



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Formulación de un modelo  
metabólicamente estructurado para  
optimizar la producción de  
Polihidroxialcanoatos (PHA) a partir  
de *Burkholderia cepacia*.**

**Adriana Catalina Torres Ospina**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Programa de Doctorado en Biotecnología  
Bogotá, Colombia  
2019.



# **Formulación de un modelo metabólicamente estructurado para la producción de Polihidroxicanoatos (PHA) a partir de *Burkholderia cepacia*.**

**Adriana Catalina Torres Ospina**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctora en Biotecnología**

Director:

PhD. MSc., Ing. Químico Carlos Arturo Martínez Riascos

Línea de Investigación:

Línea de Biopolímeros y Fermentaciones

Grupo de Investigación:

Grupo de Bioprocesos y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2019.



*Para Matías.*



## Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia por acompañarme en este proceso, sin ellos nada de eso sería posible, en especial quiero dar un agradecimiento a mi esposo Daniel Espinel quien puso en pausa sus metas profesionales por darme la oportunidad de hacer mi tesis doctoral sin sacrificar mi familia y mi labor de madre que es la misión más importante que tengo. A mis padres por ser mi pilar principal, por su apoyo constante y su motivación en todo momento, ustedes me enseñaron que lo más importante en la vida es la familia, los amo.

También quisiera agradecer a mi Director y Profesor Carlos Martínez por enseñarme con paciencia y respeto en todo momento, en usted veo un gran Profesional y una excelente persona. Al instituto de Biotecnología en especial al programa del Doctorado en Biotecnología liderado por la Profesora Sonia Ospina quienes desde el primer día han sido mi familia en la Universidad, me dieron el soporte adecuado para todo este proceso, a Raquel quien está en todo momento para nosotros. Un especial agradecimiento a los laboratorios de Biopesticidas, Enzimas y Fermentaciones donde me abrieron sus puertas para trabajar por 5 años, con su ayuda logré avanzar en mi proyecto satisfactoriamente; la gratitud que siento hacia ustedes es enorme.

Al instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Departamento de Bioingeniería y Biocatálisis y al grupo de Biopolímeros, gracias infinitas por recibirme por siete meses y acogerme como una más de ustedes, Tania Castillo sin ti mi estadía no hubiera tenido los mismos resultados, me enseñaste que una madre puede ser la mejor científica sin sacrificar la familia.

Todo esto es para ti hijo mío, mi mayor logro en la vida es ser tu mamá.





## Resumen

El mejoramiento de procesos debe ser soportado en análisis cuantitativos que permitan tomar decisiones, reduciendo la incertidumbre. Los modelos matemáticos de procesos fermentativos permiten predecir su comportamiento, tanto en estado estacionario como en condiciones dinámicas, por lo que son una herramienta clave en el mejoramiento de estos procesos. El grupo de Bioprocesos de la Universidad Nacional de Colombia ha estado estudiando la producción de Polihidroxicanoatos desde el aislamiento de cepas promisorias hasta su producción en planta piloto (100 L) empleando una cepa hiperproductora de *Burkholderia cepacia* y como fuente de carbono ácidos grasos; sin embargo, se han presentado desafíos para aumentar la concentración de producto y la productividad del proceso.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo matemático que simule el crecimiento y producción de PHB en la cepa *B cepacia* B27, considerando los cambios metabólicos que ocurren entre las fases de feast & famine, y que permita la optimización del proceso. Para lograr este objetivo fue necesario: i) identificar el comportamiento de la cepa mediante fermentaciones batch, ii) caracterizar el metabolismo en varias etapas del cultivo mediante MFA lineal, iii) identificar condiciones ambientales clave que definen el cambio entre las fases feast & famine, y la activación del nuevo comportamiento metabólico, iv) ajustar modelos semi-empíricos para cada fase y, v) validar el modelo con la estrategia operacional óptima (lote alimentado).

Los resultados muestran que los flujos metabólicos experimentan cambios significativos entre las dos fases: las vías metabólicas se ajustan para dirigir el carbono, en mayor proporción, hacia el crecimiento en la fase de feast, y a la producción de PHB en la fase famine. Además, la relación C/N fue identificada como el parámetro de correlación clave para la transición entre las dos fases. Adicionalmente, para la fase famine se detectó un periodo de adaptación, este periodo es el tiempo que requiere el ajuste de la maquinaria metabólica para el nuevo objetivo. El lote alimentado para optimizar el proceso emplea pulsos para la adición de las fuentes de carbono y nitrógeno, por separado. La alimentación permite extender la fase feast y obtener mayores concentraciones de biomasa, lo que genera mayores concentraciones de PHB al final del proceso.

**Palabras clave:** *Burkholderia cepacia*, Polihidroxicanoatos, PHB, MFA lineal, transición feast-famine, periodo de adaptación.

## Abstract

Process improvement must be supported in quantitative analyzes that allow decisions making with reduced uncertainty. Mathematical models of fermentative processes allow to predict their behavior, both in steady state and in dynamic conditions, so they are a key tool in the improvement of these processes. The Bioprocess group of Universidad Nacional de Colombia has been studying the production of Polyhydroxyalkanoates from the isolation of promising strains to its production in a pilot plant (100 L) using a hyper-producing strain of *Burkholderia cepacia* and fatty acid as carbon source carbon; however, there are challenges for increasing product concentration and process productivity.

The objective of this work is to develop a mathematical model that simulates the growth and production of PHB in *B. cepacia* B27, considering metabolic changes that occur between the phases of feast & famine, and that allows the process optimization. To achieve this objective, it was necessary: i) to identify the behavior of the strain by batch fermentation, ii) to characterize the metabolism at several culture stages by linear MFA, iii) to identify key environmental conditions that define the change between the F&F phases and the activation of a new metabolic behavior, iv) adjust semi-empirical models for each phase and, v) validate the model with the optimal operational strategy (fed batch).

Results show that metabolic fluxes undergo significant changes between the two phases: metabolic pathways are adjusted to lead carbon, in a greater extent, towards growth in feast phase, and towards PHB production in famine phase. In addition, the C/N ratio was identified as the key correlation parameter for the transition between the two phases. Additionally, for the famine phase an adaptation period was detected, this period is the time required to adjust the metabolic machinery for the new objective. Fed batch for optimal operation employs pulses for adding carbon and nitrogen sources, separately. The feed allows to extend the feast phase and obtain higher biomass concentrations, which generates higher concentrations of PHB at the end of the process.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia*, Polyhydroxyalkanoates, PHB, linear MFA, feast-famine transition, adaptation period.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Tablas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Gráficas .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Símbolos y Abreviaturas.....</b>	<b>xv</b>
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Producción de Polihidroxialcanoatos .....	3
1.2 Proteínas asociadas con las inclusiones de PHA (GAP):.....	3
1.3 Estimulación de producción de PHA.....	5
1.4 Síntesis de PHA a partir de carbohidratos .....	6
1.5 Uso de sustratos de bajo costo.....	8
1.5.1 Aceites vegetales y ácidos grasos.....	8
1.6 Antecedentes del grupo de investigación.....	9
1.6.1 <i>Burkholderia cepacia</i> B27. ....	10
1.6.2 Herramientas computacionales para el mejoramiento de bioprocesos	12
1.7 Planteamiento del problema .....	13
1.8 Hipótesis.....	14
1.9 Objetivos.....	15
<b>Capítulo 2. Identificación de las variables metabólicas que permiten caracterizar el proceso de producción de PHA. ....</b>	<b>17</b>
2.1 Antecedentes.....	18
2.1.1 Modelamiento basado en medición de metabolitos .....	18
2.1.2 Análisis de flujo metabólico .....	19
2.2 Metodología.....	21
2.2.1 Generación de la red metabólica.....	22
2.2.2 Caracterización del comportamiento de la cepa.....	22
2.2.3 Preselección de los metabolitos clave y medición de su concentración.....	24
2.2.4 Análisis de correlación .....	25
2.3 Resultados y análisis .....	26
2.3.1 Identificación de vías asociadas a crecimiento y producción de PHB. .	26
2.3.2 Construcción de la matriz estequiométrica .....	29
2.3.3 Caracterización del comportamiento de la cepa .....	33
2.3.4 Estimación de parámetros de correlación.....	37

2.4	Conclusiones.....	45
<b>Capítulo 3. Formulación del modelo matemático.....</b>		<b>47</b>
3.1	Antecedentes .....	48
3.1.1	Modelos estructurados.....	48
3.1.2	Modelamiento dinámico del proceso en abundancia y hambruna (feast & famine). .....	49
3.2	Metodología .....	50
3.2.1	Definición de la estructura del modelo. ....	50
3.2.2	Ajuste de los parámetros del modelo. ....	51
3.2.3	Experimentos para ajuste del modelo. ....	53
3.3	Resultados y análisis.....	55
3.3.1	Modelo Inicial.....	55
3.3.2	Análisis del comportamiento de la cepa. ....	59
3.3.3	Ajuste del modelo final.....	66
3.4	Conclusiones.....	73
<b>Capítulo 4. Optimización del proceso de producción de PHA. ....</b>		<b>75</b>
4.1	Antecedentes .....	77
4.1.1	Consideraciones del régimen operacional de la fermentación .....	77
4.1.2	Cultivo por lotes.....	78
4.1.3	Cultivo continuo .....	78
4.1.4	Cultivo por lote alimentado.....	79
4.1.5	Selección del régimen operacional. ....	79
4.2	Metodología .....	80
4.2.1	Optimización con programación matemática .....	80
4.2.2	Validación de la optimización.....	82
4.3	Resultados y análisis.....	83
4.3.1	Optimización por programación matemática. ....	83
4.3.2	Validación de la optimización con datos experimentales.....	84
4.3.3	Análisis de Flujos Metabólicos para la optimización.....	86
4.4	Conclusiones.....	89
<b>Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones. ....</b>		<b>91</b>
5.1	Conclusiones.....	91
5.3.	Recomendaciones.....	93
<b>Anexos .....</b>		<b>95</b>
	Anexo 1. Matriz estequiométrica y balance macromolecular.....	95
	Anexo 2. Comandos Matlab para AFM linear.....	100
	Anexo 3. Matrices RGA.....	101
	Anexo 4. Protocolos.....	103
	Anexo 5. Comandos Matlab para Modelo Feast & Famine y Optimización. ....	120
5.1	Modelo Feast & Famine.....	120
5.2	Optimización del proceso.....	123
<b>Bibliografía .....</b>		<b>126</b>

# Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Antecedentes del Grupo de Bioprocesos y Bioprospección del IBUN.</i> .....	9
<i>Tabla 2. Resumen de las fermentaciones para la cepa B27.</i> .....	11
<i>Tabla 3. Composición de la Biomasa a partir de balances macromoleculares basados en la composición molar teórica de aminoácidos de la cepa parental B. cenocepacia J2315.</i> .....	29
<i>Tabla 4. Reacciones en la red metabólica para crecimiento y producción de PHB en B. cepacia.</i> .....	30
<i>Tabla 5. Periodos e instante característico para cada fase del metabolismo.</i> .....	33
<i>Tabla 6. Variables <math>U_i</math> en los diferentes instantes, concentración de metabolitos intracelulares en <math>\mu\text{mol/mL}</math>.</i> .....	38
<i>Tabla 7. Variables de respuesta, <math>Y_i</math>, tasas específicas medidas (<math>\text{mmol/gr biomasa seca h}</math>), flujos intracelulares (<math>\text{mmol/gr biomasa seca h}</math>).</i> .....	39
<i>Tabla 8. Resultados del análisis por el método RGA.</i> .....	43
<i>Tabla 9. Valores de parámetros para el modelo Feast &amp; Famine sin inhibición de fuente de Nitrógeno.</i> .....	69
<i>Tabla 10. Valores para los parámetros estimados.</i> .....	72
<i>Tabla 11. Coeficientes de correlación del modelo para el ajuste de las velocidades.</i> .....	72
<i>Tabla 12. Tabla modelo de producción de biomasa, producto y consumo de sustrato para cultivos lote y continuo.</i> .....	80
<i>Tabla 13. Régimen de alimentación de fuentes de carbono y nitrógeno.</i> .....	83

## Lista de Gráficas

Gráfica 1. Estructura general de los PHA.....	2
Gráfica 2. Proteínas asociadas con las inclusiones de PHB.....	5
Gráfica 3. Secuencia de reacciones para síntesis del polímero a partir de acetyl-CoA. ....	6
Gráfica 4. Vías metabólicas en <i>B. cepacia</i> para la producción de PHB y crecimiento. ....	27
Gráfica 5. Flujos metabólicos estimados en los cuatro instantes de la fermentación.....	35
Gráfica 6. Tendencias para los flujos calculados (agrupados por vías metabólicas). ....	36
Gráfica 7. Tasas específicas para crecimiento, producción de PHB, consumo de sustrato y consumo de amonio.....	38
Gráfica 8. Análisis de correlación entre las variables controladas y controlantes.....	41
Gráfica 9. Fases de crecimiento para <i>Burkholderia cepacia</i> B27.....	56
Gráfica 10. Perfil del crecimiento y producción de PHB en <i>B. cepacia</i> B27 empleando aceite vegetal.....	57
Gráfica 11. Ajuste del primer modelo planteado.....	58
Gráfica 12. Cultivo de <i>B. cepacia</i> B27 en biorreactor BioStat A con volumen de trabajo de 1.5 L, 20 g/L ácido oleico. ....	60
Gráfica 13. Perfiles de biomasa total, producto y biomasa residual para <i>B. cepacia</i> B27 en bioreactor Applikon con volumen de trabajo de 2 L, 20 g/L ácido oleico.....	62
Gráfica 14. Medición de proteína, Amonio residual y Oxígeno disuelto para los cultivos de <i>B. cepacia</i> B27 en biorreactor Applikon.....	63
Gráfica 15. Concentración de ácidos orgánicos para <i>B. cepacia</i> B27 en biorreactor Applikon con volumen de trabajo de 2 L, 20 g/L ácido oleico. ....	64
Gráfica 16. Ajuste segundo modelo planteado.....	67
Gráfica 17. Ajuste tercer modelo planteado .....	68
Gráfica 18. Ajuste del modelo Feast & Famine Final, para <i>B. cepacia</i> B27.....	71
Gráfica 19. Optimización del proceso para <i>Burkholderia cepacia</i> B27. ....	85
Gráfica 20. Análisis de Flujos Metabólicos (MFA) de la optimización del proceso.....	87

## Lista de Símbolos y Abreviaturas

### Símbolos

$S$	matriz estequiométrica
$\bar{v}$	vector de flujos metabólicos desconocidos
$\bar{r}$	vector de los flujos extracelulares medibles
$X_{met}$	vector de concentraciones de los metabolitos intracelulares
$\bar{r}_{met}$	vector que contiene las tasas netas de formación de los metabolitos intracelulares.
$X$	concentración de biomasa residual
$P$	concentración de PHA
$S_C$	concentración fuente de carbono
$y_{CO_2}$	medición de la concentración de $CO_2$ en el gas de salida
$v_{aire}$	flujo volumétrico de aire
$V_{aire}$	volumen molar del aire a las condiciones ambientales
$U_i$	variables controlantes
$Y_i$	variables controladas
$\partial Y_i, \partial U_i$	derivada variables controlantes y controladas
$\mu_{xmax}, \mu_{xmax2}$	velocidades máximas de crecimiento para las feast y famine
$K_{Scx}, K_{Scx2}$	constantes de afinidad para el ácido oleico (fuente de carbono) en el crecimiento celular
$K_{Snx},$	constante de afinidad para el sulfato de amonio en el crecimiento
$\mu_{pmax}, \mu_{pmax2}$	velocidades máximas de producción
$K_{Scp2}, K_{Scp}$	constantes de afinidad para el ácido oleico en la producción de PHB

$Y_{x/s}$	rendimiento global para el crecimiento celular a partir del sustrato consumido
$Y_{p/s}$	rendimiento de producción de PHB a partir del sustrato consumido
$Y_{x/sn}$	rendimiento de crecimiento celular a partir de la fuente de nitrógeno consumida
$m_n$	concentración de fuente de nitrógeno que se estima para el mantenimiento celular.

## Abreviaturas

- *PHA*: Polihidroxicanoatos
- *PHB*: Polihidroxibutirato
- *PHV*: Polihidroxivalerato
- *3HHX*: 3-hidroxihexanoato
- *3HO*: 3-hidroxiocanoato
- *scl-PHA*: Polihidroxicanoatos de cadena corta
- *mcl-PHA*: Polihidroxicanoatos de cadena media
- *PHBV*: Polihidroxibutirato: valerato
- *ACS1*: Acil CoA sintetasa
- *MFA*: análisis de flujos metabólicos
- *phaC1*: *pha* Sintasa tipo 1
- *phaZ*: *pha* depolimeraza
- *phal*: fasinas
- *Keeg*: Kioto Enciclopedia of Genes and Genomes
- *Bigg*: Systems Biology Research Group at the University of California
- *Metacyc*: metabolic pathways from all domains
- *ChemEBI*: chemical compounds, European Bioinformatics Institute.
- *ARN*: ácido ribonucleico
- *ADN*: ácido desoxiribonucleico.
- *RGA*: Relative Gain Array



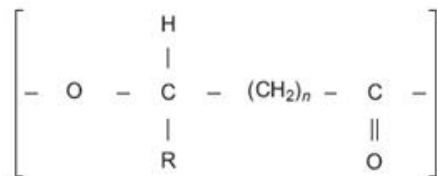
# Capítulo 1. Introducción

En los últimos años existe una intensa búsqueda por nuevos materiales, obtenidos en procesos sostenibles y a costos accesibles. Con la crisis ambiental cada vez más cerca, esta búsqueda se ha enfocado en materiales amigables con el ambiente, con términos que ahora se manejan como “renovables”, “reciclable”, “sostenible”, “totalmente biodegradable”, palabras que se han convertido en claves para los procesos (Suriyamongkol *et al.*, 2009).

Según Ojumu y colaboradores (2003), entre todos los candidatos biodegradables para la sustitución de los polímeros químicos, los polihidroxicanoatos (PHA) han llamado la atención por su similitud en propiedades con materiales plásticos convencionales y su completa biodegradabilidad. Sus características termoplásticas permiten el procesamiento en plantas existentes y diseñadas para polímeros petroquímicos, haciéndolos más llamativos; específicamente, el polihidroxibutirato (PHB) tiene algunas propiedades, incluyendo la resistencia a la tracción y la flexibilidad, similares al polietileno y al poliestireno (Lafferty *et al.*, 1998). El primer PHA descubierto fue el poli (3-D-hidroxibutirato) (PHB), un homopolímero que fue detectado en la especie *Bacillus megatherium* en el año 1925 (Lemoigne, 1926). Posteriormente, se encontraron inclusiones de PHA en una extensa variedad de especies bacterianas (Suriyamongkol *et al.*, 2009).

Los plásticos producidos con PHA han sido reportados como biodegradables por los dos caminos de degradación, aerobio y anaerobio (Page, 1995). Según Ojumu y colaboradores (2003), el producto final de la degradación de los PHA en ambientes aerobios es dióxido de carbono y agua, mientras que en condiciones anaerobias es el metano.

Los PHA están compuestos mayormente por el ácido poli-beta-hidroxibutírico (PHB) y el ácido poli-beta-hidroxivalérico (PHV) (Gráfica 1), pero hay gran diversidad de cadenas poliméricas que han sido detectadas en las bacterias. Puede haber más de 80 distintas formas de PHA (Lee, 1996).



<i>n</i>	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxipropionato)	PHP
	Metil	Poli (3-hidroxibutirato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxibutirato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxivalerato)	P5HV

Gráfica 1. Estructura general de los PHA (Lee, 1996).

El PHA es un biopoliéster constituido por monómeros de ácidos 3-hidroxicarboxílicos, con un peso molecular que varía entre 50-1000 kDa. Su diversidad radica en las sustituciones en el carbono asimétrico en posición 3, que le confiere al polímero un carácter quiral. El biopoliéster está formado únicamente por la forma enantiomérica R de los hidroxicarboxilatos (RHA) (Prieto *et al.*, 1999 en Fernández, 2012). La longitud de la cadena lateral permite clasificar los PHA en scl-PHA (de cadena corta) con cadenas de 3 a 5 carbonos o mcl-PHA (de cadena media) con cadenas de 6 a 14 carbonos.

La síntesis de polímeros con cadenas diferentes se debe principalmente a la diversidad metabólica que caracteriza a los microorganismos, que les permite transformar una gran variedad de sustratos en intermediarios 3-hidroxicarboxílicos mediante rutas como  $\beta$ -oxidación y síntesis *de novo* de ácidos grasos (Prieto *et al.*, 2007).

## 1.1 Producción de Polihidroxialcanoatos

Los distintos estudios que se han hecho en las últimas décadas permiten concluir que las rutas metabólicas involucradas en el metabolismo de PHA son muy complejas y varían en función del origen filogenético y del nicho ecológico del microorganismo productor. Adicionalmente se destaca que la maquinaria metabólica involucrada en esta producción no depende únicamente de las proteínas que catalizan la síntesis e hidrólisis del polímero, y la formación del gránulo; sino también de la conexión con otras rutas centrales y periféricas del metabolismo bacteriano (ver Anexo 1), (Fernández, 2012).

Los gránulos de PHA están compuestos por un poliéster (93-97% del peso seco del gránulo) rodeado por una monocapa fosfolipídica (1-6% del peso seco del gránulo) y proteínas asociadas al gránulo, las cuales forman una fina capa en la superficie del gránulo (Steinbüchel *et al.*, 1995; en Fernández 2012). Estas proteínas se encuentran implicadas en el metabolismo del polímero y se denominan GAP (Granule associated protein): PhaC, polimerasa (encargada de la síntesis), PhaZ, depolimerasa (encargada de la degradación) y las fasinias (las cuales tienen función estructural y reguladora) (Galán *et al.*, 2011). Adicionalmente, la acil-CoA sintetasa 1 (ACS1) se encarga de activar los productos de la depolimerización convirtiéndolos de nuevo en moléculas de (R)-3-hidroxiacil-CoA (ver anexo 1).

## 1.2 Proteínas asociadas con las inclusiones de PHA (GAP):

PHA sintasa (PhaC): es la enzima encargada de la polimerización, identificada como la enzima clave en la determinación del tipo de PHA sintetizado por el microorganismo. Se han descubierto aproximadamente 40 tipos de genes estructurales que codifican para PHA sintasa de varias bacterias Gram negativas y positivas. En general, se habla de tres tipos de PHA sintasas con respecto a la especificidad del sustrato y estructuras primarias. (Steinbüchel, 1991; en Sudesh *et al.*, 2000).

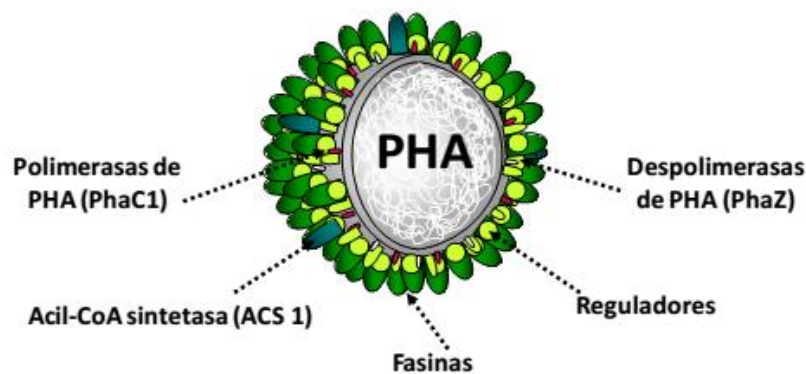
El primer tipo de PHA sintasa, identificado en la bacteria *Ralstonia eutropha*, incluye aquellas que tienen actividad en sintetizar scl-PHA como hidoxiacil monómeros. También se ha descubierto que tiene la capacidad de sintetizar pequeñas cantidades de polímero con cadenas de 6, 8 y 10 carbonos (3HHx, 3HO y 3HDD), así como copolímeros acompañantes de la cadena corta (Dennis *et al.*, 1998; en Sudesh *et al.*, 2000).

El segundo tipo de PHA sintasa ha sido caracterizada como aquellas que tienen la eficiencia de incorporar cadenas mayores de monómeros de (R)-3HA, con un contenido de 6 a 14 átomos de carbonos (mcl-PHA), este tipo de enzima se presenta en bacterias como *Pseudomona oleovorans*. Se conoce que este género de bacterias productoras de mcl-PHA en su ambiente nativo son capaces de producir grandes cantidades de scl-PHA, con genes igualmente expresados en *R. eutropha* (Sudesh *et al.*, 2000).

El tercer tipo de PHA sintasa ha sido identificado con base en el hecho de que, a diferencia del primer y segundo tipo que consisten en una subunidad de 60-70 kDa, consiste en dos subunidades: la subunidad-C de 40 kDa y la subunidad-E de 40 kDa (Rehm *et al.*, 1999 en: Sudesh *et al.*, 2000). En general no se tiene mucho conocimiento sobre esta enzima, pero se sabe que es productora de scl-PHA y que se presenta en *Chromatium vinosum* (Liebergesell *et al.*, 1994; en Sudesh *et al.*, 2000).

Depolimerasa intracelular PhaZ: ya que el microorganismo acumula el polímero cuando hay un exceso de fuente de carbono, es normal que esté equipado con un sistema de depolimerasa para poder aprovechar el carbono acumulado. También se conoce que ciertos tipos de bacterias producen una depolimerasa extracelular para consumir polímero libre en el medio (Doi, 1990). Esta enzima, en general, se conoce por hacer de la producción de PHA un ciclo metabólico adicional, esto se debe a su capacidad de sintetizar el polímero y, junto con la ACS1, integrar el metabolito producido de nuevo a las rutas periféricas como la  $\beta$ -oxidación o la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

Fasinas (PhaP): se ha confirmado que las inclusiones de PHA tienen un núcleo hidrofóbico de PHA amorfo, protegido con una monocapa de fosfolípidos conformada con varias proteínas catabólicas y no catabólicas. Las catabólicas (PhaC y PhaZ) fueron presentadas anteriormente; las no catabólicas incluyen un grupo de proteínas conocido como fasinas (Steinbüchel *et al.*, 1995; en Sudesh *et al.*, 2000; Mezzina y Pettinari, 2016). Estas se dicen que están involucradas en la estabilización de la inclusión del PHA amorfo hidrofóbico en el ambiente hidrofílico que tiene el citoplasma.



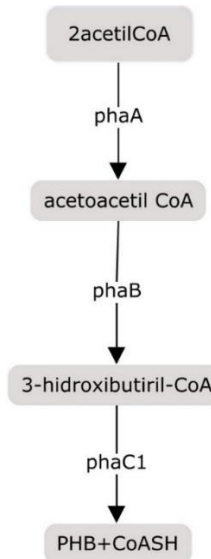
Gráfica 2. Proteínas asociadas con las inclusiones de PHB (Escapa, 2012).

### 1.3 Estimulación de producción de PHA

Lafferty y colaboradores, en 1988, determinaron que la acumulación de PHA puede ser estimulada bajo desbalances en las condiciones de crecimiento, cuando los nutrientes como nitrógeno, fósforo o sulfato se convierten en limitantes, cuando la concentración de oxígeno es baja, o cuando la relación carbono:nitrógeno es alta y la fuente de carbono está en exceso, de acuerdo con Doi (1990) cuando las condiciones de crecimiento están en desbalance, el acetyl-CoA no puede entrar en la ruta de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para obtener la energía que la célula necesita, debido a las altas concentraciones de NADH que se producen en ese ciclo.

Así mismo Dawes (1990) confirma que las altas concentraciones de NADH son el resultado del cese de la síntesis de proteínas en procesos asociados a la

producción de ATP en la cadena transportadora de electrones ante la limitación de nutrientes. De esta forma, las altas concentraciones de NADH inhiben la enzima citrato sintetasa la cual es una de las piezas claves en el ciclo de TCA, creando un incremento de acetil-CoA; éste a su vez es usado entonces como sustrato para la biosíntesis de PHA por medio de tres reacciones enzimáticas secuenciales (Gráfica 3).



Gráfica 3. Secuencia de reacciones para síntesis del polímero a partir de acetil-CoA.

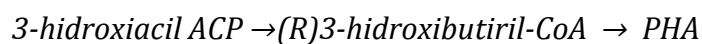
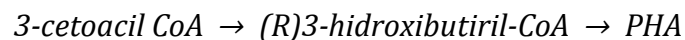
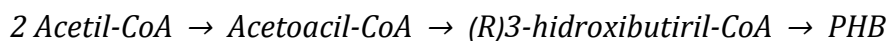
#### 1.4 Síntesis de PHA a partir de carbohidratos

En esta síntesis están involucradas rutas metabólicas como glucólisis, por medio de la cual los azúcares se rompen, dando lugar a un compuesto de tres carbonos, el piruvato, este sufre una descarboxilación oxidativa para ser convertido en un compuesto altamente activo y clave en la producción de PHA, el acetil-CoA. Por cada molécula de glucosa que entra se producen dos moléculas de acetil-CoA. De esta forma, el rendimiento máximo que se puede tener a partir de azúcares es de  $\frac{2}{3}$  cuando el microorganismo emplea la vía glucolítica o de  $\frac{1}{3}$  si se metaboliza por la vía de las pentosas fosfatos (Riascos *et al.*, 2015), (ver Anexo 2). En contraposición, el uso de ácidos grasos para la producción de PHA implica rendimientos teóricos cercanos al 100%, lo que hace de estos procesos una alternativa interesante para la producción de biopolímeros a escala industrial.

Es importante resaltar que, en la gran mayoría de microorganismos productores de PHA, la síntesis de PHB se hace a partir de acetil-Coenzima A (acetil-CoA) por una secuencia de tres reacciones catalizadas por: 3-cetotiolasa acetil-CoA acetiltransferasa (phaA), acetoacetil-CoA reductasa, hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (phaB) y la poli 3-hidroxibutirato sintasa (phaC1) (Anderson *et al.*1990). Ver gráfica 3. Síntesis del polímero a partir de ácidos orgánicos, alcanos y otros sustratos

Dado que la ruta de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos está claramente conectada con la síntesis de PHA, el estudio de la bioquímica y regulación del catabolismo de los ácidos grasos resulta de enorme interés para optimizar la producción de PHA. Además, el uso de ácidos grasos con grupos funcionales podría permitir la incorporación de estos grupos al poliéster, obteniéndose así polímeros con nuevas propiedades fisicoquímicas y susceptibles de sufrir modificaciones químicas posteriores a su síntesis. (Fernández, 2012).

Se considera que la condensación de Propionil-CoA y acetil-CoA, catalizada por 3-cetotiolasa para producir 3-cetopentanoil-CoA, puede ser la responsable de la habilidad de *A. eutrophus* para acumular el co-polímero de C<sub>4</sub> y C<sub>3</sub> 3-hidroxiácidos cuando se sustituye la glucosa por el ácido propiónico. Alternativamente, el 3-hidroxiacil-CoA puede ser generado por precursores del metabolismo normal de ácidos grasos, a partir de la actividad de las enzimas no específicas enoil-CoA hidratasa y tioquinasa (Anderson *et al.*, 1990), de acuerdo a las siguientes reacciones:



## 1.5 Uso de sustratos de bajo costo.

El precio final de los biopolímeros depende de varios factores, entre ellos los costos de producción, el rendimiento del polímero obtenido y los costos de procesamiento (Almeida *et al.*, 2004). Una de las barreras para el aumento de la producción de PHA a gran escala son los altos costos de producción, donde el 50% de estos depende de la materia prima como fuente de carbono y adicional a esto están los costos de extracción y purificación del polímero. En consecuencia, los PHA siguen siendo producidos en pequeña y mediana escala, con producciones anuales de 1000 a 20.000 toneladas lo cual, por falta de economía de escala, también aumenta los costos de producción (Urtuvia *et al.*, 2014). Actualmente existen varios enfoques para lograr la producción de PHA a precios competitivos; entre esos enfoques, el desarrollo de procesos con sustratos de bajo costo es uno de los más promisorios.

