso en una etapa temprana, para determinar no solo la viabilidad económicamente, sino las restricciones necesarias en el metabolismo celular y para el diseño del proceso a escala industrial.

El modelo metabólico a escala genómica se construirá a partir del metabolismo propio de un microorganismo chasis u hospedero, que será modificado mediante la inserción de reacciones propias de microorganismos que fijen CO, CO₂ y H₂ o produzcan etileno. Su consistencia se evaluará mediante análisis de balance de flujos, con restricciones establecidas en el modelo de caja negra. A pesar de que no se evaluarán los procesos de pretratamiento o de separación del producto, se busca establecer si con los requerimientos metabólicos celulares es posible tener un rendimiento adecuado para que el proceso sea económicamente factible en el mercado.

1. Marco teórico

1.1 Gas de síntesis

El gas de síntesis (o syngas) es una mezcla de hidrógeno, monóxido de carbono y dióxido de carbono principalmente. Este gas se produce mediante la gasificación de materia orgánica a elevadas temperaturas (600 – 900°C) en presencia de un agente gasificante, bien sea oxígeno, aire, vapor de agua o una mezcla de estos (Latif, Zeidan, Nielsen, & Zengler, 2014). El proceso de gasificación involucra cuatro pasos principales: secado de la biomasa, pirolisis, oxidación y reducción. Dependiendo de las condiciones de operación durante la gasificación, el syngas puede contener impurezas y es necesario llevar a cabo un paso adicional de purificación para remover los subproductos en aplicaciones como generación de electricidad.

La tecnología que implementa el proceso de gasificación se ha desarrollado para diferentes escalas, configuraciones del proceso, agentes gasificantes y condiciones de operación, lo que ha permitido diseñar procesos económicamente viables. El syngas se usa principalmente como una fuente de calor o vapor para calefacción y en procesos industriales, como se mencionó anteriormente, para producir energía eléctrica. Además, es una fuente de hidrógeno puro y monóxido de carbono que se usa como precursor de una amplia variedad de compuestos químicos en procesos como Fischer-Tropsch.

Tradicionalmente, la síntesis de compuestos orgánicos a partir de syngas se ha llevado a cabo mediante el proceso termoquímico Fischer-Tropsch, el cual requiere altas presiones y temperaturas (Daniell et al., 2012). No obstante, es posible transformar el syngas mediante procesos biológicos. Las principales ventajas de la bioconversión son

precisamente las bajas temperaturas y presiones que se requieren, así como la mayor tolerancia del biocatalizador a las impurezas del gas de síntesis (Bengelsdorf et al., 2013). Las principales bacterias involucradas en la bioconversión de gas de síntesis están catalogadas como bacterias acetogénicas, entre ellas, bacterias del género *Clostridium*, *Acetobacterium* y *Eubacterium* (Schiel-Bengelsdorf & Dürre, 2012). Estos microorganismos usan la ruta reductiva de acetil-CoA o ruta de Wood-Ljungdahl para la conversión de gas de síntesis. Mediante esta ruta es posible sintetizar diversidad de compuestos ya que se usa el acetil-CoA como intermediario (Schiel-Bengelsdorf & Dürre, 2012). Entre los productos más destacados se encuentran ácido acético, etanol, 2,3-butanodiol, ácido butírico y butanol (Bengelsdorf et al., 2013). Ahora bien, con el fin de diversificar los productos obtenidos mediante la fermentación del syngas, se han usado herramientas de ingeniería metabólica y biología sintética en diferentes microorganismos (Daniell et al., 2012).

La fermentación de gas de síntesis es una alternativa que ofrece ventajas sobre otros procesos de bioconversión que requieren pretratamientos de la biomasa. En las fermentaciones acuosas tradicionales, la biomasa proveniente de residuos agroindustriales debe pasar por procesos como hidrólisis, con el fin de liberar los azúcares fermentables, sin embargo, parte de la materia orgánica no puede ser usada por los microorganismos y se desecha. La gasificación, por su parte, es una alternativa que permitiría un mejor aprovechamiento del carbono y no requeriría un tipo específico de biomasa para llevarse a cabo (Redl, Diender, Ølshøj, Sousa, & Toftgaard, 2016). Por esta razón, la fermentación de syngas es una posible ruta para valorización de biomasa, especialmente si proviene de desechos agroindustriales o material lignocelulósico.

1.2 Etileno

El etileno o eteno es un hidrocarburo formado por dos átomos de carbono unidos mediante un doble enlace, los que a su vez se enlazan con dos átomos de hidrógeno cada uno (C_2H_4). Es un compuesto muy versátil puesto que su doble enlace entre carbonos (enlace

π) tiene una alta densidad de electrones y es susceptible al ataque de electrófilos, por esta razón es altamente reactivo. Debido a su alta actividad química, el etileno se usa para la producción de importantes monómeros y tiene un amplio número de derivados usados en la industria. Principalmente se emplea para la producción de polietileno de bolsas plásticas, sin embargo, se puede convertir en una gran variedad de compuestos químicos, entre ellos óxido de etileno, estireno, PVC, etanol, ácido acrílico y poliestireno usados para la elaboración de detergentes, surfactantes y envases de aislamiento. Lo que evidencia la utilidad del compuesto (Lynch, 2014).

El proceso de producción más usado alrededor del mundo actualmente es el craqueo, este proceso no catalítico propicia el fraccionamiento térmico de materia prima como etano, propano o combustibles líquidos, mediante la implementación de altas temperaturas y bajas presiones. Además de este proceso, se ha usado la transformación de metanol a olefinas, Fischer-Tropsch y recuperación de gas de refinerías. Estos procesos son altamente energéticos, especialmente el craqueo, que además genera subproductos que requieren de arduos procesos de purificación (Verma, Singla, Lal, & Sarma, 2016). Por esta razón se han explorado nuevos procesos para la producción de etileno, que requieran temperaturas y presiones menores y puedan implementar materias primas más baratas.

El etileno se puede obtener mediante procesos biológicos, además de las rutas termoquímicas mencionadas, pues en plantas es una importante fitohormona involucrada en señalización. Sin embargo, la cantidad que se produce es mínima (Pirkov, Albers, Norbeck, & Larsson, 2008). Además de las plantas, algunos microorganismos tienen la capacidad de producir etileno. Estos se descubrieron a mediados de 1990, cuando se demostró que el gas se formaba tanto en mohos verdes de frutas cítricas (*Penicillium digitatum*), como en patógenos de humanos (*Blastomyces dermatitidis*) (Eckert et al., 2014).

Se conocen dos posibles rutas metabólicas para la producción de etileno, la ruta de L-metionina dependiente de ácido 2-ceto-4-metilbutírico (KMBA) y la ruta de 2-oxoglutarato dependiente de la enzima formadora de etileno (*efe*). En una evaluación realizada por Nagahama et al. 1992, se encontró que solo una de 227 cepas productoras de etileno (*Pseudomonas syringae*) usa la ruta de *efe*, sin embargo, presentó el mayor

rendimiento y eficiencia (Lynch, 2014). Actualmente sería posible mediante la biología sintética e ingeniería metabólica hacer que microorganismos produzcan etileno con unos rendimientos mayores, para lograr que el proceso de bioproducción sea viable económicamente y de esta manera cubrir la demanda del mercado.

1.3 Microorganismo hospedero

Un chasis es una célula hospedera usada como recipiente para implementar ingeniería en sistemas biológicos. Este es importante para lograr la propagación y expresión de la información genética y obtener organismos que cumplan una serie de especificaciones técnicas. A pesar de que hay una gran variedad de hospederos potenciales, estos no pueden ser seleccionados aleatoriamente, por el contrario, es necesario hacerlo cuidadosamente de acuerdo a la tarea que se desea llevar a cabo. Entre los principales factores que se deben tener en cuenta, se pueden mencionar de manera general la resistencia del chasis a las condiciones ambientales de la aplicación final, propiedades metabólicas y su versatilidad a la hora de ser manipulado a nivel molecular.

Los microorganismos más usados en biología sintética son bacterias como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, además de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estos microorganismos son modelos ampliamente estudiados a escala de laboratorio, por lo que se cuenta con una gran variedad de herramientas moleculares disponibles para su manipulación. Así mismo, cumplen con especificaciones técnicas importantes, entre ellas se encuentran el rápido crecimiento con bajas exigencias nutricionales, la capacidad de consumir diferentes sustratos y usar diferentes aceptores finales de electrones. Esto en especial permite que se puedan implementar condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, además de permitir aplicaciones en procesos electroquímicos. En cuanto a la membrana celular, es necesario que sea resistente y si es el caso, permita modificaciones como inserción de proteínas de membrana o anclaje de anticuerpos, entre otras aplicaciones. Además de la fisiología es necesario comprender más profundamente la estructura de la red metabólica y la forma en que puede interactuar con nuevos genes

insertados. Una mejor comprensión del sistema se ve reflejado en predicciones más precisas.

1.4 *Escherichia coli*

Originalmente fue llamada “*Bacterium coli commune*”, fue aislada en 1884 por Theodor Escherich y actualmente es una de las bacterias más estudiadas. Existen cepas que son inofensivas, así como otras que son patógenas y causan afecciones tanto intestinales como en otros tejidos. *E. coli* es una bacteria Gram-negativa, un bacilo no formador de esporas de aproximadamente 0.5 μm de diámetro y de 1.0-3.0 μm de longitud. Posee flagelos peritricos que le otorgan movilidad en medios líquidos además de pilis que les permite adherirse, especialmente en fases de colonización o tienen funciones sexuales. Algunas cepas producen capsula de polisacáridos compuesta por antígenos K y antígenos M que se sintetizan bajo condiciones de alta osmolaridad, baja temperatura o humedad (Batt, 2014).

Esta bacteria es aerobia facultativa, tiene la capacidad de reducir nitratos a nitritos. Cuando crece en medios con glucosa u otros carbohidratos produce ácidos y gases como hidrógeno y dióxido de carbono. Además de fermentar lactosa y glucosa, esta bacteria puede metabolizar D-manitol, D-sorbitol, L-arabinosa, maltosa, D-xilosa, trehalosa y D-manosa. Puede crecer en un amplio rango de temperatura entre los 15°C y 48°C, sin embargo, el intervalo de temperatura para el crecimiento óptimo es de 37°C a 42°C. Puede crecer en medios con pH de 5.5-8.0 y el óptimo es un pH neutro. Sus sistemas de genes múltiples le permiten adaptarse fácilmente al medio. Su tiempo de duplicación es de 25 minutos a 37°C aproximadamente (Balows, Trüper, Dworkin, Harder, & Schleifer, 2013).

E. coli no puede fijar nitrógeno molecular, pero usa diferentes compuestos como amonio o aminoácidos como fuente de nitrógeno. La mayor velocidad de crecimiento se logra con glucosa como fuente de carbono. El metabolismo central se lleva a cabo por la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, la vía de pentosas fosfato y el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Además, por ser aerobia facultativa genera diferentes productos mediante la fermentación mixta (Förster & Gescher, 2014).

Es una bacteria además de bien estudiada, robusta. Por lo que se ha usado no solo como un microorganismo modelo, sino como un productor de diferentes químicos mediante su modificación genética. Esta bacteria ha sido usada para aplicar ingeniería con el fin de mejorar los rendimientos de algunos flujos metabólicos por la facilidad de acumular importantes precursores. Diferentes estudios han mostrado que *E. coli* puede ser usada como chasis por su capacidad de sintetizar importantes metabolitos como piruvato, acetil-CoA, malonil-CoA y shikimato para posteriormente convertirlos en alcohol, ácidos orgánicos, ácidos grasos, aminoácidos, isoprenoides y compuestos aromáticos (Matsumoto, Tanaka, & Kondo, 2017)

1.5 FBA

El análisis de balance de flujos, FBA por sus siglas en inglés, es un enfoque matemático basado en restricciones para la evaluación de flujos de metabolitos a través de una red metabólica, especialmente de modelos a escala genómica. Esta herramienta permite predecir velocidades de crecimiento, así como la velocidad de producción o consumo de algún metabolito de interés.

Los principales pasos para realizar un FBA son:

- Definición del sistema
- Obtención de la estequiometría de las reacciones involucradas en el sistema
- Definición de la función objetivo, restricciones bioquímicas y termodinámicas
- Optimización

Para hallar soluciones matemáticas esta herramienta requiere de una representación matricial, donde se organizan de manera esquemática los coeficientes estequiométricos de las reacciones involucradas en el metabolismo. Esta matriz $S_{m \times n}$ relaciona las velocidades de flujo de las reacciones $v_{n \times 1}$ con el cambio de las concentraciones de los metabolitos en el tiempo $\frac{dx}{dt}$ de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = Sv \quad (1.1)$$

Que en estado estacionario se puede expresar de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = Sv = 0 \quad (1.2)$$

El vector v contiene tanto los flujos internos como los de transporte.

Usualmente existen más metabolitos que reacciones, por lo que el sistema está subdeterminado y es necesario establecer restricciones adicionales. Estos pueden ser físico-químicos, topológicos, dependientes del medio o regulatorios, aunque lo más usado son mediciones de determinados *fluxes*.

Las principales restricciones del sistema están contenidas en la matriz estequiométrica. Estas igualdades aseguran que la distribución de *fluxes* cumpla con la suposición de estado estacionario y los compuestos estén balanceados correctamente. Además de estas restricciones estequiométricas, el espacio de solución se puede reducir si se imponen límites a los *fluxes*, en este caso la expresión matemática sería en forma de desigualdades.

Después de tener una representación y delimitación clara del sistema, es necesario establecer una función objetivo, como se muestra en la ecuación (1.3). Las más usadas son la tasa de crecimiento y producción de ATP, debido a que se asume que la célula ha evolucionado hacia un sistema óptimo que le permita crecer usando la mínima cantidad de nutrientes. Sin embargo, esto no siempre es comparable con datos experimentales, por lo que se implementan otras funciones objetivo tales como la minimización de producción de ATP, en el caso que se desee optimizar la eficiencia energética de la célula o la maximización de la producción de algún metabolito de interés, si se desea evaluar las capacidades celulares. En algunos casos es posible implementar varias funciones objetivo en una misma optimización, dependiendo de las necesidades del estudio.

$$\text{Max } C^T v \text{ s. t. } S \cdot v = 0 \quad (1.3)$$

Donde c es la función objetivo.

Finalmente, la solución se obtiene mediante programación lineal, donde el resultado es una distribución de *fluxes* y se puede interpretar como la capacidad metabólica del sistema.

1.6 Homología de secuencias

Determinar el grado de similitud entre secuencias es un procedimiento usado principalmente en el estudio de nuevos genomas. Este análisis permite obtener alineamientos más precisos a partir de múltiples secuencias, tener una búsqueda más sensible, además de hacer análisis evolutivo y predecir el fenotipo de los microorganismos. Con base en la similitud entre secuencias es posible inferir si existe homología, es decir, comparten un ancestro común. Siempre y cuando los resultados sean estadísticamente significativos.

Existen diferentes softwares diseñados para el análisis de semejanza entre secuencias, entre los más usados se encuentran BLAST, FASTA y SSEARCH. A pesar de que la distribución esperada de los alineamientos similares hallados por casualidad se describe mediante una distribución de valores extremos, estos programas computacionales, reportan el *E-value*, que representa el número esperado de veces que una puntuación puede obtenerse por casualidad. Así mismo, se reporta el porcentaje de identidad y el bit score, siendo las estimaciones estadísticas más usadas para el análisis entre los resultados que arrojan, debido a su fácil interpretación.

En algunos casos, la similitud se puede determinar por medio del porcentaje de identidad. Si se usa este criterio para establecer homología entre dos secuencias es necesario que el porcentaje sea mayor a 30%. Sin embargo, este criterio no es confiable en la mayoría de casos debido a su baja sensibilidad. Por esta razón es preferible usar el criterio de *E-value* o el *bit score*. El valor esperado *E-value* depende del tamaño de la base de datos, su significancia disminuye proporcionalmente al tamaño de la base de datos. Por esta razón en bases de datos locales pequeñas es más probable encontrar secuencias homologas, que en una de mayor tamaño. A diferencia de este estadístico, el bit score, no depende del tamaño de la base de datos. Este representa el tamaño de la base de datos necesario para que la coincidencia encontrada entre los datos sea solo por casualidad. Si

se usa este criterio de selección, es necesario que el valor sea mayor a 50 para establecer homología entre las secuencias. Mientras que el *E-value* debe ser menor a $1e^{-10}$ (Pearson, 2013).

Los alineamientos entre secuencias se pueden hacer tanto con secuencias de nucleótidos, como de aminoácidos. Sin embargo, comparar secuencias de nucleótidos traducidas con proteínas es un análisis mucho más sensible que la comparación entre secuencias de nucleótidos. Puesto que entre proteínas es posible en algunos casos detectar homólogos con *E-values* de 0.001, mientras que entre secuencias de nucleótidos un alineamiento con *E-value* igual a $1e^{-6}$ puede ocurrir por casualidad. En consecuencia, es recomendable el uso de secuencias proteicas para la búsqueda de secuencias homologas. Que a pesar de no ser suficiente para establecer si dos proteínas tienen la misma función, es posible asumir que una alta similitud entre dos secuencias implica que tengan una estructura similar (Pearson, 2013).

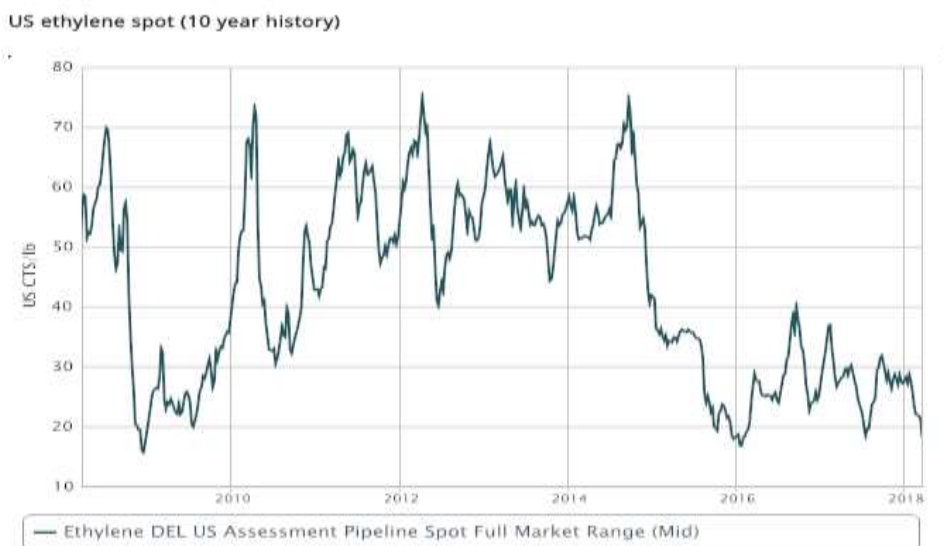
1.7 Precio del etileno y costo de producción del syngas

1.7.1 Precio del etileno

El precio del etileno se ve afectado por diferentes factores externos, reportes de *Chemical Industry News & Chemical Market Intelligence*, ICIS, muestran su variación durante los últimos diez años en Estados Unidos, como se muestra en la Figura 1-1. Fluctuación del precio del etileno entre 2008 y 2018. Tomado de ICIS (2018). En esta se evidencia la gran fluctuación del precio a través del tiempo. Dos eventos importantes se pueden rescatar de esta información y son las caídas drásticas del precio en el año 2008 y 2016. En el primer caso, la variación se dio por la crisis financiera que atravesaban los Estados Unidos. La segunda caída del precio se debió al desastre causado por el huracán Harvey que afectó la economía norteamericana fuertemente, además de esto, el precio se vio influenciado por la reducción en el precio del petróleo a nivel mundial. Se resalta también el hecho de

que la demanda tiene una influencia directa sobre producción de etileno. La disminución en fabricación de derivados tiene una repercusión directa en el consumo de materia prima.

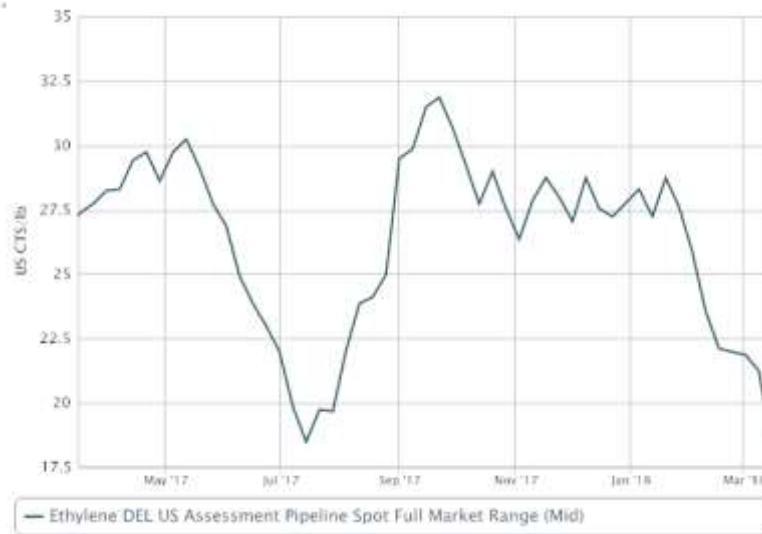
Figura 1-1. Fluctuación del precio del etileno entre 2008 y 2018. Tomado de ICIS (2018).



Las variaciones en el precio del etileno no son tan grandes desde mediados del 2016. Después de la caída en el precio en mayo de 2017, este aumentó nuevamente alcanzando la referencia anterior. En este reporte concuerdan tanto S&P GLOBAL PLATTS como ICIS, proveedores de información de materiales petroquímicos. En la Figura 1-2 se muestra la variación del precio del etileno en los últimos meses del año 2017 y comienzos del 2018 reportado por ambas entidades.

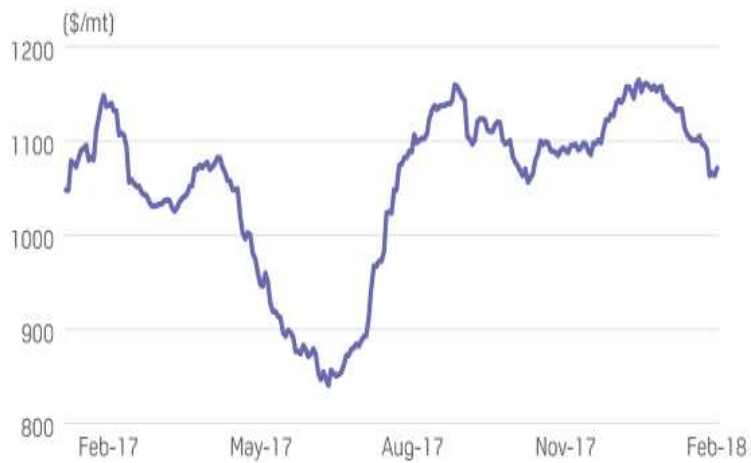
El precio promedio del etileno durante los 5 meses reportados por PLATTS GLOBAL es de 1109.61 USD/mt, como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Durante este periodo de tiempo no se da una fluctuación muy grande en el precio, sin embargo, este puede cambiar en el transcurso de los próximos años. Para efectos prácticos el análisis se llevará a cabo con este valor, que además es uno de los más bajos reportados.

Figura 1-2. Fluctuación del precio del etileno a) entre mayo de 2017 y marzo de 2018. Tomado de (ICISb, 2018). b) entre febrero de 2017 y febrero de 2018. Tomado de (Global-Platts, 2018).



a.

PLATTS GLOBAL ETHYLENE INDEX



b.

Tabla 1-1. Resumen del Precio del etileno desde octubre de 2017 y febrero de 2018. Tomado de (Global-Platts, 2018).

Mes	Precio USD/mt
Octubre de 2017	1103.66
Noviembre de 2017	1084.05
Diciembre de 2017	1106.96
Enero de 2018	1152.63
Febrero de 2018	1100.77

1.7.2 Precio del syngas o gas de síntesis.

La producción de syngas a partir de biomasa es un proceso que ha ganado interés en los últimos años, especialmente por la problemática energética que atraviesa el mundo cuya principal fuente de energía son los combustibles fósiles. La biomasa es una fuente de materia prima constante ya que es renovable, además presenta ventajas sobre los combustibles fósiles por contener bajas cantidades de sulfuros, producir menos cenizas y generar menos emisiones al aire. Aunque la biomasa es una materia prima prometedora, el proceso de gasificación es endotérmico y requiere grandes cantidades de energía, este factor es la principal restricción para tener una alta eficiencia térmica. (Atikah, Abdullah, Ha, & Inayat, 2016)

El precio del syngas, así como su composición se ven afectados principalmente por variables del proceso como el tipo de reactor, el agente gasificante, las condiciones de operación, la materia prima, entre otros. Por esta razón no es posible establecer un valor único (Atikah et al., 2016).

En la Tabla 1-2 se presentan algunos costos reportados para diferentes procesos de producción de syngas. Los valores más elevados pertenecen a la producción de hidrógeno por medio de gasificación de biomasa, esto se debe a la necesidad de implementar etapas

adicionales entre ellas la purificación que permite obtener una concentración más alta de hidrógeno. En los demás casos el principal objetivo no es la producción de hidrogeno, por lo que las condiciones del proceso son diferentes, así como la composición final del syngas. Este factor es importante para los usos que se le den al gas posteriormente, especialmente en procesos de transformación o síntesis.

Tabla 1-2. Costos de gasificación para diferentes procesos, según el país y material gasificado

Proceso	Material gasificado	Costo (USD/kg)	País	Año	Referencia
1	Biomasa residual	1.69	China	2008	(Lv, Wu, Ma, & Yuan, 2008)
2	Fruto vacío de palma de aceite	1.91	Malasia	2010	(Inayat, Ahmad, Mutalib, & Yusup, 2010)
3	Astillas de madera	1.38	Estados Unidos	2011	(Kim, Parajuli, Yu, & Columbus, 2011)
4	Carbón	0.045	Estados Unidos	2016	(Pei, Korom, Ling, & Nasah, 2016)
5	Astillas de madera	0.11	Singapur	2018	(Yao, You, Ge, & Wang, 2018)

Inayat y colaboradores reportan el costo del proceso de producción de hidrógeno como 1.91 USD/kg. Los frutos vacíos de palma son abundantes en Malasia debido a que es uno de los más grandes productores de aceite de palma y se generan más de 17 millones de toneladas por año de residuos. Según este estudio es posible disminuir del costo del proceso a 1.84 USD/kg (Inayat et al., 2010), si se implementa un sistema térmico integrado. Un costo similar presentan Lv y colaboradores, 1.69 USD/kg. En este caso la biomasa proviene de diferentes residuos agroindustriales. A pesar de que el análisis se lleva a cabo

en China y con diferente biomasa, el costo del proceso es similar al anterior, ya que involucra las mismas etapas para producción hidrógeno (Lv et al., 2008).

A diferencia de los dos casos anteriores, Kim y colaboradores (2011) presentan un análisis económico para un proceso de gasificación sencillo, que no incluye la purificación de hidrógeno. La biomasa fue astillas de madera, sin embargo, hay un costo adicional de transporte y almacenamiento de la materia prima. Este estudio indica que es necesario aumentar la capacidad de la planta, de $60 \text{ Nm}^3\text{h}^{-1}$ a $230 \text{ Nm}^3\text{h}^{-1}$ para que el proceso tenga un menor costo, ya que el calculado es de 1.38 USD/kg h. (Kim et al., 2011). Yao y colaboradores (2018) analizan también la gasificación de astillas de madera, sin embargo, lo hacen mediante modelos. Su análisis económico indica que el costo del proceso depende de diferentes variables, entre ellos la relación de equivalencia entre el flujo de aire y la velocidad de alimentación de la biomasa. El valor óptimo para el costo del gas de síntesis es 0.11 USD/kg (Yao et al., 2018). Es necesario resaltar que esto afecta no solo el precio, sino la composición del gas.

El costo de gasificación reportado por Pei y colaboradores es de 0.045 USD/kg, el estudio se realizó en Estados Unidos y el material gasificado fue carbón subterráneo. El syngas obtenido tiene un alto contenido de hidrógeno, de relación 1:2 de CO:H₂. El factor de mayor influencia para el precio es la profundidad del carbón y el espesor de las grietas donde se ubica. En este proceso se incluyen etapas de reacción *shift* y purificación del gas. Sin embargo, se da *in situ*, por lo que no se incluyen los costos de transporte o pretratamiento del material gasificado. (Pei, Korom, Ling, & Nasah, 2014)

2. Problema de investigación y objetivos

2.1 Planteamiento del problema

¿Qué modificaciones se deben hacer en el metabolismo de un microorganismo que no es productor natural de etileno para sintetizar este compuesto a partir de syngas?

2.2 Hipótesis.

La implementación de la ruta de Wood Ljungdahl o Calvin-Benson-Bassham y la enzima formadora de etileno (efe) en microorganismos que no son productores naturales de etileno, permiten la síntesis de este compuesto a partir de syngas (CO, CO₂, H₂, CH₄) en un microorganismo chasis u hospedero

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general.

Desarrollar *in silico* un modelo metabólico de una plataforma biosintética, que permita la transformación de syngas a etileno en un microorganismo chasis, mediante la implementación de análisis termodinámico y estrategias de la ingeniería metabólica.

2.3.2 Objetivos específicos.

- Estimar la viabilidad termodinámica y los requerimientos energéticos del proceso de conversión de syngas a etileno
- Determinar cuáles enzimas de la ruta de producción de etileno están presentes y cuáles están ausentes en el microorganismo hospedero o chasis, para reconstruir el sistema de biosíntesis.
- Reconstruir *in silico* la red metabólica para la producción de etileno a partir de syngas en un microorganismo chasis mediante el uso de herramientas de la ingeniería metabólica.
- Plantear diferentes escenarios para la producción de etileno dónde se evalúen los rendimientos del proceso si se usa como sustrato syngas proveniente de biomasa residual colombiana

3. Materiales y métodos

3.1 Construcción del modelo de caja negra

Para construir el modelo de caja negra se usó la metodología planteada por Sef Heijnen en el texto *Biothermodynamics* (von Stockar & van der Wielen, 2013). Donde el sustrato se distribuye para crecimiento, mantenimiento y síntesis del producto de interés, siguiendo la estructura de las relaciones matemáticas de Herbert-Pirt.

Inicialmente se especifican los sustratos y productos de interés del proceso. Con base en esta información, se debe proponer la reacción catabólica y verificar que esté balanceada estequiométricamente. Posteriormente se calcula su energía libre de Gibbs mediante la ecuación (3.2), la cual debe ser corregida bajo las condiciones celulares de pH, temperatura, concentración, fuerza iónica, entre otros. Con base en este valor se determina si la reacción es exergónica, es decir si genera energía útil, con el fin de usarla como reacción catabólica y acoplarla a los procesos anabólicos del sistema. Si no es posible, se debe proponer una nueva reacción o un producto catabólico diferente.

$$\Delta_{cat}G^{m'} = -\Delta_R G^{m'} \quad (3.1)$$

Donde $\Delta_{cat}G^{o'}$ es la energía catabólica producida bajo condiciones celulares.

$$\Delta_R G^{m'} = \sum n_p \Delta_f G_p^{m'} - \sum n_r \Delta_f G_r^{m'} \quad (3.2)$$

Siendo $\Delta_f G_p^{m'}$ la energía libre de Gibbs de formación de cada producto y $\Delta_f G_r^{m'}$ la de los reactivos, n_p es el coeficiente estequiométrico de los productos y n_r de cada reactivo.

Después de tener la reacción catabólica, se establece la reacción anabólica para la producción de biomasa, que debe cumplir con los balances de carga y masa. Además, si el producto de interés tiene una energía libre de Gibbs positiva, es necesario establecer una reacción anabólica para este, ya que no es una reacción endergónica. Finalmente, teniendo en cuenta tanto las reacciones anabólicas como las catabólicas, se establecen los parámetros de la distribución de sustrato de Herbert-Pirt con base en la energía libre de Gibbs catabólica. Como se muestra a continuación:

- **Coefficiente de mantenimiento:**

Este depende únicamente de la temperatura del proceso

$$m_S = \frac{m_G}{\Delta_{cat}G^{\circ'}} \quad (3.3)$$

Donde m_S es el coeficiente de mantenimiento y m_G [kJ de energía libre de Gibbs por hora necesaria para el mantenimiento de 1 C-molX] es la energía requerida para el mantenimiento celular.

$$m_G = 4.5 \exp \left[-\frac{69000}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right] \quad (3.4)$$

Donde T [K] es la temperatura absoluta y R la constante universal de los gases [J/mol.K]

- **Coefficiente a para la formación de biomasa:**

El coeficiente a se divide en dos términos, el primero de la ecuación (3.5) hace referencia al anabolismo propiamente dicho, son los electrones necesarios para la formación de una C-mol de biomasa, provenientes del sustrato. El segundo término, por su parte, hace referencia a la energía necesaria para la formación de una C-mol de biomasa, esta proviene de la reacción catabólica.

$$a = \frac{\gamma_X}{\gamma_D} + \frac{a_G}{\Delta_{cat}G} \quad (3.5)$$

Donde γ_X es el grado de reducción de la biomasa, γ_D es el grado de reducción del sustrato único, fuente de carbono y energía, a_G es la energía necesaria para sintetizar 1 C-molX a partir de la fuente de carbono y el donador de electrones disponible.

Esta metodología fue planteada para un proceso con un único sustrato, sin embargo, fue necesario realizar un procedimiento alternativo ya que el sustrato usado, syngas, es una mezcla de gases, donde la fuente de electrones no es necesariamente la fuente de carbono. En este caso es posible tener dos o más sustratos.

El término que hace referencia al anabolismo ($\frac{\gamma_X}{\gamma_D}$) se determina mediante un balance estequiométrico de la reacción anabólica para la formación de biomasa establecida. Esto, con el fin de que los electrones provenientes de los sustratos no sean asignados arbitrariamente a la hora de ser transferidos a la biomasa, sino que concuerden con los balances de masa y carga. Al realizar este procedimiento, cada sustrato tiene un coeficiente asignado, aunque no se calcule de forma directa.

Posteriormente, se estima el término asociado al catabolismo. Este cálculo puede hacerse usando correlaciones reportadas por Heijnen, Loosdrecht y Tijhuis (1992), dependiendo del sustrato y composición química. El valor obtenido con el segundo término de la ecuación (3.5), representa el número de veces que se debe llevar a cabo la reacción catabólica para tener la energía necesaria en la síntesis de una mol de biomasa. Por lo que se deben multiplicar todos los coeficientes estequiométricos de la reacción catabólica por este término.

Finalmente, se suman la reacción de formación de biomasa y la reacción catabólica, con sus respectivos coeficientes, formando una reacción global balanceada.

- **Coefficiente b para la formación de producto:**

Este coeficiente se debe estimar en caso de que el producto sea anabólico y requiera energía para su formación.

-

$$|b| = \frac{\gamma_P}{\gamma_S} + \frac{\Delta_R G}{\Delta_{cat} G \eta} \quad (3.6)$$

Donde $\Delta_R G$ es la energía que necesita la reacción de producción del metabolito de interés, en caso de ser positiva, el procedimiento se hace de manera similar al coeficiente a . Sin embargo, la energía libre de Gibbs de la reacción catabólica, se debe multiplicar por un factor de eficiencia, que equivale a la energía realmente útil en la célula. Este factor η es usualmente 0.5.

Finalmente, se establecen las relaciones $q_P(\mu)$ para los productos catabólicos usando los coeficientes de Herbert-Pirt ya encontrados.

3.2 Evaluación económica

Para determinar el potencial económico del proceso, es necesario calcular la diferencia entre el precio comercial del etileno y el costo de producción del gas de síntesis. Debido a que es un cálculo previo al diseño, se usa la información del modelo de caja negra para determinar la relación entre el consumo de sustrato (CO y H₂) y la producción de etileno.

El precio de referencia del syngas en el mercado se tomó de reportes publicados por S&P Global Platts e ICIS (ICIS, 2018; Global-Platts, 2018). Debido a sus fluctuaciones, se promedió el valor reportado durante 5 meses. En cuanto al precio del syngas, se tomó el costo de producción con base en diferentes reportes, como se muestra en la Tabla 1-2.

Para cada uno de los procesos de gasificación, se establece la composición del syngas y se le asigna un rendimiento de acuerdo a las reacciones establecidas en el modelo *black box*, dependiendo de la razón CO:H₂ de cada gas.

Para cada proceso evaluado, se determina el reactivo límite y mediante relaciones estequiométricas se calcula la cantidad de gas necesaria para producir 1 kg de etileno, teniendo en cuenta la cantidad de gas útil (CO y H₂) en el syngas. Finalmente, usando el costo reportado del syngas, se estima la inversión en sustrato y se compara con el precio comercial del producto. En caso de que la inversión que se debe hacer en sustrato y el precio del etileno fuese mayor a uno, el proceso no es económicamente rentable, ya que no se generaría ningún margen de rentabilidad.

$$\text{Rendimiento real} = Y_{ps} * \text{Gas útil} \quad (3.7)$$

$$\text{Inversión} = \frac{\text{Precio de syngas} * 100}{\text{Rendimiento real}} \quad (3.8)$$

Donde Y_{ps} representa el rendimiento teórico que logra el microorganismo para producir etileno a partir de syngas. El gas útil es la cantidad de sustrato (CO y H₂) que se encuentra presente en el syngas (contenido volumétrico de CO y H₂ en el syngas), excluyendo los demás gases y el reactivo en exceso.

Finalmente, para determinar las condiciones del gas ideal para el proceso, se fijó el precio del syngas como el 70% del precio comercial del etileno. Asegurando así un 10% de ganancia y un 20% para llevar a cabo todas las otras operaciones del proceso. Posteriormente, se estableció el rendimiento del proceso como se muestra en la ecuación 3.9.

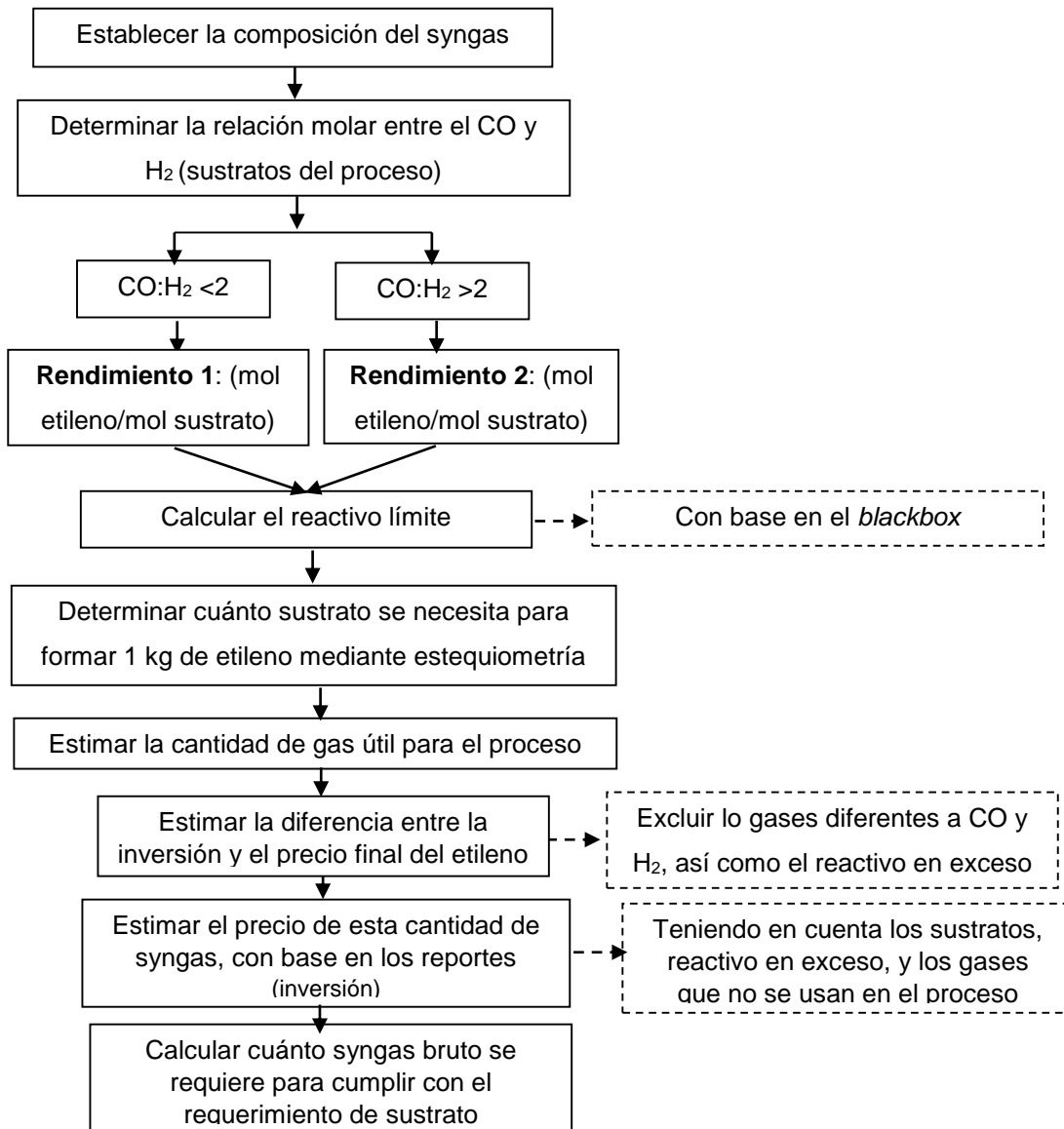
$$\text{Rendimiento ideal} \left[\frac{\text{mol etileno}}{\text{mol syngas}} \right] = \frac{\text{Precio Syngas} \left[\frac{\text{USD}}{\text{mol syngas}} \right]}{\text{Precio Etileno} \left[\frac{\text{USD}}{\text{mol etileno}} \right]} \quad (3.9)$$

Seguidamente, conociendo el rendimiento de la reacción, se halló la cantidad de gas útil que debe tener el gas de síntesis, con la ecuación 3.10

$$\text{Gas útil} \left[\frac{\text{mol sustrato}}{\text{mol syngas}} \right] = \frac{\text{Rendimiento ideal} \left[\frac{\text{mol etileno}}{\text{mol syngas}} \right]}{Y_{ps} \left[\frac{\text{mol etileno}}{\text{mol sustrato}} \right]} \quad (3.10)$$

Por último, se determinan la concentración de cada sustrato en el gas, de acuerdo a relación entre fuente de carbono e hidrógeno que genere mayor rendimiento de acuerdo a los resultados del *black box*

Figura 3-1. Diagrama de la metodología implementada para la evaluación económica



3.3 Reconstrucción del modelo metabólico a escala genómica

Para reconstruir el modelo a escala genómica se usó el modelo de *E. coli* reportado por Taymaz (2010). Inicialmente se estableció la velocidad de crecimiento del microorganismo chasis y con base en esto la reacción de biomasa. Debido a que se reporta únicamente la reacción de formación de biomasa para una velocidad de crecimiento, se tomó la composición porcentual de macromoléculas celulares y se convirtió en porcentajes molares para reestructurar la reacción de biomasa. Asumiendo que la composición de tales macromoléculas como proteínas, ADN o ARN es constante sin importar la velocidad de crecimiento del microorganismo.

El modelo se reconstruyó en cobra con la nomenclatura de BIGG. Las reacciones fueron verificadas en las bases de datos KEGG y MetaCyc. Donde se confirmó la direccionalidad de las reacciones y la estequiometría. Después de tener el modelo se usó el comando *checkMassChargeBalance* para verificar los balances de masa y carga de todas las reacciones.

Del modelo original se modificaron las reacciones que no tenían una estequiometría correcta de acuerdo al estado de protonación en que se tomaron los metabolitos para las condiciones celulares. Además, se modificaron las reacciones que contenían oxígeno, con el fin de que el modelo metabólico pudiese corresponder con el de modelo *Black box* planteado, que se hizo bajo condiciones anaeróbicas, debido a las ventajas que esto representa para los procesos biológicos.

Después de tener el modelo del microorganismo chasis, se buscaron reacciones que permitieran incorporar los componentes del syngas y el etileno en la red metabólica usando metabolitos intermediarios presentes en el metabolismo natural del chasis. Estas reacciones se verificaron en las bases de datos ya mencionadas y se verificó su balance de masa y electrones. Estas reacciones se acoplaron al modelo metabólico del microorganismo chasis para realizar los análisis de flujos posteriores.