El desarrollo de un proceso fermentativo para producción de PHA implica, entre otras cosas, optimizar el rendimiento y facilitar el proceso de purificación del polímero, además de buscar el abaratamiento del costo de los sustratos utilizados para su obtención. Los primeros procesos desarrollados para la producción de PHA en microorganismos se realizaron mediante fermentación, utilizando a la bacteria *Ralstonia eutropha*, capaz de producir PHB o PHBV (polihidroxiburitato-valerato) a partir de glucosa y propionato, sustratos cuyo alto costo incide en el precio final del polímero obtenido.

La optimización en la producción de PHA en diversos microorganismos a partir de glucosa y sacarosa, brinda oportunidades para buscar fuentes alternativas de carbono de mayor economía y rentabilidad como aceites vegetales, ácidos grasos, residuos industriales, residuos agrícolas y CO<sub>2</sub>; la utilización de productos y subproductos agrícolas cumple este propósito.

### 1.5.1 Aceites vegetales y ácidos grasos

Los aceites vegetales han sido investigados por años como fuentes alternativas de carbono y han sido de gran interés para la producción de PHA a gran escala, esto se debe a su compleja mezcla de triglicéridos y a los incrementos en los



rendimientos en comparación con los azúcares. La fuente de carbono compleja es metabolizada por múltiples rutas metabólicas y su precursor intermediario resultante es polimerizado por la PHA sintasa (PhaC) (Sudesh *et al.*, 2011).

Por lo anterior, los ácidos grasos son una fuente de carbono promisoría, por ser económica y renovable; el rendimiento teórico en la producción de PHA es considerablemente mayor comparado con la glucosa (0.65-0.98 kg/kg a partir de ácido butírico en relación con 0.32-0.48 kg/kg a partir de glucosa, según Suriyamongkol *et al.*, 2007).

### 1.6 Antecedentes del grupo de investigación

El Grupo de Investigación en Bioprocesos y Bioprocesos y Bioprospección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia ha investigado por más de dos décadas la producción de PHA, la siguiente tabla resume los desarrollos realizados por el grupo, en la búsqueda de procesos rentables para la producción de biopolímeros del tipo PHA.

Tabla 1. Antecedentes del Grupo de Bioprocesos y Bioprospección del IBUN.

Año	Autores	Objetivo	Resultado
1997	Suarez y Suarez	Primer acercamiento a la obtención de PHA a partir de <i>Pseudomona putida</i> (cepa comercial) con ácido octanóico como fuente de carbono	Producto Polihidroxibutirato Productividad 0.0068g/L*h
2001	Cortázar y Malagón	Evaluar métodos de extracción de polímero	Estandarización de tres métodos de extracción de PHB, escala laboratorio.
2002	Barbosa y colaboradores	Estudiar la capacidad de producir PHB a partir de <i>Ralstonia eutropha</i> ATCC 17697 usando fructosa como fuente de carbono.	Producto Polihidroxibutirato Productividad 0.007gPHB/L*h
2004-2010	Moreno y colaboradores	Screening de cepas promisorias para la producción de PHB de suelos de cultivos de caña de azúcar de Colombia.	Banco de 108 cepas promisorias para la producción de PHB

2010-2012	Cadena y Cely	Evaluación de banco de cepas para la producción de PHB a partir de distintas fuentes de carbono	Aislamiento de <i>Burkholderia cepacia</i> 2G57 con crecimiento celular de 4g/L escala laboratorio y capacidad de producir PHB a partir de glicerol
2012-2015	Moreno y colaboradores (asociación con Biopolab)	Estandarizar el proceso de producción de PHB a partir de <i>B. cepacia</i> 2G57, desde su mutación hasta su escalado a 2000L	Obtención de cepa hiperproductora de PHB <i>B. cepacia</i> B27. Construcción de planta piloto de producción y primeros ensayos de producción. Concentración máxima de biomasa 11g/L.
2016	Méndez y colaboradores	Modelamiento matemático para optimización de producción de PHB a partir de ácidos grasos	Primer acercamiento a la optimización de PHB. Concentración de biomasa 16g/L.

### 1.6.1 *Burkholderia cepacia* B27.

Taxonomía: Dominio: Bacteria; *Phylum*: Proteobacteria; Clase:  $\beta$ - Proteobacteria; Orden: *Burkholderiales*; Familia: *Burkholderiaceae*; Género: *Burkholderia*; Especie: *cepacia*; Subespecie: B27. Es una bacteria Gram negativa, bacilo no fermentador, aerobio estricto, mesófila crece en rangos de temperatura de 30-35°C, organismo quimioorganotrofo, Oxidasa y Catalasa (+). *B. cepacia* puede encontrarse en diferentes ambientes, como suelo, agua, y plantas en una variedad de regiones geográficas, fuentes animales y muestras clínicas diferentes.

La obtención de la cepa hiperproductora, B27, se realizó a partir de la cepa *Burkholderia sp* 2G57 (aislada por Moreno *et al.*, 2004) mediante un proceso de mutación, y selección de la cepa de mayor acumulación de polihidroxialcanoatos (PHA). Con esta mutante se optimizaron sus condiciones de crecimiento y acumulación del biopolímero, evaluando la Temperatura (25–35 °C), la fuente de carbono (aceite de maíz) y su concentración (10–40 g/L), así como la aireación del fermentador (1-2.5 vvm) manteniendo los parámetros y el medio de cultivo

evaluados para la cepa 2G57, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 (Moreno *et al.*, 2015), donde se destacan las altas concentraciones de biomasa y PHA obtenidas.

Tabla 2. Resumen de las fermentaciones para la cepa B27.

	Cepa B27	Cepa B27	Cepa B27
VVM	1	2	2,5
<b>Biomasa g/L</b>	9.7	14.6	14.4
<b>PHA g/L</b>	6.4	11.5	7.9
<b>% de PHA</b>	66.0%	79.0%	54.8%
<b>pH final</b>	5.8	6.3	6.2
<b>T (°C)</b>	30.0	32.0	32.0
<b>Volumen de trabajo (L)</b>	2.5	2.5	2.5
<b>So (g/L)</b>	20	30	40
<b>Xo (g/L)</b>	0.76	0.79	0.57
<b>Xmax (g/L)</b>	10.37	14.83	14.81
<b>Tasa esp. crecim. (h<sup>-1</sup>)</b>	0.0694	0.0914	0.0942
<b>Productividad Biomasa (g/L-h)</b>	0.1347	0.2027	0.2002
<b>Productividad PHA(g/L-h)</b>	0.0889	0.1602	0.1098
<b>Ajuste R<sup>2</sup></b>	97.53%	99.71%	99.98%

Las fermentaciones de la mutante B27 para diferentes tasas de aireación, 1, 2 y 2.5 vvm, muestran un incremento significativo en la producción de biomasa total y PHA cuando se pasa de 1 a 2 vvm: incrementando la concentración final de 9.7 a 14.6 g/L para la biomasa y de 6.4 a 11.5 g/L para PHA, lo que representa un incremento en la productividad del 50 %. La velocidad específica de crecimiento presentó un aumento de 0.069 a 0.091 h<sup>-1</sup> y el consumo de aceite de maíz aumenta de 7.82 a 11.62 g/L. Para aireaciones superiores, 2.5 vvm, no se afecta la producción de biomasa, pero si la acumulación de PHA, que se reduce de 79% a 54.8%. La máxima productividad de polímero (0.16 g/Lh) se obtuvo con aireación de 2 vvm. Teniendo el proceso de producción definido y estudios experimentales

para mejorar la productividad se pueden observar avances para un óptimo escalamiento, sin embargo, la cepa hiperproductora presenta inhibiciones en crecimiento con concentraciones de fuente de carbono mayores a 20 g/L (datos no mostrados), lo que genera un problema debido a que la productividad no es suficiente para hacer el proceso viable industrialmente. Como alternativa para aumentar la productividad se debe considerar la fermentación por lote alimentado o continua, pero estas formas de operación requieren mayor conocimiento de proceso para ser implementadas exitosamente.

### 1.6.2 Herramientas computacionales para el mejoramiento de bioprocesos

El modelamiento de bioprocesos es una herramienta útil para soportar diferentes tareas: a) puede ser la base para una adecuada optimización y la aplicación de técnicas de control, b) puede proveer la información necesaria acerca de las características del sistema como cinética de crecimiento, termodinámica y balances del bioproceso escogido, por lo tanto, se considera la mejor técnica para predecir la eficiencia del proceso (Caramihai *et al.*, 2013).

Cuando las características del proceso cambian en el tiempo, las condiciones operacionales tienen que cambiar también. Además, pueden existir muchos cambios en las condiciones del proceso con respecto a diferentes ciclos de vida de microorganismos (por ejemplo, cuando la concentración de biomasa y la tasa de crecimiento se incrementan en una fermentación, el oxígeno disponible se debe incrementar). Por eso hay una necesidad de algunos mecanismos de realimentación basados en medidas en línea o *in-silico* (Koutinas *et al.*, 2012).

Una estrategia novedosa para mejorar la predicción de los procesos fermentativos es incluir aspectos metabólicos en los modelos, en lugar de emplear solamente información de las condiciones extracelulares, con lo que se pasa de modelos tipo caja negra a modelos en los cuales la dinámica intracelular es cada vez más transparente. Un ejemplo de la aplicación de la información metabólica en el modelamiento del proceso fermentativo es presentado por Nandong *et al.* (2008) quienes formularon un modelo matemático para el análisis de la fermentación

etanólica, en este modelo los flujos metabólicos se relacionan con las tasas específicas de crecimiento y producción. Como resultado de ese estudio se observó que la inclusión de la descripción metabólica mejoró la predicción del comportamiento de la fermentación y en consecuencia el control de la misma.

### **1.7 Planteamiento del problema**

Los polihidroxicanoatos se presentan como una alternativa para el reemplazo de los poliésteres en la industria del plástico, esto se debe a sus características termoplásticas previamente nombradas y a su completa biodegradación. Sin embargo, actualmente su producción, aunque es comercial no llega a ser en gran escala, esto se debe a los altos costos de producción, ya que su precio final depende de varios factores como el costo de la materia prima, los rendimientos de producto y los costos de procesamiento.

En los últimos años se han venido estudiando distintas alternativas para posibilitar la producción de PHA es escala comercial, se han evaluado diferentes sustratos basados en residuos agroindustriales, el uso de diferentes microorganismos nativos o modificados genéticamente; adicionalmente se han planteado diferentes alternativas para mejorar la etapa de fermentación como el uso de modelos matemáticos, los cuales permiten predecir el comportamiento del proceso, comparando el comportamiento observado del microorganismo con la predicción del modelo, descartando así hipótesis planteadas incorrectas y permitiendo simular nuevos estados del sistema ante nuevas hipótesis.

El Grupo de Investigación en Bioprocesos y Bioprospección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional ha trabajado en la producción de PHA desde hace más de una década, implementando distintas estrategias para el conocimiento y la evaluación de cepas productoras del polímero, llegando a obtener una cepa hiperproductora de PHB, la cual utilizando aceite vegetal como fuente de carbono logra una acumulación intracelular de hasta 79% de polímero en peso seco.

Aunque los últimos resultados muestran mejoría en la producción de PHB para la cepa hiperproductora *Burkholderia cepacia* B27, las concentraciones de biomasa total (biomasa residual más polímero) son de 16 g/L con una concentración inicial de 20g/L de aceite vegetal, y se presenta inhibición por sustrato cuando se emplean concentraciones mayores como 30 y 40 g/L. De tal forma, para el desarrollo de un proceso comercial se requiere de estudios que permitan predecir el comportamiento del proceso en fermentación por lote alimentado, donde la dinámica del proceso tiene mayor complejidad por los cambios extracelulares generados por los flujos de alimentación. Como parte esencial del desarrollo del proceso productivo, el mejoramiento de la predicción de la fermentación es un paso clave para aumentar la concentración y productividad de polímero, que abrirá la puerta para su escalamiento y producción masiva.

El modelo desarrollado recientemente por el grupo de investigación (Méndez *et al.*, 2016), aunque permitió una primera aproximación para la optimización del proceso, por ser un modelo caja negra, no considera los cambios que se presentan dentro del microorganismo: cómo la maquinaria metabólica se ajusta para direccionar el flujo de carbono. Este ajuste depende, en gran medida, de las interconexiones entre las diferentes vías metabólicas, y estas interconexiones están determinadas por los cofactores que consumen unas vías y se regeneran en otras. Por lo anterior se hace necesario un estudio de la fermentación que considere los aspectos metabólicos y que permita predecir el comportamiento dinámico de la misma.

## **1.8 Hipótesis**

Considerando el problema que se ha identificado para el desarrollo de un proceso comercial para producción de un biopolímero tipo PHA se plantea la siguiente hipótesis: la optimización por programación matemática del proceso de producción de PHA por *B. cepacia* B27, basada en un modelo matemático estructurado, permitirá identificar el régimen de operación y las condiciones operacionales que aumentan la productividad y posibilitan la producción en escala comercial.

## **1.9 Objetivos**

### **Objetivo General:**

Optimizar la productividad en el proceso de producción de Polihidroxialcanoatos (PHA), empleando un modelo matemático metabólicamente estructurado.

### **Objetivos específicos:**

1. Identificar los metabolitos clave que permitan caracterizar el comportamiento del microorganismo dentro del proceso de producción de PHA.
2. Formular el modelo matemático considerando la medición de metabolitos clave de la producción de PHA.
3. Validar el modelo con datos experimentales.
4. Optimizar el proceso de producción de PHA empleando el modelo matemático desarrollado.





## **Capítulo 2. Identificación de las variables metabólicas que permiten caracterizar el proceso de producción de PHA.**

Este capítulo presenta el trabajo desarrollado para alcanzar el primer objetivo específico de la presente tesis y parte de la siguiente hipótesis: Con el estudio *in-sílico* del metabolismo para la producción de PHA por *Burkholderia cepacia* B27, se obtendrá información para formular un modelo metabólicamente estructurado del proceso.

Una estrategia altamente sofisticada que se ha introducido en el análisis de procesos biotecnológicos es la Ingeniería Metabólica. La ingeniería metabólica se basa en el concepto de ruta metabólica: una secuencia de reacciones catalizadas por enzimas específicas que convierte sustratos en productos celulares. Así mismo, la manipulación de las rutas metabólicas sirve para el mejoramiento de los procesos, específicamente el rendimiento o la productividad de los metabolitos de interés.

La ingeniería metabólica ha sido desarrollada con el propósito de generar información para la modificación y regulación enzimática o de transporte activo de las células. Esta información puede ser usada para la construcción de cepas mejoradas mediante tecnología de ADN recombinante. La determinación y la correcta interpretación de la estructura y el control de los mecanismos de las redes metabólicas son la primera labor crítica de la ingeniería metabólica, en orden de cumplir la misión de una correcta y racional manipulación de la red (Klappa *et al.*, 2000). El énfasis principal es considerar la red metabólica como un todo y no como una serie de reacciones individuales.

Otra aplicación relevante del análisis metabólico es la generación de información adicional para la formulación de modelos matemáticos de la fermentación, permitiendo dar el salto de modelos no estructurados a modelos metabólicamente estructurados. Nandong *et al.* (2008) formularon un modelo matemático para el análisis de la fermentación etanólica, en este modelo los flujos metabólicos se relacionan con las tasas específicas de crecimiento y producción. Como resultado de ese estudio se observó que la inclusión de la descripción metabólica mejoró la predicción del comportamiento de la fermentación y en consecuencia el control de la misma.

Siguiendo esa línea metodológica, en el presente trabajo se conectará el conocimiento del metabolismo de la cepa con el comportamiento de la misma durante de la fermentación. El metabolismo se caracterizará mediante la estimación de los flujos metabólicos y el comportamiento durante la fermentación mediante la medición de las tasas específicas de consumo de sustratos y generación de productos; con lo anterior se identificará la relación entre los cambios en el metabolismo y el desempeño del proceso fermentativo, generando información clave para el modelamiento del proceso.

## **2.1 Antecedentes**

### **2.1.1 Modelamiento basado en medición de metabolitos**

Las ómicas se han convertido en un factor importante dentro de la biología de sistemas donde constituyen la base teórica de los modelos computacionales. La identificación y cuantificación de metabolitos, comúnmente llamada metabolómica o perfilamiento metabólico es una de la ómicas con aplicación directa en los procesos fermentativos. Las técnicas usadas en la metabolómica son basadas en cromatografía y espectrometría de masas, así como también en resonancia magnética nuclear.

A lo largo de una vía metabólica, cada metabolito es producido en reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas, a partir de otros metabolitos, dando como

resultado un alto nivel de dependencia entre sus concentraciones y entre las velocidades de las reacciones involucradas. Estas dependencias son clave en la estructura de la red metabólica y su conocimiento permite el modelamiento estequiométrico (Camacho *et al.*, 2005).

El modelamiento y simulación bioquímica se están convirtiendo en una estrategia importante dentro de los algoritmos de análisis de datos en la biología de sistemas; de esta forma, las simulaciones que usan un modelo matemático asociado a una variación biológica pueden ser un instrumento para revelar un número de características regulatorias que originan las correlaciones entre metabolitos, como un equilibrio o conservación (Mendes, *et al.*, 2005).

### 2.1.2 Análisis de flujo metabólico

Debido al incremento en la complejidad de las redes metabólicas y de los mecanismos regulatorios correspondientes, el estado fisiológico (flujos metabólicos característicos en condiciones genéticas y ambientales específicas) de las células es determinado *in vivo* por los flujos metabólicos y sus controles (Caramihai *et al.*, 2013).

La cuantificación de los flujos es el principal objetivo de las técnicas de análisis de flujo metabólico (MFA por sus iniciales en inglés) (Wang *et al.*, 2006). Dentro del MFA, los balances de metabolitos son el primer paso en la determinación de estos flujos, basándose en la principal hipótesis: los flujos intracelulares pueden ser estimados con base en la medición de flujos extracelulares y el conocimiento de las correlaciones entre los metabolitos.

El balance metabólico es realizado, usando modelos estequiométricos para las reacciones intracelulares y con el uso de balances de masa para los metabolitos intracelulares, sin ninguna información de cinética enzimática. Según Teixeira *et al.* (2007), los balances se agrupan en la siguiente ecuación matricial:

$$S \cdot \bar{v} = \bar{r}$$

Donde  $S$  es la matriz estequiométrica de la red metabólica,  $\bar{v}$  es el vector de flujos metabólicos desconocidos,  $\bar{r}$  es el vector de los flujos extracelulares medibles. En la matriz  $S$ , el número de filas depende del número de metabolitos en la red metabólica y el de columnas es igual al número reacciones intracelulares incluidas en la red. Una observación importante es que las ramificaciones en las vías metabólicas, la consideración de reacciones reversibles, y los ciclos metabólicos incrementan los grados de libertad del sistema, lo que puede hacerlo imposible de resolver.

El punto de partida del análisis de flujo metabólico es el conocimiento de la estequiometría de la red de reacciones, esta estequiometria describe matemáticamente cómo los sustratos son convertidos en productos metabólicos y constituyentes de biomasa (el *pool* de macromoléculas). De forma general, en estado dinámico, el balance de los metabolitos intracelulares será:

$$\frac{dX_{met}}{dt} = \bar{r}_{met} - \mu \cdot X_{met}$$

donde  $X_{met}$  es el vector de concentraciones de los metabolitos intracelulares (o intermediarios metabólicos) y  $\bar{r}_{met}$  es el vector que contiene las tasas netas de formación de los metabolitos intracelulares.

Bajo ciertas condiciones, es razonable asumir que el metabolismo está en estado pseudo-estacionario, eso se debe a que es generalmente aceptable que hay una alta rotación del pool de metabolitos, lo que genera que las concentraciones de este pool se ajusten rápidamente a nuevos niveles, incluso poco después de que el microorganismo sea sometido a cambios drásticos en las condiciones ambientales. El estado pseudo-estacionario implica que no hay una acumulación de metabolitos (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

$$0 = \bar{r}_{met} - \mu \cdot X_{met}$$

Debido a que el nivel intracelular (concentración) de la mayoría de los metabolitos intermediarios es muy bajo, el efecto de la dilución es generalmente bajo, más

cuando se compara con el efecto de los flujos que afectan el mismo metabolito. Es por eso que el segundo término del lado derecho puede ser obviado, con lo que se llega a la ecuación:

$$0 = r_{met} = S * v$$

donde la matriz  $S$  está compuesta por los coeficientes estequiométricos de cada uno de los metabolitos en cada una de las reacciones,  $v$  es el vector de tasas de las reacciones en que intervienen los metabolitos intracelulares. Muchas veces, la ecuación matricial obtenida del balance de metabolitos no puede ser resuelta directamente, pues presenta más incógnitas (velocidades de reacción) que ecuaciones (metabolitos intracelulares sobre los que se hacen los balances). Algunas estrategias para estimar los flujos metabólicos son: incluir mediciones de algunos flujos, incluir balances de co-factores y realizar experimentos con sustrato marcado (sustrato con  $C^{13}$  en una posición específica que permiten la inclusión de nuevas ecuaciones, los balances de  $C^{13}$ ) que conllevan al desarrollo de un MFA no-lineal (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

La inclusión del balance de co-factores, aunque mantiene el MFA lineal, aumenta la incertidumbre en el análisis pues estos componentes aparecen en un gran número de reacciones, lo que dificulta tener ecuaciones completas para su balance. Por otra parte, el uso de sustrato marcado, que es la estrategia preferida en las últimas décadas, requiere capacidad experimental muy avanzada, que aún no está disponible para el presente trabajo. Por lo anterior el presente trabajo considera el MFA lineal sin inclusión de co-factores, para lo cual el desarrollo de la matriz estequiométrica requiere cuidados especiales.

## 2.2 Metodología

La identificación de los metabolitos clave que permitirán caracterizar el metabolismo requiere la generación de la red metabólica que incluya las rutas asociadas a la producción de PHA, para posteriormente hacer la estimación de los flujos intracelulares que, junto con las tasas específicas, permiten caracterizar de

forma detallada el comportamiento de la cepa, y finalmente, el análisis de correlación entre las variaciones en el comportamiento de la cepa y las variaciones en las concentraciones de los metabolitos preseleccionados

### **2.2.1** Generación de la red metabólica

La construcción de la red se basa en estudios de modelamiento metabólico para la producción de PHA a partir de diversos sustratos y en diversas cepas (Pardelha *et al.*, 2014). La definición de la red metabólica permitirá la construcción de la matriz estequiométrica del metabolismo, considerando la producción del polímero y la generación de biomasa. La matriz agrupa los balances de materia de las reacciones que describen las diferentes rutas metabólicas (Pardelha *et al.*, 2012; Caramihai *et al.*, 2013). Adicionalmente, el análisis de la estructura de la red metabólica permitirá definir la independencia de las vías metabólicas (Simpson *et al.*, 1999).

Con base en los conceptos de análisis de flujos metabólicos (MFA) se construirá la matriz estequiométrica, para que ésta describa en principio las reacciones bioquímicas entre los metabolitos principales existentes. Inicialmente, se debe hacer un balance de masa sobre los metabolitos intracelulares intermediarios, en este balance se deberá cumplir la ley de conservación de masas de todos los elementos básicos (C, H, O, N, S y P). Cumpliendo así, la principal hipótesis: los flujos intracelulares pueden ser evaluados con base en la medición de flujos extracelulares.

### **2.2.2** Caracterización del comportamiento de la cepa

Esta caracterización requiere inicialmente la estimación de las tasas específicas de consumo y producción, que se complementan con la estimación de los flujos intracelulares.

Las tasas específicas se calculan a partir de los perfiles de las concentraciones medidas (los protocolos para estas mediciones se presentan en el Anexo 4). Para la estimación se considera la definición de las tasas específicas:

$$\mu_X = \frac{dX}{dt} \frac{1}{X}$$

$$\mu_P = \frac{dP}{dt} \frac{1}{X}$$

$$\mu_{S_C} = \frac{dS_C}{dt} \frac{1}{X}$$

donde  $X, P, S_C$  son las concentraciones de biomasa residual, PHA y fuente de carbono, con lo que estas tasas se obtienen en gr/gr de biomasa seca h. Por su parte, la tasa específica de producción de  $\text{CO}_2$  se estima a partir de la medición de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el gas de salida,  $y_{\text{CO}_2}$ ; la velocidad de aireación (2 vvm) y el volumen del medio (2 L) que generan el flujo volumétrico de aire,  $v_{\text{aire}}$ ; el volumen molar del aire a las condiciones ambientales,  $V_{\text{aire}}$ , y la concentración de biomasa, así:

$$\mu_{\text{CO}_2} = \frac{y_{\text{CO}_2} v_{\text{aire}}}{V_{\text{aire}}} \frac{1}{X}$$

Para la estimación de los flujos intracelulares se sigue la idea del estado pseudo-estacionario sobre la que se soporta el MFA: la concentración de los metabolitos intracelulares y las velocidades de las reacciones se consideran constantes cuando el microorganismo está en una condición metabólica estable<sup>1</sup> Esta idea permite el balance de las reacciones que intervienen en la formación y consumo de cada metabolito (Stephanopoulos *et al.*, 1990). Para los cálculos de MFA todas las tasas específicas se deben expresar en unidades molares (mmol/gr X h).

En el presente trabajo, la cuantificación de flujos intracelulares se realiza mediante MFA lineal, para esto se requiere una combinación entre datos experimentales y modelamiento matemático, los datos experimentales son los flujos medibles: flujos

---

<sup>1</sup> Para el MFA se usan fermentaciones en quimiostato que garantizan condiciones constantes para un crecimiento en fase exponencial, o fermentaciones por lote tomando datos en la fase de crecimiento exponencial.

extracelulares como formación de biomasa, consumo de sustratos y generación de productos; por otro lado, el modelamiento se soporta en una gran cantidad de información bioquímica, la cual se obtiene del análisis de las rutas metabólicas realizada con anticipación.

Gombert y Nielsen en 2003 describen como se puede usar esta herramienta ingenieril para la caracterización fenotípica de microorganismos en términos de flujos (*in-vivo*). Los requisitos que se requieren para hacer este tipo de análisis son:

$$\text{Medidas} \left\{ \begin{array}{l} 1. \text{Balances macromoleculares} \\ 2. \text{Composición monómerica de cada pool en términos} \\ \text{de amino ácidos, proteínas, lípidos, monosacáridos} \\ 3. \text{Medición de tasas de consumo de Sustratos y} \\ \text{generación de productos} \\ 4. \text{Cálculos de drenajes metabólicos precursores del} \\ \text{metabolismo central.} \end{array} \right\}$$

Los balances realizados para cada metabolito involucrado en el metabolismo central se organizan en dos matrices que son sub-matrices de la matriz  $S$ , la matriz  $S_c$  donde se agrupan los balances de los metabolitos intracelulares cuyos flujos de formación y consumo no pueden ser medidos y se llama la matriz calculada; y la  $S_m$  donde se agrupan los balances de los metabolitos cuya tasa de formación puede ser medida y se llama la matriz medida. Así mismo, el vector de flujos metabólicos se separa en los vectores  $v_m$  y  $v_c$  donde se agrupan las velocidades medidas y calculadas, con esta separación de la matriz y realizando operaciones matriciales se llega a:

$$v_c = [(S_c^T)^{-1} * (S_m^T * v_m)]$$

### 2.2.3 Preselección de los metabolitos clave y medición de su concentración

A partir de la identificación y caracterización de las vías principales involucradas en la producción, las reacciones de estas serán agrupadas para formular los balances de materia, teniendo en cuenta los metabolitos que se encuentren asociados al crecimiento bacteriano y a la producción del biopolímero; a partir de este análisis se identificaron metabolitos que actúan como nodos en el metabolismo. Los



metabolitos considerados como nodos aparecen producidos o consumidos por más de una vía metabólica, y el cambio en su concentración podría ser indicador de cambios en la distribución del carbono, la cual se generaría por una deficiencia de alguna fuente esencial (carbono o nitrógeno). El desbalance nutricional genera modificaciones en el metabolismo para acoplarse al cambio. Los metabolitos intermediarios que se identificaron como claves en los procesos metabólicos fueron considerados para mediciones por cromatografía líquida.

La medición de la concentración de los metabolitos clave permitirá la identificación de posibles “parámetros de correlación”, siguiendo la idea de que entre una condición metabólica y otra las concentraciones de los metabolitos clave presenten una diferencia importante y relacionada con la velocidad de metabolización en la(s) vías(s) en que participa el metabolito. Así, por ejemplo, se espera que los metabolitos de la vía de los ácidos tricarbóxicos tengan mayores concentraciones en los estados metabólicos que implique una baja actividad de esta vía. Debido que estos ácidos orgánicos son producidos por la célula y excretados al medio, estos fueron considerados para medición por HPLC en las distintas etapas del proceso (ver anexo 4 sección 7.5).

#### **2.2.4** Análisis de correlación

Basados en los trabajos de Jin y colaboradores en 2013 quienes hicieron un perfilamiento metabólico sobre una cepa productora de polihidroxibutirato y evaluaron el comportamiento para dos concentraciones iniciales de sustrato, se analizó la posibilidad de relacionar las concentraciones de los metabolitos, o el cociente de concentraciones, con las tasas específicas de crecimiento y producción, buscando consistencia en los dos experimentos presentados.

Este análisis se hizo con el fin de contemplar las posibilidades de éxito en la correlación la información metabólica (concentraciones) con el comportamiento del microorganismo en diferentes fases del proceso, lo cual es un aspecto central de la tesis. Los resultados de este análisis mostraron que no es posible relacionar el comportamiento con la concentración de los metabolitos, pero sería posible

relacionarlo con la razón (cociente) entre concentraciones de varios metabolitos. En el presente trabajo, estos cocientes son llamados “parámetros de correlación” y una observación importante es que no es fácil identificar *a priori* los metabolitos cuya concentración se deben incluir en estos parámetros.

La primera estrategia para realizar el análisis de correlación es construir y evaluar las gráficas de dispersión, estas gráficas muestran el comportamiento de las variables controlantes ( $U_i$ ) contra el de las variables controladas ( $Y_i$ ). Los conceptos de variables controlantes y controladas son ampliamente estudiados en el control de procesos (Skogestad *et al.*, 2007), para nuestro sistema se considera que los parámetros de correlación deben controlar el comportamiento del metabolismo, por lo que los parámetros de correlación serán las  $U_i$ , mientras que las tasas específicas medidas y calculadas, las  $Y_i$ .

Para la validación de los análisis cualitativos se usó el método de RGA (por sus siglas en inglés: Relative Gain Array) con el fin de evaluar si los parámetros promisorios tienen algún tipo de control sobre las tasas medidas del proceso. Con el uso de matrices, el RGA permite relacionar las variables que se consideren que controlan los flujos,  $U_i$ , con otras variables que se consideran que son controladas,  $Y_i$  (Skogestad *et al.*, 2007).

$$Y_i = f(U_i)$$

Para nuestro sistema, las  $Y_i$  son los flujos intracelulares y, principalmente, los extracelulares y las  $U_i$  son las concentraciones o cocientes entre concentraciones de los metabolitos clave.

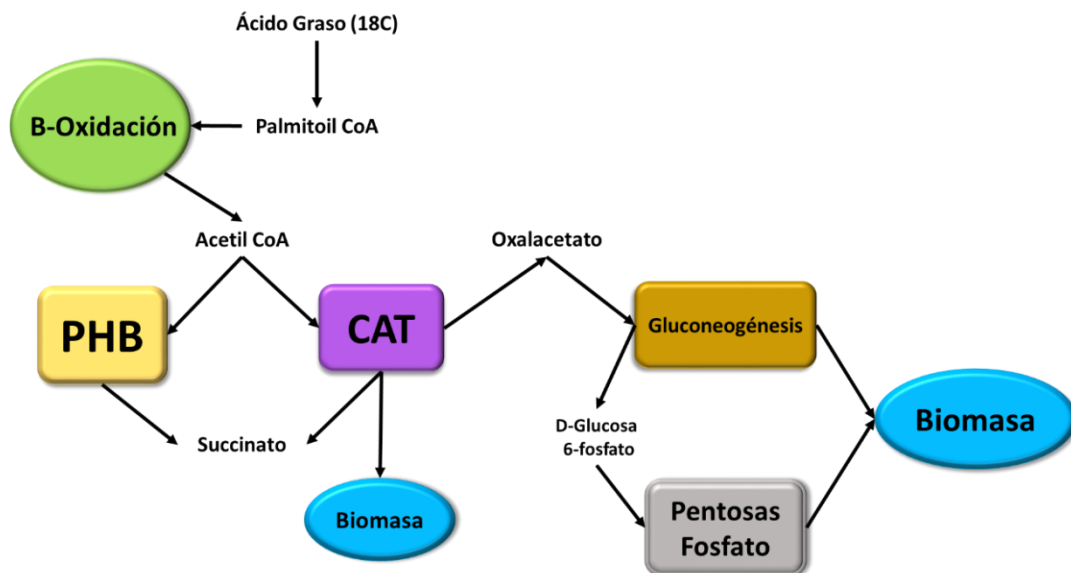
## 2.3 Resultados y análisis

### 2.3.1 Identificación de vías asociadas a crecimiento y producción de PHB.

Para identificar los metabolitos clave que permite caracterizar el comportamiento de *B. cepacia* fue necesario diseñar un mapa metabólico que incluyera las vías que contemplan crecimiento y producción del polímero, basado en la información de su cepa parental con genoma reportado en GenBank, *Burkholderia cenocepacia*

J2315 (Fang *et al.*, 2011), se realizó un análisis de las vías que se considerarían en el metabolismo central, por lo cual no se consideró necesario usar directamente la secuencia del genoma bacteriano. Sin embargo, lo que se pudo confirmar con una revisión de la secuencia de la cepa B27 es la presencia de los genes que codifican para las enzimas de polimerización (*phaC1*), depolimerización (*phaZ*) y sus correspondientes fasinas (*phaI*).

Con el uso de bases de datos tales como Keeg, Bigg models, Metacyc, ChemEBI, entre otras, se logró identificar la red metabólica central y en consecuencia la matriz estequiométrica. En esta se contemplaron 5 vías metabólicas completas y 1 parcial, asociadas a crecimiento y producción del polímero. En un principio se consideró la síntesis *de novo* de ácidos grasos como parte del metabolismo central, pero en el proceso de curación manual de la red se evidenció la carencia de la enzima EC 3.1.2.21 la cual tiene la capacidad de hidrolizar y liberar el metabolito de la proteína acompañante en el proceso de biosíntesis (ACP) y la producción de un ácido graso de diferente longitud, el cual puede ser llevado a formación de polímero por la enzima *phaC1* para cadena corta, o incluidos en el ciclo de beta oxidación, por lo que se concluyó que el metabolismo central solo debería considerar las rutas presentadas en la Gráfica 4.



Gráfica 4. Vías metabólicas en *B. cepacia* para la producción de PHB y crecimiento.

Adicional a la curación manual de la red del metabolismo central se hicieron balances macromoleculares (proteínas, carbohidratos, lípidos, ARN y ADN) ver Anexo 1, estos balances se basaron en la composición molar de cada compuesto como, aminoácido, monosacárido, fosfolípido y bases nucleotídicas que se encuentran en la formación de una mol de Biomasa.

Los balances macromoleculares permitieron calcular la contribución molar de cada metabolito precursor de los compuestos mencionados en la formación de biomasa. Para esto se estudiaron las vías metabólicas involucradas en la formación de los compuestos analizados, lo que llevo a la inclusión de nuevas reacciones en la matriz estequiométrica principal. Sabiendo que el modelo se basa en el análisis de la distribución del carbono por las vías que constituyen el metabolismo central, los balances macromoleculares y la formulación de la ecuación de biomasa se deben centrar en el seguimiento del carbono y en el análisis de las reacciones que forman aminoácidos y polímero (PHB).

Cada balance fue analizado por matrices binarias,  $G$ , específicas para cada grupo de macromoléculas y se calculó el porcentaje molar a partir del peso molecular (ver Anexo 1). Por otro lado, para poder construir una ecuación de biomasa que se acople al modelo, fue necesario incluir los metabolitos involucrados en la formación de los aminoácidos presentes en la matriz, a partir de operaciones matriciales se logró calcular el coeficiente estequiométrico de cada compuesto en la reacción de formación de una mol de Biomasa. Cabe mencionar que para esta ecuación se incluyeron cofactores como NADH, NADPH aunque estos no fueron incluidos en la matriz para el análisis de flujos metabólicos, debido que este se basó en la distribución de carbono. Adicionalmente, se estima el CO<sub>2</sub> teórico producido; y experimentalmente, esta producción se cuantifica con la medición de CO<sub>2</sub> por medio de un sensor en la salida de gases del birreactor.

Así, la matriz de la red completa ( $S$ ), la dimensión de la matriz para la formación de biomasa ( $G$ ) depende de las reacciones y los metabolitos involucrados:

$$G = G_{n \times m}$$

donde  $n$  son las reacciones formadoras de los metabolitos precursores de biomasa y  $m$  son los metabolitos precursores.

Los coeficientes estequiométricos calculados para cada metabolito involucrado en la formación de biomasa se reportan en la siguiente tabla. Los cálculos para la obtención de esta ecuación se encuentran en el Anexo1.

*Tabla 3. Composición de la Biomasa a partir de balances macromoleculares basados en la composición molar teórica de aminoácidos de la cepa parental B. cenocepacia J2315.*

<b>Compuesto</b>	<b>Coefficiente Estequiométrico</b>
$\beta$ -Glucosa-6- fosfato[c]	-0.0007
3- Fosfo-D-glicerato[c]	-0.0228
NADH[c]	-0.0286
Fosfo-enol-piruvato [c]	-0.0024
NADPH[c]	-0.4057
CO <sub>2</sub> [c]	0.0331
D- ribulosa-5- fosfato [c]	- 0.0062
D- eritrosa-4- fosfato [c]	- 0.0012
Oxalacetato[c]	- 0.0156
Alfa-cetoglutarato[c]	- 0.0411
Acetoacetyl CoA [c]	- 0.1799
Acetyl CoA[c]	- 0,0884
O <sub>2</sub> [c]	- 0.0100
ATP	- 0.3128

### 2.3.2 Construcción de la matriz estequiométrica

La matriz estequiométrica está compuesta de 55 metabolitos y 59 reacciones linealmente independientes. La curación manual de la matriz, como se mencionó en el inicio, se basó en diferentes bases de datos, las cuales quedan referenciadas

en el Anexo 1. El listado de reacciones del metabolismo central se puede observar en la Tabla 4.

Debido a que el polímero es un producto intracelular, que a su vez participa como un metabolito en un ciclo activo de depolimerización y que su peso molecular no es constante, los balances alrededor de este componente son complejos y requieren una formulación especial. La producción del polímero se dividió en tres pasos (ecuaciones R0032 a R0034) en el primer paso se cuantifica el polímero acumulado, el segundo paso transforma el polímero intracelular (citoplasmático) en extracelular, lo que permite su inclusión en el MFA como un flujo medido, y en el último se cuantifica el polímero que se consume por la depolimerasa (phaZ).

Para controlar la imposibilidad de un balance molar de polímero, en estas reacciones se emplean coeficientes derivados de un balance másico: cada mol de hidroxibutanoil consumido en la R0032 adiciona 86 gramos al polihidroxibutirato(c) que se puede transformar en polímero extracelular -polihidroxibutirato(e)- o puede depolimerizarse. En la práctica, el polímero siempre permanece intracelularmente, pero para incluir la acumulación de polímero como una medición para el MFA se modela de esta forma. En la depolimerización, para la formación de una mol de hidroxibutanoiloxobutanoato se consumen 190 g de polihidroxibutirato(c).

*Tabla 4. Reacciones en la red metabólica para crecimiento y producción de PHB en B. cepacia.*

ID	Reacciones
R0001	ACIDO_HEXADECANOICO[e]<=>ACIDO_HEXADECANOICO[c]
R0002	ACIDO_HEXADECANOICO[c]+COA+ATP<=>ACIDO_HEXADECANOICO_COA[c]+AMP[c]+DiP[c]
R0003	ACIDO_HEXADECANOICO_COA[c]+FAD[c]<=>TRANS-2_3-DIHIDROHEXADECANOIL_COA [c]+FADH2[c]
R0004	TRANS-2_3-DIHIDROHEXADECANOIL_COA[c]+H2O[c]<=>S-3-HIDROXIHEXADECANOIL_COA[c]
R0005	S-3-HIDROXIHEXADECANOIL_COA[c]+NAD[c]<=>3-OXOHEXADECANOIL_COA[c]+NADH[c]+H[c]

R0006	3-OXOHEXADECANOIL_COA[c]+COA[c]<==>TETRADECANOIL_COA[c]+ACETIL_COA[c]
R0007	TETRADECANOIL_COA[c]+FAD[c]<==>TRANSTETRADEC-2-ENOIL_COA[c]+FADH2[c]
R0008	TRANSTETRADEC-2-ENOIL_COA[c]+H2O[c]<==>S-3-HIDROXITETRADECANOIL_COA[c]
R0009	S-3-HIDROXITETRADECANOIL_COA[c]+NAD[c]<==>3-OXOTETRADECANOIL_COA[c]+NADH[c]+H[c]
R0010	3-OXOTETRADECANOIL_COA[c]+COA[c]<==>LAUROIL_COA[c]+ACETIL_COA[c]
R0011	LAUROIL_COA[c]+FAD[c]<==>2-TRANSDODECENOIL_COA[c]+FADH2[c]
R0012	2-TRANSDODECENOIL_COA[c]+H2O[c]<==>S-3-HIDROXIDODECANOIL_COA[c]
R0013	S-3-HIDROXIDODECANOIL_COA[c]+NAD[c]<==>3-OXODODECANOIL_COA[c]+NADH[c]+H[c]
R0014	3-OXOTETRADECANOIL_COA[c]+COA[c]<==>DECANOIL_COA[c]+ACETIL_COA[c]
R0015	DECANOIL_COA[c]+FAD[c]<==>TRANS-2-DECENOIL_COA[c]+FADH2[c]
R0016	TRANS-2-DECENOIL_COA[c]+H2O[c]<==>S-3-HIDROXIDECANOIL_COA[c]
R0017	S-3-HIDROXIDECANOIL_COA[c]+NAD[c]<==>3-OXODECANOIL_COA[c]+NADH[c]+H[c]
R0018	3-OXODECANOIL_COA[c]+COA[c]<==>OCTANOIL_COA[c]+ACETIL_COA[c]
R0019	OCTANOIL_COA[c]+FAD[c]<==>TRANS-2-OCTANOIL_COA[c]+FADH2[c]
R0020	TRANS-2-OCTANOIL_COA[c]+H2O[c]<==>S-3-HIDROXIOCTANOIL_COA[c]
R0021	S-3-HIDROXIOCTANOIL_COA[c]+NAD[c]<==>3-OXOOCTANOIL_COA[c]+NADH[c]+H[c]
R0022	3-OXOOCTANOIL_COA[c]+COA[c]<==>HEXANOIL_COA[c]+ACETIL_COA[c]
R0023	HEXANOIL_COA[c]+FAD[c]<==>TRANSHEXANOIL_COA[c]+FADH2[c]
R0024	TRANSHEXANOIL_COA[c]+H2O[c]<==>S-3-HIDROXIHEXANOIL_COA[c]
R0025	S-3-HIDROXIHEXANOIL_COA[c]+NAD[c]<==>3-OXOHEXANOIL_COA[c]+NADH[c]+H[c]
R0026	3-OXOHEXANOIL_COA[c]+COA[c]<==>BUTANOIL_COA[c]+ACETIL_COA[c]
R0027	BUTANOIL_COA[c]+FAD[c]<==>CROTONIL_COA[c]+FADH2[c]
R0028	CROTONIL_COA[c]+H2O[c]<==>S-3-HIDROXIBUTANOIL_COA[c]
R0029	S-3-HIDROXIBUTANOIL_COA[c]+NAD[c]<==>ACETOACETIL_COA[c]+NADH[c]+H[c]
R0030	ACETOACETIL_COA[c]+COA[c]<==>2ACETIL_COA[c]
R0031	ACETOACETIL_COA[c]+NADPH[c]+H[c]<==>R-3-HIDROXIBUTANOIL_COA[c]+NADP[c]

R0032	R-3-HIDROXIBUTANOIL_COA<==>POLI-B-HIDROXIBUTIRATO[c]+COA
R0033	POLI-B-HIDROXIBUTIRATO[c]<==>POLI-B-HIDROXIBUTIRATO[e]
R0034	POLI-B-HIDROXIBUTIRATO[c]+H2O[c]<==>R-3-HIDROXIBUTANOILOXIBUTANOATO[c]
R0035	R-3-HIDROXIBUTANOILOXIBUTANOATO[c]+H2O[c]<==>2R-3-HIDROXIBUTANOATO[c]
R0036	R-3-HIDROXIBUTANOATO[c]+NAD[c]<==>ACETOACETATO[c]+NADH[c]+H[c]
R0037	ACETOACETATO[c]+SUCCINIL_COA[c]<==> SUCCINATO[c]+ACETOACETIL_COA[c]
R0038	ACETIL_COA[c]+H2O[c]+OXALACETATO[c]<==> CITRATO+COA
R0039	CITRATO[c]+NADP[c]<==>OXALOSUCCINATO[c]+NADPH[c]+H[c]
R0040	OXALOSUCCINATO[c]<==>2-OXOGLUTARATO[c]+CO2[c]
R0041	2-OXOGLUTARATO[c]+COA[c]+NAD[c]<==>SUCCINIL_COA[c]+CO2[c]+NADH[c]+H[c]
R0042	SUCCINIL_COA+ORTOFOSFATO+ADP<==>SUCCINATO+ATP+COA
R0043	SUCCINATO[c]QUINONA[c]<==>FUMARATO[c]+HIDROQUINONA[c]
R0044	FUMARATO[c]+H2O[c]<==>S-MALATO[c]
R0045	S-MALATO[c]+QUINONA[c]<==>OXALACETATO[c]+HIDROXIQUINONA[c]
R0046	OXALACETATO[c]+GTP[c]+<==>FOSFOENOLPIRUVATO[c]+CO2[c] +GDP[c]
R0047	FOSFOENOLPIRUVATO[c]+H2O[c]<==>3-FOSFO-D-GLICERATO[c]
R0048	3-FOSFO-D-GLICERATO[c]+ATP[c]<==>3-FOSFO-D-GLICEROILFOSFATO[c]+ADP[c]
R0049	3-FOSFO-D-GLICEROILFOSFATO[c]+NADH[c]+H[c]<==>D-GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO[c]+ORTOFOSFATO[c]+NAD[c]
R0050	2D-GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO[c]<==>D-FRUCTOSA-1_6-BIFOSFATO[c]
R0051	D-FRUCTOSA-1_6-BIFOSFATO[c]+H2O[c]<==>D-FRUCTOSA-6-FOSFATO[c]+ORTOFOSFATO[c]
R0052	D-FRUCTOSA-6-FOSFATO[c]<==>D-GLUCOSA-6-FOSFATO[c]
R0053	D-GLUCOSA-6-FOSFATO[c]+2NADP[c]+H2O[c]<==>PENTOSA-5-FOSFATO[c]+CO2[c]+2NADPH[c]+H[c]
R0054	2PENTOSA-5-FOSFATO<==>SEUDOHEPTULOSA-7-FOSFATO+GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO
R0055	SEUDOHEPTULOSA-7-FOSFATO+GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO<==>D-FRUCTOSA-6-FOSFATO+ERITROSA-4-FOSFATO



R0056	PENTOSA-5-FOSFATO+ERITROSA-4-FOSFATO<==>D-FRUCTOSA-6-FOSFATO+GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO
R0057	0.0007D-GLUCOSA-6-FOSFATO[c]-0.0228(3-FOSFO-D-GLICERATO[c])-0.0286NADH[c]-0.0024FOSFOENOLPIRUVATO[c]-0.4057NADPH[c]-0.0062D-PENTOSA-5-FOSFATO[c]-0.0012D-ERITROSA-4-FOSFATO[c]-0.0156OXALACETATO[c]-0.0411(2-OXOGLUTARATO[c])-0.1799ACETOACETATO[c]-0.0884ACETIL_COA[c]-0.0100O2[c]-0.3128ATP[c]==>Biomasa[c]+0.0331CO2[c]
R0058	CO2[c]<==>CO2[e]
R0059	Biomasa[c]<==>Biomasa[e]

### 2.3.3 Caracterización del comportamiento de la cepa

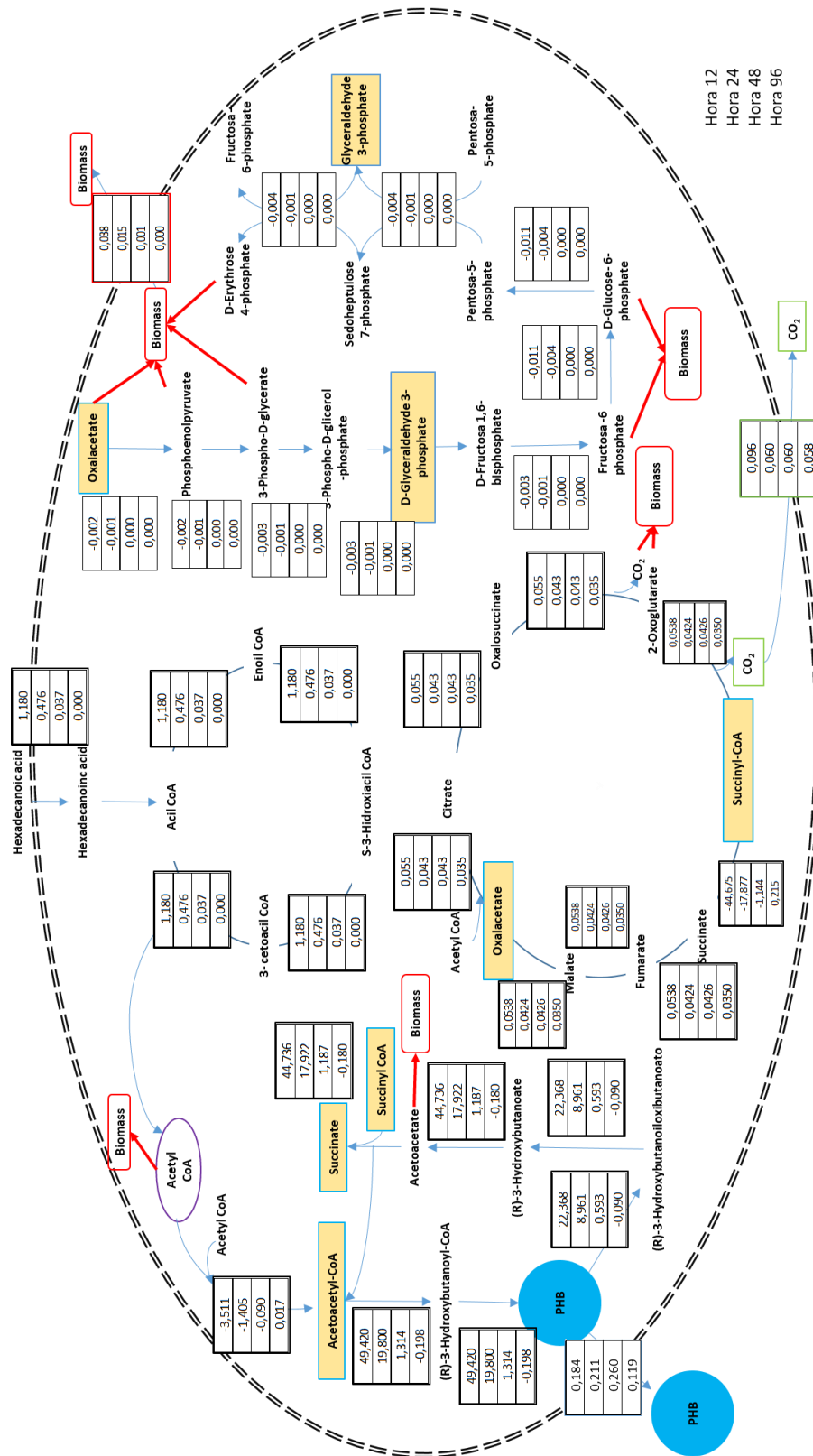
Considerando que el comportamiento de la cepa debe ser caracterizado en instantes específicos del proceso, en los cuales se pueda identificar claramente la fase metabólica en que se encuentra, se partió de los perfiles de concentración de biomasa, de tasa específica de crecimiento y de la estimación de las unidades formadoras de colonia (UFC) para una fermentación lote prolongada (96 h) iniciando con las condiciones consideradas óptimas para la operación en este régimen (20 g/L de ácidos grasos, 2.5g/L de Sulfato de amonio). El análisis de estos perfiles, Gráfica 9, permite observar que la cepa pasa inicialmente por un periodo de crecimiento exponencial, posteriormente por una fase estacionaria y finalmente hay un periodo con leve reducción de la biomasa. Los periodos y el instante que se considera característico para cada fase se presentan en la Tabla 5.

*Tabla 5. Periodos e instante característico para cada fase del metabolismo.*

<b>Fase</b>	<b>Periodo (inicio – fin)</b>	<b>Instante característico</b>
Adaptación	Hora 0 – hora 4	0 h
Exponencial	Hora 4 – hora 14	12 h
Estacionaria	Hora 14 – hora 54	24 y 48 h
Muerte	Hora 54 – hora 96	96 h

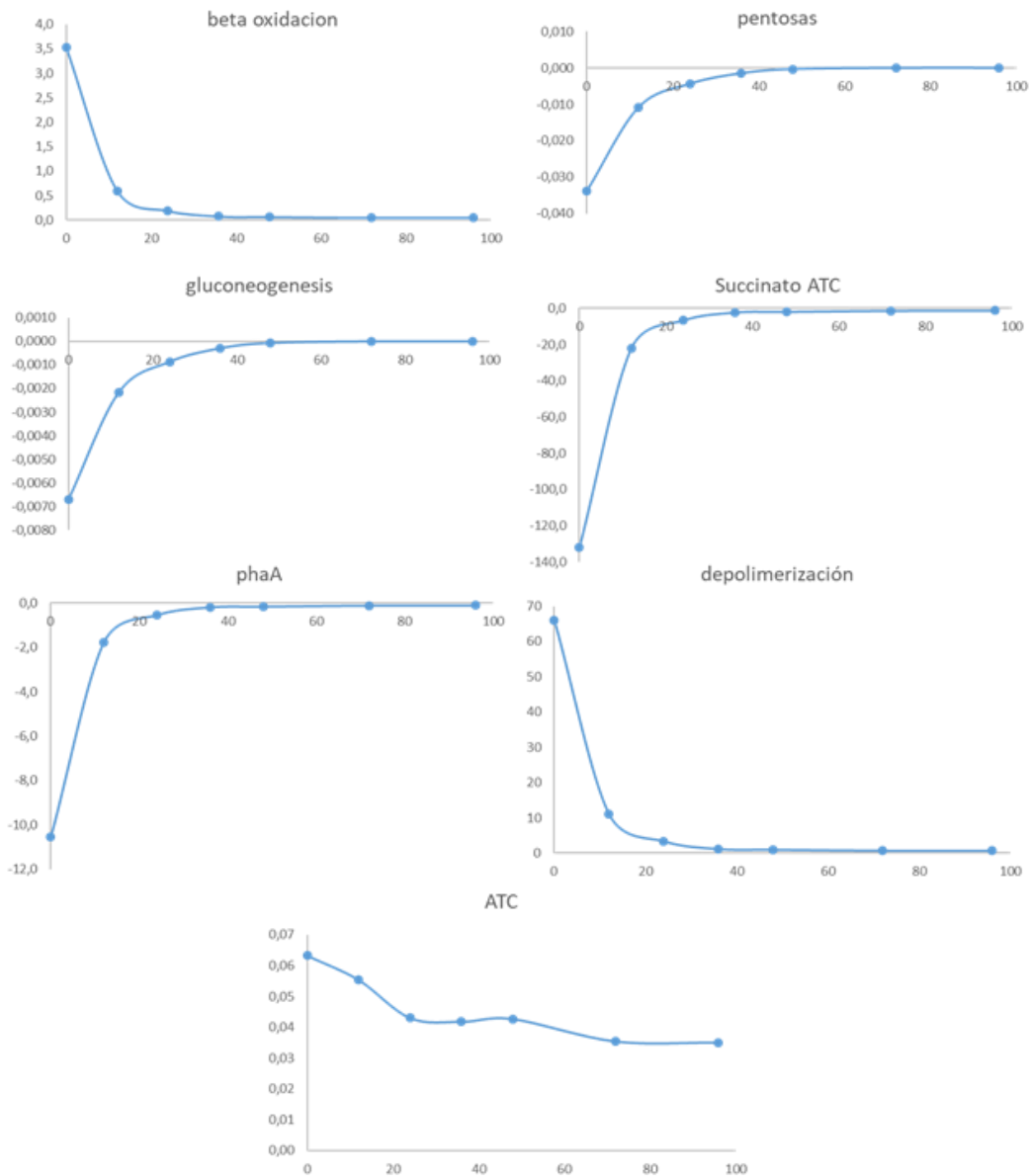
Aprovechando el trabajo realizado en los balances macromoleculares y la matriz estequiométrica se logró realizar un análisis de flujo linear, la matriz de 59 reacciones y 55 metabolitos, con la medición de 4 flujos extracelulares (tasas específicas de consumo y producción) se convierte en un sistema de ecuaciones bien especificado, lo que permite la estimación de todos los flujos y confirma la principal hipótesis de este tipo de análisis: los flujos intracelulares pueden ser estimados con base en la medición de suficientes flujos extracelulares y el conocimiento de las transformaciones bioquímicas que pueden ocurrir por el metabolismo (Wang *et al.*, 2006).

El cálculo de los flujos intracelulares se realizó por separado para cada uno de los instantes que se definieron para las distintas fases del metabolismo, con el fin de caracterizar el metabolismo de *Burkholderia cepacia* en sus 4 estadios de crecimiento, y determinar las variaciones de los flujos intracelulares en función de las diferentes condiciones nutricionales y metabólicas. Los principales resultados de los vectores calculados en los diferentes instantes se muestran en el Gráfico 5. Las operaciones matriciales se realizaron en Matlab y se registran en el Anexo 2.



Gráfica 5. Flujos metabólicos estimados en los cuatro instantes de la fermentación.

Una observación importante es que los flujos de una vía metabólica tienen tendencias similares, esto es completamente consistente pues la suposición de estado pseudo-estacionario que implica concentración constante de los metabolitos por lo que la variación en los flujos debe ser consistente para garantizar esta condición. Por lo anterior, el análisis de las tendencias se agrupó por vías, los flujos que presentan cambios importantes se graficaron para ser analizados individualmente (Gráfica 6).



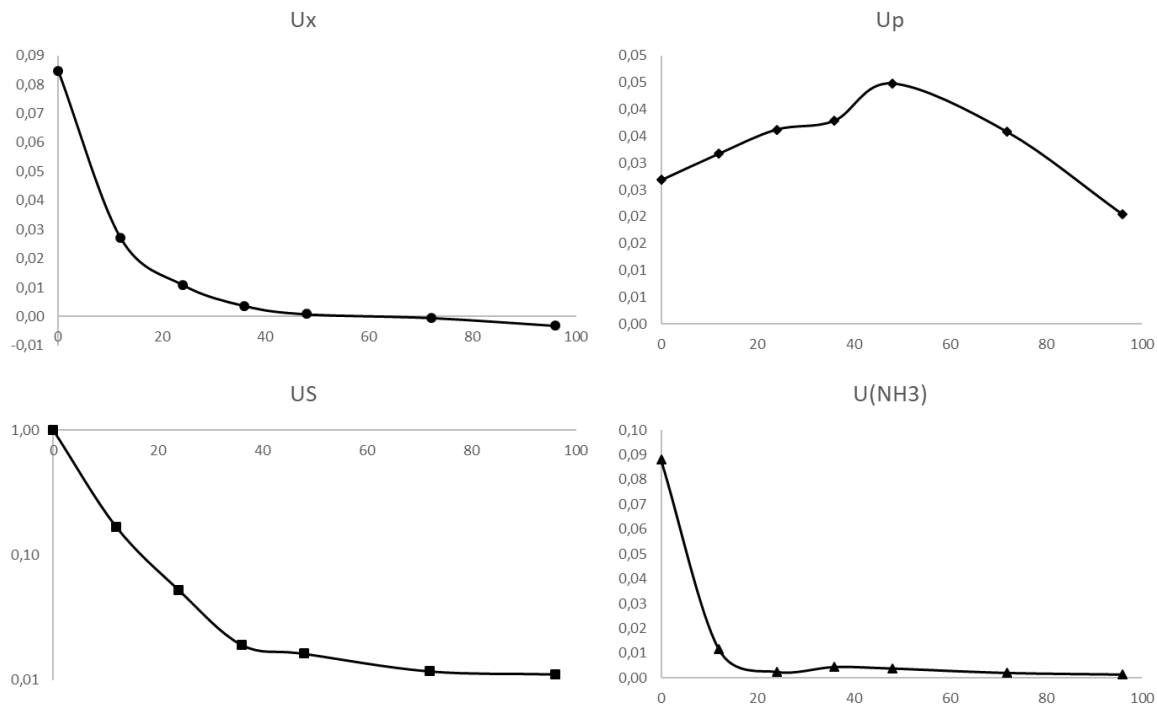
Gráfica 6. Tendencias para los flujos calculados (agrupados por vías metabólicas).

En la Gráfica 6 se observa que durante la fase exponencial de crecimiento (caracterizada por el instante  $t = 12$  h) el flujo los flujos en las vías de  $\beta$ -oxidación, depolimerización, ciclos de los ácidos tricarbóxicos (ATC) presentan los mayores valores debido a que el metabolismo está direccionado en con mayor intensidad hacia la producción de biomasa, mientras que las vías de gluconeogénesis y pentosas fosfato, así como las reacciones de la phaA (reacción de formación de acetyl-CoA al final de la  $\beta$ -oxidación) y producción de succinato en la vía ATC operan con su máximo valor pero en dirección inversa, lo anterior se debe a que el microorganismo o dispone de azúcares para metabolizar y estas vías deben operar generando metabolitos necesarios para la formación de biomasa.