3.4 Determinación de la presencia o ausencia de los genes codificantes para las enzimas necesarias en las nuevas reacciones implementadas.

Para establecer si el microorganismo chasis tiene la maquinaria metabólica necesaria para llevar a cabo las nuevas reacciones agregadas al modelo, o si es necesario expresar genes heterólogos, es necesario evaluar el genoma mediante un alineamiento BLAST. Esto permite establecer homología entre los genes y predecir cuales enzimas no pueden ser expresadas por el hospedero.

Después de elegir las reacciones adicionales para la fijación de gas (CO, CO₂ y H₂) y producción de etileno, se establecieron las enzimas correspondientes a cada una de las reacciones usando la base de datos BRENDA. Luego, se descargaron las secuencias de aminoácidos en formato FASTA de cada enzima de la base de datos UNIPROT. Las secuencias se tomaron de microorganismos referencia que contienen la ruta metabólica de interés. Sin embargo, en caso de que la secuencia no estuviese curada para estos microorganismos, se recurrió a otros microorganismos de referencia para evaluar los alineamientos mediante el análisis de BLAST con información verificada manualmente.

Se construyó una base de datos local de nucleótidos con el genoma del microorganismo chasis seleccionado, en este caso *E. coli* K12. Y se procedió a realizar el análisis de BLAST. Para este caso particular, se usó el *tblastn*, debido a que la base de datos se encuentra en secuencia nucleotídica y los *query* en secuencia de aminoácidos. Por esta razón, es necesario traducir la base de datos a aminoácidos para comparar las secuencias. Finalmente, para determinar la presencia o ausencia de las enzimas en el microorganismo chasis, se usan los criterios de *% de coverly*, *E-value* y *bit score*. Para el *E-value*, el umbral se estableció en $1e^{-6}$, es decir, si un alineamiento posee un valor menor, las secuencias son homologas. Por su parte, el umbral del *bit score* es 50, valores mayores a este, indican la presencia de un gen homologo. Para el porcentaje de identidad, la cobertura debe ser

mayor a 30%, sin embargo, este valor no tiene una gran precisión para detectar genes homólogos por lo que no será un criterio determinante.

3.5 Evaluación termodinámica

Para determinar los coeficientes estequiométricos del modelo *black box* es necesario calcular la energía libre de Gibbs de las reacciones involucradas, tanto las reacciones anabólicas, como las catabólicas. De manera análoga, se debe hacer una evaluación a la ruta metabólica paso a paso, para establecer la viabilidad de las nuevas reacciones implementadas.

Se evalúan las reacciones pertenecientes a la reacción catabólica del modelo metabólico reconstruido y se evalúa la energía libre de Gibbs de cada una bajo las condiciones celulares. Para las reacciones catabólicas se determina si son o no exergónicas, en caso de no serlo, se estima la relación entre la concentración de productos y reactivos para que la reacción ocurra de manera espontánea o se aleje del equilibrio como se muestra en el siguiente esquema.

Debido a que ya las energías libres de formación se encuentran corregidas por temperatura, presión, pH y concentración, se modifica la relación entre la concentración de los productos y reactivos como se muestra a continuación

$$\Delta_f G_s^{m'} = \Delta_f G^{o'} + RT \ln(S/1) \quad (3.12)$$

$$\Delta_f G_p^{m'} = \Delta_f G^{o'} + RT \ln(P/1) \quad (3.13)$$

Al restar estas ecuaciones para hallar la energía libre de Gibbs para la reacción

$$\Delta_R G^{m'} = \Delta_f G_p^{m'} - \Delta_f G_s^{m'} \quad (3.14)$$

$$\Delta_R G^{m'} = \left[\Delta_f G^{o'} + RT \ln\left(\frac{P}{1}\right) \right] - \left[\Delta_f G^{o'} + RT \ln\left(\frac{S}{1}\right) \right] \quad (3.15)$$

$$\Delta_R G^{m'} = \Delta_R G^{o'} + RT \ln([P]/[S]) \quad (3.16)$$

Posteriormente, se despeja la relación entre la concentración de producto y sustrato para hallar las condiciones que hacen posible obtener una energía de reacción negativa y alejada del equilibrio

$$[P]/[S] = \exp\left(\frac{\Delta_R G^{m'} - \Delta_R G^{s'}}{RT}\right) \quad (3.17)$$

Finalmente se estima la relación entre la concentración de algunos metabolitos usando las concentraciones intracelulares reportadas por Taymaz (2010) para una velocidad de crecimiento igual a 0.1 h^{-1} .

3.6 FBA (*Flux Balance Analysis*)

Para llevar a cabo el análisis de FBA se usa Cobra, toolbox de Matlab. Después de reconstruir el modelo se establecen los límites entre $-1000 \text{ mol/C-molX h}$ y $1000 \text{ mol/C-molX h}$ para las reacciones, siendo este el intervalo para reacciones reversibles y $0, 1000$ los límites para las reacciones irreversibles.

Para reducir el espacio solución del análisis FBA durante la optimización del sistema, es necesario fijar el valor de *fluxes*. En este caso, con base en la información obtenida en el modelo *black box*, se establece el valor para los *fluxes* correspondientes a la velocidad de crecimiento, además del transporte de metabolitos extracelulares diferentes al etileno. Así mismo, se debe fijar la función objetivo, en este caso, la producción de etileno ya que es el producto de interés. Finalmente se procede a realizar el análisis FBA mediante optimizaciones de programación lineal.

4. Resultados y discusión

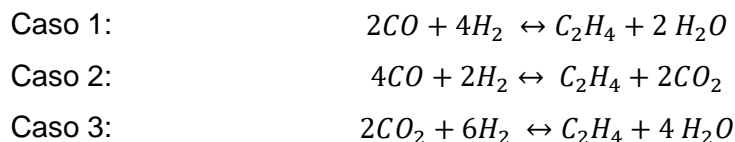
4.1 Determinación de los parámetros del modelo *black box*

Para establecer la distribución del sustrato se usa la ecuación de Herbert-Pirt que se expresa en términos de la velocidad específica de crecimiento y velocidad de formación de productos. Para esto es necesario plantear las reacciones anabólicas, catabólicas y de mantenimiento. En primer lugar, se establece la reacción catabólica, posteriormente la anabólica y finalmente se calcula el coeficiente de mantenimiento.

4.1.1 Coeficientes estequiométricos de la reacción catabólica

En primer lugar, se proponen diferentes reacciones para producción de etileno a partir de CO, H₂ y CO₂, componentes que se encuentran en mayor proporción en el gas de síntesis. El monóxido de carbono es la principal fuente de carbono contemplada en este estudio debido a que es también una fuente de electrones. Al usarlo como sustrato, en la reacción de producción de etileno, es posible observar que los productos varían de acuerdo a la relación CO:H₂, además, hay infinitas combinaciones, por lo que se plantearon dos casos extremos, donde la relación de monóxido de carbono e hidrógeno es 2 y cuando es 0.5. El dióxido de carbono, presentado como un tercer caso se evalúa debido a que es un componente presente en algunos gases, por lo que puede ser también aprovechado en el proceso fermentativo como fuente de carbono. En este caso solo hay una fuente de electrones, el hidrógeno, por lo que solo hay una posible reacción.

Las posibles reacciones catabólicas consideradas se muestran a continuación:



Posteriormente se calcula la energía libre de Gibbs de las tres reacciones balanceadas, bajo condiciones estándares y se corrigen según el pH, temperatura, fuerza iónica y concentraciones respectivas en condiciones celulares.

$$-\Delta_R G'^{\circ} = \sum n_{pi} * \Delta_f G'^{\circ}_{pi} - \sum n_{si} * \Delta_f G'^{\circ}_{si} \quad (4.1)$$

Donde n_{pi} y n_{si} representan los coeficientes del producto i y sustrato i en la reacción catabólica. Así mismo, $\Delta_f G'^{\circ}_{pi}$ y $\Delta_f G'^{\circ}_{si}$ son las energías de formación de productos y sustratos bajo condiciones celulares. Las energías libres de Gibbs usadas en el cálculo se reportan en las Tabla 4-1.

Tabla 4-1 Energía libre de Gibbs de formación estándar, bajo condiciones celulares corregidas por temperatura (298 K) y pH (7). ($\Delta_f G'^{\circ}$) y energía libre de Gibbs en condiciones celulares corregida por concentración (1mM).

Compuesto	$\Delta_f G^{\circ}$ kJ/mol	$\Delta_f G'^{\circ}$ kJ/mol	$\Delta_f G'^m$ kJ/mol	γ
CO _(aq)	-119.9	-119.9	-137.0	2
CO _{2(aq)}	-386.0	-386.0	-403.1	0
H _{2(aq)}	17.6	97.6	80.5	2
C ₂ H _{4(aq)}	81.4	241.5	224.4	12
H ₂ O _(aq)	-237.2	-156.1	-173.2	0

Tabla 4-2 Energía de reacción para la formación de etileno a partir de syngas

	Reacción	$\Delta_f G'^{\circ}$ kJ/mol	$\Delta_f G'^m$ kJ/mol
Caso 1	$2CO + 4H_2 \leftrightarrow C_2H_4 + 2 H_2O$	-221.3	-204.3
Caso 2	$4CO + 2H_2 \leftrightarrow C_2H_4 + 2CO_2$	-246.1	-223.9
Caso 3	$2CO_2 + 6H_2 \leftrightarrow C_2H_4 + 4 H_2O$	-196.5	-184.7

Como se muestra en la Tabla 4-2 todas las reacciones son exergónicas, por lo que pueden ser usadas como reacciones catabólicas en el sistema. Sin embargo, en todos los casos la energía disponible es diferente. Las reacciones de los dos primeros casos, generan una mayor cantidad de energía, en estas los sustratos son los mismos, pero los coeficientes estequiométricos tienen una distribución diferente. A pesar de que ambos sustratos, monóxido de carbono e hidrógeno poseen la misma cantidad de electrones, el contenido de energía libre de Gibbs por electrón del monóxido es mayor que en el hidrógeno (Cueto et al., 2015). En el caso 3, la energía libre de Gibbs de la reacción es menor debido a que todos los electrones se concentran en el hidrógeno. Además, la fuente de carbono es CO₂, carbono inorgánico sin electrones, lo que dificulta su transformación en comparación al monóxido de carbono.

Debido a que estas reacciones aportan energía al sistema, no se implementarán reacciones aerobias. En este proceso es algo conveniente, pues además de los costos de operación que representa el sistema de aireación, la mezcla de oxígeno con syngas es potencialmente explosiva, por lo que es preferible llevar a cabo una fermentación anaerobia.

4.1.2 Coeficientes estequiométricos de la reacción anabólica

La reacción anabólica se refiere a la cantidad de sustrato consumido para la producción de biomasa y se calcula usando la ecuación (3.5).

4.1.2.1. Distribución de electrones para la producción de biomasa

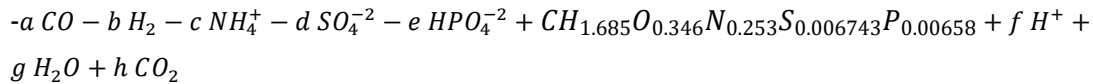
Para establecer la reacción catabólica se plantearon 3 posibles reacciones con el fin de evaluar las dos principales fuentes de carbono del syngas, CO y CO₂. En este caso, cuando se usa el monóxido de carbono, hay infinitas combinaciones para los coeficientes estequiométricos, por lo que se evaluaron solo dos posibilidades. Así mismo, para establecer la reacción anabólica de producción de biomasa, se tienen en cuenta ambos sustratos como fuente de carbono. En ambos casos, el hidrógeno es donador de

electrones, sin importar si la fuente de carbono tiene electrones disponibles, como es el caso del monóxido.

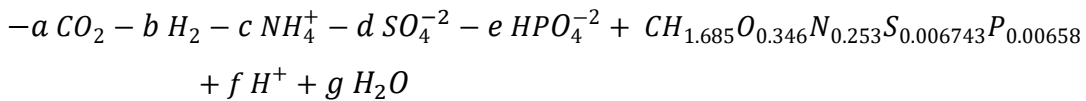
Los demás compuestos involucrados en la reacción son amonio, sulfato y fosfato, fuentes de nitrógeno, de azufre y fósforo para la biomasa. Estos fueron tomados de la composición del medio de crecimiento de *E. coli* reportado por Taymaz (2010). De este mismo reporte se tomó la composición elemental de la biomasa para las velocidades de crecimiento de 0.1 h^{-1} y 0.3 h^{-1} . Para la primera velocidad de crecimiento la fórmula para biomasa es $CH_{1.685}O_{0.346}N_{0.253}S_{0.006743}P_{0.00658}$ y para la segunda velocidad de crecimiento es $CH_{1.642}O_{0.364}N_{0.268}S_{0.00668}P_{0.0121}$. En estas reacciones no se usa el oxígeno como sustrato, pues como se mencionó el proceso es anaerobio.

Las reacciones planteadas para los dos sustratos son:

Fuente de carbono: CO



Fuente de carbono: CO₂



Las reacciones se normalizaron con el fin de expresar todos los coeficientes en términos de 1 mol de biomasa. En este caso, los coeficientes a, b, c, d, e, f, g y h, representan los rendimientos bien sean de consumo o producción de su respectivo metabolito y se representan en el vector x (Ecuación 4.2). El balance elemental, de cargas y de electrones se expresa en forma matricial como se muestra a continuación, donde en las filas se presenta cada balance, mientras que las columnas representan cada uno de los metabolitos involucrados en la reacción de biomasa planteada.

Balance													
Electrones	(γ)	-2	-2	0	0	0	0	0	0	a	=	-4.307	
Carga		0	0	-1	2	2	1	0	0	b		0	
Carbón	(C)	-1	0	0	0	0	0	0	1	c		-1	
Oxígeno	(O)	-1	0	0	-4	-4	0	1	2	d		-0.346	
Hidrógeno	(H)	0	-2	-4	0	-1	1	2	0	e		-1.685	
Nitrógeno	(N)	0	0	-1	0	0	0	0	0	f		-0.253	
Azufre	(S)	0	0	0	-1	0	0	0	0	g		-0.00674	
Fósforo	(P)	0	0	0	0	-1	0	0	0	h		-0.00658	
		A								x		b	

El sistema se puede expresar de la forma:

$$Ax = b \tag{4.2}$$

Donde A es la matriz de coeficientes, x es un vector que contiene las variables $[a, b, c, \dots]$ y b son los valores independientes en la igualdad, en este caso los relacionados con la biomasa ya que su coeficiente se ha fijado como 1 y no es una incógnita. Para solucionar el sistema es necesario que la matriz de coeficientes A sea invertible. Sin embargo, para la reacción que tiene como sustrato monóxido de carbono, se encontró que la matriz A es singular por lo que no es invertible. A pesar de que el rango de la matriz es 8, el de su transpuesta es 7, por lo que existe una dependencia lineal. Por esta razón, al coeficiente h se le asignó un valor de cero. Además, se eliminó una reacción para obtener un sistema con 7 ecuaciones y que la matriz pueda ser invertible.

Para la segunda reacción se realizó el mismo procedimiento. Sin embargo, se eliminó uno de los balances con el fin de obtener una matriz cuadrada invertible, debido a que se tienen 7 variables y 8 reacciones. De esta manera se solucionó el sistema y posteriormente se corroboró la consistencia de la solución con la ecuación no usada en la matriz.

Los coeficientes de la reacción de producción de biomasa se muestran en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3. Coeficientes de la reacción de producción de biomasa, para los dos casos planteados, teniendo CO o CO₂ como sustrato.

	a	b	c	d	e	f	g	h
Fuente de carbono:								
CO	1	1.1537	0.253	0.00674	0.00658	0.2263	0.707	0
Fuente de carbono:								
CO₂	1	2.1537	0.253	0.00674	0.00658	0.2263	1.707	-

a: fuente de carbono (CO/CO₂), b: H₂, c: NH₄⁺, d: SO₄⁻², e: HPO₄⁻², f: H⁺, g: H₂O,

h: CO₂ (subproducto de la primera reacción)

Con este procedimiento se establece la distribución de electrones de los sustratos que se consumen por C-mol de biomasa. Como se muestra en la Tabla 4-3 la fuente de carbono requiere igual cantidad de moles para la formación de 1 C-mol de biomasa, sin importar si es monóxido o dióxido de carbono. Sin embargo, en el primer caso, debido a que el monóxido de carbono también es un donador de electrones, se requiere menos cantidad de hidrogeno (coeficiente *b*) para suplir la demanda de la biomasa, esto resulta además, en una menor producción de agua (coeficiente *g*). Los demás coeficientes de consumo de amonio, sulfato o fosfato, no presentan diferencia, debido a que dependen únicamente de la composición de la biomasa.

4.2.1.2. Requerimiento energético para la producción de biomasa

Para calcular el segundo término de la ecuación del coeficiente *a* ($a_G/\Delta_{cat}G$), son necesarios la energía libre de Gibbs de la reacción catabólica y el valor de a_G , el primero se tomó de la base de datos eQuilibrator—the biochemical thermodynamics calculator (Flamholz, Noor, Bar-even, & Milo, 2012), tomando los valores propuestos por Alberty, (1998), que posteriormente se corrigieron a condiciones fisiológicas.

Por su parte, la demanda energética de la célula para la formación de nueva biomasa a_G , puede ser calculada mediante correlaciones. Cuando el crecimiento es heterotrófico, la

energía libre de Gibbs necesaria depende únicamente de la naturaleza de la fuente de carbono orgánico, debido a que es también la fuente de electrones. En estos casos, cuando el grado de reducción por carbono es cercano a 4, llevar a cabo la conversión a biomasa, es no energéticamente costoso, ya que el grado de reducción de la biomasa es aproximadamente 4.2. Cuando se tienen cadenas carbonadas pequeñas y el grado de reducción se aleja de 4, es necesario llevar a cabo reacciones adicionales, especialmente para formar enlaces carbono-carbono (von Stockar & van der Wielen, 2013).

En el caso de crecimiento autotrófico, esta energía también depende de la naturaleza de la fuente de carbono. Sin embargo, el donador de electrones tiene una gran influencia, ya que determina la necesidad de usar el transporte inverso de electrones. En el caso del CO o H₂, no es necesario el uso de este mecanismo. Mientras que la reducción de CO₂ a biomasa es mucho más costosa, debido a que este compuesto no posee electrones.

El valor de a_G se tomó del reporte de Heijnen y colaboradores (Heijnen et al., 1992), que se muestra en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4. Energía libre de Gibbs necesaria para sintetizar un mol de biomasa a_G , según la fuente de carbono.

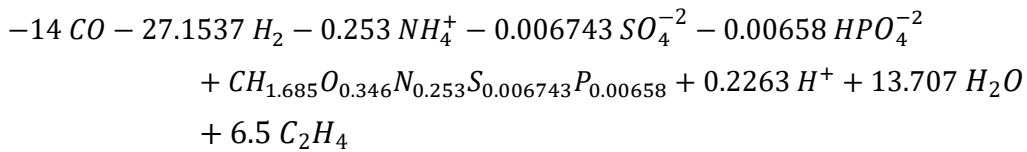
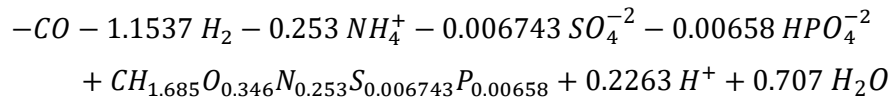
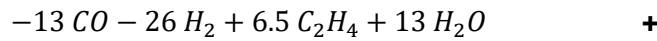
Fuente de carbono	Grado de reducción	Longitud de la cadena de carbono	a_G kJ/C-mol X	Desviación estándar reportada (%)
CO	2	1	1105	-
CO ₂	0	1	1061	16

Dividiendo estos valores por la energía libre de Gibbs proveniente del catabolismo es posible calcular la segunda parte de la ecuación (3.5), estos valores se reportan en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5. Valores de $a_G/\Delta_{cat}G$ para el coeficiente a de la ecuación Herbert-Pirt

Caso	$a_G/\Delta_{cat}G$	Reacción catabólica asociada el anabolismo
1	6.500	$13 CO + 26 H_2 \leftrightarrow 6.5 C_2H_4 + 13 H_2O$
2	5.672	$22.688 CO + 11.344 H_2 \leftrightarrow 5.672 C_2H_4 + 11.344 CO_2$
3	7.307	$14.614 CO_2 + 43.842 H_2 \leftrightarrow 7.307 C_2H_4 + 29.228 H_2O$

Este coeficiente corresponde al número de veces que es necesario correr la reacción catabólica para obtener la energía que requiere la síntesis de una mol de biomasa. Para acoplar ambos coeficientes se suman la reacción anabólica de formación de biomasa y la reacción catabólica multiplicada por el factor $a_G/\Delta_{cat}G$.



Para hallar las demás reacciones anabólicas se realiza el mismo procedimiento y las reacciones resultantes se muestran a continuación:

Tabla 4-6. Reacciones anabólicas para la producción de biomasa a partir de diferentes fuentes de carbono (CO y CO₂).