Por su parte, en la fase estacionaria ( $t = 24$  h) se observa que todos estos flujos mantienen su dirección, pero reducen notablemente su magnitud debido a la reducción en la tasa de metabolización. Finalmente, en los instantes de la fase estacionaria y muerte ( $t = 48$ h y 96h) del análisis la mayoría de los flujos se hacen muy cercanos a cero, especialmente en las vías que están involucradas en la formación de biomasa, al no tener una alimentación, este tipo de cultivos tipo lote, *Burkholderia cepacia* entra en una fase estacionaria temprana, así que las tasas a partir de la hora 24 se mantienen bajas y cercanas a cero.

#### 2.3.4 Estimación de parámetros de correlación.

Durante la identificación de posibles parámetros de correlación se considera que las concentraciones de los metabolitos o los cocientes de estas, que presenten una tendencia semejante a la de alguna de las tasas específicas y se mantenga esta similitud en los diferentes instantes analizados, son candidatos promisorios. Con las tasas calculadas a partir de las mediciones en los cultivos realizados (Gráfica 7) y las concentraciones de metabolitos medidas por HPLC en los distintos instantes del proceso, datos reportados en la Tabla 6 y detallados en el Anexo 4, sección Protocolos 7, numeral 7.5.), se logró hacer un análisis cualitativo.



Grafica 7. Tasas específicas para crecimiento, producción de PHB, consumo de sustrato y consumo de amonio.

Tabla 6. Variables  $U_i$  en los diferentes instantes, concentración de metabolitos intracelulares en  $\mu\text{mol/mL}$ .

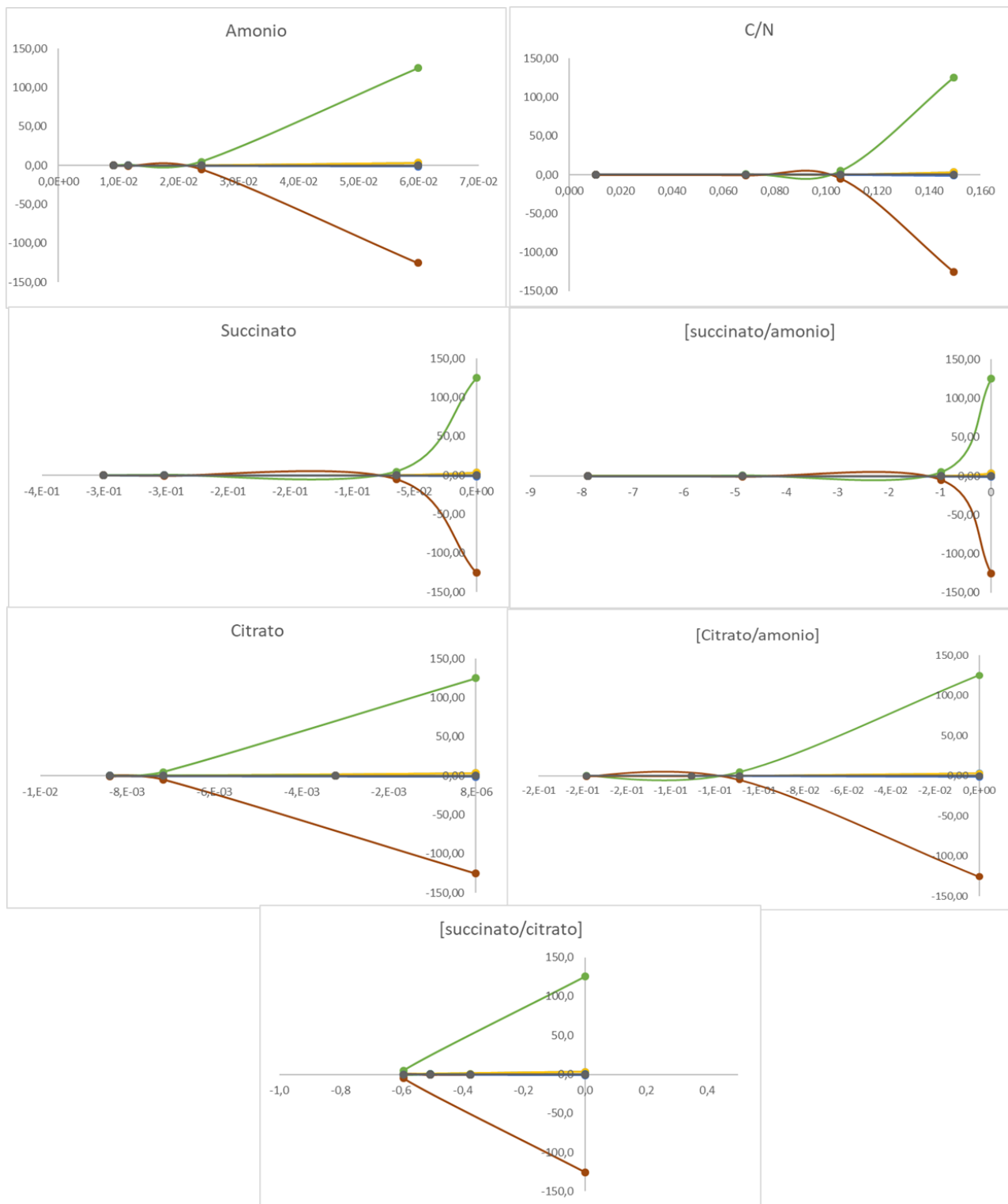
hora	[amonio] U1	[Citrato] U2	[Succinato] U3	[citrato/ amonio] U4	[succinato /amonio] U5	[succinato/ citrato] U6	C/N U7
0	0.15	0	0	0	0	0.00	0.47
12	0.10	0	0	0	0	0.00	0.36
24	0.09	0	0	0	0	0.00	0.32
36	0.08	0	0	0	0	0.00	0.27
48	0.07	0.01	0.06	0.11	0.98	0.59	0.22
72	0.05	0.02	0.32	0.29	5.83	1.10	0.15
96	0.04	0.02	0.62	0.42	13.71	1.48	0.14

Tabla 7. Variables de respuesta,  $Y_i$ , tasas específicas medidas (mmol/gr biomasa seca h), flujos intracelulares (mmol/gr biomasa seca h).

hora	$\mu_s$ (V1) Y1	$\mu_p$ (V33) Y2	$\mu_{CO_2}$ (v58) Y3	$\mu_x$ (V59) Y4	phaA (V30) Y5	Succinato phaZ, (V37) Y6	Citrato ATC, (V38) Y7	Succinato ATC (V42) Y8	PEP (V46) Y9
0	3.531	0.16	0.085	3.67	-10.56	132.10	0.063	-132.04	-0.0067
12	0.598	0.18	0.097	1.18	-1.77	22.13	0.055	-22.08	-0.0022
24	0.186	0.21	0.081	0.48	-0.54	6.76	0.043	-6.71	-0.0009
36	0.068	0.22	0.082	0.16	-0.18	2.34	0.042	-2.30	-0.0003
48	0.058	0.26	0.085	0.04	-0.15	1.96	0.043	-1.91	-0.0001
72	0.042	0.21	0.071	0.00	-0.11	1.40	0.035	-1.36	0.0000
96	0.039	0.12	0.070	0.00	-0.10	1.31	0.035	-1.28	0.0000

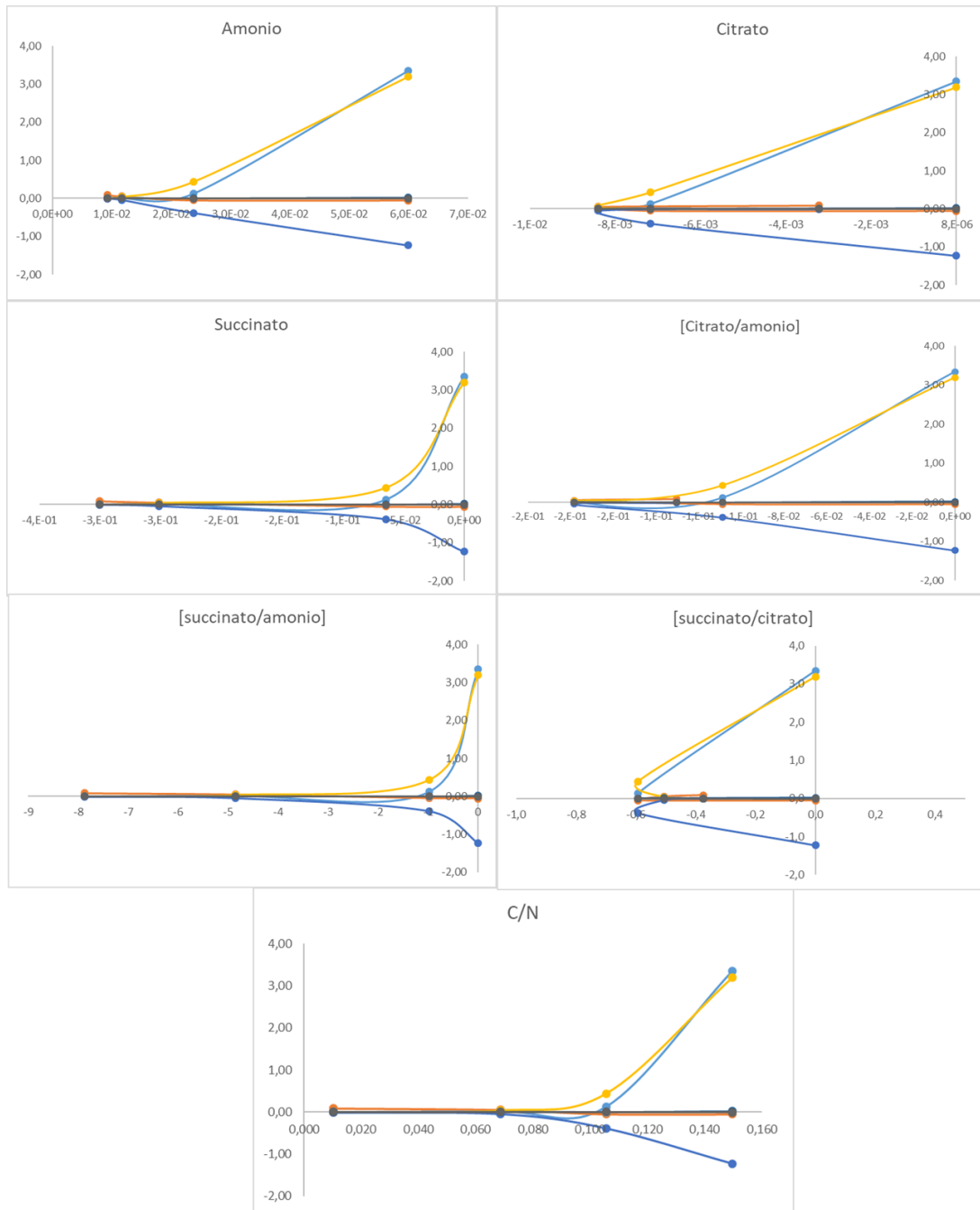
El primer análisis de correlación se evaluó por graficas de dispersión (Gráfica 8), analizando cada una de las  $U_i$  por separado, con las  $Y_i$  calculadas.

a.





b.



Gráfica 8. Análisis de correlación entre las variables controladas y controlantes, a) análisis de todas las variables  $Y_i$ , b) análisis excluyendo  $Y_6, Y_8$ . (líneas café  $Y_6$  succinato por *phaZ*, verde  $Y_8$  succinato ATC, línea naranja  $Y_2 \mu p$ , línea azul claro  $Y_1 \mu s$ , línea azul oscuro  $Y_5 phaA$ , línea amarilla  $Y_4 \mu x$ , línea gris  $Y_3 \mu CO_2$ , línea gris oscura  $Y_7$  Citrato ATC)

Con este tipo de análisis se busca encontrar correlaciones entre los metabolitos calculados con algunas tasas medidas experimentalmente y otras estimadas por el AFM, por lo que cada gráfica muestra en el eje horizontal la concentración de un metabolito específico, el cociente calculado entre dos concentraciones o la relación carbono/nitrógeno, esta última se incluye como posible variable controlante porque es considerada determinante para la producción de este tipo de polímeros; mientras que en el eje vertical se encuentran las tasas específicas y las tasas para algunos flujos intracelulares. Este análisis cualitativo permite evidenciar como los flujos de succinato son los que presentan las mayores correlaciones con la concentración de todos los metabolitos medidos, sus cocientes, la fuente de nitrógeno y la relación C/N, tanto para consumo como para formación ( $Y_8$ ,  $Y_6$  respectivamente), seguidos de la velocidad específica de crecimiento  $Y_4$  y producción  $Y_2$  lo que es de importancia porque son los flujos extracelulares medibles, las correlaciones menos significativas fueron las de producción de citrato por ciclo de ácidos tricarbónicos y la velocidad de formación de  $\text{CO}_2$ . Por lo tanto, se puede estimar que las concentraciones de los metabolitos medidos y sus cocientes tienen algún tipo de control sobre algunas tasas medidas o calculadas que se consideran de importancia en el metabolismo central de *B. cepacia* B27.

El análisis RGA emplea las derivadas parciales de las variables  $\partial Y_i / \partial U_i$ , en el presente trabajo, como aproximación a las derivada ( $\partial Y_i, \partial U_i$ ) se emplearon los deltas ( $\Delta Y_i, \Delta U_i$ ) entre los diferentes instantes analizados (Tabla 7), por lo que se generaron cuatro matrices para los periodos 0-24h, 24-48h, 48-72h, 72-96h; de esta forma, la primera matriz (0-24h) permite analizar la correlación entre el cambio del comportamiento intracelular y el cambio en las tasas específicas cuando el microorganismo pasa de la fase de adaptación a la fase exponencial; la segunda matriz (de 24 y 48 horas) busca relacionar los cambios cuando se pasa de la fase exponencial a la estacionaria; la tercera matriz (de 48 a 72 horas) relaciona los cambios que se puedan generar en la fase estacionaria, la última matriz (de 72 a 96 horas) busca relacionar los cambios generados al pasar de fase estacionaria a una fase de muerte.

Como se mencionó anteriormente la correlación que se observe en estas matrices debe ser consistente en todos los intervalos analizados, las 4 matrices RGA (0-24h, 24-48h, 48-72h, 72-96h), estos resultados se pueden observar en la Tabla 8. Para facilitar la identificación de tendencias las celdas de la tabla presentan diferentes colores e intensidades: color verde cuando el cociente ( $\Delta Y_i/\Delta U_i$ ) presenta signo positivo y rojo cuando el signo es negativo y la intensidad depende del valor absoluto del cociente

El uso de esta metodología evidencia el control que ejercen las concentraciones sobre las velocidades medidas y los flujos calculados. Así como en el análisis de correlación por distribución, se observa que algunas de las concentraciones y cocientes evaluados presentan una relación o control superior sobre los flujos de formación y consumo de succinato  $Y_8$ ,  $Y_6$ , comportamiento que se mantiene en el tiempo para concentración de amonio ( $\Delta U_1$ ) y relación C/N ( $\Delta U_7$ ). Para las concentraciones de los metabolitos medidos no fue posible analizar su correlación con las variables controladas en todos los instantes, debido a que no se detectó su presencia en las fases de adaptación y crecimiento exponencial.

Tabla 8. Resultados del análisis por el método RGA

hora 0 a 24									
	$\Delta Y1$ ( $\mu_s$ )	$\Delta Y2$ ( $\mu_p$ )	$\Delta Y3$ ( $\mu_{co2}$ )	$\Delta Y4$ ( $\mu_x$ )	$\Delta Y5$ phaA	$\Delta Y6$ Suc phaZ	$\Delta Y7$ ATC cit	$\Delta Y8$ Suc atc	$\Delta Y9$ PEP
$\Delta U1$	55.85	-0.91	0.08	53.33	-20.53	2092.8	0.34	-2092.6	-0.10
$\Delta U2$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$\Delta U3$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$\Delta U4$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$\Delta U5$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$\Delta U6$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$\Delta U7$	22.35	-0.37	0.03	21.34	-8.22	837.56	0.14	-837.45	-0.04
Hora 24 a 48									
$\Delta U1$	5.41	-2.09	-0.18	18.43	-16.19	201.74	0.01	-201.75	-0.03
$\Delta U2$	-17.95	6.95	0.59	-61.18	53.74	-669.73	-0.05	669.76	0.11
$\Delta U3$	-1.99	0.77	0.07	-6.78	5.95	-74.20	-0.01	74.21	0.01
$\Delta U4$	-1.18	0.46	0.04	-4.03	3.54	-44.09	0.00	44.09	0.01
$\Delta U5$	-0.13	0.05	0.00	-0.45	0.39	-4.89	0.00	4.89	0.00
$\Delta U6$	-0.22	0.08	0.01	-0.74	0.65	-8.08	0.00	8.08	0.00
$\Delta U7$	1.22	-0.47	-0.04	4.15	-3.65	45.48	0.00	-0.02	-131.67

Hora 48 a 72									
$\Delta U_1$	1.37	4.51	1.22	3.20	-3.79	48.18	0.63	-47.55	-0.01
$\Delta U_2$	-1.90	-6.25	-1.69	-4.43	5.24	-66.73	-0.87	65.87	0.01
$\Delta U_3$	-0.06	-0.21	-0.06	-0.15	0.18	-2.23	-0.03	2.20	0.00
$\Delta U_4$	-0.09	-0.29	-0.08	-0.21	0.25	-3.14	-0.04	3.10	0.00
$\Delta U_5$	0.00	-0.01	0.00	-0.01	0.01	-0.12	0.00	0.11	0.00
$\Delta U_6$	-0.03	-0.10	-0.03	-0.07	0.09	-1.11	-0.01	1.09	0.00
$\Delta U_7$	0.23	0.76	0.21	0.54	-0.64	8.15	0.11	-8.05	0.00
hora 72 a 96									
$\Delta U_1$	0.24	9.69	0.08	0.00	-0.70	8.81	0.04	-8.77	0.00
$\Delta U_2$	-0.68	-27.72	-0.22	0.00	2.00	-25.20	-0.11	25.09	0.00
$\Delta U_3$	-0.01	-0.30	0.00	0.00	0.02	-0.27	0.00	0.27	0.00
$\Delta U_4$	-0.02	-0.68	-0.01	0.00	0.05	-0.62	0.00	0.62	0.00
$\Delta U_5$	0.00	-0.01	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.00	0.01	0.00
$\Delta U_6$	-0.01	-0.24	0.00	0.00	0.02	-0.22	0.00	0.21	0.00
$\Delta U_7$	0.21	8.61	0.07	0.00	-0.62	7.83	0.03	-7.80	0.00

Si, se llegara a ver el comportamiento bacteriano en dos fases, una dedicada al crecimiento y otra a la producción, como un concepto “*feast and famine*”. Se podría hacer un análisis por separado. Siendo así, la concentración de citrato  $\Delta U_2$  tiene un correlación con el flujo  $\Delta Y_2$  que es la velocidad de producción de polímero que se mantiene en la fase estacionaria y muerte y tiene un comportamiento contrario con el flujo  $\Delta Y_4$  que es la velocidad de crecimiento llegando a datos de ceros en la fase de muerte, aunque este comportamiento no va de acuerdo con la condición de mantenerse en el tiempo para el caso de crecimiento si lo hace para la producción, lo cual podría ser de importancia para incluirlo en el modelo matemático.

Otro cociente que puede llegar a usarse como parámetro de correlación sería la relación C/N, esta presenta cierto tipo de control sobre la gran mayoría de flujos evaluados, evidenciando valores superiores en la primera fase de crecimiento y disminuyendo a medida que pasa el tiempo de cultivo. Como se mencionó anteriormente si se trabaja en el concepto de “*feast and famine*” en el modelo matemático, esta variable podría definir la condición en que se pasa del periodo *feast* al *famine* o viceversa.

## 2.4 Conclusiones

El conocimiento detallado de las rutas metabólicas involucradas en la producción de PHB y crecimiento bacteriano para *B. cepacia B27* permite generar una serie de datos cuantitativos que pueden ser usados para identificar posibles correlaciones entre los metabolitos identificados como nodos de las vías metabólicas y los flujos extracelulares medidos e intracelulares calculados, para poder incluirlos en el modelo matemático a desarrollar.

La medición de múltiples flujos extracelulares permitió la cuantificación de los flujos intracelulares por MFA lineal sin el uso de balances de cofactores, por lo que los resultados de este análisis son bastante confiables. La estimación de la distribución de la fuente de carbono entre las diferentes vías permitió analizar en detalle el comportamiento del metabolismo en sus diferentes fases, para buscar dependencias entre los parámetros de correlación propuestos y el comportamiento del metabolismo.

El análisis del comportamiento del metabolismo y de las correlaciones permitió concluir que el modelo para *B. cepacia B27* debe considerar dos fases, una en la que el flujo de carbono se direcciona principalmente para crecimiento celular y otra en que la cepa ajusta su maquinaria para aumentar la producción de polímero. Así mismo, se identificó que la transición entre estas dos formas de operación para el metabolismo depende de la relación C/N, Adicionalmente, se propone que con la disminución de la velocidad de drenaje de acetil-CoA hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos se favorece la acumulación de ácidos orgánicos y su excreción al medio. En especial la concentración de citrato presenta una correlación que se mantiene en el tiempo con la producción de PHB.



## Capítulo 3. Formulación del modelo matemático

Este capítulo presenta el trabajo desarrollado para alcanzar el segundo y tercer objetivo específico de la presente tesis y parte de la siguiente hipótesis: a partir del uso de un modelo matemático se podrá predecir el comportamiento de *Burkholderia cepacia* B27 durante el proceso de producción de PHA, considerando las alteraciones metabólicas que ocurren durante el proceso.

El modelamiento de Bioprocesos es una herramienta útil para soportar el desarrollo de diferentes tareas, entre ellas: a) puede ser la base para una adecuada optimización y la aplicación de técnicas de control, b) puede proveer la información necesaria acerca de las características del sistema como cinética de crecimiento, termodinámica y balances del bioproceso escogido, por lo tanto, se considera la mejor técnica para predecir la eficiencia del proceso (Caramihai *et al.*, 2013).

Las principales características del modelo matemático para un sistema biológico fueron definidas por Edwards y Wilke en 2000: a) debe ser capaz de representar todas las fases del cultivo; b) debe ser lo suficientemente flexible para aproximar diferentes tipos de datos sin la inserción de distorsiones significativas; c) debe ser continuamente derivable; d) debe ser fácil de operar, una vez que los parámetros sean evaluados; e) cada parámetro del modelo debe tener un significado físico y debe ser fácil de evaluar. En la siguiente sección, se definen algunas características y clasificaciones de los modelos matemáticos para procesos biotecnológicos.

### 3.1 Antecedentes

#### 3.1.1 Modelos estructurados.

En estos modelos la fase biótica del proceso es vista como un componente homogéneo, pero este provee información acerca del estado fisiológico de las células, su composición y adaptación regulatoria al ambiente. De acuerdo con este concepto la masa celular es estructurada en varios compuestos intracelulares y grupos funcionales los cuales están conectados entre sí y con el ambiente por medio de flujos de materia e información.

Los modelos estructurados pueden ser: modelos multi-compartimentos, modelos genéticamente estructurados y modelos bioquímicamente estructurados (Caramihai *et al.*, 2013). Existen algunos modelos estructurados para la producción de PHA que se han desarrollado utilizando *R. eutropha* (Khanna y Srivastava, 2006; en Padwardhan y Srivastava, 2007). En estos se hacen las siguientes suposiciones:

- La biomasa se divide en dos componentes: la biomasa residual (libre de polímero) y el componente inerte. La primera es catalíticamente activa y está formada por proteínas, ácidos nucleicos, etc.; mientras que el segundo componente está formado por el polímero propiamente dicho.
- La fuente de carbono está en exceso para todos los procesos metabólicos, y el nitrógeno es el nutriente limitante que afecta de manera compleja la producción de PHB.

La necesidad de desarrollar un modelo estructurado para el proceso de producción de PHA por *B. cepacia* se deriva de los resultados de estudios previos desarrollados por el grupo de investigación. Estos estudios han dado como resultado modelos tipo caja negra; recientemente, Méndez en el 2016, desarrolló un modelo para a optimización del proceso en lote alimentado. A partir de los resultados experimentales se observó que el proceso no se puede predecir satisfactoriamente mediante un modelo caja negra convencional, por lo que se incluyó un parámetro variable para cuantificar el consumo de nitrógeno, debido a



que las observaciones indicaron que la eficiencia en el uso de este sustrato (cuantificada con el coeficiente de rendimiento biomasa/nitrógeno:  $Y_{x/Sn}$ ) varía dependiendo de la abundancia de los nutrientes. Esos resultados nos llevan a suponer que el modelo debe considerar cambios metabólicos que ocurren a lo largo del proceso, posiblemente, como consecuencia de cambios en las condiciones medio ambientales.

### 3.1.2 Modelamiento dinámico del proceso en abundancia y hambruna (feast & famine).

Para entender, diseñar y optimizar un proceso de feast & famine es necesario tener un modelo que pueda describir los cambios biológicos y fisicoquímicos en el sistema. Este tipo de modelo puede ser usado con el fin de ajustar datos experimentales para identificar características cinéticas y valores de parámetros estequiométricos que algunas veces dificultan la simulación en función de las variables operacionales. En la actualidad existen un sin número de modelos para fermentación que consideran el concepto de feast & famine, sin embargo, presentan algunas deficiencias como la carencia de descripción de la dinámica que ocurre entre las fases, el cambio entre ellas y además tienden a ser modelos generalizados con bajo poder de predicción (Beun *et al.*, 2002; en Tamis, 2014).

En los modelos con poder de predicción, las fases de feast & famine se describen con dos sets de ecuaciones diferenciales que describen las cinéticas del proceso. Durante la fase de feast, cuando hay abundancia de nutrientes, el crecimiento bacteriano y la velocidad de consumo de sustrato se pueden describir con una ecuación de Monod. Ya en la fase famine, donde el metabolismo está direccionado a la producción de PHA, esta producción se ha formulado como estequiométricamente dependiente de la velocidad de consumo de sustrato. Adicional a la consideración de la estructura matemática del modelo es importante considerar que la acumulación de PHB puede deberse a un sin número de desbalances nutricionales que obligan a una redistribución del flujo de carbono y a la disminución en las velocidades en algunas rutas metabólicas, desfavoreciendo

el crecimiento celular. Esa redistribución implica cambios importantes en el comportamiento del microorganismo, lo que justifica un nuevo set de ecuaciones para lograr la predicción (Van Aalst *et al.*, 1997) pero es lógico esperar que la transición entre las fases, que se relaciona con el cambio del set de ecuaciones que se usa para la predicción, no sea un proceso instantáneo pues para esta transición el microorganismo debe ajustar su maquinaria metabólica.

## **3.2 Metodología**

### **3.2.1 Definición de la estructura del modelo.**

La estructura del modelo matemático debe considerar los fenómenos macroscópicos identificados en las fermentaciones (limitaciones e inhibiciones por sustratos y productos, consumo para mantenimiento, periodos de adaptación, etc), así como el conocimiento de las fases del metabolismo y su relación con los factores de correlación, que fueron identificados con los análisis del capítulo 2.

Considerando las observaciones de Méndez (2016) de que el rendimiento del metabolismo no es constante en todo el proceso, se hace necesario desarrollar corridas experimentales que permitan analizar los cambios que se presentan en el comportamiento de la cepa. Para definir las fases de crecimiento bacteriano se realizaron diferentes cultivos en lote con el fin de conocer el comportamiento en el tiempo. Estos cultivos fueron realizados en el laboratorio de Fermentaciones del Instituto de Biotecnología, en un biorreactor BioFlo/cellGen de 7 L (Fotografía 1), como fuente de carbono se empleó aceite vegetal (20 g/L), como fuente de nitrógeno sulfato de amonio (2.5 g/L), para tener una relación C/N inicial de 8 g/g, al cultivo solo se le adicionó aire a una tasa de 2 vvm e hidróxido de sodio 3M para ajustar pH a 6.5.



Fotografía 1. BioFlo/CellGen 7L para ensayos de estimación de fases de crecimiento celular.

Conociendo las fases por las que pasa la fermentación y analizando los perfiles de concentración se puede inferir los fenómenos que ocurren en el proceso para proponer un modelo matemático del proceso y ajustar los parámetros del mismo, pero este procedimiento no es lineal ni definitivo, en realidad es cíclico e iterativo: después de un ciclo en el que se propone el modelo y se ajustan sus parámetros se puede llegar a la conclusión de que el ajuste no es satisfactorio y que el modelo requiere cambios estructurales, por lo que se inicia un nuevo ciclo de construcción y ajuste del modelo, como se evidencia en la sección de resultados.

### 3.2.2 Ajuste de los parámetros del modelo.

Considerando la topología de los modelos matemáticos para procesos fermentativos, el ajuste de los parámetros requerirá algoritmos de optimización no-lineal y de solución de sistemas de ecuaciones diferenciales (Amribt *et al.*, 2013) por lo que se considera programar los algoritmos en el lenguaje MATLAB, aprovechando los *solvers* de integración numérica por Runge Kutta y de optimización no-lineal. Para la integración numérica se empleó el solver ODE45, mientras que para la optimización un algoritmo genético mediante la función GA.

Para iniciar los ciclos de formulación y ajuste del modelo se partió de un modelo tipo caja negra bastante simplificado, para analizar las deficiencias del mismo y proceder a incluir términos matemáticos que permitieran mejorar la predicción al

incorporar nuevas fenomenologías en el modelo. En este modelo se consideró que la biomasa está constituida por dos componentes: la biomasa residual (que es la biomasa que realmente consume los sustratos y tiene capacidad de crecer y reproducirse) y el polímero, con lo que el modelo inicial tiene la siguiente estructura:

$$\begin{aligned}\mu_x &= \mu_{xmax} * \left( \frac{S_c}{K_{Scx} + S_c} \right) \\ \mu_p &= \mu_{pmax} * \left( \frac{S_c}{K_{Scp} + S_c} \right) \\ \mu_{Sc} &= - \left[ \frac{1}{Y_{x/Sc}} * \mu_x \right] - \left[ \frac{1}{Y_{p/Sc}} * \mu_p \right] \\ \mu_{Sn} &= - \frac{1}{Y_{x/Sn}} * \mu_x + m_n\end{aligned}$$

Modelo inicial

Este modelo posee 8 parámetros que deben ser ajustados por el algoritmo de optimización, mientras que el modelo final, presentado en la sección de resultados tiene un total de 17 parámetros. Los principales cambios para llegar al modelo final fueron:

- Inclusión de un término de limitación en el crecimiento por baja concentración de la fuente de nitrógeno.
- Inclusión del concepto de feast & famine, con lo que emplea un par ecuaciones para  $\mu_x$  y  $\mu_p$  en la fase de abundancia y otro par de ecuaciones en la fase de hambruna.
- Inclusión de un término de adaptación para el cambio de fase.

Para el ajuste de los modelos fue necesario realizar múltiples corridas de optimización, identificando y priorizando los parámetros que generan mayor efecto sobre el ajuste (ver Anexo 5). Un criterio fundamental para el ajuste fue el significado físico de los parámetros, con este criterio se descartaron soluciones con valores ilógicos; adicionalmente, para los rendimientos ( $Y_{x/Sc}$ ,  $Y_{p/Sc}$ ,  $Y_{x/Sn}$ ) ante la sensibilidad del ajuste se empleó un procedimiento especial: el rendimiento producto/sustrato se estimó por la estequiometría de la vías metabólicas y los rendimientos biomasa/sustrato con la relaciones  $\Delta X/\Delta S_c$  y  $\Delta X/\Delta S_n$  considerando las concentraciones en el inicio y final de la fase de crecimiento exponencial. Otro elemento clave para el ajuste de modelo final fue la estimación del instante en el

que se presenta el cambio de fase feast a famine, lo cual se detalla en la sección de resultados.

La función objetivo para el problema de ajuste de los parámetros es el error entre los datos experimentales y los datos simulados, que se debe sumar para todas variables medidas y todos los puntos de medición:

$$SDC = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2$$

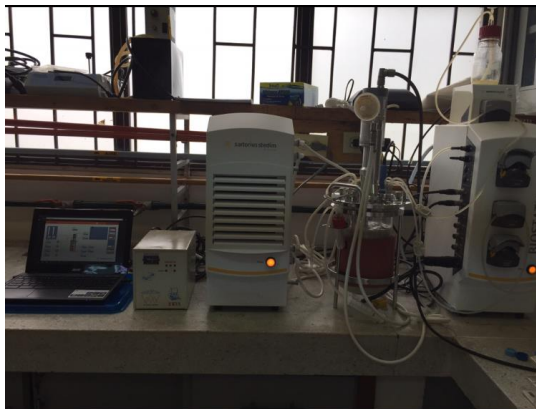
donde  $y_i$  es el valor experimental y  $f(x_i)$  es el valor estimado por el modelo

### 3.2.3 Experimentos para ajuste del modelo.

Se desarrollaron fermentaciones por lote, para hacer la caracterización del cultivo y del metabolismo de la cepa en diferentes fases. Los instantes fueron definidos en la sección 2.3.3 con base en la cuantificación de los principales efectos del metabolismo: el crecimiento de la biomasa, la producción del polímero y el consumo de los sustratos.

Teniendo definidos los cuatro instantes que caracterizan el metabolismo de *B. cepacia*, se continuaron los diferentes ensayos en biorreactores, teniendo en cuenta que la fuente de carbono era una mezcla de ácidos grasos se optó por cambiarla por un ácido graso conocido, el ácido oleico, ácido graso mono insaturado con una cadena de 18 carbonos, con este se realizaron los demás ensayos del presente trabajo. El uso de una fuente de carbono única y completamente identificada permite realizar el MFA con menor incertidumbre, pues este análisis emplea flujos molares en lugar de máxicos.

Estos ensayos fueron realizados en el laboratorio de Enzimas del Instituto de Biotecnología en un biorreactor Sartorius BioStat A (Fotografía 2), con las siguientes condiciones: ácido oleico 20 g/L, sulfato de amonio 2.5 g/L, pH 6.5, temperatura 30 °C; con control del pH por adición de hidróxido de sodio 3M y volumen de trabajo de 2 L.



Fotografía 2. Biorreactor Sartorius BioStat A 2L, para ensayos de ajuste del modelo.

Los datos obtenidos se reportan en el numeral 3.3.2., teniendo un perfil definido del comportamiento bacteriano frente a la nueva fuente de carbono, se opta por continuar con los ensayos que se tenían contemplados para la pasantía de investigación realizada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, específicamente en el grupo de Biopolímeros.

*Burkholderia cepacia* B27 fue reactivada en los mismos medios con los que se ha trabajado en los ensayos anteriores para no tener variabilidad en los resultados obtenidos. Se realizaron ensayos por duplicado en biorreactores Applikon de 3 L (Fotografía 3) con 2 litros de volumen de trabajo, a 30 °C, 350 rpm, pH 6.5 y 2 vvm.



Fotografía 3. Reactores Applikon en línea de 3 L para corridas de ajuste del modelo.

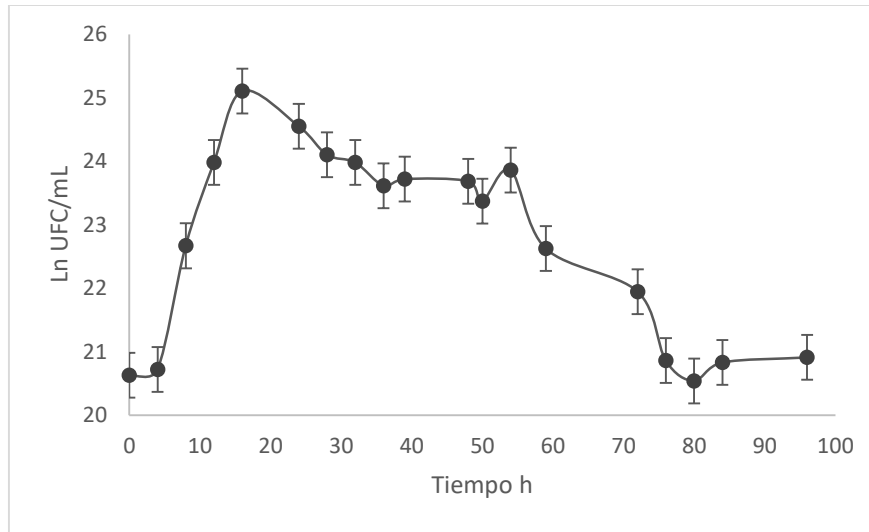
En estos ensayos se midió la concentración de CO<sub>2</sub> en los gases de salida, con esta medición se estimó la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> la cual se usa junto con las velocidades de crecimiento, producción y consumo de fuente de carbono para conformar el vector de flujos medidos en el análisis de flujos metabólicos, como presentado en el numeral 2.3.3.

Otras mediciones que se tuvieron en cuenta fueron consumo de sustratos como fuente de carbono por cromatografía de gases, nitrógeno por la técnica de Indofenol, producción de polímero empleando hidrólisis ácida y liberación de ácido crotónico medido en HPLC, medición de biomasa como proteína por la técnica de Lowry, medición de ácidos orgánicos por HPLC en los instantes característicos de cada fase del proceso. También se obtuvo un perfil de oxígeno disuelto en el medio para las 96 horas de cultivo, los protocolos de las técnicas usadas se pueden ver en el Anexo 4 numeral 7.

### **3.3 Resultados y análisis**

#### **3.3.1 Modelo Inicial**

Para la formulación del modelo es necesario identificar el comportamiento bacteriano, en el presente trabajo este análisis se basa en los trabajos previos del grupo de investigación especialmente el trabajo de Méndez en 2016. Para definir con más claridad las fases de crecimiento se realizó recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en placa de agar nutritivo, lo que permitió comprobar y cuantificar la viabilidad de *B. cepacia* B27 (ver Anexo 4 Protocolo 6). Estos ensayos fueron realizados a partir de muestras del cultivo por lote en el biorreactor BioFlo 7 L. A continuación, se muestran los diferentes resultados de estos análisis.



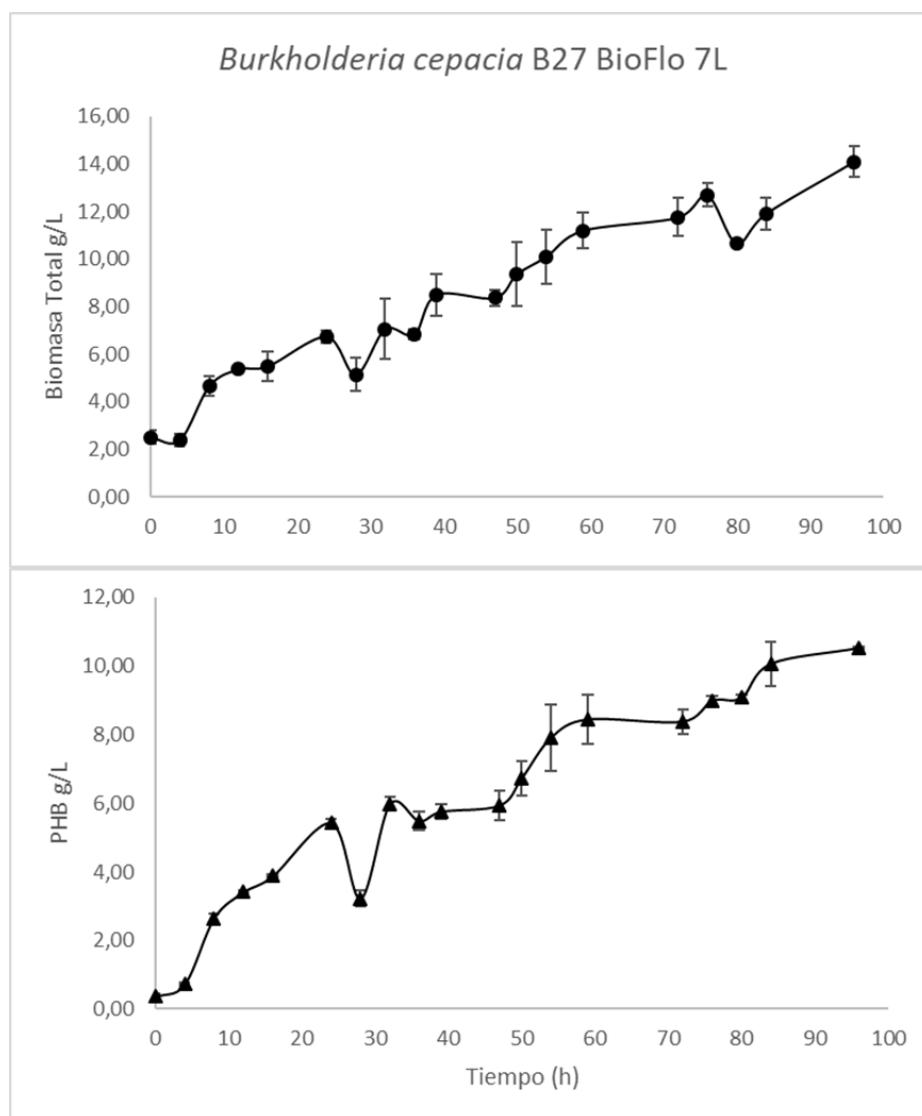
Gráfica 9. Fases de crecimiento para *Burkholderia cepacia* B27. Cultivo en lote (BioFlo 7 litros) en aceite vegetal 20 g/L, 350 rpm, 2 vvm, 30 °C y pH 6.5.

El crecimiento de *Burkholderia cepacia* tiene ciertas características que la diferencian de otro tipo de bacterias, esta bacteria tiene la capacidad de permanecer en estado estacionario por varias horas, mostrando perfiles difíciles de diferenciar entre la fase estacionaria y de muerte. Con base en el comportamiento observado en la Gráfica 9, se define como fase de adaptación de la hora 0 a la hora 4, esta etapa es corta debido al tren de inóculo que se maneja, en el cual se pasa por una activación del crío vial en medio líquido LB seguido de inoculación en medio PHA definido anteriormente, por 12 a 14 horas de cultivo.

La fase exponencial se define de la hora 4 a la hora 14, en esta se evidencia el punto más alto en crecimiento llegando a unidades exponenciales de 10. A las 14 horas se da inicio a la fase estacionaria donde, como se analizará posteriormente, la mayor parte del flujo de carbono se dirige a la formación del polímero intracelular por el mismo motivo si para el modelo se usan mediciones de peso seco se puede generar estimaciones erróneas. Se estima que la fase estacionaria finaliza en el momento que hay una disminución marcada en el logaritmo de las UFC, a la hora 54. De la hora 54 a la 96 (final del análisis) se define como un periodo de muerte celular.



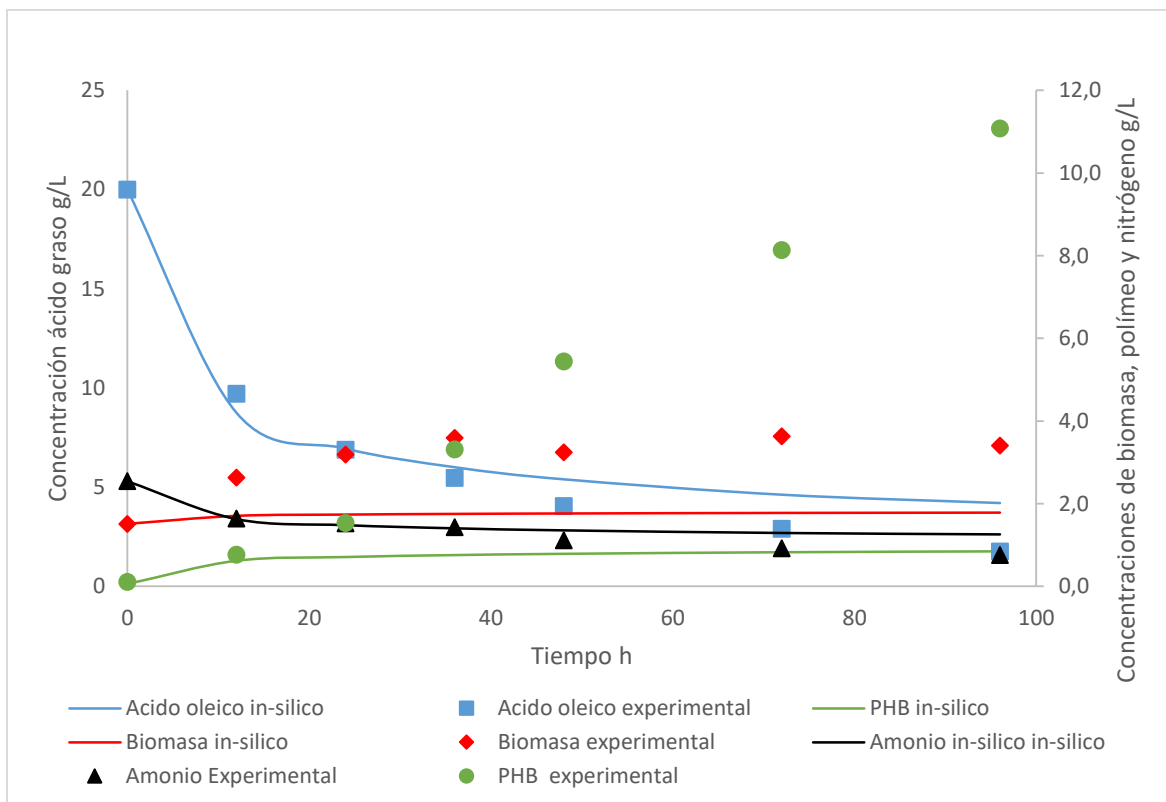
*Burkholderia cepacia* se caracteriza por su acumulación temprana de polímero, lo que antes se asociaba a su taxonomía, similar a *Pseudomonas sp.*, ahora también se puede asociar a una fase exponencial corta, lo que genera dificultades para el proceso en escala comercial; pues, aunque se tiene una cepa híper-productora no se alcanzan concentraciones superiores a las mencionadas en los antecedentes. En los primeros cultivos celulares realizados en el BioFlo 7 L usando como fuente de Carbono aceite vegetal de composición desconocida se obtienen los siguientes perfiles:



Gráfica 10. Perfil del crecimiento y producción de PHB en *B. cepacia* B27 empleando aceite vegetal.

El comportamiento de la cepa frente a esta fuente de carbono favorece la acumulación y crecimiento, por esta razón ha sido considerada como una fuente de carbono promisoría para los objetivos del grupo de investigación; sin embargo, en estos primeros análisis no se cuenta con las mediciones de fuentes de nitrógeno y carbono, lo que imposibilita en el cálculo de las velocidades de consumo. De esta forma, los resultados de estas fermentaciones son útiles para identificar las fases de crecimiento y como ensayos preliminares de extracción y cuantificación del polímero y biomasa en el tiempo; pero no para la formulación del modelo ni para el análisis de flujos metabólicos.

A partir de los resultados obtenidos por Méndez en el 2016, se pudo comparar los perfiles registrados por el investigador junto con los obtenidos en estos ensayos y al observar la similitud en las réplicas se opta por hacer un modelo estructurado tipo caja negra. Como se menciona en el numeral 3.2.1 este modelo se basa en inhibiciones y limitaciones, y su ajuste se observa en la siguiente gráfica.

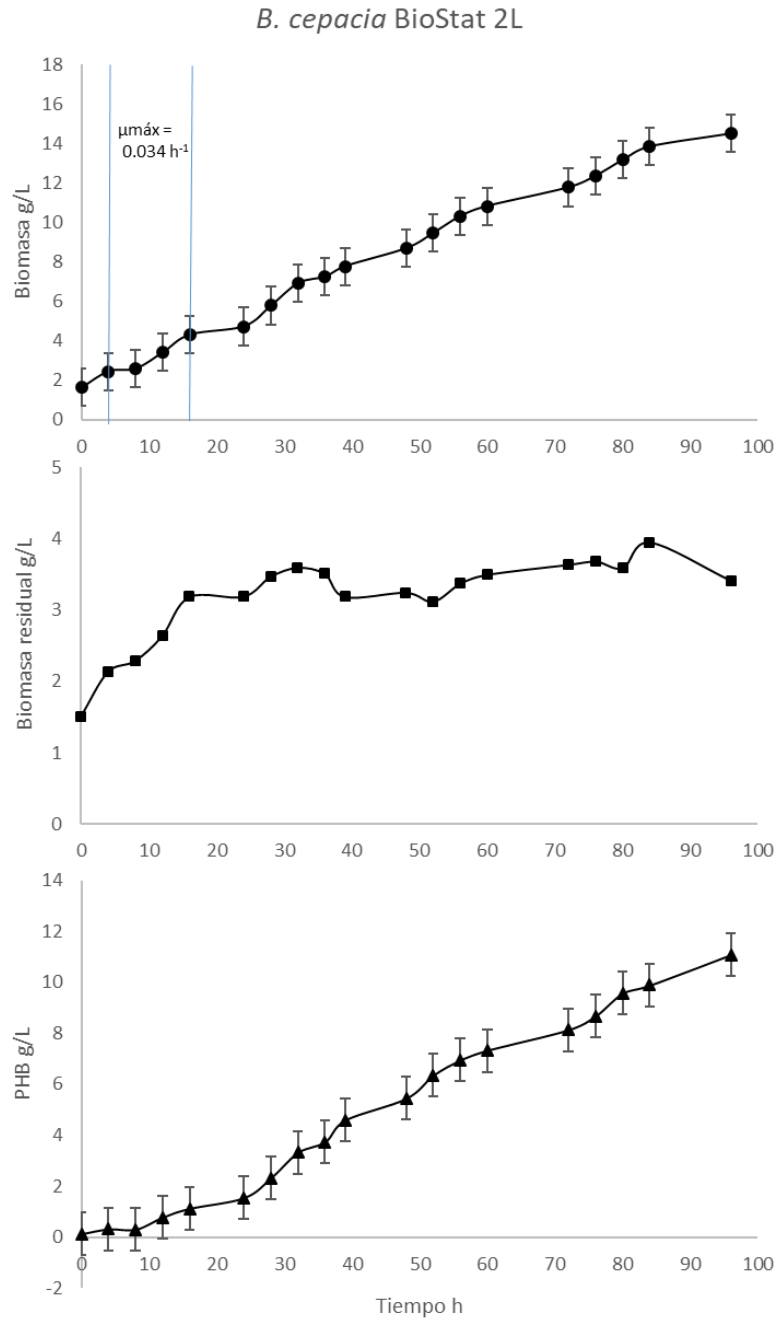


Gráfica 11. Ajuste del primer modelo planteado.

De este primer modelo se puede observar que cumple su objetivo principal, ajustar el consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno a los datos obtenidos experimentalmente, sin embargo, no predice el comportamiento del crecimiento y producción de PHB. Lo que llevo a plantear una nueva estrategia de mejora, iniciando por la estructura del modelo; como se menciona en el numeral 3.2.2. para lograr la predicción de una bacteria como *Burkholderia cepacia* fue necesario asumir que se está tratando de un comportamiento segmentado, dependiente de algún parámetro de correlación calculado en el primer objetivo.

### 3.3.2 Análisis del comportamiento de la cepa.

Para ajustar datos experimentales al modelo es necesario realizar cultivos celulares con condiciones experimentales establecidas por tal motivo se continuo con los ensayos para definir condiciones e instantes de muestreo. Como se menciona en metodología, se realizaron cambios en las condiciones iniciales de los cultivos celulares, la fuente de carbono se cambia a ácido oleico, los ensayos para comparar el comportamiento celular se realizaron en el reactor Sartorius BioStatA y estos resultados se muestran a continuación:



Gráfica 12. Cultivo de *Burkholderia cepacia* B27 en biorreactor BioStat A con volumen de trabajo de 1.5L, 20 g/L ácido oleico.

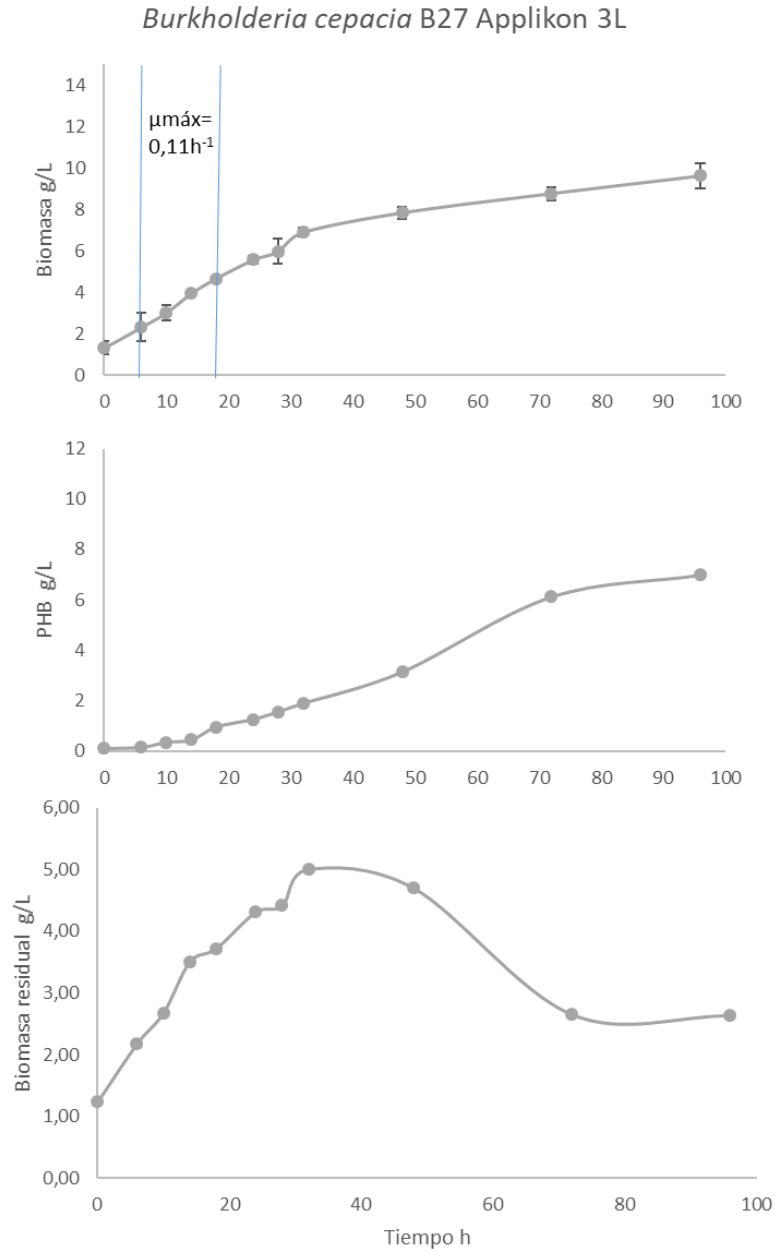
En estos ensayos solo se analizaron el crecimiento y la producción del polímero PHB, lo que se buscaba era encontrar similitudes con los ensayos realizados con el aceite vegetal, como es un cambio en una condición inicial y de gran magnitud, era necesario realizar todos los ensayos por triplicado, manteniendo todas las otras

condiciones para que la variabilidad solo se debiera al cambio de fuente de carbono. Lo primero que se observó fue que la capacidad de acumular el polímero no se vio afectada por el cambio de fuente de carbono, presento resultados similares a los reportados para el aceite vegetal, dando concentraciones cercanas a 15 g/L para biomasa total, con porcentajes de acumulación cercanos al 80 %, lo que implica concentraciones finales cercanas a 12 g/L de PHB.

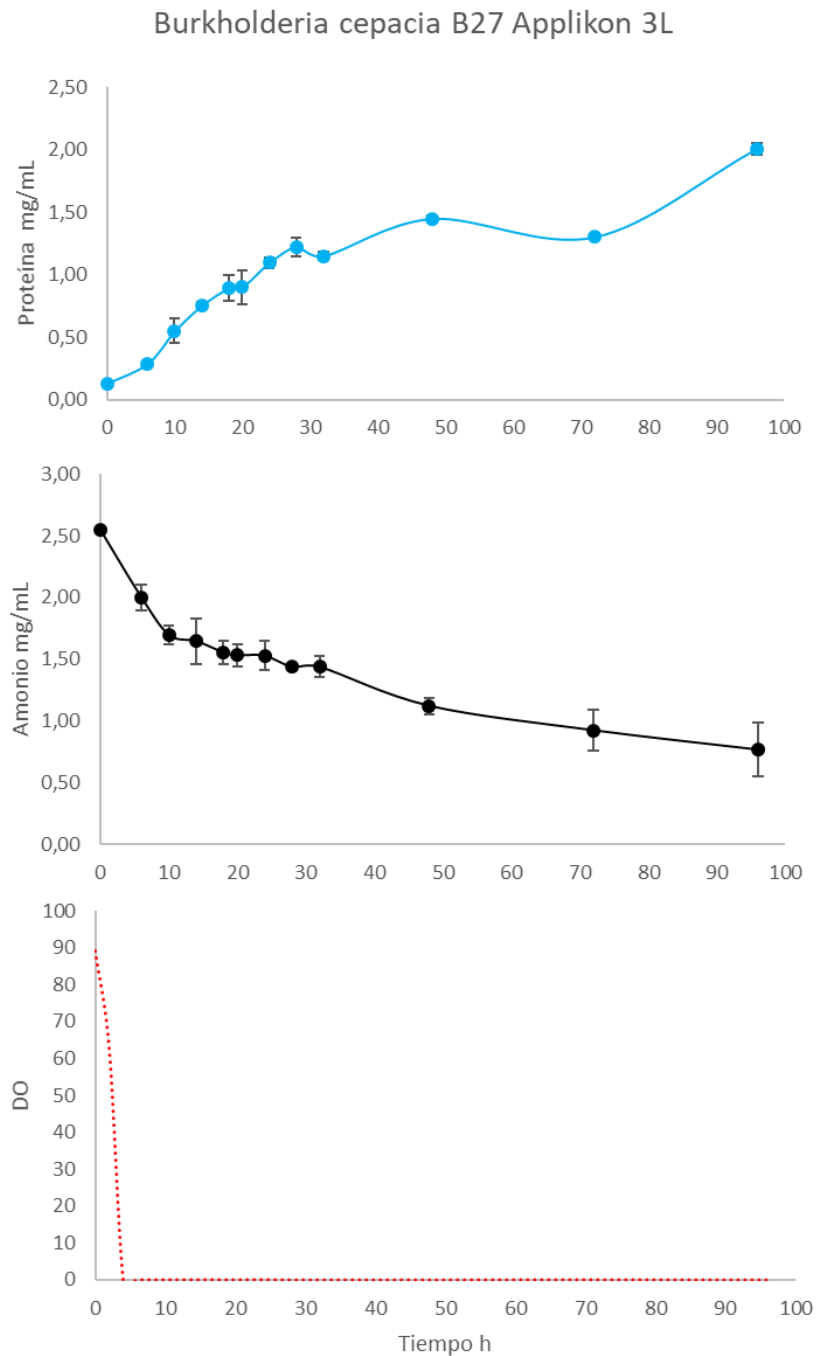
Así mismo, se observa que al cambia la fuente de carbono, el comportamiento sigue siendo el mismo, la acumulación del polímero inicia desde etapas tempranas, algo desfavorable de estos ensayos es la productividad, debido que *Burkholderia* se demora un poco más en acumular el polímero, sus mayores porcentajes de acumulación se dan en las últimas horas de muestreo, aproximadamente desde la hora 72 (Gráfica 12), mientras que con aceite vegetal el mayor porcentaje de acumulación se presenta desde la hora 50 aproximadamente (gráfica 10). Lo que genera un nuevo reto para el modelo formulado.

También, se llegó a la conclusión que analizando la biomasa completa (incluyendo el polímero intracelular) no se puede estimar correctamente la velocidad de crecimiento y la fase exponencial por lo que se decide trabajar *in silico* y experimental como dos componentes diferentes. Por esa razón la ecuación de formación de biomasa en la matriz estequiométrica no incluye el polímero, este tiene una ecuación diferente, R0032 (Tabla 4).

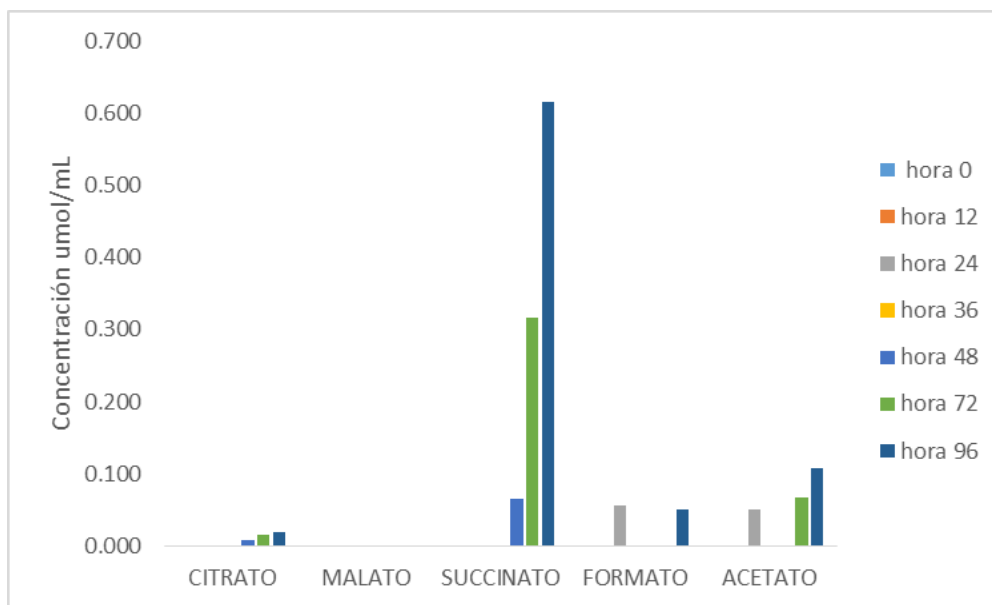
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por los ensayos anteriores se realizaron los siguientes cultivos, trabajando con las condiciones establecidas anteriormente, pero midiendo las concentraciones de biomasa, polímero, ácido graso, nitrógeno, para permitir el cálculo de las velocidades de consumos y producción. Además, los resultados de estas corridas permitieron desarrollar el análisis de los parámetros de correlación por RGA. Los resultados de estos ensayos se reportan a continuación.



Gráfica 13. Perfiles de biomasa total, producto y biomasa residual para *B. cepacia* B27 en bioreactor Applikon con volumen de trabajo de 2 L, 20 g/L ácido oleico.



Gráfica 14. Medición de proteína, Amonio residual y Oxígeno disuelto para los cultivos de *B. cepacia* B27 en biorreactor Applikon.



Gráfica 15. Concentración de ácidos orgánicos para *Burkholderia cepacia* B27 en biorreactor Applikon con volumen de trabajo de 2 L, 20 g/L ácido oleico.