Caso	Reacción
1	$-14 CO - 27.1537 H_2 - 0.253 NH_4^+ - 0.006743 SO_4^{-2} - 0.00658 HPO_4^{-2}$ $+ CH_{1.685}O_{0.346}N_{0.253}S_{0.006743}P_{0.00658} + 0.2263 H^+$ $+ 13.707 H_2O + 6.5 C_2H_4$
2	$-23.688 CO - 12.4976 H_2 - 0.253 NH_4^+ - 0.006743 SO_4^{-2} -$ $0.00658 HPO_4^{-2} + CH_{1.685}O_{0.346}N_{0.253}S_{0.006743}P_{0.00658} + 0.2263 H^+ +$ $0.707 H_2O + 5.67 C_2H_4 + 11.344 CO_2$
3	$-15.614 CO_2 - 45.9956 H_2 - 0.253 NH_4^+ - 0.006743 SO_4^{-2}$ $- 0.00658 HPO_4^{-2} + CH_{1.685}O_{0.346}N_{0.253}S_{0.006743}P_{0.00658}$ $+ 0.2263 H^+ + 30.935 H_2O + 7.307 C_2H_4$

4.1.3 Coeficiente de mantenimiento

El coeficiente de mantenimiento se calcula con la ecuación (3.3). Para esto la temperatura se estableció en 298.15 K y la constante de los gases usada fue 8.314 J/mol.K.

$$m_G = 4.5 \exp \left[-\frac{69000}{8.314 \text{ J/mol.K}} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{298} \right) \right] \quad (4.3)$$

Luego el coeficiente m_G es:

$$m_G = 4.56 \frac{\text{kJ para mantenimiento}}{\text{C-mol}} \quad (4.4)$$

Debido a que la energía que se necesita para el mantenimiento celular depende únicamente de la temperatura, se usará el mismo valor para calcular el coeficiente de

mantenimiento para los tres casos planteados, donde el sustrato puede ser monóxido de carbono en diferente proporción, o bien dióxido de carbono. El coeficiente de mantenimiento de mantenimiento se calculó con la expresión (3.3) y los resultados se muestran en la Tabla 4-7.

Al igual que para el cálculo de la energía necesaria para el anabolismo, el coeficiente m_s representa las veces que se debe correr la reacción catabólica para tener la energía suficiente para el mantenimiento. En este caso se debe multiplicar la reacción catabólica (Tabla 4-2) por cada uno de los coeficientes calculados.

Como se puede observar en estos resultados, el sustrato que se debe consumir en el tercer escenario planteado, es mayor, pues esta reacción catabólica libera menos energía, haciendo más costoso energéticamente el mantenimiento de una misma biomasa. En el caso del monóxido de carbono, si la relación de $H_2:CO$ es 1:2, se necesita menos sustrato para el mantenimiento debido al mayor contenido energético del monóxido de carbono. Sin embargo, la diferencia entre este primer caso y el segundo no es muy grande, pues la energía libre de Gibbs que liberan ambas reacciones es similar. Por ende, el costo energético para el mantenimiento de la misma cantidad de biomasa en ambos casos será similar.

Tabla 4-7. Coeficientes de mantenimiento celular para los tres diferentes casos de catabolismo propuestos.

Caso	m_s	Reacción catabólica (mantenimiento)
1	0.027	$0.054CO + 0.108H_2 \leftrightarrow 0.027C_2H_4 + 0.054 H_2O$
2	0.023	$0.092CO + 0.046H_2 \leftrightarrow 0.023C_2H_4 + 0.046CO_2$
3	0.031	$0.062CO_2 + 0.186H_2 \leftrightarrow 0.031C_2H_4 + 0.124 H_2O$

4.1.4 Expresiones cinéticas de velocidad consumo o producción de metabolitos

Las expresiones de Herbert-Pirt y las de velocidad de consumo o producción de cada metabolito involucrado en el proceso se obtuvieron con los coeficientes de las reacciones anabólica y catabólica. Para cada metabolito, se multiplicó su coeficiente estequiométrico en la reacción anabólica por μ y seguidamente se sumó a su coeficiente estequiométrico en la reacción catabólica. Al realizar este procedimiento, es evidente que todo el metabolismo depende de una variable, la velocidad de crecimiento. Al fijar este valor es posible conocer la distribución de sustratos y productos.

Las expresiones de velocidad de consumo o producción de metabolitos se muestran en el la Tabla 4-8.

Tabla 4-8. Ecuaciones de velocidad de consumo o producción de metabolitos en términos de la velocidad de crecimiento μ (para la composición de la biomasa a $\mu = 0.1h^{-1}$)

Metabolito	Caso 1 (H ₂ :CO es 2:1)	Caso 2 (H ₂ :CO 1:2)	Caso 3
CO	$q_{CO} = -14\mu - 0.054$	$q_{CO} = -23.688\mu - 0.092$	-
CO ₂	-	$q_{CO_2} = 11.344\mu + 0.046$	$q_{CO_2} = -15.614\mu - 0.062$
H ₂	$q_{H_2} = -27.1537\mu - 0.108$	$q_{H_2} = -12.497\mu - 0.046$	$q_{H_2} = -45.9956\mu - 0.186$
H ₂ O	$q_w = 13.707\mu + 0.054$	$q_w = 0.707\mu$	$q_w = 30.935\mu + 0.124$
NH ₄ ⁺	$q_{NH_4^+} = -0.253\mu$	$q_{NH_4^+} = -0.253\mu$	$q_{NH_4^+} = -0.253\mu$
SO ₄ ⁻²	$q_{SO_4^{-2}} = -0.00674\mu$	$q_{SO_4^{-2}} = -0.00674\mu$	$q_{SO_4^{-2}} = -0.00674\mu$
HPO ₄ ⁻²	$q_{HPO_4^{-2}} = -0.00658\mu$	$q_{HPO_4^{-2}} = -0.00658\mu$	$q_{HPO_4^{-2}} = -0.00658\mu$
H ⁺	$q_{H^+} = 0.226\mu$	$q_{H^+} = 0.226\mu$	$q_{H^+} = 0.226\mu$
C ₂ H ₄	$q_{C_2H_4} = 6.5\mu + 0.027$	$q_{C_2H_4} = 5.67\mu + 0.023$	$q_{C_2H_4} = 7.307\mu + 0.031$
Biomasa	μ	μ	μ

En la Tabla 4-8 se presentan las ecuaciones cinéticas para los tres casos planteados en el metabolismo. En el primer caso, no se presenta ecuación para el consumo o producción de dióxido de carbono, debido a que este metabolito celular no se genera en el

catabolismo, ni en la formación de biomasa. De manera similar en el caso tres, donde no se presenta ecuación cinética para el monóxido de carbono, ya que no es un metabolito involucrado en la reacción. En este último caso, la única fuente de carbono es el dióxido de carbono.

Al comparar los tres casos, es posible observar que el mayor consumo de sustrato, tanto fuente de carbono como de electrones, se da cuando se alimenta dióxido de carbono. Esto puede explicarse por la dificultad de reducir este compuesto. El dióxido de carbono es una cadena pequeña, que además carece de electrones, por lo que su grado de reducción está muy alejado del de la biomasa. Esto se ve también reflejado en los coeficientes de mantenimiento, que son mayores que los dos primeros casos. Esto indica que la energía que aporta el dióxido de carbono es nula y se requiere una mayor cantidad de sustrato para mantener las funciones celulares.

En cuanto a la producción de etileno, compuesto de interés, es posible observar que el mayor coeficiente se logra en el tercer caso. Sin embargo, es necesario analizar que el consumo energético de sustrato es mucho mayor, por lo que el rendimiento en este caso es menor que en los casos 1 y 2. Cuando se usa monóxido de carbono, se obtiene una mayor producción con una relación del sustrato $H_2:CO$ de 2:1 (columna 1). Debido a que en este proceso no se pierde carbono en forma de CO_2 como en el segundo caso.

Para hallar la expresión de Herbert-Pirt con la composición de la biomasa a una velocidad de crecimiento igual a 0.3 h^{-1} , se realizó todo el procedimiento explicado anteriormente cuando la velocidad de crecimiento es 0.1 h^{-1} . Las expresiones del modelo *black box* correspondientes a la velocidad de crecimiento $\mu = 0.3\text{ h}^{-1}$ se muestran en la Tabla 4-9.

Como se observa en los resultados de la Tabla 4-10, la diferencia que hay entre las ecuaciones cinéticas de una y otra composición celular se evidencia principalmente es los metabolitos asociados únicamente a la biomasa, como consumo de amonio, sulfato o fosfato, mientras que los términos asociados al catabolismo, como lo es la producción de etileno, el consumo de la fuente de carbono o hidrogeno, no presentan diferencias significativas.

Tabla 4-9. Reacciones anabólicas para la producción de biomasa a partir de diferentes fuentes de carbono (CO y CO₂) con la composición de biomasa correspondiente a la velocidad de crecimiento 0.3 h⁻¹.

Caso	Reacción
1	$-14 CO - 27.105 H_2 - 0.268 NH_4^+ - 0.00668 SO_4^{-2} - 0.0121 HPO_4^{-2} + CH_{1.642}O_{0.364}N_{0.268}S_{0.00668}P_{0.0121} + 0.2312 H^+ + 13.7112 H_2O + 6.5 C_2H_4$
2	$-23.688 CO - 12.449 H_2 - 0.268 NH_4^+ - 0.00668 SO_4^{-2} - 0.0121 HPO_4^{-2} + CH_{1.642}O_{0.364}N_{0.268}S_{0.00668}P_{0.0121} + 0.2304 H^+ + 0.7112 H_2O + 5.67 C_2H_4 + 11.344 CO_2$
3	$-15.61 CO_2 - 45.948 H_2 - 0.268 NH_4^+ - 0.00668 SO_4^{-2} - 0.0121 HPO_4^{-2} + CH_{1.642}O_{0.364}N_{0.268}S_{0.00668}P_{0.0121} + 0.2304 H^+ + 29.939 H_2O + 7.307 C_2H_4$

Tabla 4-10. Ecuaciones de velocidad de consumo o producción de metabolitos en términos de la velocidad de crecimiento μ (para la composición de la biomasa a $\mu = 0.3h^{-1}$)

Metabolito	Caso 1	Caso 2	Caso 3
CO	$q_{CO} = -14\mu - 0.054$	$q_{CO} = -23.688\mu - 0.092$	-
CO ₂	-	$q_{CO_2} = 11.344\mu + 0.046$	$q_{CO_2} = -15.61 - 0.062$
H ₂	$q_{H_2} = -27.105\mu - 0.108$	$q_{H_2} = -12.449\mu - 0.046$	$q_{H_2} = -45.948\mu - 0.186$
H ₂ O	$q_w = 13.711\mu + 0.054$	$q_w = 0.711\mu$	$q_w = 29.939\mu + 0.124$
NH ₄ ⁺	$q_{NH_4^+} = -0.268\mu$	$q_{NH_4^+} = -0.268\mu$	$q_{NH_4^+} = -0.268\mu$
SO ₄ ⁻²	$q_{SO_4^{-2}} = -0.00668 \mu$	$q_{SO_4^{-2}} = -0.00668 \mu$	$q_{SO_4^{-2}} = -0.00668 \mu$
HPO ₄ ⁻²	$q_{HPO_4^{-2}} = -0.0121\mu$	$q_{HPO_4^{-2}} = -0.0121\mu$	$q_{HPO_4^{-2}} = -0.0121\mu$
H ⁺	$q_{H^+} = 0.2304\mu$	$q_{H^+} = 0.2304\mu$	$q_{H^+} = 0.2304\mu$
C ₂ H ₄	$q_{C_2H_4} = 6.5\mu + 0.027$	$q_{C_2H_4} = 5.67\mu + 0.023$	$q_{C_2H_4} = 7.307\mu + 0.031$
Biomasa	μ	μ	μ

La relación entre la velocidad de crecimiento y las velocidades de consumo o producción son lineales debido a que el etileno es un producto catabólico asociado al crecimiento. Cuando la velocidad de crecimiento es cero, hay consumo o producción de metabolitos como monóxido de carbono, hidrogeno y etileno, sin embargo, no se observa adecuadamente debido a la escala, ya que es del orden de $1e-2$. Esta actividad metabólica se debe al mantenimiento celular, aunque no haya crecimiento. No obstante, la producción de etileno aumenta al aumentar la velocidad de crecimiento celular.

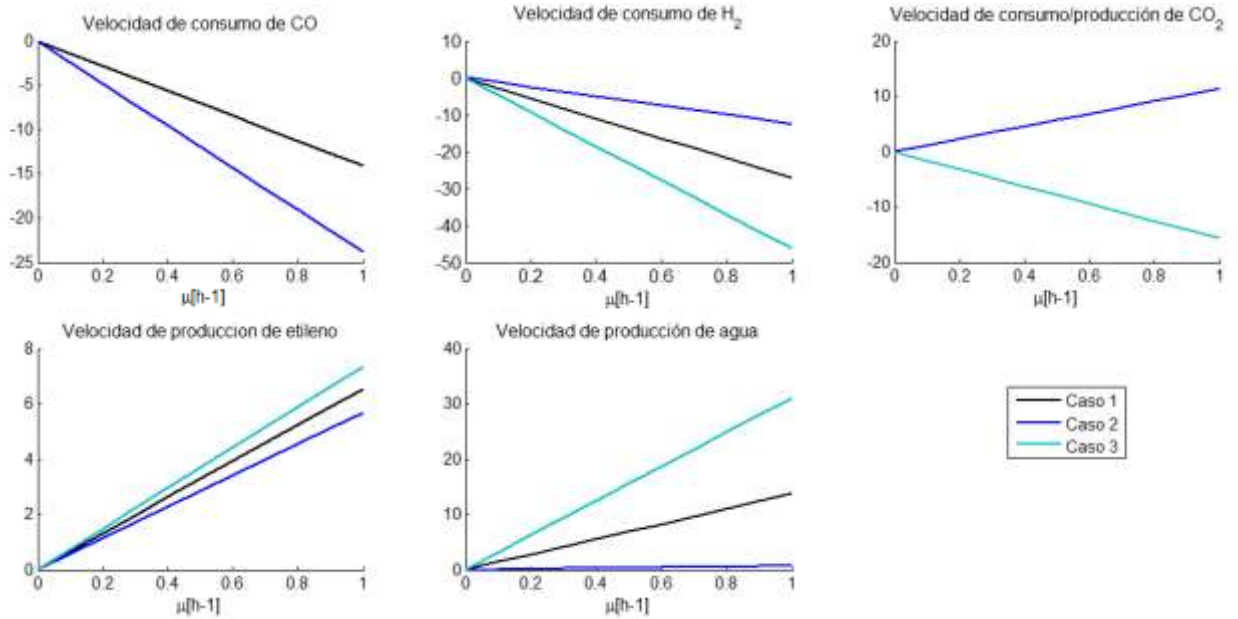
En la Figura 4-1. es posible observar la relación entre diferentes sustratos y productos con el etileno. En este caso, el intercepto con el eje depende de la relación del metabolito con el anabolismo y mantenimiento celular. Compuestos como el amonio, sulfato, fosfato o protones, tienen relevancia únicamente cuando hay producción de biomasa, por lo que el intercepto es cero. Mientras que compuestos como CO e H_2 , presentan un intercepto diferente de cero cuando no hay formación de biomasa. Además, se puede inferir a partir de la relación entre la fuente de carbono con el etileno, que a medida que aumenta la velocidad de crecimiento, más carbono se debe consumir por mol de producto, ya que es necesario para la síntesis de biomasa.

Al igual que se observa en las ecuaciones de velocidades de consumo o producción de metabolitos (Tablas 4-8 y 4-10), hay diferencias marcadas entre los 3 casos evaluados. Un comportamiento destacado es que la producción de etileno no se ve fuertemente afectada por el cambio de fuente de carbono siempre y cuando se tenga electrones disponibles, en este caso provenientes del hidrógeno. Pasa lo contrario con los sustratos, se puede observar que el hidrógeno es consumido en altas cantidades en el caso 3, donde la fuente de carbono es únicamente el dióxido de carbono. Esto refleja claramente el costo energético que conlleva el uso de sustratos inorgánicos.

En cuanto al agua, se ve una clara diferencia entre los 3 casos. En el segundo caso la producción es muy baja, mientras que en los demás casos se generan altas cantidades de agua. Algo que se debe resaltar en esta situación es la relación del metabolito con los procesos anabólicos de formación de biomasa, mantenimiento y catabolismo. En el primer caso la formación de agua está asociada a los 3 procesos celulares, por lo que se genera

en altas cantidades. Mientras que, en el segundo caso, el agua se genera únicamente como resultado de la formación de biomasa.

Figura 4-1. Velocidades de consumo o producción [mol/C-molX*h] vs la velocidad de crecimiento para los 3 casos establecidos en el modelo *black box*



Finalmente, si comparamos los tres casos, cuando se tiene como fuente de carbono el monóxido, además de obtener una cantidad similar de etileno, el consumo electrones es similar sin importar si hay mayor cantidad de hidrógeno o de dióxido en el sistema. Mientras que, si se usa dióxido de carbono, es necesario consumir una alta cantidad de hidrógeno por lo que el rendimiento es menor, aunque se observe una mayor cantidad de etileno. Esto indica que el proceso es costoso energéticamente en el tercer caso y aunque con los tres casos planteados es posible obtener el producto de interés, el costo energético de los tres procesos difiere especialmente de acuerdo a la naturaleza de la fuente de carbono.

4.2 Evaluación del potencial económico de la producción de etileno a partir de syngas

La producción de etileno se da principalmente a partir de sustratos no renovables. Sin embargo, el uso de materias primas renovable es un proceso de alto interés pues presenta diferentes beneficios, especialmente ambientales (Haro, Ollero, & Trippe, 2013). Para que el proceso petroquímico tradicional pueda ser reemplazado por un bioproceso es necesario garantizar que sea viable tanto técnica como económicamente. Por esta razón, se llevará a cabo un análisis preliminar del potencial económico del proceso y establecerán las condiciones bajo las cuales se logra un margen de rentabilidad adecuado.

Como menciona Douglas (1988) en su texto *Diseño Conceptual para Procesos Químicos*, el costo de las materias primas es un factor dominante en el diseño de procesos. Por esta razón, los balances de materia y energía juegan un papel muy importante. Siguiendo esta línea de pensamiento, se propone usar el modelo de caja negra para el análisis preliminar ya que es un enfoque simple que permite un análisis rápido.

Figura 4-2. Diagrama global del proceso de producción de etileno a partir de syngas.



4.2.1 Comparación de costos

Como se reporta en la sección 1.7, el etileno tiene un precio en el mercado de 1.109 USD/kg aproximadamente, mientras que el costo del syngas varía entre 0.045 y 1.91 USD/kg. Con esta diferencia inicial es posible determinar que no todos los procesos de

gasificación son económicamente viables, ya que el precio de la materia prima para el proceso es mayor que el del producto mismo. Es importante resaltar que no todos los componentes del gas de síntesis serán usados durante la bioproducción de etileno, por ende, el rendimiento no será del 100%.

Teniendo en cuenta estos requerimientos, es posible descartar tres de los procesos de gasificación reportados ya que tienen un costo mayor al precio comercial del etileno. Los únicos costos de gasificación que podrían generar ganancias son los que usan carbón (0.045 USD/kg) y astillas de madera (0.11 USD/kg) como biomasa.

Para el análisis del potencial económico, se restringe el espectro de reacciones durante la fermentación a los dos primeros casos del *black box*, fijando la velocidad de crecimiento en 0.1 h^{-1} . Debido a que la diferencia entre estas reacciones es la relación entre el hidrógeno y el monóxido de carbono, dependiendo de la composición del gas se asigna el respectivo rendimiento molar. En la Tabla 4-11 se muestra la composición del gas y su precio en USD/mol, asumiendo que la masa molar del syngas húmedo es 21.9 g/mol como reporta (Pei et al., 2014). Además, se muestra el reactivo límite de la reacción y el rendimiento de la bioconversión, teniendo en cuenta la cantidad de gas que sería usado realmente durante la fermentación (RR%), sin contemplar procesos de reciclaje o filtración que modifiquen la composición del gas.

Tabla 4-11. Precio del syngas, composición y rendimiento para la producción de etileno

Proceso	Costo USD/mol	H ₂ %mol	CO %mol	Ratio	RL	R %	RR%	Referencia
1	0.0370	56.3	8.9	6.32	CO	15.8	4.217	(Lv et al., 2008)
2	0.0418	79.9	20	3.99	CO	15.8	9.478	(Inayat et al., 2010)
3	0.0302	18	22	0.82	CO	15.8	5.178	(Kim et al., 2011)
4	0.0098	38.8	15.6	2.49	CO	15.8	7.392	(Pei et al., 2016)

Continuación Tabla 4-11

5	0.0024	21.73	17.5	1,24	H ₂	15.8	4.133	(Yao et al., 2018)
5.1	0.0014	27.59	18.64	1,48	H ₂	15.8	4.387	
5.2	0.0021	23.65	17.21	1,37	H ₂	15.8	4.051	
5.3	0.0021	19.71	16.84	1,17	H ₂	15.8	3.964	
5.4	0.0021	16.49	16.84	0,98	CO	15.7	3.964	
5.5	0.0020	13.62	16.13	0,84	CO	15.7	3.796	
5.6	0.0019	10.39	16.13	0,64	CO	15.7	3.797	

El proceso 5.X hace referencia al mismo proceso de gasificación bajo diferentes condiciones, donde se varía el flujo de aire desde 0.1 hasta 0.6.

Ratio es la relación molar H₂:CO, RL. Reactivo límite, R% rendimiento molar de la reacción, RR% es el rendimiento total del proceso, teniendo en cuenta la cantidad de gas útil presente en el syngas.

El rendimiento molar no varía significativamente entre los casos uno y dos del modelo *black box* (relación de hidrógeno:monóxido de carbono 2:1 y 1:2) debido a que la cantidad de moles de sustrato es similar. Sin embargo, si se analiza el rendimiento másico, la diferencia es grande debido a la variación de peso molecular entre el hidrógeno y el monóxido. En el caso 1 se consume el doble de hidrógeno y su rendimiento másico es 40.2%, mientras que en el segundo caso se consume el doble de monóxido de carbono y el rendimiento es de 22.9%. A pesar de que las moles totales de sustrato (H₂+CO) son similares, su peso es menor si hay mayor proporción de hidrógeno, por lo que el rendimiento aumenta.