El comportamiento de *B. cepacia* B27 muestra semejanzas con los resultados anteriormente mencionados, en estos ensayos se pudo hacer un análisis un poco más detallado del comportamiento bacteriano. En las 96 horas de cultivo se puede apreciar que la velocidad de crecimiento bacteriano (medido en la fase exponencial) aumenta de  $0.034 \text{ h}^{-1}$  a  $0.11 \text{ h}^{-1}$ . Esto puede verse asociado a la manera como fue calculado este dato, debido que en los ensayos realizados en el Instituto de biotecnología de la UNAM se hizo una cuantificación de proteína debido que el dato de peso seco puede generar un error por la acumulación del polímero intracelular.

Se estimó que la fase exponencial como se observó en la Gráfica 13 termina en la hora 14. Por otro lado, la acumulación del polímero tuvo un comportamiento diferente porque no tiene la misma distribución en las horas iniciales del cultivo como siempre había sido característico de la cepa. Sin embargo, alcanza los mismos porcentajes de acumulación en las últimas horas del cultivo, llegando a una acumulación de casi el 80% del polímero.



El perfil de oxígeno disuelto (Gráfica 14) muestra un comportamiento normal en la cepa, como mantiene limitado el oxígeno desde horas tempranas del cultivo celular, aun teniendo una agitación de 350 rpm y 2 vvm de aireación. Algo para destacar de esta gráfica es observar como esta limitación se presenta durante las 96 horas de cultivo, lo que nos lleva a cuestionar el comportamiento de la bacteria en la fase estacionaria y muerte celular: el oxígeno está siendo utilizado para mantenimiento y para favorecer la acumulación del polímero.

Una temprana hipótesis del cultivo se basaba en las teorías antes descritas por diferentes autores, donde mencionan que la acumulación del polímero puede deberse a una limitación de un sustrato esencial para el crecimiento como la fuente de Nitrógeno, por esta razón se realizaron mediciones de consumo de amonio por el método de Indofenol (Kaplan, 1969) y se pudo concluir que para el caso de *Burkholderia cepacia* B27 no está siendo limitado por la fuente de nitrógeno, lo que lleva a continuar con la búsqueda del sustrato limitante o como se ha mencionado un posible control de nodos o parámetros de regulación que redirige la distribución de carbono para crecimiento o para producción del polímero.

Lo que lleva al siguiente análisis realizado, la medición de ácidos orgánicos, estos resultados muestran como la bacteria redirige el carbono en las últimas horas del cultivo (fase estacionaria y muerte celular), esto se evidencia en la liberación de esos ácidos al medio de cultivo, lo que indica que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos no se encuentra activo o en la misma tasa que lo estaba en horas más tempranas. Este aumento en concentración de ácidos en el medio es muy similar a la acumulación del polímero intracelular, por eso se nombra un posible re-direccionamiento de carbono intracelular.

El Succinato es el ácido orgánico que está en mayor concentración en el medio y este puede ser producido por dos vías incluidas en el modelo, el ciclo de Krebs (R0043) y en la activación de la phaZ donde se libera Succinato en la activación del acetoacetato en Acetoacetyl-coA. Estos resultados obtenidos dan ideas claras de cuales metabolitos podrían ser usados como parámetros de correlación (como se menciona en la sección 2.3.2.).

### 3.3.3 Ajuste del modelo final.

A partir del análisis de RGA del capítulo 2 se llegó a la conclusión que la relación carbono nitrógeno tiene una alta correlación con las velocidades extracelulares medibles; como segundo paso se debe identificar el momento en que genera ese cambio en el comportamiento de la cepa, para determinar el valor crítico de la relación C/N que genera el cambio de fase feast a famine.

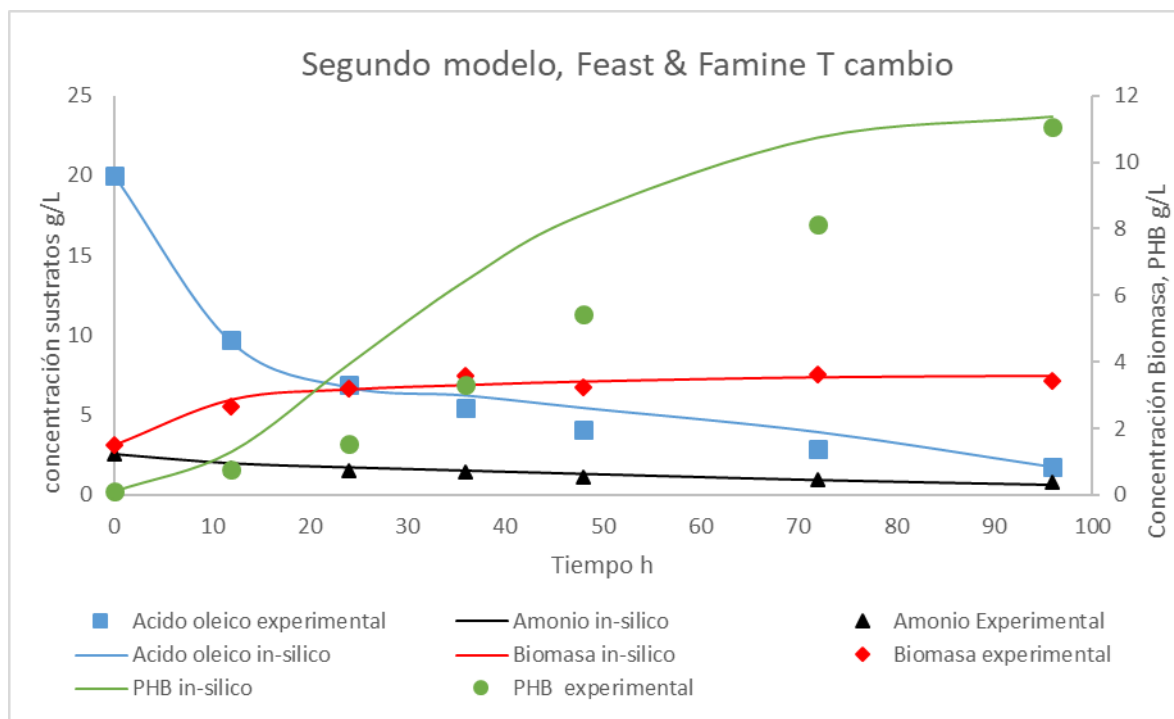
Para encontrar el momento de cambio de fase ( $T_{cambio}$ ) fue necesario calcular múltiples corridas el algoritmo de optimización con diferente número de generaciones e iteraciones que permitieran determinar con mayor certeza el momento en el que ocurre el cambio que redirecciona la distribución de carbono de un metabolismo enfocado a producción de Biomasa a un metabolismo que enfoca la producción del polímero. Como se explicó en la sección 3.3.1 el número de parámetros aumentó debido al segundo set de reacciones que describen el modelo en el concepto feast & famine y a la inclusión de nuevos fenómenos.

Nuevamente, el objetivo de predicción del modelo son las concentraciones medidas, mientras que las variables de optimización son los parámetros de los fenómenos del modelo (constantes de saturación, de inhibición) y los parámetros de los términos de estructuración metabólica del modelo, que permiten incluir y ponderar el efecto de los parámetros de regulación en el metabolismo.

Siguiendo con esta idea, y basado en los primeros ensayos de cultivos celulares donde se estimaron las fases de crecimiento y según el análisis de correlación por RGA se sabe que el único parámetro de correlación planteado que cumplía con las reglas del análisis y presentaba algún tipo de correlación con las velocidades extracelulares medidas era la relación carbono nitrógeno (C/N), tal como lo plantea Doi *et al.*, 1990, la relación carbono nitrógeno se encuentra en desbalance cuando la fuente de carbono se considere alta frente a la fuente de nitrógeno, presentando desbalances metabólicos en cadena, desfavoreciendo rutas metabólicas como la síntesis de proteínas, generando así concentraciones altas de NADH lo que genera el cese en la actividad del ciclo ATC, esto se evidencia en la gráfica 14, donde se

empieza a ver la presencia de ácidos orgánicos liberados en el medio de cultivo a partir de la hora 36.

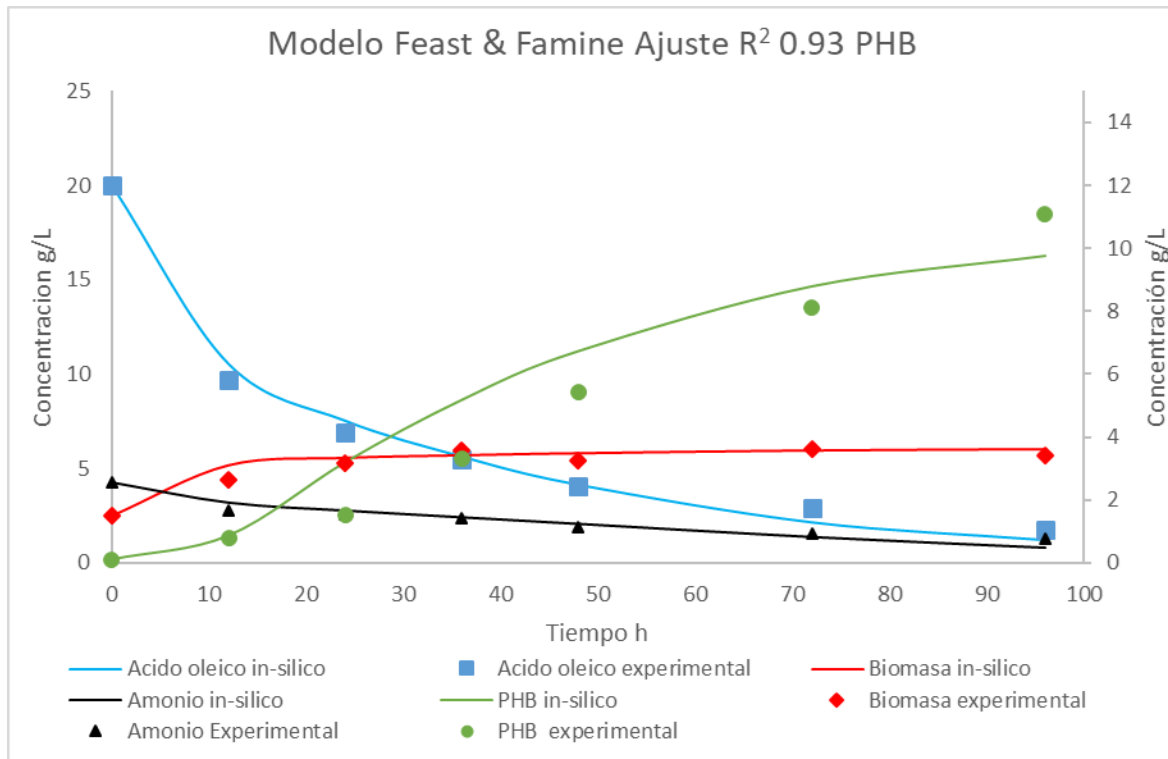
A partir de este análisis se propone que el metabolismo debe funcionar de forma diferente cuando está sometido a una relación carbono nitrógeno balanceada y cuando la relación es baja y la disponibilidad de estos nutrientes se encuentra desbalanceada. Para incluir este comportamiento en el modelo, se debe identificar el instante en el cual el metabolismo, debido a la relación C/N presente en el medio inicia la transición, este instante se presentó como una condicional en el modelo por lo que hubo un aumento en el número de parámetros y por tanto la estructura que genera el algoritmo llamada opciones cambia y genera nuevos datos para 16 parámetros cinéticos. La simulación de este nuevo modelo se presenta a continuación.



Gráfica 16. Ajuste segundo modelo planteado, considerando feast and famine.

Usando esta condicional, las velocidades de consumo de sustratos y la de crecimiento celular presentan buen ajuste con los datos experimentales, sin embargo, esta condicional no logra simular la producción de PHB, sobre estimando

su producción desde horas tempranas del cultivo celular, esto se debe por ser una programación matemática, esta no tiene en cuenta el cómo opera la maquinaria metabólica, por lo que asume que la condicional incluida redirige los flujos inmediatamente pasado el Tiempo de cambio. Por esta razón es necesario incluir un nuevo termino que tiene en cuenta el tiempo que toma esta bacteria en generar este cambio, este término se conoce como Tiempo de adaptación. Los resultados se muestran a continuación:



Gráfica 17. Ajuste Tercer modelo planteado, considerando feast and famine y adaptación

La siguiente tabla muestra los nuevos parámetros cinéticos calculados incluyendo los nuevos términos Tiempo de cambio, Tiempo de adaptación y el parámetro de mantenimiento con respecto a la fuente de carbono para la velocidad de crecimiento y producción.

Tabla 9. Valores de parámetros para el modelo Feast & Famine con tiempo de adaptación, sin inhibición por fuente de Nitrógeno.

$\mu_{m\acute{a}x} (h^{-1})$	0.0591	$\mu_{p\ m\acute{a}x2} (h^{-1})$	0.148
$K_{S_{Cx}} \left(\frac{g}{L}\right)$	4.68	$T_{Cambio} (h)$	12.9
$Y_P \left(\frac{gPHB}{gS_c}\right)$	1.37	$Y_x \left(\frac{gX}{gS_c}\right)$	0.18
$\mu_{p\ m\acute{a}x} (h^{-1})$	0.093	$Y_{x/sn}$	2.97
$K_{S_{Cp}} \left(\frac{g}{L}\right)$	12.85	$K_{S_{Cp2}} \left(\frac{g}{L}\right)$	9.08
$S_{np} \left(\frac{g}{L}\right)$	1.38	$K_{S_{Cx2}} \left(\frac{g}{L}\right)$	69.97
$\mu_{m\acute{a}x\ 2} (h^{-1})$	0.044	$m_n \left(\frac{g}{L}\right)$	0.0045
$T_{Adapt} (h)$	30	$m_c \left(\frac{g}{L}\right)$	0.001

Este modelo mejoró la predicción del comportamiento de *Burkholderia*, sin embargo la producción del polímero se estaba sobreestimando en algunas horas de la fase estacionaria, lo que se debía a la falta de un último término que se añadió en el siguiente modelo, una inhibición por fuente de nitrógeno en el cálculo de la velocidad de crecimiento, como se menciona anteriormente, el cambio que se genera en el “tiempo de cambio” se debe a la variación en la relación C/N que redirecciona el proceso, sin embargo el tiempo de adaptación no se estaba teniendo en cuenta por que el nitrógeno *in silico* se estaba consumiendo con un rendimiento fijo pero no se estaba teniendo en cuenta la inhibición que tiene esta fuente sobre la velocidad de crecimiento, dato de mucha importancia debido que una de las vías que se alteran con el cambio de la relación C/N es la síntesis de proteínas. Teniendo en cuenta lo que varios autores concluyen (Beun *et al.*, 2000; Dias *et al.*, 2005; Tamis *et al.*, 2014) el cambio que hay entre los estadios feast & famine se debe a un cambio en las concentraciones de los sustratos principales y la única manera de describirlo matemáticamente es con un set de ecuaciones diferenciales diferente para cada instante.

Continuando con esta idea se modificó el set de ecuaciones diferenciales añadiendo el término de inhibición por fuente de nitrógeno para la velocidad de crecimiento, esta inhibición solo se tiene en cuenta cuando la relación C/N es favorable para el crecimiento celular, es decir, cuando el tiempo es inferior al tiempo de cambio. Las ecuaciones diferenciales usadas para el modelo final son las siguientes:

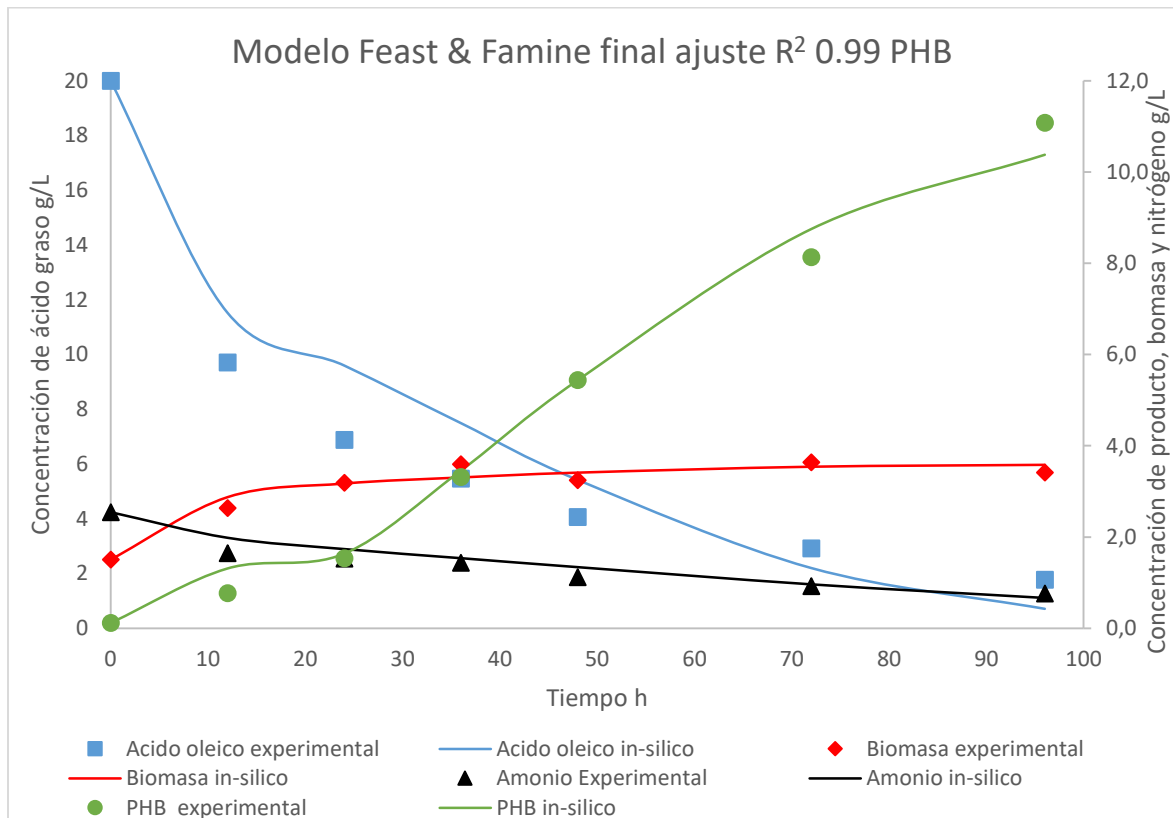
$$\begin{aligned}
 \text{si } t < T_{\text{cambio}} & \begin{cases} \mu_x = \left[ \mu_{x\text{max}} * \left( \frac{S_c}{K_{S_{cx}} + S_c} \right) * \left( \frac{S_n}{K_{S_{nx}} + S_n} \right) \right] \\ \mu_p = \left[ \mu_{p\text{max}} * \left( \frac{S_c}{K_{S_{cp}} + S_c} \right) \right] \end{cases} \\
 \text{si } t > T_{\text{cambio}} & \begin{cases} \mu_x = \left[ \mu_{x\text{max}2} * \left( \frac{S_c}{K_{S_{cx2}} + S_c} \right) * \left( \frac{S_n}{K_{S_{nx}} + S_n} \right) \right] \\ \text{si } t < T_{\text{cambio}} + T_{\text{adapt}} \quad \mu_p = \mu_{p\text{max}2} \left( \frac{S_c}{K_{S_{cp2}} + S_c} \right) * \left[ \frac{t - T_{\text{cambio}}}{T_{\text{adapt}}} \right]^\alpha \\ \text{si } t > T_{\text{cambio}} + T_{\text{adapt}} \quad \mu_p = \left[ \mu_{p\text{max}2} \left( \frac{S_c}{K_{S_{cp2}} + S_c} \right) \right] \end{cases}
 \end{aligned}$$

$$\mu_{S_c} = - \left[ \frac{1}{Y_{x/S_c}} * \mu_x \right] - \left[ \frac{1}{Y_{p/S_c}} * \mu_p \right]$$

$$\mu_{S_n} = - \frac{1}{Y_{x/S_n}} * \mu_x + m_n$$

donde,  $T_{\text{cambio}}$  se define como un tiempo específico en el proceso donde se presenta la transición de fase feast a famine, que tiene efectos en las tasas de crecimiento y producción de polímero, por lo que las tasas requieren parámetros específicos para cada fase. Los parámetros  $\mu_{x\text{max}}$ ,  $\mu_{x\text{max}2}$  son las tasas específicas máximas de crecimiento para cada fase;  $K_{S_{cx}}$ ,  $K_{S_{cx2}}$  son constantes de afinidad para el ácido oleico (fuente de carbono) para el crecimiento celular;  $K_{S_{nx}}$ , es la constante de afinidad para el sulfato de amonio para el crecimiento;  $\mu_{p\text{max}}$ ,  $\mu_{p\text{max}2}$  son las tasas específicas máximas de producción;  $K_{S_{cp2}}$ ,  $K_{S_{cp}}$  son las constantes de afinidad para el ácido oleico para la producción de PHB;  $Y_{x/s}$ , es el rendimiento global para el crecimiento celular a partir del sustrato consumido;  $Y_{p/s}$ ,

es el rendimiento de producción de PHB a partir del sustrato consumido;  $Y_{x/S_n}$ , es el rendimiento de crecimiento celular a partir de la fuente de nitrógeno y por último  $m_n$  es el consumo de fuente de nitrógeno para el mantenimiento celular. Con los cálculos de las tasas específicas se calculan las derivadas en el tiempo para cada concentración ( $X, P, S_c, S_n$ ) con la definición de las tasas. El ajuste del proceso con este modelo se registra a continuación:



Gráfica 18. Ajuste del modelo Feast & Famine Final, para Burkholderia cepacia B27.

La siguiente tabla registra los parámetros calculados para el modelo final, incluyendo el nuevo término que se usa en la inhibición por nitrógeno, también se incluye la relación C/N que se tiene en el instante en que se identificó el cambio de modelo de feast a famine ( $C/N_{cambio}$ ), este parámetro será usado como criterio para cambio de fase cuando el modelo se emplee para la fermentación por lote alimentado.

Tabla 10. Valores para los parámetros estimados.

$\mu_{m\acute{a}x} (h^{-1})$	0.059	$\mu_p m\acute{a}x2 (h^{-1})$	0.100
$K_{S_{C_x}} \left(\frac{g}{L}\right)$	4.680	$T_{Cambio} (h)$	12.900
$Y_{\frac{P}{S}} \left(\frac{gPHB}{gS_c}\right)$	1.370	$Y_{\frac{x}{S}} \left(\frac{gX}{gS_c}\right)$	0.180
$\mu_p m\acute{a}x (h^{-1})$	0.093	$Y_{x/sn}$	2.970
$K_{S_{C_p}} \left(\frac{g}{L}\right)$	12.850	$K_{S_{C_p2}} \left(\frac{g}{L}\right)$	6.496
$S_{np} \left(\frac{g}{L}\right)$	3.998	$K_{S_{C_x2}} \left(\frac{g}{L}\right)$	63.390
$\mu_{m\acute{a}x2} (h^{-1})$	0.040	$m_n \left(\frac{g}{L}\right)$	0.005
$T_{Adapt} (h)$	14	$m_c \left(\frac{g}{L}\right)$	0.001
$K_{S_n} \left(\frac{g}{L}\right)$	0.048	$C/N_{cambio} \left(\frac{g}{g}\right)$	5.9

La diferencia que se encuentra entre los dos últimos modelos es el ajuste en la predicción de la velocidad de producción del PHB y en la velocidad de crecimiento célula, logrando ajustes de  $R^2$  0.99 y 0.94 respectivamente (Tabla 11), también, el tiempo de adaptación disminuye a la mitad, calculando 14 horas en este parámetro cinético, el modelo como tal simula que le toma a la célula aproximadamente 28 horas para entrar al estadio de famine, lo que puede llevar la contraria con algunos autores que aseguran que el cambio de un estadio a otro es casi inmediato, esto se debe a que el cambio entre estos es a nivel metabólico, como niveles intracelulares de ATP, NADH y acetil CoA (Beun, et al., 2002; Anderson et al., 1990). En este caso, *Burkholderia* al tener una fase exponencial tan rápida, deja una brecha en la relación C/N que genera el cambio intracelular, pero a una tasa muy lenta lo que se ve expresado también en que la presencia de ácidos orgánicos se empiece a hacer visible en el espectro a las 36 horas del cultivo celular.

Tabla 11. Coeficientes de correlación del modelo final para el ajuste de las concentraciones.

$R^2$ Biomasa	$R^2$ PHB	$R^2$ ácido oleico	$R^2$ Sufato de Amonio
0.94	0.99	0.96	0.94



### 3.4 Conclusiones.

El modelo construido logra predecir el comportamiento de *Burkholderia cepacia* B27, con ajustes ( $R^2$ ) de 0.99 para la producción de PHB, 0.94 para velocidad de crecimiento, 0.96 para el consumo de fuente de carbono y 0.94 para el consumo de fuente de nitrógeno. Esto se logró con un procedimiento cíclico que partió de un modelo sencillo y fue adicionando términos que permitieran predecir los comportamientos identificados en la cepa. Dentro de la formulación del modelo fueron clave la información del MFA y los resultados de estudios previos del grupo de investigación.

Se puede concluir que la relación carbono nitrógeno sí tiene efecto preponderante en el direccionamiento del carbono dentro del metabolismo, como se había propuesto en primer capítulo. Este efecto se pudo cuantificar y modelar, con lo que se logró un modelo estructurado y segmentado simulando un comportamiento feast & famine. El modelo incorpora una novedad para el cambio entre estas fases, proponiendo un tiempo de adaptación entre estas, lo que implica que este cambio no es inmediato como la literatura lo dicta sino, que es paulatino, para bacterias que tienen la capacidad de acumular polímero desde etapas tempranas.



## **Capítulo 4. Optimización del proceso de producción de PHA.**

Este capítulo presenta el trabajo desarrollado para alcanzar el cuarto objetivo específico del presente trabajo: con el modelo matemático se podrán determinar las mejores condiciones de cultivo para definir así un régimen de alimentación y condiciones operacionales que permitan un aumento en el crecimiento bacteriano, por ende, una mayor producción del biopolímero.

Las técnicas de optimización pueden ser aplicadas en cualquier sistema representado por un modelo matemático, permitiendo determinar las condiciones o características que mejoran algún indicador de su desempeño (Riascos, 2014). La optimización de un proceso de cultivo celular depende en su mayoría del balance entre la viabilidad del cultivo prolongado y el incremento de la productividad. Por eso, hay una necesidad de identificar y cuantificar esta compensación entre el crecimiento y la formación del producto con el fin de derivar realmente condiciones óptimas de cultivo (Koutinas *et al.*, 2012).

En la práctica, la optimización de procesos fermentativos implica la identificación de valores adecuados para algunas condiciones como la temperatura, el pH del medio y las concentraciones de micronutrientes. Definidas estas condiciones se evalúa el proceso -experimentalmente o con el auxilio de modelos matemáticos y herramientas computacionales- para definir valores óptimos para las demás condiciones de operación.

Para el caso de cultivos por lote alimentado, las condiciones óptimas de operación serán las concentraciones iniciales de los nutrientes incluidos en el modelo matemático y las tasas de alimentación de estos mismos nutrientes. La

optimización de la fermentación considerando la tasa de alimentación como variable de optimización ha sido el foco de múltiples investigaciones que emplean modelos matemáticos como herramienta para auxiliar el análisis del proceso (Khanna y Srivastava, 2005; Banga *et al.*, 2005).

De modo general, el problema de optimización para un proceso por lote alimentado se considera como un problema de control óptimo, el cual en su formulación estándar (Banga *et al.*, 2005) es:

$$J[\bar{x}, \bar{u}] = \Theta[\bar{x}\{t_f\}] + \int_{t_0}^{t_f} \phi[\bar{x}\{t\}, \bar{u}\{t\}, t] dt$$

$$\text{s.a.} \quad \frac{d\bar{x}}{dt} = \psi[\bar{x}\{t\}, \bar{u}\{t\}, t]$$

$$\bar{h}[\bar{x}\{t\}, \bar{u}\{t\}] = 0$$

$$\bar{g}[\bar{x}\{t\}, \bar{u}\{t\}] \leq 0$$

$$\bar{x}^L \leq \bar{x}\{t\} \leq \bar{x}^U$$

$$\bar{u}^L \leq \bar{u}\{t\} \leq \bar{u}^U$$

donde,  $J[\bar{x}, \bar{u}]$  es la función objetivo que depende de las variables de optimización ( $\bar{x}$ ) y de las variables de control ( $\bar{u}$ ),  $\bar{h}[\bar{x}, \bar{u}]$  son restricciones de igualdad, como los modelos para la estimación de las tasas de crecimiento,  $\bar{g}[\bar{x}, \bar{u}]$  son restricciones de desigualdad,  $\bar{x}^L$ ,  $\bar{x}^U$ ,  $\bar{u}^L$ ,  $\bar{u}^U$  son los límites mínimos y máximos para las variables de optimización y de control. Además, las ecuaciones diferenciales que modelan el proceso deben ser incluidas como restricciones del problema, pues permiten estimar la dinámica del proceso en función de las condiciones y de los flujos de alimentación, en cualquier instante. Respecto a la función objetivo, el primer término del lado derecho ( $\Theta$ ) cuantifica el resultado final del proceso, por ejemplo, la cantidad de producto obtenido, mientras que el segundo ( $\int\phi$ ) cuantifica el esfuerzo para obtener ese resultado, por ejemplo, el costo del flujo de alimentación requerido.

## 4.1 Antecedentes

Para la resolución de problemas de optimización que incluyen ecuaciones diferenciales existen diferentes métodos eficientes y robustos que permiten obtener las condiciones óptimas de operación, tales como:

- Métodos indirectos: aproximaciones indirectas basadas en transformaciones del problema de control óptimo original en un problema de condiciones de contorno (BVP, por sus iniciales en inglés) siguiendo las condiciones necesarias de Pontryagin. (Bryson *et al.*, 1975; Banga *et al.*, 2005).
- Métodos determinísticos directos: estos transforman el problema de control óptimo original en un problema de programación no lineal (NLP, por sus iniciales en inglés) usando una discretización del perfil de las variables de control (CVP) o una discretización completa.
- Métodos estocásticos directos: estos métodos son una alternativa a la falencia que tienen métodos como NLP, ya que las técnicas determinísticas de optimización local pueden converger en óptimos locales. Algunos de los métodos estocástico que han sido probados para la solución de problemas de control óptimo son los algoritmos de búsqueda al azar (Simutis *et al.*, 1997; Luus *et al.*, 1999; Banga *et al.*, 2005) y los algoritmos genéticos (Yamashita *et al.*, 1997; Banga *et al.*, 2005).

### 4.1.1 Consideraciones del régimen operacional de la fermentación

Una decisión importante para la definición de cualquier proceso concierne a la configuración que debe tener el sistema del reactor. Muchas variables dependen del tipo de reactor y del régimen operacional que se elija; entre estas variables están la concentración de producto, conversión del sustrato, rendimientos y la productividad del proceso (Shuler *et al.*, 2002). A continuación, se presentan las características de los regímenes de operación y sus efectos sobre el proceso.

#### 4.1.2 Cultivo por lotes

En este tipo de fermentaciones el medio de cultivo es suministrado sólo al inicio de la fermentación, así como el inóculo, y solo existen corrientes de entrada y salida de los gases. En las fermentaciones por lote se evidencian diferentes fases que se caracterizan por la velocidad de crecimiento (Acevedo, 2000; en Acosta, 2007), el proceso pasa por una fase con tasa de crecimiento elevada pero posteriormente los efectos de inhibición y limitación reducen esta tasa.