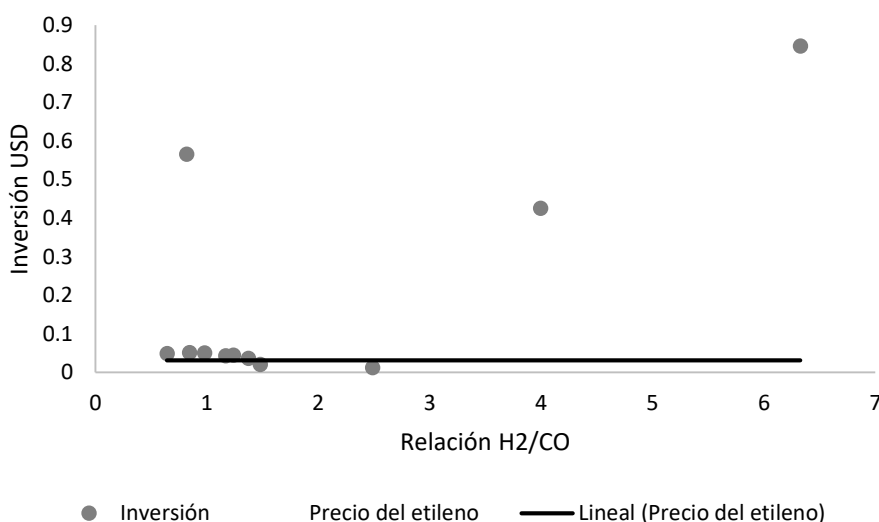
En la

Figura 4-3 se muestra la inversión que se debe hacer en syngas para producir un mol de etileno. En esta gráfica es posible observar que, con el rendimiento y composición del gas, únicamente dos procesos de gasificación tienen un costo menor al precio del etileno. Sin embargo, estos no aseguran una ganancia mínima del 10% del precio del producto final.

Bajo las condiciones expuestas, no es posible tener un proceso rentable para la producción de etileno a partir del syngas obtenido por los autores consultados. Sin embargo, se deben contemplar otros escenarios, con una composición mayor de

sustratos (H_2 y CO) en el gas, ya que esto permitiría aumentar el rendimiento global del proceso. Es posible también considerar procesos adicionales que enriquezcan el gas o permitan recircularlo para aumentar la conversión.

Figura 4-3. Inversión en syngas necesaria para obtener un mol de etileno, de acuerdo a la composición del gas proveniente de diferentes procesos de gasificación



En la Tabla 4-12 se muestra la composición que debe tener el gas para que el proceso genere una ganancia mínima del 10%. En este caso, de los requerimientos económicos del proceso se destinan 80% para el sustrato y 20% a los demás gastos. Sin embargo, esta distribución puede variarse de acuerdo a las necesidades, en caso de que se requiera una mayor inversión en etapas de acondicionamiento del syngas antes de la fermentación. Este análisis se realizó únicamente para los gases reportados en la Tabla 4.11 con un costo menor al precio del syngas.

Para los gases analizados, es necesario aumentar la concentración de gas útil por lo menos al doble con el fin de que el proceso sea rentable. En este caso es necesario implementar soluciones estratégicas y mejorar la tecnología de gasificación para que no solo se aumente la concentración del hidrógeno, ya que el syngas enriquecido en

hidrógeno es altamente energético, pero no permite la transformación de la totalidad del sustrato por la falta de monóxido de carbono. Un proceso de gasificación adecuado para generar syngas como sustrato debe generar una alta concentración de los gases útiles, además de que estos se encuentren en una proporción adecuada.

Tabla 4-12. Rendimiento y composición ideal para que el bioproceso de producción de etileno a partir de syngas sea económicamente viable

Proceso	Rendimiento ideal (mol etileno/mol gas)	Gas útil como sustrato (%molar)	H2 (%mol)	CO (%mol)
4	0.045	28.65	19.10	9.55
5	0.110	70.04	46.69	23.34
5.1	0.065	41.32	27.55	13.77
5.2	0.098	62.06	41.37	20.69
5.3	0.096	60.90	40.60	20.30
5.4	0.096	60.53	40.35	20.18
5.5	0.093	58.72	39.15	19.57
5.6	0.088	55.60	37.07	18.54

Para que el proceso sea económicamente viable el syngas debe tener un precio aproximadamente de 0.0020 USD/mol. Además, la cantidad de gas útil debe estar alrededor de 50% y la composición de este gas debería tener una distribución del doble de hidrógeno, ya que esta genera un mayor rendimiento en la reacción de bioconversión según el modelo *black box*. Con base en la información que brinda el modelo de *black box* se obtienen composiciones de syngas similares a las requeridas por procesos termoquímicos de conversión como Fischer-Tropsch, donde la concentración de hidrógeno dobla la de monóxido de carbono. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los casos evaluados solo fueron extremos como representación del espectro de posibles composiciones del syngas.

Los requerimientos planteados para que el proceso sea rentable corresponden a las condiciones extremas, que posteriormente serán evaluadas mediante un modelo metabólico. Sin embargo, el syngas debe cumplir con especificaciones de composición para que el proceso sea globalmente viable. Esto implica mayores esfuerzos de investigación enfocados en el proceso de gasificación, pero plantear soluciones a este nivel está fuera del alcance del presente trabajo.

4.3 Reconstrucción de la red metabólica en el microorganismo chasis *E. coli*

La red metabólica se construyó a partir del modelo mínimo metabólico a escala genómica reportado por Taymaz, (2010) para el crecimiento de *E. coli* K12 bajo fuente limitada de carbono. Este modelo cuenta con 284 reacciones, incluyendo las de formación de macromoléculas como carbohidratos, lípidos, RNA y DNA, principales componentes de la biomasa, cuya formación se representa en una sola reacción. Este modelo está construido para una velocidad de crecimiento de 0.1 h⁻¹, debido a que la composición de la biomasa depende fuertemente de este parámetro. Posteriormente, se agregaron las reacciones pertenecientes a la ruta de Wood-Ljungdahl y las reacciones para la producción de etileno.

Del modelo original, se usaron únicamente 280 reacciones, debido a que no se contempló el crecimiento en acetato como fuente de carbono. Además, se modificaron 5 reacciones con el fin obtener un balance completo tanto de materia como de cargas y electrones. Las reacciones modificadas se muestran en la Tabla 4-13.

La reacción número 66 del modelo original se modificó ya que el proceso es anaeróbico, como se mencionó anteriormente. Por esta razón era necesario establecer una reacción alternativa para la producción de *2-keto-4-methylthiobutyrate*, metabolito intermediario en reacciones de formación de biomasa.

Tabla 4-13. Modificaciones del modelo metabólico para *E. coli* reportado por Taymaz (2010)

	Reacción original	Modificación
66. DKMPPD	$dkmpp + h_2o + o_2 \Rightarrow 2kmb + for + (2) h + pi$	$dkmpp + 3 h_2o + 2 nad \Rightarrow 2kmb + for + 4 h + pi + 2 nadh$
211. MTHFC	$h_2o + methf \Leftrightarrow 10fthf$	$h_2o + methf \Leftrightarrow 10fthf + h$
212. MTHFD	$mlthf + nadp \Leftrightarrow methf + nadph + h$	$mlthf + nadp \Leftrightarrow methf + nadph$
267. PRFGS	$atp + fgam + gln-L + h_2o \Rightarrow adp + fpram + glu-L + h + pi$	$atp + fgam + gln-L + h_2o \Rightarrow adp + fpram + glu-L + 2 h + pi$

Tabla 4-14 En la Tabla 4-14 se muestran las reacciones usadas para la formación de macrocomponentes y de biomasa, debido a que se realizó un ajuste en los decimales, con el fin de reducir el error del modelo respecto al modelo *black box*.

Al modelo original se le agregaron 12 reacciones intracelulares entre las cuales se encuentran las pertenecientes a la ruta metabólica de Wood-Ljungdahl para la fijación de syngas, así como reacciones del sistema energético y de formación de etileno. Obteniendo un total de 291 reacciones intracelulares. Además de estas reacciones, se implementaron 5 nuevas de transporte para permitir el intercambio celular de los nuevos sustratos y productos. El número total de reacciones de transporte es 24.

Para la formación de etileno se usó la enzima EC 1.18.6.1. Pues a pesar de que la enzima formadora de etileno ha sido ampliamente estudiada y se ha expresado en el microorganismo chasis, necesita de oxígeno para llevar a cabo la reacción. Las rutas reportadas en plantas también son altamente dependientes de oxígeno. Sin embargo, debido a que el proceso se planteó desde un principio como anaerobio, era necesario recurrir a otros sistemas metabólicos. A pesar de que la enzima usada es una nitrogenasa, puede usar como sustrato acetileno para

producir el compuesto de interés (Zumft, Paneque, Aparicio, & Losada, 1969)(Dance, 2004)(Chan, Wu, Dean, & Seefeldt, 2000).

Tabla 4-14. Reacciones de componentes celulares y biomasa implementados en el modelo

Reacción	Estequiometría
Aaprot	0.113 ala-L + 0.0512 arg-L + 0.0532 asn-L + 0.0532 asp-L + 0.0176 cys-L + 0.0599 gln-L + 0.0599 glu-L + 0.0872 gly + 0.0182 his-L + 0.0493 ile-L + 0.0541 leu-L + 0.0605 lys-L + 0.0259 met-L + 0.0350 phe-L + 0.0416 pro-L + 0.0501 ser-L + 0.0545 thr-L + 0.0114 trp-L + 0.0290 tyr-L + 0.0752 val-L => Aaprot
Aaprot_Biom_Prot	0.0001 Aaprot + 4 atp + 3 h2o => 4 adp + 0.0047738 Biom_Prot + 4 h + 4 pi
amp_RNA	0.262 amp + 2 atp + 0.2 cmp + 0.322 gmp + 1 h2o + 0.216 ump => 2 adp + 2 h + 2 pi + 0.0009584 RNAtot
damp_DNA	2 atp + 0.246 damp + 0.254 dcmp + 0.254 dgmp + 0.246 dtmp + 1 h2o => 2 adp + 0.0009746 DNA + 2 h + 2 pi
Biomass (0.1h-1)	0.0007400 Biom_Prot + 0.000000865 DNA + 0.0109 etha + 0.0122 glyc + 0.000956 glycogen + 0.00304 hdca + 0.00235 hdcea + 0.0000543 lps_EC + 0.00154 ocdcea + 0.000156 peptido_EC + 0.000784 ptrc + 0.00000535 RNAtot + 0.000159 spmd + 0.0076 h => 1 Biom_01
Biomass (0.3h-1)	0.0007330 Biom_Prot + 0.00000161 DNA + 0.0087 etha + 0.0097 glyc + 0.0007582 glycogen + 0.002417 hdca + 0.00187 hdcea + 0.00004292 lps_EC + 0.001219 ocdcea + 0.000124 peptido_EC + 0.0006249 ptrc + 0.000009939 RNAtot + 0.0001209 spmd + 0.01978 h => Biom_03

En cuanto al sistema energético, fue necesario implementar enzimas que permitiesen poner los electrones del hidrógeno en una forma útil para la célula. Los complejos enzimáticos usados fueron el Rnf, nfn y HydABC. En primer lugar, a partir del hidrógeno molecular se generan protones, mientras que los electrones se transfieren a la ferredoxina oxidada, que pasa a un estado reducido, posteriormente, por medio de la translocación de protones, los electrones pueden

pasar de la ferredoxina reducida al NAD, para formar NADH (Schuchmann & Müller, 2014). Los electrones que se expulsaron de la célula forman un gradiente de concentración que permite posteriormente formar ATP mediante la acción de una enzima ATPasa. A pesar de que este mecanismo puede variar, en este caso se decidió usar protones para la generación de ATP, ya que después de ingresar a la célula, se pueden fijar para la formación del producto, así como la biomasa.

Las reacciones intracelulares adicionales se muestran en la Tabla 4-15. Además de estos cambios, se implementó una reacción extra, catalizada por la enzima formate C-acetyltransferase (E.C. 2.3.1.54), reportada en *E. coli*. Debido a que en el modelo original la reacción para convertir piruvato en acetil CoA, catalizada por la enzima piruvato deshidrogenasa, no es reversible. Además, para convertir el acetil CoA en piruvato, se requiere energía en forma de ATP. Esta nueva reacción se reporta como reversible en la base de datos BRENDA, sin embargo, se verificó la energía libre de Gibbs para la reacción bajo condiciones celulares (concentración 1mM para todos los metabolitos, pH 7, temperatura 25°C) y presenta un valor positivo. Por esto fue necesario calcular las condiciones que hacen posible la regeneración del piruvato en esta ruta hipotética.

Se varió la relación entre las concentraciones de los productos y sustratos, como se muestra en la Figura 4-44 y se observa que al disminuir la concentración del producto, es decir del piruvato, la reacción se aleja del equilibrio y toma un valor negativo que indica la posibilidad de llevar a cabo la reacción.

Es posible implementar esta reacción en el modelo, siempre y cuando el piruvato sea consumido por otras reacciones y así se mantenga en una baja concentración celular. Esto es posible debido a que este metabolito es intermediario en la formación tanto de biomasa como del etileno, lo que genera un consumo de piruvato constante en la célula.

Tabla 4-15. Reacciones adicionadas al modelo a escala genómica para la producción de etileno a partir de syngas

Reacción	Sistema	Número EC	Reacción
ACALD	Etileno	1.2.1.10	$accoa + h + nadh \rightleftharpoons acald + coa + nad$
ACDH	Etileno	4.2.112	$acald \rightleftharpoons h_2o + ethy$
NEFE	Etileno	1.18.6.1	$ethy + fdxr_{42} + h + atp + h_2o \rightleftharpoons ethe + fdxo_{42} + adp + pi$
FO ^a	Energía	-	$2 h_2 + 2 fdxo_{42} \rightleftharpoons 2 fdxr_{42} + 4 h$
R09508 ^a	Energía	-	$3 h + nad + fdxr_{42} \rightleftharpoons nadh + 2 h[e] + fdxo_{42}$
nfn	Energía	1.6.1.1	$nadh + nadp \rightleftharpoons nadph + nad$
FDH	WL	1.2.1.2	$co_2 + nadph \rightleftharpoons nadp + for$
METR	WL	2.1.1.258	$5mthf + cfesp + h \rightarrow thf + mecfsp$
CODH_ACS	WL	2.3.1.169	$mecfsp + co + coa \rightarrow accoa + h + cfesp$
CODH4	WL	1.2.7.4	$co + fdxo_{42} + h_2o \rightleftharpoons co_2 + 2 h + fdxr_{42}$
PC	WL	6.4.1.1	$atp + co_2 + pyr + h_2o \rightleftharpoons adp + oaa + pi + 2 h$
PPCK	WL	4.1.1.49	$atp + oaa \rightleftharpoons adp + co_2 + pep$

^a Tomado del reporte de Schuchmann y Müller (2014) , WL: Wood-Ljungdahl pathway

Con el fin de examinar la estructura del modelo, además de verificar el balance de las reacciones tanto de masa como de carga, se verificó la presencia de todos los precursores de la biomasa, la presencia de metabolitos que no se producen o consumen en la ruta, entre otros. Se encontró que la ferredoxina no puede ser sintetizada por ninguna de las reacciones planteadas en el modelo, sin embargo, los demás metabolitos necesarios para la formación de biomasa se encuentran presentes. En cuanto a las reacciones bloqueadas, estas dependen del escenario planteado, en el caso 3 planteado en el *black box*, donde el dióxido de carbono es la fuente de carbono, se encuentra bloqueada la reacción de consumo de monóxido. Sin embargo, sin importar si la fuente de carbono es CO o CO₂, la reacción de consumo de glucosa se encuentra bloqueada.

Figura 4-4. Energía libre de Gibbs para la reacción R00212 (*formate C-acetyltransferase*, E.C. 2.3.1.54) respecto a la concentración de piruvato.

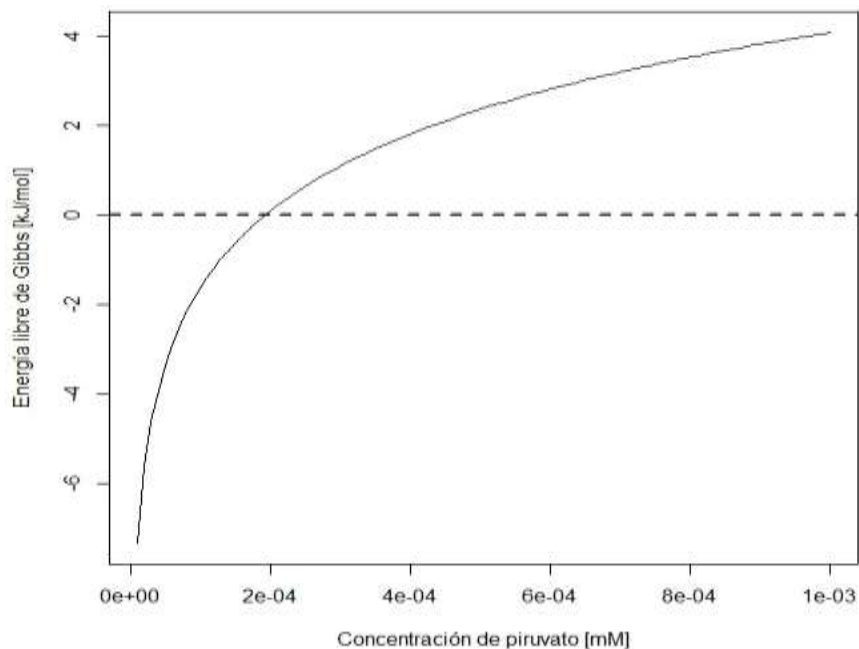
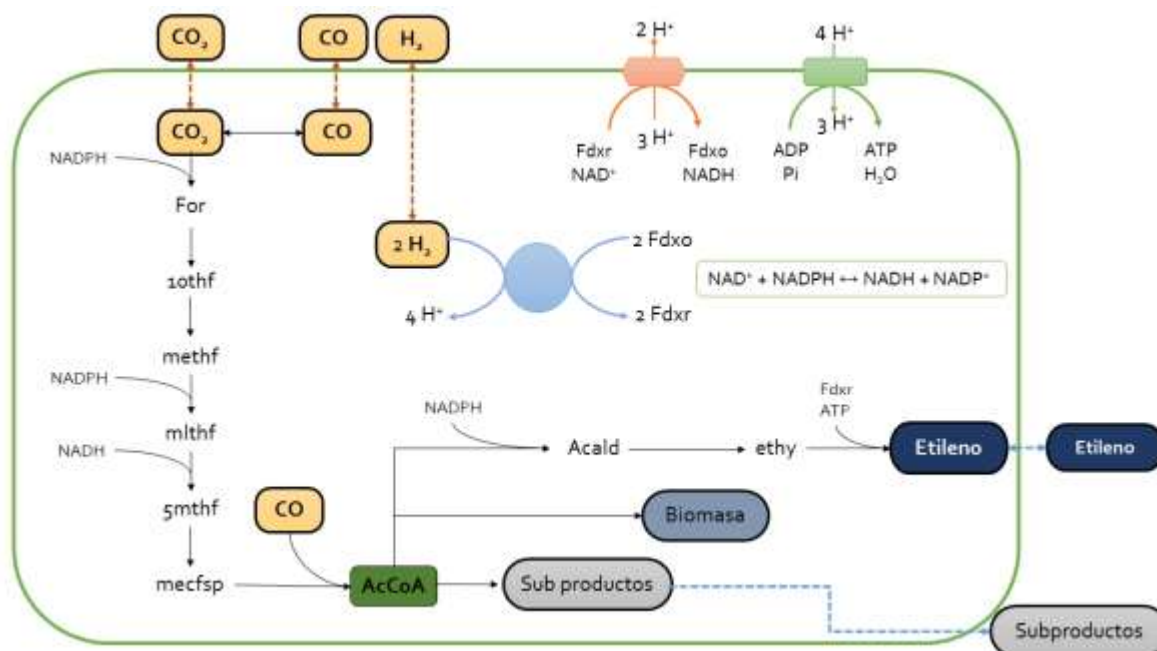


Figura 4-5. Esquema de las reacciones implementadas en el modelo metabólico



Se aclara que el modelo contempla únicamente los compartimientos extracelular y citosólico por lo que se trata de un microorganismo procariota.

4.4 Determinación de la presencia o ausencia de los genes codificantes para enzimas involucradas en las nuevas reacciones implementadas.

Después de ampliar el modelo metabólico con nuevas reacciones para el consumo de syngas y producción de etileno, es necesario establecer cuáles enzimas deben ser expresadas en el microorganismo chasis para tener una plataforma de bioconversión funcional. Para esto se realizó un análisis con BLAST local mediante un tblasn, donde el genoma del microorganismo chasis es la base de datos y las secuencias proteicas pertenecientes a las enzimas que catalizan las nuevas reacciones implementadas los *query* alienados. Los resultados del análisis estadístico, porcentaje de identidad, *E-value* y *Bit-score* se muestran en la Tabla 4-16.

Tabla 4-16. Resultados del alineamiento BLAST para las nuevas enzimas implementadas en el modelo metabólico.

Reacción	Enzima	Microorganismo	% <i>identity</i>	<i>E-value</i>	<i>Bit-score</i>
FDH	Formate dehydrogenase	<i>E. coli</i>	99.9	0	2054
FTHFLi	Formate--tetrahydrofolate ligase	<i>Clostridium botulinum</i>	24.14	0.27	31.6
		<i>Clostridium acetobutylicum</i>	55.5	8.7	26.6
MTHFC	Bifunctional protein FOLD	<i>E. coli</i>	100	0	587
		<i>Acetobacterium woodii</i>	31.09	1.37E-35	133
MTHFD_1	Bifunctional protein FOLD	<i>E. coli</i>	100	0	617
		<i>Acetobacterium wieringae</i>	28.89	0.55	29.3

Continuación Tabla 4-16

METR	5- methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein co-methyltransferase	<i>Moorella thermoacetica</i>	27.12	3.15E-13	66.6
		<i>Clostridium ljungdahlii</i>	26.506	7.99E-11	59.7
CODH _ACS	CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase	<i>Moorella thermoacetica</i>	24.64	0.38	31.6
		<i>Clostridium ljungdahlii</i>	27.04	0.087	32.7
CODH4	Acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex subunit alpha/beta-1/2 carbon monoxide dehydrogenase	<i>Methanosarcina thermophila b2</i>	26.04	4	27.3
		<i>Methanosarcina thermophila a1</i>	26.74	0.019	35.8
		<i>Methanosarcina thermophila b1</i>	31.37	2.9	27.7
		<i>Methanosarcina thermophila a2</i>	24.47	0.013	36.6
ACALD	Aldehyde-alcohol dehydrogenase	<i>E. coli</i>	100	0	1640
		<i>Clostridium acetobutylicum</i>	56.381	0	993
		<i>Acetobacterium woodii</i>	59.4	0	992
ACDH	Acetylene hydratase	<i>Pelobacter acetylenicus</i>	25.884	2.78E-39	154
NEFE	Nitrogenase iron protein	<i>Azospirillum brasilense</i>	34.694	2.3	27.3
		<i>Azobacteroides pseudotrichonymphae</i>	25	1.4	27.7
		<i>Clostridium acetobutylicum</i>	39.31	0.002	37

Continuación Tabla 4-16

FO	Iron hydrogenase Hydrogenase-1	<i>Clostridium pasteurianum</i>	20.717	1.90E-07	51.6
		<i>E. coli</i>	100	0	1244
R09508	Iron-translocating oxidoreductase complex subunit C	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	37.037	8.18E-90	296
NFN	nucleotide transhydrogenase	<i>Escherichia coli</i>	100	0	942

En la Tabla 4-16 se puede observar que 8 de las 13 secuencias analizadas poseen homología con secuencias pertenecientes al microorganismo chasis, estas se resaltan en azul. 6 de ellas se encontraron directamente en el microorganismo hospedero. Para estas enzimas el porcentaje de cobertura es 100% o un valor cercano, mientras que el *E-value* fue cero y el *bit-score* entre 500 y 2000. Lo que confirma que es una secuencia altamente similar. En algunos de los casos se evaluó además de la secuencia de *E. coli*, una secuencia de microorganismos modelo, del cual proviene la nueva reacción. Como el caso de la enzima *Bifunctional protein FOLD*, que hace parte de la ruta Wood-Ljungdahl presente en bacterias acetogénicas. En este caso se puede observar que la segunda secuencia analizada posee un porcentaje de cobertura pequeño, sin embargo, su *E-value* es pequeño. En este caso es posible que ambas enzimas posean un sitio activo similar y puedan llevar a cabo la misma reacción. Caso similar a la enzima *Aldehyde-alcohol dehydrogenase*, que para secuencias provenientes de otros microorganismos posee un porcentaje de cobertura mayor a 50% y un *E-value* de cero.