Esta estrategia de fermentación es usada en algunos procesos de producción, y principalmente en los estudios de modelamiento; por ejemplo, para ajustar parámetros cinéticos de consumo de sustratos y producción de metabolitos. Los modelos ajustados con estos datos pueden ser usados en el diseño de procesos fed-batch y continuos.

#### 4.1.3 Cultivo continuo

En este tipo de cultivos además de la salida de los gases se tiene dos corrientes más, una de entrada de medio de cultivo y otra de salida que contiene nutrientes no consumidos, biomasa y producto. Con la corriente de entrada se puede suministrar nuevo sustrato a una velocidad constante y por la salida se retira parte del medio de cultivo también de manera constante, esto con el fin de no variar el volumen de trabajo y que su composición dentro del reactor sea constante en el tiempo.

En este tipo de fermentación las células pueden permanecer en un estado fisiológico estable y determinado, esto se logra con la manipulación de los flujos de entrada y de salida. Este proceso, aunque en teoría presenta algunas ventajas frente a la fermentación por lote, específicamente en la productividad, también presenta desventajas por la complejidad de los equipos, por el no aprovechamiento completo de algunos sustratos, y por el riesgo de contaminación y de mutación de la cepa debido al tiempo de operación (Acevedo, 2000).

#### 4.1.4 Cultivo por lote alimentado.

En este sistema los nutrientes, o algunos de estos, no solo se alimentan al inicio de la fermentación, sino que se suministran durante la fermentación, de forma continua o en determinados instantes (alimentación por pulsos). La diferencia con el cultivo continuo es que este tipo de fermentación no tiene corriente de salida, solo la salida de gases por lo tanto el volumen de trabajo varía al igual que las concentraciones de biomasa y nutrientes (Acevedo, 2000). Una ventaja importante de esta forma de operación se deriva de que el sustrato se alimenta durante el proceso, por lo que su concentración al inicio del mismo no necesita ser muy alta, reduciendo la posibilidad de inhibición.

#### 4.1.5 Selección del régimen operacional.

Para el caso específico de la producción de PHA se debe considerar las características propias del microorganismo seleccionado: si este requiere de limitación de algún nutriente para inducir la generación de producto, y si la síntesis del PHA se realiza simultáneamente, o no, al crecimiento. Por lo general para este proceso se usan fermentaciones en lote alimentado, esto con el fin de diferenciar fases de abundancia y de limitación de nutrientes (en inglés feast & famine).

De esta forma, las necesidades de sustrato por parte de los microorganismos, así como los mecanismos para la inducción de la producción son determinantes en la definición del régimen operacional y de la(s) tasa(s) de alimentación, si el proceso lo requiere. La definición del régimen operacional debe considerar tanto las características de los equipos disponible como las del microorganismo.

Algunos elementos clave en esta definición son la posibilidad de mutación en la cepa, los efectos de inhibición generados por altas concentraciones de sustrato y la concentración final del producto. La siguiente tabla presenta los cambios en el modelo matemático generados al incluir la alimentación.

Tabla 12. Ecuaciones para concentración de biomasa, producto y sustrato para cultivos por lote, lote alimentado y continuo.

	Lote	Lote alimentado	Continuo
<b>Biomasa</b>	$\frac{dX}{dt} = \mu X - K_d X$	$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F}{V} X$	$\frac{dX}{dt} = \mu X - K_d X - \frac{F}{V} X$
<b>Sustrato</b>	$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu}{-Y_{x/s}} X$	$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} (S_0 - S) - \frac{1}{Y_{x/s}} \mu X$	$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu}{-Y_{x/s}} X + \frac{F}{V} (S_0 - S)$
<b>Producto</b>	$\frac{dP}{dt} = \mu_p X$	$\frac{dP}{dt} = \mu_p X - \frac{F}{V} P$	$\frac{dP}{dt} = (\mu - D) X$

donde  $\mu_p$  es una función independiente ó  $\mu_p = f(\mu_x)$  (Shuler *et al.*, 2002).

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Optimización por programación matemática

La estrategia de optimización fue basada en el método secuencial modular, el cual consiste en el particionamiento del problema de optimización en dos sub-problemas más simples, uno es el problema de integración numérica y otro, el problema de optimización (Edgar *et al.*, 2001). Estos problemas deben ser resueltos secuencialmente y su solución puede hacerse por diferentes métodos, en este trabajo se usaron *solvers* disponibles en MATLAB. Las condiciones de cultivo se mantuvieron de acuerdo a lo obtenido en los resultados de la validación del modelo, sección 3.2.3, con respecto a las condiciones ambientales se mantuvieron las propuestas por el grupo de investigación, ver Tabla 2. A excepción de la fuente de carbono.

Considerando la operación en lote alimentado, como variable de optimización se tendrán la alimentación para la fuente de carbono y de nitrógeno, y el criterio de optimización será la concentración de producto. El algoritmo de optimización que fue implementado para las tasas de alimentación fue el mismo que se usó para optimizar los parámetros cinéticos, el *gaoptimset*, esto con el fin de dar la misma flexibilidad que se dio en el modelo, pero con un número de generaciones e iteraciones diferentes.



Hay que tener en cuenta que la alimentación usada en este modelo es de dos flujos diferentes, uno para fuente de carbono y otro para fuente de nitrógeno, con el fin de actuar sobre la relación carbono nitrógeno en la optimización y que esta relación pudiera variar con sus dos términos independientes. El tipo de alimentación que se uso fue por pulsos, esto se debe a la complejidad que tendría la alimentación de una corriente de ácido graso de alta concentración, lo que no permite garantizar que la alimentación usando un flujo en el tiempo este con la concentración y tasa deseada. Para el algoritmo de optimización el pulso se simuló por un flujo aplicado en un intervalo de 0.01 h, permitiendo que el algoritmo estime los flujos óptimos; mientras que, las concentraciones de la alimentación se definieron como 895 g/L para la alimentación de ácido graso, que equivale al ácido oleico puro, y 50 g/L para la alimentación de amonio.

En la función de integración se usó el *sol/ver ode23s*, el cual tiene la capacidad de integrar el set de ecuaciones diferenciales, teniendo en cuenta condiciones iniciales establecidas. En este caso se integró a partir de las condiciones iniciales del proceso (Biomasa residual, PHB, Sustrato carbono, Sustrato Nitrógeno), el vector de tiempo para los datos de salida incluye los tiempos definidos para el muestreo y para la alimentación.

El modelo final formulado en el capítulo 3 fue ajustado para la operación en lote alimentado (ver Tabla 12). Considerando que en la optimización del proceso se permite la alimentación, esta alimentación debe modificar la relación C/N en el medio de cultivo, por lo que el criterio para la transición del modelo feast al modelo famine será el  $C/N_{cambio} = 5.9$  g/g. Los parámetros cinéticos del modelo se encuentran registrados en la Tabla 10.

$$si \frac{C}{N} < \frac{C}{N}_{cambio} \quad \begin{cases} \mu_x = \left[ \mu_{xmax} * \left( \frac{S_c}{K_{S_{cx}} + S_c} \right) * \left( \frac{S_n}{K_{S_{nx}} + S_n} \right) \right] \\ \mu_p = \left[ \mu_{pmax} * \left( \frac{S_c}{K_{S_{cp}} + S_c} \right) \right] \end{cases}$$

$$si \frac{C}{N} = \frac{C}{N}_{cambio} \quad T_{cambio} = t$$

$$si \frac{C}{N} > \frac{C}{N} cambio \left\{ \begin{array}{l} \mu_x = \left[ \mu_{xmax2} * \left( \frac{S_c}{K_{Scx2} + S_c} \right) * \left( \frac{S_n}{K_{Snx} + S_n} \right) \right] \\ si \ t < Tcambio + Tadapt \ \mu_p = \mu_{pmax2} \left( \frac{S_c}{K_{Scp2} + S_c} \right) * \left[ \frac{t - Tcambio}{Tadapt} \right]^\alpha \\ si \ t > Tcambio + Tadapt \ \mu_p = \left[ \mu_{pmax2} \left( \frac{S_c}{K_{Scp2} + S_c} \right) \right] \end{array} \right.$$

$$\mu_{Sc} = - \left[ \frac{1}{Y_{x/Sc}} * \mu_x \right] - \left[ \frac{1}{Y_{p/Sc}} * \mu_p \right]$$

$$\mu_{Sn} = - \frac{1}{Y_{x/Sn}} * \mu_x + m_n$$

Con el cálculo de las tasas específicas se calcula las derivadas según:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x * X - X * \left[ \frac{(F_C + F_N)}{V} \right]$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p * X - P * \left[ \frac{(F_C + F_N)}{V} \right]$$

$$\frac{dSc}{dt} = - \left[ \frac{\mu_x}{Y_{x/s}} + m_c \right] * X - \left( \frac{\mu_p}{Y_{p/s}} * X \right) + \left[ \frac{((\rho_{ác.oleico} * F_C) - (S_c * (F_C + F_N)))}{V} \right]$$

$$\frac{dSn}{dt} = - \left[ \frac{\mu_x}{Y_{x/s}} + m_n \right] * X + \left[ \frac{((S_{Nmáx} * F_N) - (S_n * (F_C + F_N)))}{V} \right]$$

$$\frac{dV}{dt} = F_C + F_N$$

#### 4.2.2 Validación de la optimización.

La verificación de los resultados se realizará con una corrida experimental con las condiciones definidas por el algoritmo de optimización, alimentando el volumen total definido en cada instante. Al definir como objetivo de la optimización la maximización la cantidad de producto al final del proceso, se logra que el algoritmo de optimización arroje propuestas para la política de alimentación, lo que permitirá mejorar o definir el régimen de operación.

### 4.3 Resultados y análisis

#### 4.3.1 Optimización por programación matemática.

Tal como se mencionó en la metodología para realizar la optimización fue necesario trabajar con los criterios iniciales planteados en estudios previos del grupo de investigación, fuente de carbono (ácido oleico) 20 g/L, fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) 2.5 g/L, también se mantuvieron las condiciones operacionales, 350 rpm, 1.6 L de volumen de trabajo, 2 vvm, pH 6,5. La alimentación se definió por pulsos, con opción de alimentar a las horas 12, 24, 36, 48 y 72 con dos corrientes de alimentación independientes ( $F_C$  y  $F_N$ ), una para fuente de carbono y otra para fuente de nitrógeno. La alimentación independiente permite el ajuste de las composiciones de los sustratos y de la relación C/N, para que el algoritmo, durante el proceso de optimización, pueda “decidir” el instante óptimo para hacer el cambio de fase (de feast a famine) lo que equivale a “decidir” la duración de la fase exponencial. Los volúmenes de alimentación óptimos en cada instante se presentan en la siguiente tabla

*Tabla 13. Régimen de alimentación óptimo.*

Hora	0	12	24	36	48	72	96
Volumen de $F_C$ (mL)	0	16.55	0	7.16	0	1.43	0
Volumen de $F_N$ (mL)	0	0.005	0	1.23	0	0.28	0

Este régimen de alimentación lo genera el programa con las condiciones que se plantearon iniciales y el número de intervalos definidos, las horas de alimentación se definieron haciendo múltiples corridas del algoritmo, lo que permitió identificar los mejores instantes para alimentar y liberando límites inferiores y superiores de los flujos hasta su máximo de 3.22 L/h. Se llegó a la conclusión que los instantes en que se debe alimentar dependen de la relación C/N, ya que el cambio en esta relación define qué fase del modelo se va a usar (feast o famine) y que tanto se podría extender el modelo feast para tener una fase exponencial más prolongada

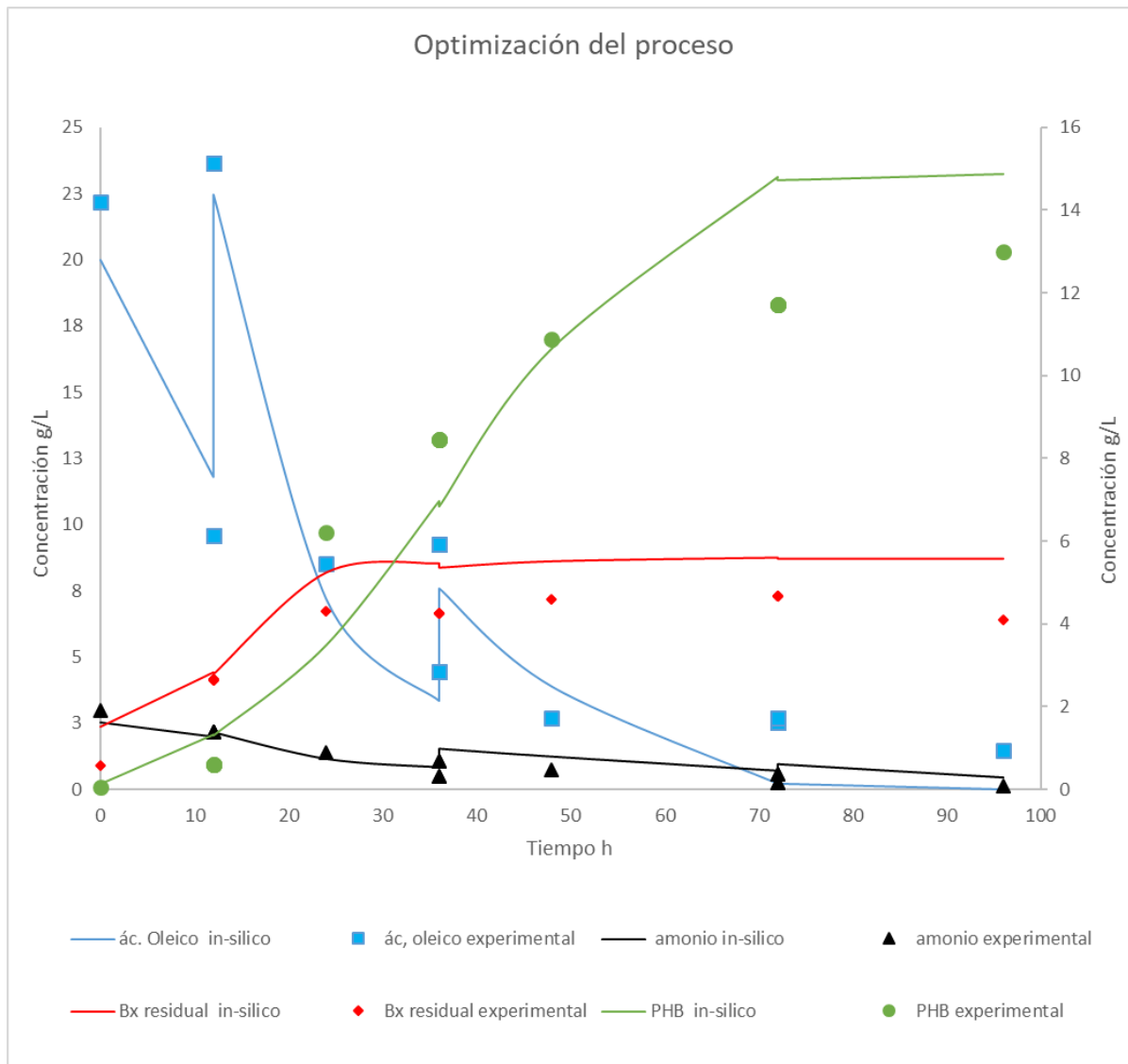
sin afectar la producción del polímero intracelular. En ese sentido, la alimentación en la hora 12 evita que la relación C/N pase el valor crítico ( $C/N_{\text{cambio}}$ ) para que el proceso se mantenga en la fase de feast, mientras que la alimentación en la hora 36 parece estar destinada únicamente a evitar que la fuente de carbono se agote (ver Gráfica 19).

#### 4.3.2 Validación experimental de la optimización

Con los resultados dados por el algoritmo de optimización empleado se corrió una fermentación en el reactor Sartorius Biostat A con un volumen de trabajo de 1.6L teniendo en cuenta que su alimentación es por pulsos y se va a hacer una adición de volumen, se emplearon las mismas condiciones operacionales que fueron usadas en los ensayos anteriores, incluyendo el tren de inóculo y el banco de trabajo. Las muestras fueron procesadas tal como se explica en el anexo 4. Los resultados de este nuevo régimen de alimentación se presentan a continuación:

Este régimen de alimentación tiene como objetivo principal, la producción de polímero intracelular; sin embargo, por el comportamiento de la cepa, la solución obtenida busca mantener un balance entre las fuentes de carbono y nitrógeno para permitir que las rutas metabólicas como la síntesis de proteínas se mantuvieran activas por más tiempo logrado aumentar la producción del polímero.

Como se observa en la gráfica 19, la fase exponencial aumenta de 14 horas (en la fermentación batch, Gráfica 12) a 24 horas, un resultado significativo en términos de mejorar el problema planteado inicialmente, por otro lado la producción del polímero no se ve afectada por este cambio, mostrando resultados de aproximadamente 50 % de acumulación en la hora 24 y de aproximadamente 70 % en la hora 36, resultados favorables en términos de productividad, esta acumulación se mantiene las siguientes horas del proceso y se aumenta en las últimas horas llegando a una acumulación final de 77%.



Gráfica 19. Optimización del proceso para *B. cepacia* B27.

Debido a un buen ajuste en el modelo planteado en el capítulo 3 se logra predecir el comportamiento bacteriano, y se logró un mejoramiento en el proceso con la manipulación del régimen de alimentación implementando el algoritmo elaborado para este proceso en específico. Aunque los resultados no alcanzan a llegar al umbral de lo predicho por el algoritmo, se tienen comportamientos similares y aproximados a los óptimos, al implementar el algoritmo genético para determinar el régimen de alimentación y al ser integrado por el solver ode23s, se logró tener

una flexibilidad en los resultados obtenidos *in silico*, lo que hace que pueda predecir un comportamiento intracelular a partir de sus velocidades de consumo y producción extracelulares.

#### **4.3.3** Análisis de Flujos Metabólicos para la optimización.

Haciendo uso de los datos y de las metodologías usadas en el capítulo 2 sección 2.1.2, se optó por usar de nuevo la herramienta matemática del análisis de flujos metabólicos con las velocidades extracelulares obtenidas con el régimen de alimentación óptimo. Recordando, este análisis se realizó basado en los balances macromoleculares y la matriz estequiométrica compuesta de 59 reacciones y 55 metabolitos, con la medición de 4 flujos extracelulares (tasas específicas de consumo y producción), con estos datos se logra la estimación de todos los flujos intracelulares del metabolismo central.

El análisis de flujos metabólicos se hace con el fin de corroborar la nueva hipótesis planteada con la optimización del proceso, usando un modelo basado en el fundamento feast & famine que tenga una buena predicción del comportamiento de *Burkholderia cepacia* B27 en un algoritmo que optimice el régimen de alimentación, se logrará una nueva distribución de carbono intracelular que favorecerá el crecimiento bacteriano sin afectar la producción de PHB.



Sabiendo que, las tasas intracelulares que se calculan con esta herramienta dependen de los flujos extracelulares medidos, se espera que haya diferencias significativas con las obtenidas en el proceso batch. En el primer instante (hora 12), se observa un aumento en las tasas involucradas en la vía de los ácidos tricarbóxicos, estas son 8 veces mayores que las tasas calculadas del cultivo en lote (Gráfica 5), lo que se puede explicar como un direccionamiento del acetil-CoA hacia esta vía, esto indica que la relación C/N si tiene control sobre la inactivación de esta vía por algún desbalance que pueda generarse cuando esta relación cambia. También se encuentran diferencias entre las velocidades de producción de PHB en este instante. La distribución de carbono se calcula en los distintos instantes, en la hora 12 la distribución de carbono es del 39% para producción de PHB y 61% para formación de Biomasa y energía. Esto también se evidencia con el aumento en las tasas involucradas en la gluconeogénesis y vía de las pentosas, vías precursoras de metabolitos involucrados en la formación de biomasa.

En el segundo instante medido (hora 24), empieza una transición de una etapa de condiciones óptimas en las fuentes de carbono y nitrógeno a una etapa en la que la relación C/N disminuye y favorece la distribución de carbono hacia la producción de PHB, presentando valores más altos que en cultivo lote, las tasas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos disminuyen en este instante llegando a ordenes similares al de cultivo tipo lote. Datos que se comprueban con los porcentajes de distribución de carbono calculados, una distribución del 57 % para producción de PHB y 43 % para formación de biomasa. La tasa de producción de PHB disminuye, pero aún se mantiene cercana a la de la hora 12, estos resultados comprueban que el régimen de alimentación implementado no afecta la producción temprana del polímero, por lo contrario, la alimentación de fuente de carbono en  $t = 12$  h parece favorecer la producción temprana de polímero.

A partir de la hora 48 se puede ver como esta transición culmina, dirigiendo aproximadamente el 100% del carbono restante para la producción de PHB y dejando un remanente para condiciones de mantenimiento celular (dato que se tiene en cuenta en el modelo para las dos fuentes usadas). Este comportamiento



se mantiene hasta la hora 72 (datos no mostrados), cuando la cepa presenta una velocidad de producción de PHB baja y crecimiento nulo, esto comprueba que el tiempo en el cultivo de 96 horas llega a ser innecesario para optimizar el proceso.

#### **4.4 Conclusiones.**

Con la aplicación de algoritmos de optimización sobre el modelo para el proceso de producción de PHB por *Burkholderia cepacia* B27 se logró aumentar el crecimiento celular llegando a 18 g/L de biomasa total con un porcentaje de acumulación de 77 %. Con el nuevo régimen de alimentación se prolongó la fase de crecimiento exponencial a 24 horas sin afectar su producción de polímero. El régimen de alimentación obtenido mantiene la relación C/N sobre el valor crítico que define el cambio de fase (de feast a famine) por un tiempo mayor, con lo que se actúa sobre la distribución de carbono.

A partir de la Validación los resultados del nuevo régimen de alimentación con un análisis de flujos metabólicos se puede comprobar la hipótesis de cambio de dirección en la distribución de carbono notando un cambio en las tasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la hora 12, lo que indica que manteniendo la relación C/N por encima del valor que se estimó para el cambio de feast a famine, se mantiene en condiciones adecuadas para que el metabolismo se mantenga dirigido hacia crecimiento bacteriano y se corrobora con la medición en ese mismo instante de la tasa de producción de PHB la cual disminuye a la mitad con respecto al mismo instante en el cultivo tipo lote.



# Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones.

## 5.1 Conclusiones

El estudio del proceso de producción de PHA por *B. cepacia* B27 desde la perspectiva metabólica, con la identificación de las vías y la deducción de una reacción para la generación de biomasa que considera las principales macromoléculas involucradas, permitió la estimación de los flujos en las diferentes vías para analizar el comportamiento intracelular de la cepa en diferentes condiciones mediante MFA lineal.

Los resultados del MFA confirman que el metabolismo sufre cambios drásticos durante el desarrollo del proceso batch: al inicio del proceso, con las fuentes de carbono y nitrógeno bien balanceadas, el metabolismo direcciona los flujos de carbono mayoritariamente hacia la producción de biomasa (87 %), mientras que en la fase estacionaria del proceso, cuando la relación carbono/nitrógeno (C/N) se ha reducido, generando un desbalance de estos sustratos, el metabolismo sufre una dinámica importante pasando de 70 % a 14 % de carbono direccionado a biomasa, entre la hora 24 y 48. Lo anterior confirma que durante el proceso la cepa pasa por fases de abundancia y hambruna (feast & famine) que deben ser consideradas en el modelamiento del proceso. Así mismo, el análisis RGA indica que la relación C/N es el parámetro que mejor se correlaciona con el cambio de comportamiento de la cepa y que podría ser considerado para predecir la transición entre las fases feast & famine.

Durante el proceso iterativo de formulación y ajuste del modelo matemático se observó que el mejoramiento en el ajuste se logró en mayor medida por la inclusión del concepto de feast & famine con un periodo de adaptación. Para el proceso

batch, el instante de transición estimado por el algoritmo de optimización (12.9 horas) se ajustó bastante bien con el final de la fase exponencial estimado, a partir de los datos experimentales, durante la caracterización del comportamiento de la cepa (14 horas). Por su parte, la relación C/N se definió como el parámetro clave para la transición, con un valor crítico que implica el cambio de fase y de modelo: si  $C/N > 5.9$  g/g la cepa está en fase de abundancia, caso contrario está en fase de hambruna.

La inclusión de un tiempo de adaptación para la transición entre las fases difiere de las propuestas de varios autores que consideran que el *switch* entre los modelos es inmediato. La existencia de un tiempo de adaptación es consecuente con la necesidad que tiene el microorganismo de ajustar su maquinaria para cumplir el nuevo objetivo metabólico. El ajuste del metabolismo, durante el cambio de fase, implica modificaciones importantes en los flujos intracelulares e incluso la inactivación de algunas vías metabólicas, como se observa en los resultados de MFA. Este comportamiento disyuntivo del metabolismo de *B. cepacia*, que en el proceso batch ocurre en un instante precoz, implica que durante la mayor parte del cultivo el carbono sea empleado en mayor proporción para la producción de PHB dejando un remanente para mantenimiento celular.

La precocidad de la terminación de la fase de crecimiento será uno de los elementos clave en la optimización del proceso, puesto que prolongar esta fase permite aumentar la concentración de biomasa, que al final del proceso se traduce en mayor concentración de polímero. Con el modelo planteado se logra una predicción satisfactoria de este comportamiento estableciendo que el cambio entre las fases feast & famine para *B. cepacia* B27 no es instantáneo.

Con el uso del modelo desarrollado y de técnicas de optimización matemática se logró una optimización satisfactoria del proceso considerando la maximización de la concentración de polímero. El éxito en la optimización del proceso puede verse en varios aspectos: el primero, con la implementación del régimen de alimentación propuesto se alcanzan concentraciones de biomasa total de 18 g/L con un 77% de acumulación de PHB, contra 15 g/L y aproximadamente 80% de acumulación para

el proceso batch, y 16 g/L y 80% para un proceso batch con reposición de sustratos en la hora 24 (Méndez, 2016).

El segundo indicador del éxito de la optimización es la prolongación de la fase exponencial, de 14 a 24 horas, lo que se logra con la alimentación en la hora 12 tanto de fuente de carbono como de nitrógeno en las cantidades justas para evitar que la relación C/N baje del valor crítico y se termine la fase exponencial debido al desbalance de sustratos. Finalmente, el último indicador de éxito de la optimización es la obtención de valores experimentales similares a los predichos *in sílico*, superando la dificultad de simular un proceso por lote alimentado empleando un modelo obtenido con datos de experimentos por lote.

La prolongación de la fase de crecimiento exponencial de la bacteria sin afectar la capacidad de acumular PHB desde horas tempranas, teniendo acumulación del 70% desde los primeros instantes de la fase estacionaria (hora 36), genera opciones para incrementar la productividad del proceso.

## 5.2 Recomendaciones

El uso de herramientas matemáticas e ingenieriles fue un soporte fundamental para predecir el comportamiento de una bacteria hiperproductora de PHB obtenida por mutación, cuya distribución interna de carbono era desconocida. La carencia de conocimiento detallado del comportamiento del microorganismo genera incertidumbre en el análisis del proceso y en la definición de las condiciones operacionales para mejorar su desempeño. El análisis realizado en este trabajo sirve de punto de partida e incentivo para futuras investigaciones donde se empleen herramientas que permitan aumentar el conocimiento del comportamiento de la cepa, como proteómica, metabolómica y genómica, tecnologías que se usan para la validación de este tipo de modelos y que permiten medir experimentalmente concentraciones intracelulares para así cuantificar velocidades que en este estudio se consideran teóricas.

La capacidad de predicción del modelo es clave para garantizar su uso futuro, para evaluar esta capacidad se debe analizar la calidad de la predicción en otras condiciones. Se recomienda el uso de este régimen operacional en procesos de escalamiento a planta piloto y evaluar el poder de predicción del modelo, con lo que se podrá inferir sobre la robustez del modelo y, si es necesario, definir nuevos ajustes en el modelo.

Dentro del objetivo del grupo de investigación de lograr una producción rentable en escala de 2000 L se deben analizar otras estrategias operacionales que permitan lidiar con la imposibilidad de alcanzar concentraciones de biomasa superiores a 20 g/L. Algunas opciones de estrategia operacional son la operación continua que permite retirar biomasa continuamente para evitar concentraciones que parecen ser inhibitorias, o la operación en lotes o lotes alimentados consecutivos que permite aprovechar mejor los sustratos.

También se considera importante estudiar el efecto de la disponibilidad de oxígeno en el metabolismo, pues se ha observado que el suministro y disponibilidad de este sustrato es clave en el proceso.

Para buscar la implementación del proceso en escala comercial, sería de gran utilidad desarrollar la optimización considerando la productividad como función objetivo.

Dado que el proceso implica dinámicas importantes en el comportamiento intracelular, se sugiere estudiar el control metabólico buscando aumentar el conocimiento de dichas dinámicas.

# Anexos

## Anexo 1. Matriz estequiométrica y balance macromolecular.

### Balance para proteínas.

Aa	mol%	SD	GLCpyt	GEpyt	FGpyt	FBpyt	DHAPpyt	GAPpyt	PG3pyt	NADHPyt	PEPpyt	PIrpyt	GDHpyt	NADPHpyt	ICD2	RUSpyt	RSpyt	XUSpyt	S77pyt	Erfpyt	OAApyt	AKGpyt	ACEpyt	ACCOApyt	ID2	ATP
ALA	12,1231	0,0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARG	6,9888	0,0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-7
ASP+ASN	5,6894	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-3
CYST	2,1572	0,0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-4
GLU+GLN	6,2066	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	0	-1
GLY	0,0000	0,0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HIS	2,2455	0,0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	-1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	-6
ILE	6,8500	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2
LEU	10,6345	0,0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LYS	8,0863	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-4	1	0	0	0	0	0	0	-1	0	-1	0	-3
MET	3,6205	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-8	-1	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	-7
ORN→ARG	0,0	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-3	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHE	4,3774	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	-2	1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	-1
PRO	5,2227	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
SER	5,0839	0,0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THR	5,9796	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-2
TRP	1,3372	0,00	0	0	0	0	0	0	0	2	-1	0	0	-3	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	-5
TYR	3,4187	0,0	0	0	0	0	0	0	0	1	-2	0	0	-2	1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	-1
VAL	9,9786	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			G	G	F	F	D	G	P	N	P	P	G	N		R		X	S	E	O	A	A	A	A	
			L	6	6	B	A	A	G	A	D	E	O	A		U		U	7	4	A	A	C	C		
			C	P	P	P	P	P	3	H	P	R	L	H		S		S	P	P	A	G	E	A		
			c	c	c	c	c	c	c	C	C	C	C	C		P		P	c	c	c	c	c	c		
			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		
			T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		T		T	T	T	T	T	T	T		
100,0000			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,09	0,17	-0,06	0,00	0,00	-1,96	0,32	0,00	-0,03	0,00	0,00	-0,04	-0,15	-0,29	0,00	-0,07	0,00	-1,64
			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,03	-0,01	0,00	0,00	-0,41	0,07	0,00	-0,01	0,00	0,00	-0,01	-0,03	-0,06	0,00	-0,01	0,00	-0,34





## Biomasa

	%w/w	SD%w/w	Cmol/100g	n/n		DW	3,4
Proteins	50,0	5,00	1,8285	0,43325858		Proteins	1,473079184
Carbohidr.	0,5	0,03	0,01849931	0,00438334		Carbohidr.	0,014903364
Lipids	43,0	4,30	2,18924111	0,5187324		Lipids	1,763690146
RNA	6,0	0,30	0,16939163	0,04013671		RNA	0,1364648
DNA	0,5	0,05	0,01472474	0,00348897		DNA	0,011862506
		0,00					
	100,0		4,2204				3,4
	Proteins	Carbohidr.	Lipids	RNA	DNA	GLOBAL	
GLCcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	6
G6Pcyt	0,00	-0,16	0,00	0,00	0,00	-0,0007	6
F6Pcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	6
FBPcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	6
DHAPcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	3
GAPcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	3
PG3cyt	-0,05	0,00	0,00	-0,06	-0,05	-0,0233	3
NADHcyt	0,05	0,00	0,00	0,17	0,16	0,0291	0
PEPcyt	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,0025	3
PYRcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	3
GOLcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	3
NADPHcyt	-0,35	0,00	-0,47	-0,21	-0,22	-0,4044	0
iCO2	0,08	0,00	0,00	-0,06	-0,08	0,0342	1
RU5Pcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	5
R5Pcyt	0,00	0,00	0,00	-0,10	-0,11	-0,0062	5
XU5Pcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	5
S7Pcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	7
E4Pcyt	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,0013	4
OAAcyt	-0,03	0,00	0,00	-0,05	-0,05	-0,0160	4
AKGcyt	-0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,0423	5
ACEcyt	0,00	0,00	-0,34	0,00	0,00	-0,1762	2
ACCOAcyt	-0,01	0,00	-0,16	0,00	0,00	-0,0867	2
iO2	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00	-0,0098	0
ATP	-0,27	-0,17	-0,30	-0,85	-0,82	-0,3119	0
	-0,73893903	-0,99065663	-1	-0,94319849	-0,97834211		-0,88449675



Lista de metabolitos en el metabolismo central de *Burkholderia cepacia* B27.