Cuatro de las secuencias analizadas, las pertenecientes a las enzimas *Nitrogenase iron protein* (NEFE), *Acetyl-CoA decarbonylase* (CODH4), *CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase* (CODH_ACS) y *Formate--tetrahydrofolate ligase* (FTHFLi), no cumplieron con los criterios de selección (*E-value* <1e-6, % *identity* > 30%, *Bit-score* > 50), por lo que se infiere que el microorganismo hospedero no posee enzimas con la misma función. Sin embargo, en el caso de la última enzima, enzima *5-methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein co-methyltransferase* (METR), se encontraron valores muy cercanos al umbral del criterio de selección. En este caso no se afirmará que existe homología de genes ya que el porcentaje de cobertura es muy pequeño. Es necesario hacer una

evaluación minuciosa del sitio activo de la enzima codificada por la secuencia y la enzima del microorganismo modelo para tener conclusiones verídicas.

Los resultados del BLAST indican que es necesario expresar 5 de las enzimas que catalizan las nuevas reacciones implementadas en el modelo metabólico para hacer el proceso viable. Las demás reacciones se encuentran presentes en el microorganismo, sin embargo, no se habían incluido, pues como se mencionó anteriormente, el modelo metabólico del chasis usado es un modelo mínimo. En este caso, al ampliar el modelo, se representan las funciones mínimas necesarias para que se pueda completar la transformación de syngas en etileno, además de la producción de biomasa.

4.5 FBA

4.5.1 Consistencia del modelo

Para evaluar la consistencia del modelo se llevó a cabo un análisis de balance de flujos. Para optimizar el sistema se usó la herramienta Cobra toolbox de Matlab (Heirendt, L., Arreckx, S., Pfau, T., Mendoza, S. N., Richelle, A., Heinken, A., ... & Magnusdóttir, 2017). Se estableció la reversibilidad de cada reacción mediante la modificación de límites para los *fluxes*. La reversibilidad de las reacciones se verificó mediante reportes de las bases de datos, tanto del chasis como de las nuevas implementadas en el modelo expandido para producción de etileno a partir de syngas. Además, para llevar a cabo el análisis de balance de flujos con una velocidad de crecimiento única, correspondiente al escenario propuesto por el *black box*, se fijó el *flux* de amonio, cuya función es servir de única fuente de nitrógeno. De esta manera se estableció cómo única función objetivo la maximización del *flux* de etileno.

Para cumplir con las restricciones impuestas por el modelo *black box* se restringió el espacio solución del modelo metabólico (FBA) a los *fluxes* de metabolitos extracelulares estimados a partir de la estequiometría correspondiente a una velocidad de crecimiento

de 0.1 h^{-1} . Estos resultados se muestran en la Tabla 4-17, donde los metabolitos con *fluxes* establecidos previamente como restricciones se muestran en negrita.

La diferencia obtenida entre el modelo de *black box* y el modelo metabólico es mínima como se muestra en la Tabla 4-17. El error cuadrático medio (ECM) es pequeño comparado con el valor del *flux* más bajo. Algunas de las diferencias se deben al sistema de redondeo del software, evidente en el caso 2, donde el valor fijado en el software fue de -2.4608, sin embargo, después del análisis FBA, el *flux* extracelular se muestra con un valor de -2.461. Esto mismo pasa con el caso 3, los cuales presentan el mayor error.

Tabla 4-17. Comparación entre las velocidades de consumo y producción de metabolitos del modelo *black box* y *fluxes* [mol/C-molX*h] extracelulares del modelo metabólico obtenidos mediante FBA

Metabolito	Caso 1		Caso 2		Caso 3	
	<i>Black box</i>	FBA	<i>Black box</i>	FBA	<i>Black box</i>	FBA
CO	-1.454	-1.454	-2.4608	-2.461	0	0
CO_2	0	0	1.1804	1.18	-1.6234	-1.623
H_2	-2.823	-2.823	-1.2957	-1.296	-4.7855	-4.786
H_2O	1.4247	1.425	0.0707	0.07063	3.2175	3.217
NH_4^+	-0.0253	-0.0253	-0.0253	-0.0253	-0.0253	-0.0253
H^+	0.0226	0.02266	0.0226	0.02266	0.0226	0.02266
SO_4^{-2}	-0.000674	-0.000674	-0.000674	-0.000674	-0.000674	-0.000674
HPO_4^{-2}	-0.000658	-0.0006579	-0.000658	-0.0006579	-0.000658	-0.0006579
C_2H_4	0.677	0.6769	0.59	0.59	0.7617	0.7617
Biomasa	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ECM	1e-8		2e-8		6e-8	

El modelo de *black box* inicialmente se construyó con la fórmula molecular reportada como se explica con antelación. Sin embargo, para disminuir el error se corrigió la fórmula aumentando la cantidad de decimales con base en la composición macromolecular. Para

la velocidad de crecimiento de 0.1 h^{-1} se obtuvo un consumo de amonio, sulfato y fosfato igual en los tres casos, pues estos dependen únicamente de la formación de biomasa. La formación del producto de interés, etileno, no involucra ninguno de estos metabolitos.

Los resultados del análisis FBA corresponden al modelo de *black box*, lo que indica que es consistente. En los tres casos el error es similar, por lo que no existe un sesgo para algún escenario específico y se puede usar el modelo metabólico para evaluar el fenotipo del microorganismo bajo diferentes escenarios. El proceso planteado inicialmente para la producción de etileno a partir de syngas, podría llevarse a cabo bajo condiciones anaeróbicas si se implementan las enzimas necesarias en un microorganismo chasis. Esto sin tener en cuenta mecanismos regulatorios de la célula.

Tabla 4-18. Comparación entre el análisis FBA para el modelo 1 (0.1 h^{-1}) y el modelo 2 (0.3 h^{-1}) usando las mismas restricciones para el espacio solución.

Metabolito	Caso 1		Caso 2		Caso 3	
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 1	Modelo 2
CO	-1.454	-1.454	-2.4608	-2.4608	0	0
CO_2	0	0	1.182	1.182	-1.623	-1.623
H_2	-2.823	-2.823	-1.2907	-1.2907	-4.784	-4.784
H_2O	1.426	1.426	0.0673	0.0692	3.266	3.2186
NH_4^+	-0.0253	-0.0253	-0.0253	-0.0253	-0.0253	-0.0253
H^+	0.0226	0.02179	0.0226	0.02179	0.0226	0.02179
SO_4^{-2}	-0.000674	-0.000626	-0.000674	-0.000626	-0.000674	-0.000626
HPO_4^{-2}	-0.0006579	-0.001135	-0.0006579	-0.001135	-0.0006579	-0.001135
C_2H_4	0.6769	0.6798	0.589	0.5921	0.761	0.7643
Biomasa	0.1	0.093	0.1	0.093	0.1	0.093
ECM	6e-6		6e-6		2e-4	

A pesar de que la mayoría de reacciones están activas, algunas reacciones pertenecientes a la glicólisis o al ciclo TCA, tienen un *flux* igual a cero. En el caso de la

glicólisis no se forma el piruvato a partir de fosfoenolpiruvato, este último se consume en reacciones involucradas en la formación de precursores de la biomasa. En el caso del ciclo TCA, es posible ver que una de las reacciones intermediarias, en la formación de fumarato a partir de succinato tiene un *flux* igual a cero. En este caso el fumarato se obtiene de otras reacciones que no involucran transferencia de electrones, por lo que no tienen influencia alguna en el estado redox de la célula. En este modelo se encuentra también inactivo el sistema de consumo de oxígeno y transporte de electrones relacionados con ello. Además de reacciones de transporte de metabolitos como glucosa, y productos como etanol y ácidos orgánicos.

Debido a que la composición de la biomasa puede tener una alta influencia en el modelo, se decidió analizar los dos modelos con composición de biomasa estimada con una velocidad de crecimiento de 0.1 y otro con 0.3 h⁻¹. En este caso se busca estimar el error que se puede cometer al usar una reacción de formación de biomasa bajo condiciones de diferentes de velocidad de crecimiento en el mismo microorganismo.

En la Tabla 4-18 se puede observar que la diferencia está principalmente en los metabolitos relacionados con la biomasa. Sin embargo, en algunos casos pueden verse afectadas las predicciones del fenotipo. Particularmente para estos resultados, se puede observar que el producto se sobreestima si se usa el modelo para 0.3 h⁻¹ con una velocidad de crecimiento de 0.1 h⁻¹, esto debido a la diferencia de energía catabólica involucrada en la producción de biomasa. Además, el *flux* de agua varía altamente para compensar las variaciones en la producción de protones. Estas alteraciones son causadas principalmente por la diferencia en la demanda de amonio, sulfato y fosfato. Sin embargo, si no se cuenta con la composición de la biomasa exacta, este podría ser un acercamiento que muestra el comportamiento entre las velocidades de consumo y producción de diferentes metabolitos y permitiría hacer predicciones, aunque no sea un valor exacto.

4.5.2 Caso de estudio

Con el fin de evaluar el comportamiento de la plataforma biosintética diseñada, se analizaron diferentes escenarios a partir de gases de síntesis obtenidos a partir de biomásas colombianas. Pues como se ha mencionado, la composición del syngas varía de acuerdo al proceso de gasificación, a la tecnología usada y a las condiciones del proceso y la materia prima usada. El syngas evaluado proviene principalmente de residuos agroindustriales, los cuales tienen una alta oferta según el Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia (Escalante et al., 2011).

Los diferentes escenarios se evaluaron con el modelo a escala genómica por medio de un análisis FBA, donde la composición del gas fue la principal variable para la optimización. Para la evaluación se asumió un flujo total de gas igual a 4 mol syngas $C\text{-molX}^{-1} h^{-1}$. Este flujo se estableció con base en el *black box*, siendo la cantidad de gas promedio necesario para lograr una velocidad de crecimiento de $0.1 h^{-1}$. El flujo de cada sustrato se halló con base en las composiciones reportadas en los diferentes procesos de gasificación de biomásas colombianas realizados en la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín.

Debe resaltarse que, para esta evaluación, se asume que el gas que se alimenta, se transfiere a la fase acuosa y está disponible para el consumo, es decir, se supone que la transferencia de masa no presenta resistencia y es igual para los tres tipos de gases. Sin embargo, para el diseño del proceso o para un análisis a escala de reactor debe tenerse en cuenta este fenómeno ya que es uno de las principales limitantes para la implementación de sustratos gaseosos.

A continuación, se presentan los resultados de las simulaciones para los flujos de etileno a obtener en cada uno de los diferentes escenarios donde se varía la composición del syngas. De igual manera se presentan los rendimientos del proceso correspondientes

Escenario 1. Syngas proveniente de residuos agronindustriales de café, arroz y madera.

Para el primer caso estudiado se usó el syngas producido a partir de co-gasificación de carbón y biomasa en un lecho fluidizado. En este estudio, se analizaron dos mezclas, en la primera se usó 6% de biomasa, mientras que la segunda se usó 15%. Para obtener el gas de síntesis, se evaluaron 3 tipos de biomasa, aserrín, cáscara de café y cáscara de arroz (Vélez, Chejne, Valdés, Emery, & Londoño, 2009).

En la Tabla 4-19 se muestra la composición de cada gas, así como la cantidad de etileno obtenido y el rendimiento.

Tabla 4-19. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente mezclas de carbón y de biomasa residual (cáscara de café, aserrín y cáscara de arroz) en porcentajes de 6% y 15%

Biomasa	% de biomasa	H_2 %	CO_2 %	CO %	Etileno mol/C-molX h	Y_{SP}	Gas útil %	Relación H_2/CO
Cáscara de café	6	14	8	8.2	0.11	9.28	30.2	1.71
	15	10	7	8.2	0.09	8.47	25.2	1.22
Aserrín	6	10.7	10	11.8	0.11	8.78	32.5	0.91
	15	12	8.4	6.8	0.09	8.22	27.2	1.76
Cáscara de arroz	6	11.4	9.3	6	0.08	7.50	26.7	1.90
	15	14	10	5	0.09	7.83	29	2.80

La cantidad de etileno obtenida en las simulaciones presentadas tiene una diferencia 27% con referencia al mayor flujo, es decir, 0.11 mol Etileno/C-molX h. El rendimiento más grande se obtuvo con el syngas proveniente de cáscara de café con bajo contenido de biomasa. Por su parte la cascarilla de arroz generó el menor rendimiento. En el primer caso la relación de hidrógeno y monóxido es cercana a 2, además la cantidad de gas útil, es alta. A diferencia del caso de la cascarilla de arroz, donde la relación es cercana a dos,

sin embargo, el contenido de gas útil es menor. En estos dos casos hay un factor importante que se debe resaltar, en el primero, la cantidad de monóxido de carbono y de dióxido de carbono es similar, mientras que en el segundo caso, el contenido de dióxido de carbono es mayor, como se mencionó anteriormente, para usar dióxido de carbono como sustrato es necesario tener un mayor gasto de hidrógeno y en este escenario la cantidad de este gas es solo 11.4%, por lo que no es suficiente para compensar los electrones necesarios para la fijación del dióxido.

Para estas muestras de syngas, la cantidad de gas útil para el sustrato no supera el 33%, por lo que el rendimiento total es bajo. A pesar de que no se conoce el costo de este syngas, debido a su composición, se puede deducir que no hay sobrecostos en enriquecimientos del gas. Sin embargo, con base en los resultados de la evaluación económica, es posible afirmar que la inversión en sustrato sería alta debido al bajo contenido de gas útil, aunque el costo de producción de gas de síntesis sea bajo.

Escenario 2. Syngas proveniente de biomasa residual de bagazo de caña y carbón

Para este caso se usó syngas proveniente de bagazo de caña. Para la gasificación se implementó tanto la biomasa, como su mezcla con carbón en una relación bagazo:carbón de 5:1. El proceso de gasificación se llevó a cabo en un lecho fluidizado a escala piloto. La temperatura usada durante el proceso fue entre 800 y 900°C. Además, se usó aire en lugar de vapor de agua (Macías, Chejne, Montoya, & Blanco, 2018).

Tabla 4-20. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de biomasa residual (caña y carbón)

Biomasa	H₂ %	CO₂ %	CO %	Etileno mol/C-molX h	Y_{SP}	Gas útil %	Relación H₂/CO
caña	9.64	40.29	47	0.34	8.81	96.93	0.21
bagazo+carbón	18.96	47.66	28.31	0.28	7.35	94.93	0.67
carbón	15.94	43.72	36.79	0.32	8.18	96.45	0.43

En este caso la cantidad de etileno obtenida sería mayor que en el primer escenario, aunque el rendimiento es similar. Esto se debe a que se cuenta con una gran cantidad de fuente de carbono, pero el contenido de hidrógeno es muy bajo para los tres casos. En este escenario, el gas útil es mucho mayor que en otros de los escenarios estudiados, sin embargo, la relación entre los diferentes gases de sustrato, no es la más adecuada, como se observa en la Tabla 4-20, es menor a 1. Por lo que se desperdiciaría una gran cantidad de syngas, pues a pesar de que se implementen reciclos, no se tendría el hidrógeno necesario para sintetizar el etileno ni la biomasa.

En este escenario se presenta una singularidad que vale la pena resaltar. Al implementar carbón en la gasificación, la cantidad de hidrógeno aumenta, sin embargo, la producción de etileno disminuye. Esto se puede explicar ya que en el primer caso el contenido de monóxido de carbono es mayor que el de dióxido, por lo que se necesita menor cantidad de hidrógeno para la formación de biomasa. Mientras que, en el segundo caso, la mayor fuente de carbono es el dióxido, por lo que necesita mayor cantidad de hidrógeno para generar una cantidad similar de etileno. Aunque la cantidad de hidrógeno es casi el doble, la cantidad de electrones requeridos para fijar el carbono es mayor lo que genera un menor rendimiento.

En el estudio se determinó que diferentes temperaturas y flujos de combustible o aire afectan fuertemente el contenido final del syngas. En este caso, es necesario explorar condiciones de operación que favorezcan la producción de syngas con un mayor contenido de hidrógeno. Pues bajo las condiciones evaluadas se obtienen bajos rendimientos y se desperdiciaría una gran cantidad de sustrato.

Escenario 3. Syngas proveniente de residuos de bagazo de caña de azúcar, cáscara de arroz y cáscara de almendra de palma.

Para la gasificación de estas biomásas residuales, se llevaron a cabo dos etapas. Primero una pirolisis y posteriormente se llevó a cabo la gasificación del carbón producido en la primera etapa (Macías et al., 2018).

Tabla 4-21. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de pirolisis de biomasa residual (bagazo de caña de azúcar, cascara de arroz y cáscara de almendra de palma)

Biomasa	H_2 %	CO_2 %	CO %	Etileno mol/C-molX h	Y_{SP}	Gas útil %	Relación H_2/CO
Bagazo de caña de azúcar	20.2	11.3	49.8	0.43	13.23	81.3	0.41
Cascarilla de arroz	21.3	15	45.5	0.41	12.51	81.8	0.47
Cáscara de almendra de palma	11.4	24.4	42.4	0.32	10.32	78.2	0.27

Tabla 4-22. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de gasificación de biomasa residual (bagazo de caña de azúcar, cáscara de arroz y cáscara de almendra de palma)

Biomasa	H_2 %	CO_2 %	CO %	Etileno mol/C-molX h	Y_{SP}	Gas útil %	Relación H_2/CO
Bagazo de caña de azúcar	51.85	15.4	32.2	0.52	13.18	99.45	1.61
Cascarilla de arroz	46.29	20.2	32.6	0.49	12.36	99.09	1.42
Cáscara de almendra de palma	44.07	47.2	5.5	0.29	7.61	96.77	8.01

En ambos casos, tanto en la pirolisis como en la gasificación, se obtiene una alta cantidad de etileno, en comparación con los demás gases de síntesis evaluados. La cáscara de almendra de palma, es la materia prima que genera el menor rendimiento en la conversión de syngas a etileno. Como se puede ver en la Tabla 4-21 el gas generado presenta menor cantidad de hidrógeno que de fuente de carbono en el caso de la pirolisis. Mientras que, en la gasificación, debido a que la mayor fuente de carbono es dióxido de carbono, se necesita una mayor cantidad de hidrógeno para la síntesis del etileno, como lo indica el

modelo *black box*. En cuanto al bagazo de caña de azúcar, la fuente de carbono predominante es el monóxido de carbono. En este caso se puede aprovechar en mayor medida el sustrato. El contenido de gas útil como sustrato de este syngas es alto, incluso en el gas generado por la pirolisis, por lo que puede ser económicamente benéfico.

Si se comparan la pirolisis y la gasificación, para el caso del bagazo de caña de azúcar, en ambos casos se obtiene mayor cantidad de monóxido que de dióxido. Aunque si se usa pirolisis, se obtiene mayor cantidad de monóxido que de hidrógeno, como se ve en la relación hidrógeno (0.41). Mientras que usando la gasificación se obtiene una relación de hidrógeno y monóxido de 1.6. Estos resultados concuerdan con lo que predice el modelo *black box*, si se usa mayor cantidad de hidrógeno la producción de etileno es mayor.

Escenario 4. Syngas proveniente de biomasa residual del sector floricultor del oriente antioqueño.

En este caso el gas de síntesis se obtuvo a partir de biomasa residual de cultivos de pompón, áster y hortensia con vapor de agua como agente gasificador. Para el proceso se usaron temperaturas entre los 700 y 750°C, además se usó un reactor de lecho fluidizado (Yepes & Chejne, 2012).

Tabla 4-23. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de biomasa residual del sector floricultor del oriente antioqueño.

Tiempo [h]	Etileno				Y_{SP}	Gas útil %	Relación H ₂ /CO
	H ₂ %	CO ₂ %	CO %	mol/C-molX h			
0.5	59.6	22.5	13.9	0.45	11.83	96	4.29
1	53.4	27.2	14.7	0.42	10.97	95.3	3.63
1.5	46.7	29.8	18.4	0.40	10.49	94.9	2.54
2	54.1	24.9	18.4	0.45	11.48	97.4	2.94
2.5	51.4	28.2	18.1	0.43	10.94	97.7	2.84
3	49.5	30.2	18.2	0.42	10.61	97.9	2.72

Continuación Tabla 4-23

3.5	30.7	44.3	22.1	0.32	8.14	97.1	1.39
4	39.6	42.4	15.6	0.33	8.51	97.6	2.54
4.5	42.6	42.1	13.4	0.34	8.60	98.1	3.18
5	32.2	52.1	13.7	0.27	6.89	98	2.35
5.5	33.8	53.2	11.4	0.27	6.74	98.4	2.96

La fuente de carbono más abundante en este escenario es el dióxido de carbono. Sin embargo, la cantidad de hidrógeno varía con el tiempo, inicialmente la cantidad de hidrógeno es muy alta, pero disminuye durante la gasificación y al finalizar el proceso la concentración de dióxido supera a la de hidrógeno. Bajo este escenario, la existencia de un reactivo limitante genera el desperdicio de gas y un bajo rendimiento. Esto se explica por el alto requerimiento energético del proceso cuando se usa CO₂ como fuente de carbono ya que es un compuesto inorgánico sin electrones disponibles.

En este escenario debe resaltarse que el contenido de gas útil para sustrato es alto, alrededor del 97%. La composición de este gas, respecto a gas útil, así como a la relación entre los diferentes sustratos, presenta amplias ventajas. La relación entre hidrógeno y monóxido es cercana a 2, sin embargo, debido al alto contenido de dióxido a partir de las 4 horas de gasificación, generan una disminución del rendimiento, por lo que sería recomendado usar el gas de las primeras horas de gasificación e implementar diferentes condiciones de operación que permitan mantener la producción de syngas con composición constante. Esta biomasa y proceso de gasificación pueden ser implementados para la producción de etileno. Sin embargo, es necesario evaluar el costo de producción del syngas, para saber si es económicamente viable.

Escenario 5. Syngas proveniente de residuos agroindustriales de cultivos de flores

En este caso, a diferencia del syngas anterior producido a partir de flores en el escenario 4, se evaluaron diferentes agentes de gasificación, vapor, aire y una mezcla de estos. La temperatura usada fue 850°C y se llevó a cabo en un lecho fluidizado (Sarmiento, Maya, Chejne, & Lora, 2015).

Tabla 4-24. Flujo de etileno obtenido a partir de syngas proveniente de biomasa residual del sector floricultor

Agente gasificador	H_2 %	CO_2 %	CO %	Etileno mol/C-molX h	Y_{SP}	Gas útil %	Relación H_2/CO
Vapor	44.8	24.4	21.9	0.408	11.218	91.1	2.05
Aire	23.9	9.2	18.2	0.248	12.124	51.3	1.31
Vapor + Aire	34.7	16.2	20.9	0.334	11.657	71.8	1.66

Para este proceso de gasificación, se puede ver que el mejor rendimiento se obtiene al usar como sustrato el gas generado con aire como agente gasificante, a pesar de no ser el que posee mayor contenido de gas útil. No obstante, la diferencia entre los rendimientos del etileno usando los tres posibles agentes gasificantes no es muy grande, es de 7% entre el primer y segundo caso y 4% entre el segundo y tercer caso. Sin embargo, la cantidad de etileno generada con el syngas generado con vapor o mezcla vapor aire, es mayor. Además, la cantidad de gas útil en estos gases también es mayor. Siguiendo esta premisa, la inversión en syngas como sustrato para el proceso de bioconversión sería menor.

Al igual que en el anterior escenario, donde se usan flores como biomasa para la gasificación, la cantidad de hidrogeno es alta, por lo que se puede consumir la fuente de carbono en su mayoría. También es evidente que la relación entre el monóxido de carbono e hidrógeno es cercana a dos, por lo que el monóxido de carbono sería usado eficientemente durante el proceso de producción de etileno.

Como se observa en los resultados, de acuerdo a la composición de cada gas, se obtienen diferentes rendimientos de etileno. De acuerdo al análisis de flujos, el syngas que mayor cantidad de etileno genera es el proveniente de bagazo de caña de azúcar. Sin embargo, los residuos del sector floricultor, presentaron un buen rendimiento. Además, en algunos procesos el syngas tiene una concentración de gas útil mayor al 90%, lo que es favorable desde el punto de vista económico, ya que este hecho disminuye la inversión en sustrato.

Como se había analizado en el estudio de potencial económico, la composición del gas es de gran importancia. Esto se ve reflejado en los bajos rendimientos si los sustratos no se encuentran en una proporción adecuada. Además, es posible descartar algunos procesos de gasificación debido a su bajo contenido de gas útil. De manera análoga, es posible ver que algunos de los escenarios planteados poseen gases con altas concentraciones de los sustratos de interés, superando el límite inferior planteado en el análisis económico. Lo que indica que es posible llevar a cabo el proceso, siempre y cuando el costo de gasificación se encuentre alrededor de 0.09 USD/kg.

4.6 Evaluación termodinámica de las reacciones metabólicas del catabolismo

El catabolismo tiene una gran importancia en el proceso ya que es el mecanismo que aporta energía para la producción del compuesto de interés, además de permitir la producción de biomasa y su mantenimiento. En este proceso la energía se está obteniendo de compuestos inorgánicos que presentan una dificultad mayor para la bioconversión que los compuestos orgánicos usados tradicionalmente en las fermentaciones. Debido a que el microorganismo usado como chasis no es naturalmente autótrofo, su sistema metabólico no está diseñado para llevar a cabo la fijación del gas, por este motivo se decidió evaluar la viabilidad de las reacciones involucradas en la fijación del gas y producción de etileno.

Se evaluó la viabilidad de las reacciones metabólicas involucradas en el catabolismo, debido a que su implementación fue la mayor modificación del modelo metabólico a escala genómica. Las demás reacciones pueden llevarse a cabo sin problema en *E. coli* debido a la presencia de enzimas y se tiene evidencia experimental. La energía libre de Gibbs de las reacciones se muestra en la Tabla 4-25. Tanto bajo condiciones estándares como para condiciones celulares.

Para aquellas reacciones donde no fue posible conocer las energías de formación de todos los metabolitos involucrados, la evaluación de la energía libre Gibbs se realizó mediante el análisis de *lump reactions*, es decir, teniendo en cuenta varias reacciones en

conjunto. Tal fue el caso de las reacciones METR, CODH_ACS, ACDH y NEFE, pues no se contó con la información de la energía de formación de la proteína mecfsp (*Methylcorrinoid iron sulfur protein*) y del acetileno. Como alternativa, se tomaron dos reacciones globales donde se involucran todos los pasos intermedios.

Al analizar las reacciones involucradas en el catabolismo, como se muestra en la Tabla 4-25 es posible ver que la mayoría posee una energía libre de Gibbs negativa. Después de realizar la corrección por concentración bajo condiciones celulares (1 mM), algunas energías de reacción cambian favorablemente, como en las reacciones MTHFC y ACALD. Estas presentan una energía positiva a condiciones normales, pero al corregir la concentración la energía de reacción es cercana a cero, lo que indica que está cerca al equilibrio y es posible modificar la dirección de la reacción con la relación de concentración de sustratos y productos. En el caso de la reacción FTHFLi, la energía que bajo condiciones normales de concentración estaba cerca al equilibrio, se aleja de él, al tener una energía mucho menor

Tabla 4-25. Energía libre de Gibbs de las reacciones del modelo metabólico involucradas en el catabolismo, bajo condiciones celulares a 1 M ($\Delta_r G'^{\circ}$) y 1mM ($\Delta_r G'^m$).

	Reacción	$\Delta_r G'^{\circ}$	$\Delta_r G'^m$	$\Delta_r G'^m$ * flux $\left[\frac{Kj}{Cmol - x h} \right]$
FDH	nadh + co2 <=> nad +for	13.1	13.1	-10.811
FTHFLi	for + atp + thf <=> pi + adp + 10fthf	-4.8	-13.72	-18.433
MTHFC	10fthf + 2 h <=> methf + h2o	15.1	-2.01	1.603
MTHFD_1	methf + nadph <=> nadp + mlthf + h	-18.8	-18.78	14.973
MTHFR2_1	mlthf + nadh + h <=> 5mthf + nad	-37.8	-37.8	-30.263
METR	5mthf + cfesp + h -> thf + mecfsp mecfsp + co + coa -> accoa + h +	---	---	
CODH_ACS	cfesp	---	---	
Lump 1	5mthf + co + coa -> thf + accoa	-54.8	-37.8	-30.248
	co + fdxo_42 + h2o <=> co2 + 2 h +			
CODH4	fdxr_42	-71.3	-54.2	-43.371

Continuación Tabla 4-25

	accoa + h + nadh \rightleftharpoons acald + coa +			
ACALD	nad	17	-0.2	-0.153
ACDH	acald \rightleftharpoons h2o + ethy	---	---	
	ethy + fdxr_42 + h + atp + h2o \rightleftharpoons			
NEFE	ethe + fdxo_42 + adp + pi	---	---	
	acald + fdxr_42 + h + atp \rightleftharpoons ethe			
Lump 2	+ fdxo_42 + adp + pi	-1	-18.11	-13.790
FO	2 h2 + 2 fdxo_42 \rightleftharpoons 2 fdxr_42 + 4 h	-120	-85.78	-205.19
	3 h + nad + fdxr_42 \rightleftharpoons nadh + 2			
R09508	h[e] + fdxo_42	25.5	25.5	-82.176
Nfn	nadh + nadp \rightleftharpoons nadph + nad	0.9		
TOTAL		-	-	-417.86

Para el proceso, la reacción limitante es la fijación de dióxido de carbono. La energía de esta reacción es positiva. Además, al corregir la concentración no hay cambio en la energía libre de Gibbs. El CO₂ está pasando de una forma inorgánica a una forma orgánica, como lo es el formato, como se mencionó anteriormente, debido a que el dióxido de carbono debe reducirse, necesita ganar electrones, que en este caso provienen del NADH. Esto implica gasto energético. Para que la reacción pueda correr en la dirección deseada, es decir que el CO₂ sea un sustrato y genere formato como producto, es necesario que la relación entre la concentración del formato y la del dióxido sea de 1e-6, teniendo en cuenta que la relación NADH/NAD en *E. coli* es de 75 aproximadamente, como lo reporta Taymaz (2010). Bajo estas condiciones es posible obtener una energía libre de Gibbs de -10 kJ/mol, alejada del equilibrio.

La relación entre el producto y sustrato de la reacción FDH, indica que debe haber una cantidad de formato muy baja. En este caso, como se muestra en la Tabla 4-25, la reacción que consume este compuesto, FTHFLi, tiene una energía libre de Gibbs negativa, por lo que fácilmente procede siempre y cuando haya sustrato. Además, se debe tener en cuenta que el CO es un gas que se difunde fácilmente a través de la membrana celular por su tamaño, además de ser una molécula sin carga. De este modo, si se logra una buena transferencia de masa y hay un suministro constante del gas, la concentración

del sustrato será mayor que la del formato, ya que la reacción de formación de dióxido a partir de monóxido es altamente exergónica y se puede dar con facilidad. Se tendría una respuesta similar si se alimentara dióxido de carbono como sustrato.

Otra reacción que presenta una alta energía libre de Gibbs de reacción es la R09508, lo que indica que la transferencia de electrones se ve favorecida desde el NADH hacia la ferredoxina oxidada. Para que se de en sentido contrario la concentración de NADH debe ser baja. Sin embargo, esta molécula es muy conservada en los sistemas celulares ya que es responsable de mantener el grado de reducción. A pesar de esto, si la concentración de la ferredoxina oxidada respecto a la concentración de su forma reducida es $4e-5$, la reacción se puede dar en el sentido deseado. Para esta reacción lo importante es mantener los electrones en una forma que puedan ser usados por otras reacciones, por lo que, al ser consumidos, los metabolitos cambian su estado de oxidación y es necesario regenerarlos de nuevo.

De acuerdo a los flujos de las reacciones en el caso 1, la sumatoria total de la ruta metabólica construida para el catabolismo es negativa, $-417.86 \frac{Kj}{Cmol-xh}$, que puede ser usada por las demás reacciones anabólicas. A pesar de que hay un cuello de botella en la reacción de fijación de carbono inorgánico, si se logra tener una concentración baja de formato intracelular, la ruta puede llevarse a cabo. Además, al acoplar la reacción R09508 con las demás, la producción de energía neta es negativa, por lo que es posible llevarse a cabo en el microorganismo chasis. Aclarando que no se han tenido en cuenta regulaciones de tipo transcripcional o enzimático que puedan afectar el comportamiento celular.

4.7 Optimización de la composición de syngas

4.7.1 Análisis de diferentes composiciones

Como se observó en la discusión de los 5 escenarios para la biosíntesis de etileno, la composición del syngas varía de acuerdo al proceso de gasificación, a la biomasa utilizada, a la tecnología usada y a las condiciones del proceso. Por esta razón se hace necesario evaluar nuevos y diferentes escenarios con el fin de predecir el comportamiento del microorganismo frente a diferentes composiciones del syngas con el fin de establecer las condiciones ideales para desarrollar el proceso de una manera factible técnicamente. Para hacer esta evaluación se asume un gas cuya composición consta de monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno en su totalidad. De esta manera se varió la cantidad de cada uno, asegurando que siempre la suma de estos tres fuese 100%.

Para llevar a cabo el FBA en cada uno de los casos, se fijó la velocidad de crecimiento en 0.1 h^{-1} y la función objetivo fue la maximización de la producción de etileno, al igual que en el análisis de consistencia entre el *black box* y el modelo metabólico. Sin embargo, para los sustratos (H_2 , CO y CO_2), no se fijó el *flux*, únicamente se estableció un límite inferior de acuerdo a la concentración de cada gas. Esto hace posible, que se consuma menos gas del suministrado, es decir, en algunos casos, no se consumirá la totalidad del gas alimentado. Esto es evidente por la relación estequiométrica entre los sustratos, en algunos escenarios donde la composición del gas no esté balanceada, habrá reactivos límites. Fijar el flujo impediría la solución del sistema, mientras que imponer únicamente el límite inferior, permite tener una mayor flexibilidad, además de mostrar en qué casos no es posible consumir todo el gas suministrado.

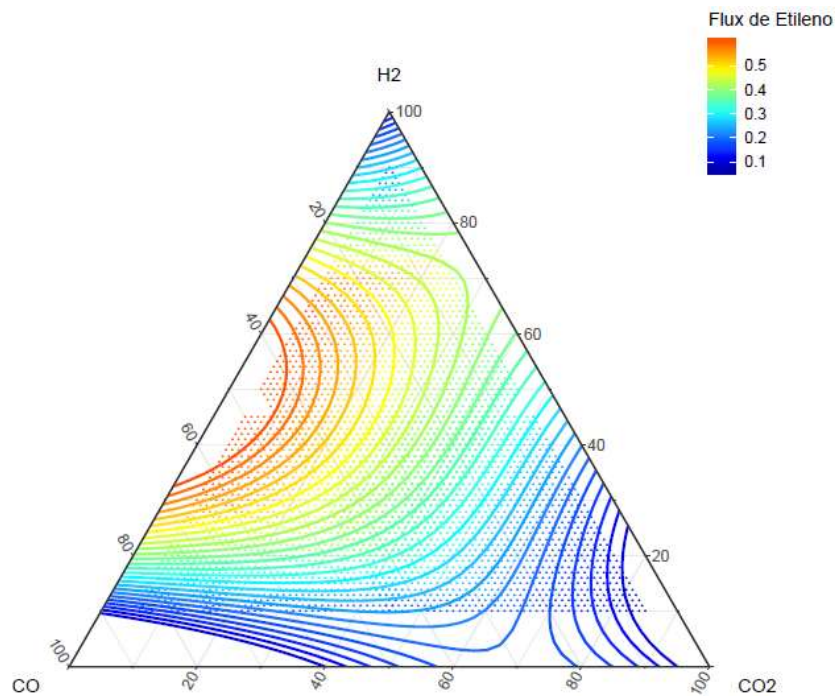
La composición del monóxido de carbono se varió entre 0% y 90%, al igual que el dióxido de carbono, el hidrógeno por su parte se varió entre 2% y 95%. En todos los casos se impuso la restricción de que la cantidad de gas fuese 100% usando siempre un mismo flujo molar de syngas para la simulación. La variación en la producción de etileno se muestra en la

Figura 4-6 construidas con el paquete de R *ggtern: Ternary Diagrams Using ggplot2*. (Hamilton & Ferry, 2018)

En el caso del monóxido de carbono, se observa que al aumentar su concentración se aumenta la producción de etileno. No obstante, en los casos extremos donde la concentración del monóxido es muy alta, o muy baja, el etileno producido se disminuye,

esto debido al desbalance que se genera en la composición de hidrógeno. En el primer caso, la concentración de hidrógeno es muy baja, en el segundo, es muy alta. Lo que genera que haya reactivo en exceso, bien sea hidrógeno o monóxido de carbono. El comportamiento del hidrógeno es similar al del monóxido de carbono. Al aumentar en el gas la cantidad de hidrógeno aumenta la producción de etileno, pero en los casos extremos, la producción disminuye.

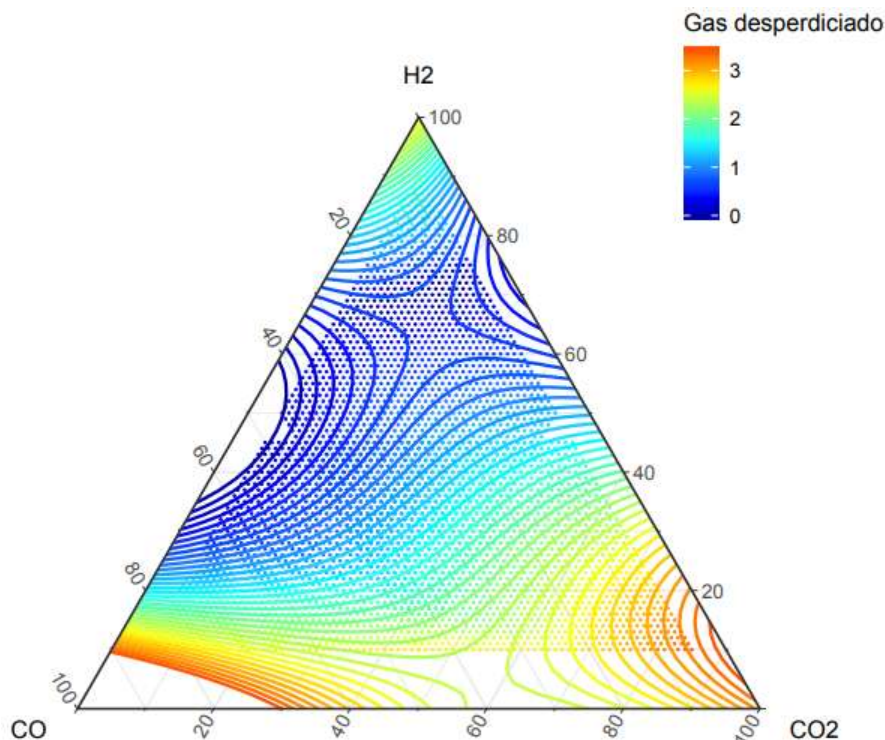
Figura 4-6. Producción de etileno para diferentes composiciones de syngas [mol etileno/C-molX h]



En la **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.** se muestra la cantidad de gas desperdiciado, de acuerdo a la composición del syngas. Esto hace referencia al gas en exceso que no se consume para producción de etileno. Debido a que el sistema se restringió únicamente en el límite inferior, es posible que no se consuma la totalidad del gas. Al comparar este gráfico de desperdicio de gas, con el de producción de etileno, es posible observar que en las zonas donde se obtiene una mayor producción de etileno, el syngas que no se usa tiende a cero. Sin embargo, se puede ver que cuando no hay monóxido de carbono como sustrato, a pesar de que se usa todo el gas, el rendimiento

es bajo. Esto gracias a que parte de los electrones del hidrógeno se usan para activar el dióxido de carbono como fuente de carbono.

Figura 4-7. Cantidad de gas desperdiciado para las diferentes composiciones de syngas [mol gas/C-molX h].



De los dos gráficos se puede concluir que el escenario ideal para la producción de etileno es cuando se tienen cantidades similares de hidrógeno y monóxido de carbono. A pesar de que el dióxido de carbono es un sustrato útil, al disminuir su concentración se favorece la producción de etileno. Sin embargo, debido a que los gases de síntesis varían fuertemente su composición, es posible hacer uso de ambas fuentes de carbono, con diferente rendimiento dependiendo de la relación molar de los sustratos.

4.7.2 Optimización de la composición del syngas

Para optimizar la composición del syngas se construyó un modelo lineal de segundo orden, donde la producción de etileno depende únicamente de la concentración porcentual del hidrógeno y monóxido de carbono. El tercer compuesto, dióxido de carbono no se usó como variable en el modelo, pues el sistema planteado es ternario y la concentración del tercer compuesto depende de la composición de los otros dos gases. El modelo ajustado mediante mínimos cuadrados se muestra a continuación, su R-cuadrado ajustado es de 92.5%.

$$\hat{y} = 0.328 + 0.538x_{CO} - 0.050x_{CO}^2 + 0.663x_{H_2} + 1.731x_{CO}x_{H_2} - 0.441x_{H_2}^2 \quad (4.5)$$

Para realizar la optimización se aplicó el método de multiplicadores de Lagrange, donde se estableció como restricción que el contenido de dióxido de carbono fuese cero. Esto con base en los resultados exploratorios obtenidos en las Figuras 4-6 y 4-7. La restricción se muestra en la ecuación 4.6

$$x_{CO} + x_{H_2} = 1. \quad (4.6)$$

Aplicando el método de multiplicadores de Lagrange, el problema de optimización se puede expresar así:

$$F_{Ob}(x_{CO}, x_{H_2}) = f(x_{CO}, x_{H_2}) - \lambda g(x_{CO}, x_{H_2}), \quad (4.7)$$

Donde $f(x_{CO}, x_{H_2}) = \hat{y}$ es el modelo ajustado) y $g(x_{CO}, x_{H_2}) = x_{CO} + x_{H_2} - 1$ procede de la restricción (4.6). Para el punto crítico, se debe resolver el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\frac{\partial F_{Ob}}{\partial \mathbf{x}} = 0 \quad (4.8)$$

Resolviendo las derivadas respectivas, el sistema de ecuaciones se puede expresar de la siguiente manera:

$$\frac{\partial F_{Ob}}{\partial x_{CO}} = 0.538 - 0.1x_{CO} + 1.731x_{H_2} - \lambda = 0, \quad (4.9)$$

$$\frac{\partial F_{Ob}}{\partial x_{H_2}} = 0.663 + 1.731x_{CO} - 0.882x_{H_2} - \lambda = 0, \quad (4.10)$$

$$x_{CO} + x_{H_2} - 1 = 0 \quad (4.11)$$

Finalmente, la concentración en porcentaje molar obtenida para las dos variables de interés es:

$$x_{CO} = 0.5598$$

$$x_{H_2} = 0.4401$$

Para hacer este análisis de FBA se usó el mismo *flux* total de gas que en el escenario evaluado para verificar el *black box* mostrado en la Tabla 4-17. Bajo estas restricciones se obtiene la siguiente distribución de flujos extracelulares:

Black box para la máxima producción de etileno

$$\begin{aligned} & -2.394 CO - 1.883 H_2 - 0.0253 NH_4^+ - 0.000674 SO_4^{-2} - 0.000658 HPO_4^{-2} \\ & + 0.1 CH_{1.686}O_{0.346}N_{0.253}S_{0.00674}P_{0.00658} + 0.0226 H^+ + 0.4842 H_2O \\ & + 0.677 C_2H_4 + 0.9404 CO_2 \end{aligned}$$

En este escenario se observa una mayor producción de etileno si se compara con el escenario donde la relación entre hidrógeno y monóxido de carbono es 1:2. Sin embargo, esta producción es igual al caso 1 donde relación entre hidrógeno y monóxido de carbono es 2:1. Debido a que se usó la misma cantidad de syngas, el rendimiento es el mismo en ambos casos. Como se observa en las gráficas del *ternplot*, hay diferentes distribuciones de concentración del syngas que generan la misma cantidad de etileno. Esto indica que no es necesario tener procesos adicionales de enriquecimiento del gas para obtener mayor producción de etileno, además, los subproductos como agua o dióxido de carbono disminuyen notablemente.

Este comportamiento se debe al contenido de electrones del hidrógeno y el monóxido de carbono dado que poseen la misma cantidad de electrones. Es posible tener diferentes distribuciones de consumo de estos gases para las reacciones, en el caso donde se use

mayor cantidad de monóxido, el exceso de carbono sale en forma de dióxido de carbono u otro subproducto que contenga los carbonos en exceso. Para el caso del hidrógeno, si este se usa en mayor proporción, el exceso de átomos de hidrógeno saldrá en forma de agua. Lo que no ocurre si se usa dióxido de carbono, puesto que la única fuente de electrones es el hidrógeno en este caso, no se da tal flexibilidad.

El proceso de optimización dio como resultado un punto, sin embargo, como se observa en la Figura 4-6, el mayor rendimiento se obtiene en una región, por lo que no se generó un máximo global, sino un máximo local. Como se explica anteriormente, de acuerdo a la relación entre el monóxido y el hidrógeno se genera más agua o dióxido de carbono como subproducto. Contrario a lo que pasa en los bioprocesos normalmente, que se busca maximizar el rendimiento de la fuente de carbono, se debe tener en cuenta que en este caso el hidrógeno es una fuente importante de electrones, por lo que optimizar el consumo de monóxido no tiene prioridad sobre el consumo de hidrógeno.

Con base la información obtenida, es posible decir que no es necesario tener una relación 2:1 de hidrógeno y de monóxido de carbono como se estipula en los procesos como Fischer-Tropsch. Lo que otorga a los bioprocesos una mayor flexibilidad y una ventaja frente a los procesos termoquímicos, ya que se pueden usar gases con diferente composición y obtener el producto de interés.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El proceso de producción de etileno a partir de syngas es termodinámicamente factible. Este gas representa además de una fuente de carbono, una fuente de electrones que puede ser usada tanto en la formación de biomasa, como en la formación del producto de interés. Además, la reacción de formación de etileno bien sea a partir de monóxido de carbono o dióxido de carbono, libera energía útil para el anabolismo y mantenimiento celular.

A pesar de que la reacción catabólica de formación de etileno es exergónica y libera energía, esta es baja si se compara con los requerimientos para la síntesis de biomasa, por lo que es necesario consumir una cantidad alta de sustrato para cumplir no solo con la demanda de carbono, sino de energía para llevar a cabo las reacciones de polimerización de los macrocomponentes celulares.

Las dos principales fuentes de carbono estudiadas, CO y CO₂, pueden servir como sustrato para el proceso. Sin embargo, cuando se usa monóxido de carbono es posible usar menor cantidad de syngas para la formación de la misma cantidad de biomasa, ya que el uso del dióxido tiene mayores requerimientos energéticos por su naturaleza inorgánica y grado de reducción.

Para que el etileno tenga un precio competitivo en el mercado y su bioproducción a partir de syngas sea económicamente viable, es necesario mejorar la tecnología de gasificación, debido a que el costo de producción del syngas y su composición tienen una gran influencia en el costo del etileno.

El syngas usado para la bioproducción de etileno debe tener un costo igual o menor a 0.09 USD/kg, además, debe contener por lo menos 50% de gas útil (CO, H₂). En este caso, el precio del etileno sería competitivo en el mercado, si se cumple con los demás requerimientos donde se garantice que en el reactor la transferencia de masa no sea

limitante garantizando que todos los sustratos se transfieren de manera similar permitiendo proveer una relación molar deseada entre ellos con el fin de obtener los rendimientos estimados metabólicamente.

No todos los genes que codifican para las enzimas catalizadoras de las nuevas reacciones implementadas en el modelo pueden ser expresadas en la bacteria *E. coli*. Para cumplir con los requerimientos del proceso desde el punto de vista metabólico es necesario modificar el microorganismo chasis e implementar 5 nuevos genes. Las enzimas codificadas por estos genes catalizan reacciones de la ruta de Wood-Ljungdahl, para fijar el syngas, así como reacciones para la producir etileno y complejos enzimáticos que le den la capacidad al microorganismo de usar los electrones presentes en el hidrógeno y ponerlos en formas que la célula pueda asimilar como NADH o ferredoxina y de esta manera pueda utilizados como energía biológica para realizar las transformaciones deseadas.

El modelo metabólico se encuentra balanceado en cuanto a materia, carga y estado de reducción, además concuerda con los resultados obtenidos en el modelo de *black box*. Los resultados del análisis de flujo FBA, presentan desviaciones mínimas, con errores cuadráticos medios del orden de $1e-8$, debido principalmente al proceso truncamiento de cifras decimales.

Mediante la evaluación de diferentes escenarios de composición del syngas se encontró que la más alta producción de etileno se logra cuando la única fuente de carbono es monóxido, además la relación entre la concentración de hidrógeno y monóxido de carbono es cercana a uno. En este caso se logra no solo un alto rendimiento, sino un mejor aprovechamiento del sustrato. A diferencia de lo obtenido en el *black box*, donde el mejor rendimiento se obtenía con la relación $H_2:CO$, 2:1. La cual es usada también en la industria química en procesos como Fischer-Tropsch

El rendimiento del caso óptimo se puede igualar con diferentes composiciones de H_2 y CO . Además, el dióxido de carbono también puede ser usado con este fin, aunque su rendimiento sea menor. Esto confiere una mayor flexibilidad a los procesos biológicos y otorga ventajas, pues además de ser un proceso altamente específico, tiene menores requerimientos técnicos del sustrato. A diferencia de los procesos termoquímicos que se ven altamente afectados por la composición del sustrato.

El syngas obtenido mediante la gasificación de biomásas colombianas presenta altas concentraciones de gas útil como sustrato. Por lo que podría ser usado para la bioproducción de etileno, si el costo de su producción es aproximadamente de 0.09

USD/kg. Además, hay diferentes tipos de residuos que pueden ser usados como biomasa en la gasificación, entre estos encontramos residuos de flores, bagazo de caña de azúcar o cascarilla de arroz.

A pesar de que fue necesario implementar nuevas reacciones de transporte en el modelo, estas no implican expresión de proteínas de transporte, ya que se trata de gases de tamaño pequeño que pasan a través de mecanismos de difusión a través de la membrana. Para que el modelo metabólico planteado funcione adecuadamente, es necesario que se cumplan algunos requerimientos termodinámicos, especialmente que las concentraciones de algunos metabolitos sean bajas, con el fin de que las reacciones planteadas se den en la dirección adecuada y el flujo de carbono se dirija a la formación de productos como biomasa o etileno.

Si bien para este trabajo se asumió que aspectos como la transferencia de masa no son limitantes para el proceso, este es un factor fundamental en el estudio de sistemas donde el sustrato se encuentra en fase gaseosa. En el grupo Bioprocess Intensification and Rational Design – BIRD, Sebastián Moreno en su tesis de pregrado desarrolló el diseño del reactor para llevar a cabo el proceso de biotransformación de syngas en etileno. En este se encontró que el reactor en forma de panal de abeja permite una transferencia adecuada del sustrato por su amplia área de superficie, además, la concentración de cada sustrato en el gas alimentado no es un impedimento, ya que se puede regular con filtros antes de su entrada al reactor. Con estos resultados preliminares es posible decir que la transferencia de masa con un diseño adecuado del reactor no sería una limitante para el proceso.

Con este trabajo fue posible cumplir los objetivos planteados. Se obtuvo un modelo metabólico coherente con el modelo *black box* planteado. Esto permitió plantear modificaciones genéticas *in silico* para obtener un microorganismo chasis con la maquinaria metabólica para llevar a cabo el proceso de transformación de syngas en etileno. Además, se evaluaron diferentes gases de síntesis producidos a partir de biomasa colombiana que generan rendimientos altos, además de tener altos contenidos de gas útil, lo que indica que podrían ser usados para el proceso si su costo de producción es asequible.

Para conseguir estos resultados la mayor dificultad se presentó en el tipo de sustrato usado, pues a diferencia de los procesos tradicionales, la fuente de electrones no es necesariamente la fuente de carbono. Esto generó dificultades en la solución matemática

debido a la presencia de dependencias lineales, lo que implicó la modificación de la metodología usada. Además de representar un reto en cuanto a las modificaciones metabólicas del microorganismo chasis ya que se tuvo que implementar reacciones que permitiesen el aprovechamiento de electrones presentes en el hidrógeno además de las de fijación del carbono.

Con este trabajo fue posible determinar que la hipótesis planteada inicialmente no contenía las condiciones suficientes para resolver el problema de investigación. Si bien es cierto que implementar las reacciones de la ruta de Wood-Ljungdahl permite fijar el syngas, la enzima formadora de etileno solo permite generar etileno bajo condiciones aerobias, además es necesario tener en cuenta los requerimientos energéticos celulares, por lo que a nivel metabólico son necesarios complejos enzimáticos que permitan el aprovechamiento de los electrones provenientes del hidrógeno, especialmente si se usa dióxido de carbono como sustrato.

5.2 Recomendaciones

En este trabajo se usó un enfoque de diseño racional de bioprocesos, donde se planteó un producto objetivo y se construyó una plataforma biosintética para cumplir con los requerimientos establecidos. Sería igualmente interesante explorar la diversidad del modelo para la producción de otros metabolitos bajo diferentes escenarios. Al igual que la implementación de combinación de funciones objetivo, con el fin de ver su influencia sobre el producto de interés.

Es posible explorar otros microorganismos hospederos ya que, en este caso, a pesar de que el modelo metabólico indica que las reacciones son posibles a nivel estequiométrico, no hay certeza de que enzimas pertenecientes a microorganismos autótrofos se implementen con facilidad en microorganismos heterótrofos. Para esto se sugiere el uso de modelos cinéticos que tienen en cuenta la afinidad de la enzima y posibles efectos regulatorios, con el fin de comparar ambos casos. Pues a pesar de que los modelos estequiométricos son simples y útiles, no brindan este tipo de información.

En este trabajo, la evaluación se centró en el diseño *in silico* del microorganismo chasis como plataforma para la bioconversión del etileno mediante modelos metabólicos. Para

hacer el diseño completo del proceso, es necesario tener un enfoque más holístico, que reúna tanto el análisis metabólico, como el diseño de las diferentes etapas del proceso, además de un análisis económico más amplio. Esto con el fin de ver posibles limitaciones desde otras perspectivas.

La biomasa de residuos agroindustriales generada en Colombia tiene un potencial grande, pues el syngas generado posee una alta concentración de gases útiles como sustrato para la producción de etileno. En este caso se debe hacer un estudio económico para determinar el costo de gasificación y verificar que además de cumplir con los requerimientos técnicos genere un proceso económicamente viable.

A partir de la información obtenida, se dedujo que el syngas es un sustrato que permite a la célula obtener energía además de carbono. Sin embargo, sería importante evaluar otros productos de mayor valor comercial, de esta manera, el costo del syngas podría ser más alto y dar mayor flexibilidad al proceso.

Algo de vital importancia si se desea implementar el proceso es la validación del modelo. Las evaluaciones realizadas en este trabajo indican cuáles reacciones se deben implementar, es decir cuáles enzimas se deben expresar en el microorganismo chasis para hacer el proceso viable metabólicamente. Sin embargo, es necesario verificar la coherencia de las predicciones y de ser necesario, reajustar el modelo a los resultados experimentales, comprobando aspectos como los supuestos planteados.

Bibliografía

- Alberty, R. A. (1998). Calculation of Standard Transformed Formation Properties of Biochemical Reactants and Standard Apparent Reduction Potentials of Half Reactions, *358*(1), 25–39.
- Atikah, A., Abdullah, N., Ha, F., & Inayat, A. (2016). Assessing the gasification performance of biomass : A review on biomass gasification process conditions , optimization and economic evaluation, *53*, 1333–1347. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.09.030>
- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., & Schleifer, K. H. (2013). *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. (S. S. & B. Media, Ed.).
- Bengelsdorf, F. R., Straub, M., & Dürre, P. (2013). Bacterial synthesis gas (syngas) fermentation. *Environmental Technology*, *34*(13–14), 1639–1651. <http://doi.org/10.1080/09593330.2013.827747>
- Bernabé, A., Gallego, A., Haro, P., & Azapagic, A. (2018). Environmental assessment of thermo-chemical processes for bio-ethylene production in comparison with biochemical and fossil-based ethylene, *202*.
- Chan, J. M., Wu, W., Dean, D. R., & Seefeldt, L. C. (2000). Construction and Characterization of a Heterodimeric Iron Protein: Defining Roles for Adenosine Triphosphate in Nitrogenase Catalysis. *Biochemistry*, *39*(24), 7221–7228. <http://doi.org/https://doi.org/10.1021/bi000219q>
- Cueto, H., Maris, A. Van, Wahl, A. S., Cueto-rojas, H. F., Maris, A. J. A. Van, Wahl, S. A., & Heijnen, J. J. (2015). factories for anaerobic product formation Thermodynamics-based design of microbial cell factories for anaerobic product formation, (JULY). <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.010>
- Dance, I. (2004). The Mechanism of Nitrogenase. Computed Details of the Site and Geometry of Binding of Alkyne and Alkene Substrates and Intermediates. *J. Am.*

- Chem. Soc.*, 126(38), 11852–11863. <http://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja0481070>
- Daniell, J., Köpke, M., & Simpson, S. D. (2012). *Commercial biomass syngas fermentation. Energies* (Vol. 5). <http://doi.org/10.3390/en5125372>
- Douglas, J. (1988). *Conceptual design of chemical processes* (McGraw-Hill). New York.
- Eckert, C., Xu, W., Xiong, W., Lynch, S., Ungerer, J., Tao, L., ... Yu, J. (2014). Ethylene-forming enzyme and bioethylene production. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 33. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-7-33>
- Escalante, H., Oduz, J., Zapata, H., Cardona, M., & Duarte, M. (2011). *Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Flamholz, A., Noor, E., Bar-even, A., & Milo, R. (2012). eQuilibrator — the biochemical thermodynamics calculator, 40(November 2011), 770–775. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr874>
- Flickinger, M. (2010). *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (John Wiley).
- Förster, A. H., & Gescher, J. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products, 2(May), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016>
- Ghanta, M., Fahey, D., & Subramaniam, B. (2013). Environmental impacts of ethylene production from diverse feedstocks and energy sources. *Applied Petrochemical Research*, 4(2), 167–179. <http://doi.org/10.1007/s13203-013-0029-7>
- Global-Platts. (2018). S&P Global Platts. Retrieved from www.spglobal.com
- Gu, Y., Lv, X., Liu, Y., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2019). Synthetic redesign of central carbon and redox metabolism for high yield production of N -acetylglucosamine in *Bacillus subtilis*, 51(September 2018), 59–69.
- Hamilton, N., & Ferry, M. (2018). ggtern: Ternary diagrams using ggplot2. *Journal of Statistical Software*, 87(1), 1–17. <http://doi.org/10.18637/jss.v087.c03>
- Haro, P., Ollero, P., & Trippe, F. (2013). Technoeconomic assessment of potential processes for bio-ethylene production. *Fuel Processing Technology*, 114, 35–48. <http://doi.org/10.1016/j.fuproc.2013.03.024>
- Heijnen, J. J., Loosdrecht, M. C. M. Van, & Tijhuis, L. (1992). A Black Box Mathematical Model to Calculate Auto- and Heterotrophic Biomass Yields Based on Gibbs Energy

Dissipation.

- Heirendt, L., Arreckx, S., Pfau, T., Mendoza, S. N., Richelle, A., Heinken, A., ... & Magnúsdóttir, S. (2017). Creation and analysis of biochemical constraint-based models: the COBRA Toolbox v3.0. *ArXiv Preprint*.
- ICIS. (2018). ICIS.com: Chemical Industry News & Chemical Market Intelligence. Retrieved from www.icis.com
- Inayat, A., Ahmad, M. M., Mutalib, M. I. A., & Yusup, S. (2010). Heat Integration Analysis of Gasification Process for Hydrogen Production from Oil Palm Empty Fruit Bunch. *Chemical Engineering*, (2009).
- Kim, H., Parajuli, P. B., Yu, F., & Columbus, E. P. (2011). Economic analysis and assessment of syngas production using a modeling approach. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2011, ASABE 2011*, 6, 2–15.
- Latif, H., Zeidan, A. A., Nielsen, A. T., & Zengler, K. (2014). Trash to treasure: Production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 79–87. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.001>
- Lv, P., Wu, C., Ma, L., & Yuan, Z. (2008). A study on the economic efficiency of hydrogen production from biomass residues in China. *Renewable Energy*, 33(8), 1874–1879. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2007.11.002>
- Lynch, S. (2014). Ethylene Production via Engineered Microbes, (August), 3. Retrieved from <http://www.isb.vt.edu/news/2014/Aug/Lynch.pdf>
- Macías, R. J., Chejne, F., Montoya, J. I., & Blanco, A. (2018). Gasificación de bagazo de caña y carbón en planta piloto. *Revista Mutis*, 4(1), 24–32. <http://doi.org/10.21789/22561498.907>
- Matsumoto, T., Tanaka, T., & Kondo, A. (2017). Bioresource Technology Engineering metabolic pathways in *Escherichia coli* for constructing a “ microbial chassis ” for biochemical production, 245, 1362–1368. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.008>
- Mohsenzadeh, A., Zamani, A., & Taherzadeh, M. J. (2017). Bioethylene Production from Ethanol: A Review and Techno-economical Evaluation. *ChemBioEng Reviews*, 4(2), 75–91. <http://doi.org/10.1002/cben.201600025>
- Pearson, W. R. (2013). An Introduction to Sequence and Series (“Homology”) Searching.

- Curr Protoc Bioinformatics*, 1(10), 1286–1292.
<http://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42.An>
- Pei, P., Korom, S. F., Ling, K., & Nasah, J. (2016). Cost comparison of syngas production from natural gas conversion and underground coal gasification. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 21(4), 629–643.
<http://doi.org/10.1007/s11027-014-9588-x>
- Pei, P., Korom, S., Ling, K., & Nasah, J. (2014). Cost comparison of syngas production from natural gas conversion and underground coal gasification, (June).
<http://doi.org/10.1007/s11027-014-9588-x>
- Pirkov, I., Albers, E., Norbeck, J., & Larsson, C. (2008). Ethylene production by metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 10(5), 276–280. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.06.006>
- Redl, S., Diender, M., Ølshøj, T., Sousa, D. Z., & Toftgaard, A. (2016). Exploiting the potential of gas fermentation. *Industrial Crops & Products*.
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.015>
- Sarmiento, A. L. E., Maya, D. M. Y., Chejne, F., & Lora, E. E. S. (2015). Gasification of Agro-Industrial Wastes for Electricity Cogeneration, V003T03A008.
<http://doi.org/10.1115/gt2015-43410>
- Schiel-Bengelsdorf, B., & Dürre, P. (2012). Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Letters*, 586(15), 2191–2198.
<http://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.043>
- Schuchmann, K., & Müller, V. (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life : a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Publishing Group*, (November).
<http://doi.org/10.1038/nrmicro3365>
- Taymaz, H. (2010). *Quantitative analysis of relationships between fluxome and metabolome in Escherichia coli*.
- Thiruvenkataswamy, P., Eljack, F. T., Roy, N., Mannan, M. S., & El-halwagi, M. M. (2016). Journal of Loss Prevention in the Process Industries Safety and techno-economic analysis of ethylene technologies. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 39, 74–84. <http://doi.org/10.1016/j.jlp.2015.11.019>
- Vélez, J. F., Chejne, F., Valdés, C. F., Emery, E. J., & Londoño, C. A. (2009). Co-gasification of Colombian coal and biomass in fluidized bed: An experimental study.

- Fuel*, 88(3), 424–430. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.10.018>
- Verma, D., Singla, A., Lal, B., & Sarma, P. M. (2016). Conversion of biomass-generated syngas into next-generation liquid transport fuels through microbial intervention: Potential and current status. *Current Science*, 110(3), 329–336.
- von Stockar, U., & van der Wielen, L. A. (2013). Biothermodynamics.
- Yao, Z., You, S., Ge, T., & Wang, C. H. (2018). Biomass gasification for syngas and biochar co-production: Energy application and economic evaluation. *Applied Energy*, 209(July 2017), 43–55. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.10.077>
- Yepes, D., & Chejne, F. (2012). Gasificación de biomasa residual en el sector floricultor : Caso Oriente antioqueño. *Revista Ion*, 25(2), 49–55.
- Zumft, W. G., Paneque, A., Aparicio, P., & Losada, M. (1969). Mechanism of nitrate reduction in *Chlorella*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 36(6), 980–986. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90300-3](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90300-3)