ID	NAME	COMPOSITION	REPLACEMENT ID
ACIDO_HEXADECANOICO[c]	ACIDO_HEXADECANOICO/ACIDO_PALMITICO	C16H32O2	M0001
ACIDO_HEXADECANOICO_COA[c]	PALMITOIL_COA	C37H66N7O17P3S	M0002
TRANS-2_3-DIHIDROHEXADECANOILCOA[c]	TRANS-2-HENADECENOIL_COA	C37H64N7O17P3S	M0003
S-3-HIDROXIHEXADECANOIL_COA[c]	S-3-HIDROXIHEXADECANOIL_COA	C37H66N7O18P3S	M0004
3-OXOHEXADECANOIL_COA[c]	3-OXOPALMITOIL_COA	C37H64N7O18P3S	M0005
TETRADECANOIL_COA[c]	TETRADECANOIL_COA	C35H62N7O17P3S	M0006
TRANSTETRADEC-2-ENOIL_COA[c]	TRANSTETRADECANOIL_COA	C35H60N7O17P3S	M0007
S-3-HIDROXITETRADECANOIL_COA[c]	S-3-HIDROXITETRADECANOIL_COA	C35H62N7O18P3S	M0008
3-OXOTETRADECANOIL_COA[c]	3-OXOTETRADECANOIL_COA	C35H60N7O18P3S	M0009
LAUROIL_COA[c]	LAUROIL_COA	C33H58N7O17P3S	M0010
2-TRANSDODECENOIL_COA [c]	2-TRANSDODECENOIL_COA	C33H56N7O17P3S	M0011
S-3-HIDROXIDODECANOIL_COA[c]	S-3-HIDROXIDODECANOIL_COA	C33H58N7O18P3S	M0012
3-OXODODECANOIL_COA[c]	3-OXODODECANOIL_COA	C33H56N7O18P3S	M0013
DECANOIL_COA[c]	DECANOIL_COA	C31H54N7O17P3S	M0014
TRANS-2-DECENOIL_COA[c]	TRANS-2-DECENOIL_COA	C31H52N7O17P3S	M0015
S-HIDROXIDECANOIL_COA[c]	S-HIDROXIDECANOIL_COA	C31H54N7O18P3S	M0016
3-OXODECANOIL_COA[c]	3-OXODECANOIL_COA	C31H52N7O18P3S	M0017
OCTANOIL_COA[c]	OCTANOIL_COA	C29H50N7O17P3S	M0018
TRANS-2-OCTANOIL_COA[c]	TRANS-2-OCTANOIL_COA	C29H48N7O17P3S	M0019
S-3-HIDROXIOCTANOIL_COA[c]	S-3-HIDROXIOCTANOIL_COA	C29H50N7O18P3S	M0020
3-OXOOCTANOIL_COA[c]	3-OXOOCTANOIL_COA	C29H48N7O18P3S	M0021
HEXANOIL_COA[c]	HEXANOIL_COA	C27H46N7O17P3S	M0022
TRANSHEXANOIL_COA[c]	TRANSHEXANOIL_COA	C27H44N7O17P3S	M0023
S-3-HIDROXIHEXANOIL_COA[c]	S-3-HIDROXIHEXANOIL_COA	C27H46N7O18P3S	M0024
3-OXOHEXANOIL_COA[c]	3-OXOHEXANOIL_COA	C27H44N7O18P3S	M0025
BUTANOIL_COA[c]	BUTANOIL_COA	C25H42N7O17P3S	M0026
CROTONIL_COA[c]	CROTONIL_COA	C25H40N7O17P3S	M0027
S-3-HIDROXIBUTANOIL_COA[c]	S-3-HIDROXIBUTIRIL_COA	C25H42N7O18P3S	M0028
ACETOACETIL_COA[c]	ACETOACETIL_COA	C25H40N7O18P3S	M0029
ACETIL_COA[c]	ACETIL_COA	C23H38N7O17P3S	M0030
R-3-HIDROXIBUTANOIL_COA[c]	R-3-HIDROXIBUTANOIL_COA	C25H42N7O18P3S	M0031
POLI-B-HIDROXIBUTIRATO[c]	POLI-B-HIDROXIBUTIRATO	(C4H6O2)n	M0032
R-3-HIDROXIBUTANOILOXIBUTANOATO[c]	R-3-HIDROXIBUTANOILOXIBUTANOATO	C8H14O5	M0033
R-3-HIDROXIBUTANOATO[c]	R-3-HIDROXIBUTANOATO	C4H8O3	M0034
ACETOACETATO[c]	ACETOACETATO	C4H6O3	M0035
CITRATO[c]	CITRATO	C6H8O7	M0036
OXALOSUCCINATO[c]	OXALOSUCCINATO	C6H6O7	M0037
2-OXOGLUTARATO[c]	2-OXOGLUTARATO	C5H6O5	M0038
SUCCINIL_COA[c]	SUCCINIL_COA	C25H40N7O19P3S	M0039
SUCCINATO[c]	SUCCINATO	C4H6O4	M0040
FUMARATO[c]	FUMARATO	C4H4O4	M0041
S-MALATO[c]	S-MALATO	C4H6O5	M0042
OXALACETATO[c]	OXALACETATO	C4H4O5	M0043
FOSFOENOLPIRUVATO[c]	FOSFOENOLPIRUVATO	C3H5O6P	M0044
3-FOSFO-D-GLICERATO[c]	3-FOSFO-D-GLICERATO	C3H7O7P	M0045
3-FOSFO-D-GLICEROILFOSFATO[c]	3-FOSFO-D-GLICEROILFOSFATO	C3H8O10P2	M0046
D-GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO[c]	D-GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO	C3H7O6P	M0047
D-FRUCTOSA-1_6-BIFOSFATO[c]	D-FRUCTOSA-1_6-BIFOSFATO	C6H14O12P2	M0048
D-FRUCTOSA-6-FOSFATO[c]	D-FRUCTOSA-6-FOSFATO	C6H13O9P	M0049
D-GLUCOSA-6-FOSFATO[c]	D-GLUCOSA-6-FOSFATO	C6H13O9P	M0050
PENTOSA-5-FOSFATO	D-PENTOSA-5-FOSFATO	C5H11O8P	M0051
SEUDOHEPTULOSA-7-FOSFATO[c]	SEUDOHEPTULOSA-7-FOSFATO	C7H15O10P	M0052
D-ERITROSA-4-FOSFATO[c]	D-ERITROSA-4-FOSFATO	C4H9O7P	M0053
CO2[c]	DIOXIDO DE CARBONO	CO2	M0054
Biomasa[c]	biomasa	CH1,98N0,25O0,22S0,002	M0055

## Anexo 2. Comandos Matlab para MFA lineal

```

function [ MFA ] = FUN( Sm, Sc, Vm )
%Análisis de Flujos Metabólicos
% Funciones para calcular el vector de flujos desconocidos (Vc)

>> ibcS3'

>>Sc=[ibc27S2(:,1),ibc27S2(:,2),ibc27S2(:,3),ibc27S2(:,4),ibc27S2(:,5),ibc27S2
(:,6),
ibc27S2(:,7),ibc27S2(:,8),ibc27S2(:,9),ibc27S2(:,10),ibc27S2(:,11),ibc27S2(:,1
2),ibc27S2
(:,13),ibc27S2(:,14),ibc27S2(:,15),ibc27S2(:,16),ibc27S2(:,17),ibc27S2(:,18),i
bc27S2(:,
19),ibc27S2(:,20),ibc27S2(:,21),ibc27S2(:,22),ibc27S2(:,23),ibc27S2(:,24),ibc2
7S2(:,25),
ibc27S2(:,26),ibc27S2(:,27),ibc27S2(:,28),ibc27S2(:,29),ibc27S2(:,30),ibc27S2(
:,31),
ibc27S2(:,32),ibc27S2(:,34),ibc27S2(:,35),ibc27S2(:,36),ibc27S2(:,37),ibc27S2(
:,38),
ibc27S2(:,39),ibc27S2(:,40),ibc27S2(:,41),ibc27S2(:,42),ibc27S2(:,43),ibc27S2(
:,44),
ibc27S2(:,45),ibc27S2(:,46),ibc27S2(:,47),ibc27S2(:,48),ibc27S2(:,49),ibc27S2(
:,50),
ibc27S2(:,51),ibc27S2(:,52),ibc27S2(:,53),ibc27S2(:,54),ibc27S2(:,55),ibc27S2(
:,56),
ibc27S2(:,57),ibc27S2(:,58),ibc27S2(:,59),ibc27S2(:,60),ibc27S2(:,61)]

>> rank(Sc)

>> Sm=[ibc27S2(:,1),ibc27S2(:,33),ibc27S2(:,58),ibc27S2(:,59)]

>> SmVm=Sm*Vm

>> Vc=Scinv*SmVm
end

```

## Anexo 3. Matrices RGA

Definiendo  $\Delta U_i$

hora	[amonio $\mu\text{mol/ml}$ ] U1	[Citrato $\mu\text{mol/ml}$ ] U2	Succinato $\mu\text{mol/ml}$	[citrato/amonio] U4	[succ/NH <sub>3</sub> ] U5	[succ/cit] U6	C/N
0	0.150	0	0	0	0	0	0.47
12	0.097	0	0	0	0	0	0.36
24	0.090	0	0	0	0	0	0.32
36	0.084	0	0	0	0	0	0.27
48	0.066	0.007	0.065	0.11	0.98	0.59	0.22
72	0.054	0.016	0.316	0.29	5.83	1.10	0.15
96	0.045	0.019	0.617	0.42	13.71	1.48	0.14

	Matriz 1 (0-24h)	Matriz 2 (24-48h)	Matriz 3(48-72h)	Matriz 4(72-96h)
$\Delta U1$	0.060	0.024	0.012	0.009
$\Delta U2$	0	0.007	0.008	0.003
$\Delta U3$	0	-0.065	-0.251	-0.301
$\Delta U4$	0	-0.109	-0.178	-0.130
$\Delta U5$	0	-0.983	-4.849	-7.877
$\Delta U6$	0	-0.594	-0.506	-0.376
$\Delta U7$	0.150	0.106	0.069	0.010

Definiendo  $\Delta Y_i$ 

hora	Us(V1)Y1	Up(V33)Y2	UCO2(v58)Y3	Ux (V59)Y4	V30 Y5	V37 Y6	V38 Y7	V42 Y8	V46 Y9
0	3.531	0.16	0.085	3.67	-10.56	132.10	0.063	-132.04	-0.0067
12	0.598	0.18	0.097	1.18	-1.77	22.13	0.055	-22.08	-0.0022
24	0.186	0.21	0.081	0.48	-0.54	6.76	0.043	-6.71	-0.0009
36	0.068	0.22	0.082	0.16	-0.18	2.34	0.042	-2.30	-0.0003
48	0.058	0.26	0.085	0.04	-0.15	1.96	0.043	-1.91	-0.0001
72	0.042	0.21	0.071	0.00	-0.11	1.40	0.035	-1.36	0.0000
96	0.039	0.12	0.070	0.00	-0.10	1.31	0.035	-1.28	0.0000

	Matriz 1 (0-24h)	Matriz 2 (24-48h)	Matriz 3(48-72h)	Matriz 4(72-96h)
$\Delta Y1$	3.345	0.129	0.016	0.002
$\Delta Y2$	-0.055	-0.050	0.053	0.089
$\Delta Y3$	0.005	-0.004	0.014	0.001
$\Delta Y4$	3.194	0.439	0.037	0.000
$\Delta Y5$	-1.229	-0.385	-0.044	-0.006
$\Delta Y6$	125.343	4.801	0.561	0.081
$\Delta Y7$	0.020	0.00035	0.007	0.000
$\Delta Y8$	-125.327	-4.801	-0.553	-0.081
$\Delta Y9$	-0.006	-0.001	-0.00007	0.0000

## Anexo 4. Protocolos

### PROTOCOLO 1

#### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PHA

##### *Método de digestión de PHA*

Para facilitar el proceso de separación del PHA es necesario utilizar un reactivo orgánico que sea muy poco soluble en agua pero que sean afines químicamente con el compuesto de interés, es por ello, que, para el caso del poliéster, se facilitará la separación utilizando un agente tenso activo como lo es el SDS, el cual tiene una solubilidad en agua leve por hidrolisis lenta, pero es muy compatible químicamente con los poliésteres.

Para la cuantificación del polímero, se parte del procedimiento de cuantificación de biomasa sin realizar el secado buscando que la biomasa sin residuos del medio pueda ser digerida y sea posible cuantificar el PHA.

El precipitado obtenido se resuspende en agua destilada con 0.55 (mL/gBX) de solución de SDS al 20% y digeridos a 90°C durante una hora. Posteriormente, las muestras deben ser centrifugadas, para luego ser lavadas y secadas a 80°C durante 24 horas.

La cantidad de volumen de SDS que debe ser adicionado se determina por la siguiente ecuación:

$$X_{SDS} = m_{Bx}(mg) * \frac{0.55 \text{ mL sln}}{1000 \text{ mg}}$$

donde  $X_{SDS}$  son los mililitros de la solución al 20 % de SDS que deben ser adicionados y  $m_{Bx}$  es el peso de biomasa determinado en las muestras en miligramos.

**Procedimiento**

- Realizar el muestreo previo del caldo de fermentación en distintos tiempos
- Refrigerar las muestras
- Lavar y secar los tubos falcón que se usarán
- Pesar y marcar los tubos en balanza analítica
- Tomar 5mL de cada muestra del caldo de fermentación y llevar a tubo falcón
- Centrifugar a 6000rpm durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante en un recipiente (para hacer su adecuado descarte)
- Adicionar al pellet 5 mL de agua destilada y resuspender usando vortex
- Centrifugar a 6000rpm durante 10 minutos y descartar sobrenadante (repetir las veces necesarias).
- Agregar el volumen necesario de SDS para realizar la digestión y 2 mL de agua destilada
- Agitar en vortex
- Llevar a proceso de digestión en baño termostático a 90°C durante 1 hora.
- Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Reconstituir con 5 mL de agua destilada, centrifugar y descartar sobrenadante (repetir las veces necesarias)
- Secar a 75 °C durante 24 horas
- Pesar tubo de falcón seco
- Determinar la concentración de PHA.



## PROTOCOLO 2.

### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE BIOMASA

Método de precipitación: la especie de interés precipita mediante un proceso de centrifugación en ocasiones, es necesario la adición de algún reactivo para facilitar su separación de la fase líquida.

#### ***Procedimiento***

- Realizar el muestreo previo del caldo de fermentación en distintos tiempos
- Lavar y secar los tubos falcón que se utilizarán para la prueba
- Pesar y marcar los tubos falcón de 15 mL en balanza analítica
- Tomar 5 mL de cada muestra del caldo de fermentación y depositarlos en los tubos
- Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante en un recipiente para su posterior disposición
- Adicionar agua destilada estéril al pellet y resuspender con vortex
- Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos, descartar sobrenadante (realizar las veces necesarias)
- Secar las muestras de biomasa contenida en los tubos falcón usando una mufla a 75 °C durante 24 horas.
- Pesar los tubos secos
- Determinar la concentración de biomasa.

**PROTOCOLO 3.****Preparación de medios de cultivo y tren de inoculación**

Desarrollar la fermentación en un cultivo lote de 5 L de la cepa mutante *Burkholderia cepacia* B27 a partir del medio de cultivo preparado y el inóculo.

*Composición de micronutrientes*

<b>Compuesto</b>	<b>Nombre</b>
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de hierro
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobalto hexahidratado
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobre dihidratado
NiCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro de níquel hexahidratado
MgCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Cloruro de manganeso tetra hidratado
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	Ácido triborico
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio dihidratado

*Composición de medio de cultivo.*

<b>Compuesto</b>	<b>Nombre</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio difásico anhidro
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amonio
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico
Sln. Micronutrientes	
Acido oleico	
NaOH	Hidróxido de sodio N

*Composición de medio LB*

<b>Componente</b>	<b>Nombre</b>
NaCl	Cloruro de sodio
	Extracto de Levadura
	Triptosa

La fermentación en el biorreactor BioFlo/CelliGen\*115, es necesario realizar la preparación del medio de cultivo el cual le brindará al microorganismo las condiciones pertinentes para que este pueda tener un ambiente rico en sustratos y condiciones metabólicas que permita crecer en condiciones óptimas, así mejore su síntesis del producto intracelular deseado.

El proceso previo para realizar la fermentación en el reactor BioFlo\*/CelliGen\*115, es la preparación del tren de inóculo, que se basa en la preparación de los medios en volúmenes de 500mL y 5000mL; por otro lado, la preparación de medio LB.

*Preparación de micronutrientes:*

<b>Compuesto</b>	<b>Nombre</b>	<b>Concentración g/L</b>
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de hierro	2
CaCl <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio	2
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.2
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobre dihidratado	0.01
NiCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro de níquel hexahidratado	0.2
MgCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Cloruro de manganeso tetra hidratado	0.03
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado	0.1
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	Ácido tribórico	0.3
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio dihidratado	0.03

*Preparación de medio de cultivo:*

Compuesto	Nombre	Concentración g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio difásico anhidro	3.39
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amonio	2.8
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	0.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico	2.65
Sln. Micronutrientes		2(mL/L)
Ácido oleico		20
NaOH	Hidróxido de sodio 3N	

*Preparación de medio LB:*

Componente	Nombre	Concentración g/L
NaCl	Cloruro de sodio	10
	Extracto de Levadura	5
	Triptosa	10

Procedimiento.

**Preparación de LB**

- En Erlenmeyer se mezclan las cantidades respectivas de triptosa, cloruro de sodio y extracto de levadura, aforando a 25 mL con agua destilada. Agitar y homogenizar.
- Esterilizar medio
- Inocular medio con 4mL de la cepa *Burkholderia cepacea* B27 (usar dos viales)
- Agitar a 150 rpm, 32 °C por 24 horas

**Preparación del medio PHA**

- Esterilizar medio
- Inocular medio con los 400 mL del cultivo crecido en LB
- Agitar a 150rpm, 32°C por 24 horas

**Preparación del reactor BioFlo con 4L de volumen de trabajo**

- Esterilizar medio
- Inocular medio con los 400 mL del cultivo crecido en PHA
- Condiciones de fermentación: agitación constante, 1,5vvm, pH 7.0, 30°C.
- Tamaño de la muestra 20mL cada 4 horas por 96horas
- Entradas: Agua estéril, NaOH 3M.

## PROTOCOLO 5.

### Preparación de Banco de trabajo

Conservar la cepa *Burkholderia cepacia* en condiciones óptimas para las fermentaciones que se realicen en el trabajo experimental.

#### Procedimiento

- Usar un vial de *Burkholderia cepacia* madre mantenido a -20 °C, llevar a 10 mL de caldo LB a 30 °C por 24 horas.
- Comprobar pureza del cultivo con coloración Gram. (Se debe observar bacilos Gram Negativos cortos).
- Tomar 5 mL del cultivo y llevar a medio de 50 mL de LB y 100 µl de cloranfenicol (por duplicado); se repite la incubación a 30 °C por 12 horas (asumiendo que la cepa se encuentra en fase exponencial de crecimiento).
- A partir de los cultivos de 50 mL, realizar un tercer pase a volúmenes de 500 mL, incubando a 30 °C por 12 horas.
- Los cultivos de 500 mL se mezclan con glicerol estéril, concentración final de la mezcla 25 % v/v.
- Tomar 1,5 mL de la mezcla medio con glicerol y verter a vial de 2 mL (realizar esto hasta tener la cantidad necesaria). Se llevan a -4 °C para su conservación.
- Se realiza una prueba de viabilidad pasada una semana.

## **PROTOCOLO 6.**

### **Unidades formadoras de Colonia**

#### **Procedimiento**

- A partir de 1 mL de muestra hacer diluciones seriadas en agua peptonada 0.85 %, con volumen final de 10 mL, llegar a una dilución 10EXP-13,
- De las 8 últimas diluciones se siembra 0,1 mL en superficie de medio solido LB.
- Incubar a 30 °C por 24 horas.
- Recuento de colonias que se evidencian por placa.

## PROTOSCOLOS 7.

### 7.1 Cultivo celular en bioreactor Aplikon 3L

#### Pre inóculo

- A partir de un criovial (-20 °C) del banco de trabajo de *Burkholderia cepacia* B27 se inocula en medio de cultivo LB (Peptona, Extracto de Levadura y Cloruro de Sodio) de 20 mL de volumen (por duplicado).
- Incubar a 30°C y 150rpm por 24 horas.

#### Inoculo medio PHA

- A partir de los medios LB crecidos (pre inoculo) pasar a 200mL de medio PHA estéril, a continuación, se describe la composición exacta del medio:

Composición de medio de cultivo para inóculo y fermentación.

Compuesto	Concentración g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.39
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.8
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.65
Sln. Micronutrientes	2 (mL/L)
Ácido Oleico	20
Antiespumante (reactor)	2 mL



## Composición de solución de micronutrientes

Compuesto	Concentración g/L
FeSO <sub>4</sub>	2
CaCl <sub>2</sub> :H <sub>2</sub> O	2
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.2
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.01
NiCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.2
MgCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.03
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.3
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.03

- Incubar a 30 °C y 150 rpm por 24 horas.

Fermentación de 2 L en reactor Aplikon

- Preparar los reactores con un día de anterioridad para iniciar en condiciones controladas, calibración de sensores, preparación de medio de cultivo (medio PHA) y control de pH, todo previo a la esterilización.
- Inocular por la entrada de inoculación con condiciones de esterilidad dadas por un mechero cercano al puerto.
- Las condiciones seguirán siendo las mismas usadas en el Biostat, 30 °C, 400 rpm, pH 6.5, 2 vvm.
- El volumen final de toma de muestra no debe superar al 10 % del volumen final, por tanto, el volumen de muestra será de 12 mL por muestra que será dividida de la siguiente manera:
  - i) El cultivo iniciará a las 10 pm, para que el tiempo de adaptación (6 horas) sea en la primera noche. Se tomará muestra a la hora 0 de cultivo, para conocer sus concentraciones iniciales.

- ii) La primera muestra se hará a la hora 8 de cultivo y de ahí en adelante se tomará muestra cada 2 horas hasta la hora 32 de cultivo, donde se espera evidenciar la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria de la bacteria.
  - iii) También se considerarán las horas de toma de muestra planteadas como el parámetro independiente en el modelo (hora 8, hora 12, hora 16, hora 28, hora 48, hora 72 y hora 96).
  - iv) El número de muestras será de un total de 17 muestras para un total de 204 mL de medio.
- Durante las 96 horas de cultivo se controlarán parámetros como los son, pH, TOD, CO<sub>2</sub>, nivel de espuma.

## 7.2 Medición de Biomasa.

La medición de Biomasa total se realizará por gravimetría y peso seco.

- Llevar la muestra a tubos falcon de 15mL previamente pesados y centrifugar a 5000 rpm por 20 minutos.
- Separar el sobrenadante y lavar el pellet con agua destilada.
- Repetir tres veces el procedimiento para asegurar que quede libre del medio de cultivo que puede inferir en el peso.
- Llevar a horno a 75 °C por 24 horas.
- Dejar enfriar y pesar
- La biomasa en gramos será la diferencia de pesos del tubo vacío y con muestra.

## 7.3 Medición de PHB por HPLC por detección del ácido crotónico.

La cuantificación de este polímero se determinará por la conversión a ácido crotónico por hidrolisis con ácido sulfúrico concentrado (García *et al.*, 2018). El hidrolizado será analizado por cromatografía líquida usando una columna Aminex HPX-87H (Biorad), usando como fase móvil ácido sulfúrico 7mM a un flujo de 0.65mL/min a 50°C; como detector se utilizará un arreglo de diodos (Waters 2996). La muestra se preparará de la siguiente manera:

- A partir de la biomasa seca (determinación de biomasa por peso seco) realizar hidrolisis químico con 1mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Incubar a 90°C a 700rpm durante 1 hora en un *Thermomixer R*.
- Dejar enfriar las muestras
- Realizar diluciones 1/50
- Se lleva a viales para la inyección en el HPLC. Se inyecta un volumen de 20uL.
- Los valores de las áreas obtenidas a 220nm se extrapolan a la curva patrón que se realizara con anterioridad con un PHB comercial (Sigma- Aldrich) a concentraciones conocidas.
- El cálculo del porcentaje de PHB se hará empleando la siguiente formula:

$$PHB(\%) = \left[ \frac{\left( \frac{\text{área bajo la curva} + 7600}{158,848.710} \right) * \text{Dilución}}{\text{Biomasa Empleada}} \right] * 100$$

#### 7.4. Medición de proteína por el método de Lowry

- Preparación de curva de calibración Albumina bovina  
1.0mg/mL; 0.8 mg/mL; 0.4mg/mL; 0.2mg/mL; 0.1mg/mL; 0.5mg/mL

Pasos:

- i) Centrifugar la muestra 11000rpm
- ii) Resuspender pellet en 1mL de agua destilada y agitar en vortex

- iii) Hacer dilución en caso de estar muy concentrada (1:4 ó 1:6)
    - 1:4 (250uL muestra y 750 uL agua destilada)**
    - 1:6 (170uL muestra y 830 uL agua destilada).**
  - iv) Tomar 200 uL de muestra a nuevo tubo
  - v) Adicionar 1mL de solución reactiva y agitar en vortex
  - vi) Reposar por 10min
  - vii) Adicionar 100uL de reactivo de Folin y agitar en vortex
  - viii) Reposar por 30 minutos en oscuridad (papel aluminio)
  - ix) Centrifugar por 2 minutos a 11000rpm
  - x) Leer en absorbancia a 625nm.
  - xi) **Blanco:** 200uL agua destilada, 1 ml de solución reactiva y 100uL reactivo de folin.
  - xii)
- **Soluciones para Proteína**
    - A.** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1 N
    - B.** Tartrato de sodio y potasio 2%
    - C.** CuSO<sub>4</sub> 1%

Solución reactiva: Mezclar 1mL de la solución C, 1 mL de la solución y 98 mL de la solución A.

Reactivo de Folin: Utilizar el reactivo Folin con una dilución 1:1 con agua destilada.

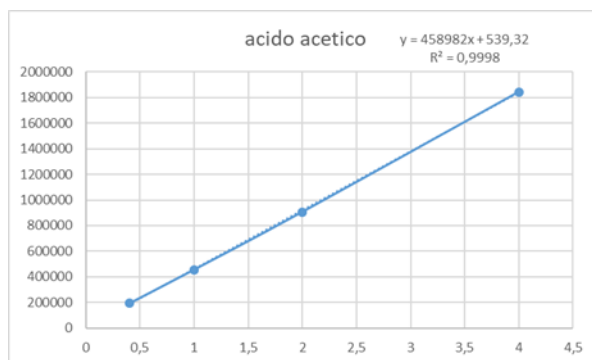
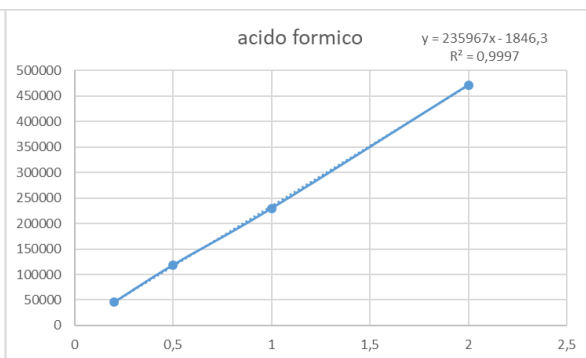
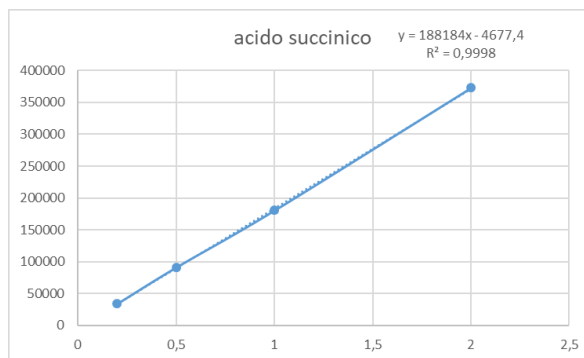
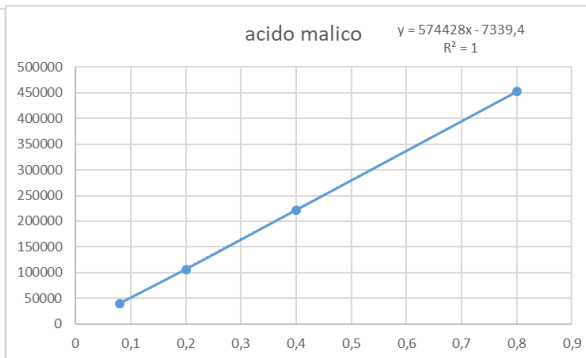
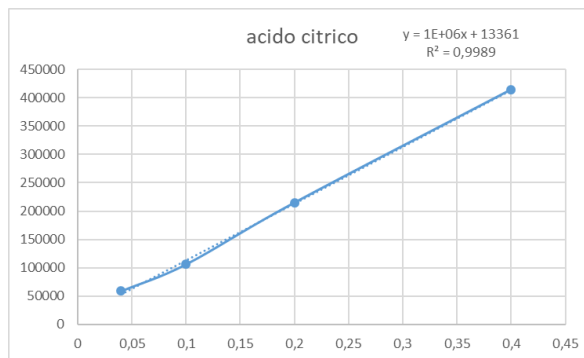
## 7.5. Medición de ácidos orgánicos.

La cuantificación de estos ácidos será analizada por cromatografía líquida usando una columna Aminex HPX-87H (Biorad), usando como fase móvil ácido sulfúrico 5mM a un flujo de 0.65mL/min a 50°C; como detector se utilizará IR/PDA.

La muestra se preparará de la siguiente manera:

- Centrifugar muestra y tomar sobrenadante.

- Se lleva a viales para la inyección en el HPLC. Se inyecta un volumen de 40uL.
- Para calcular las concentraciones inyectarán muestras patrones a distintas concentraciones y se usarán como referente para las muestras.

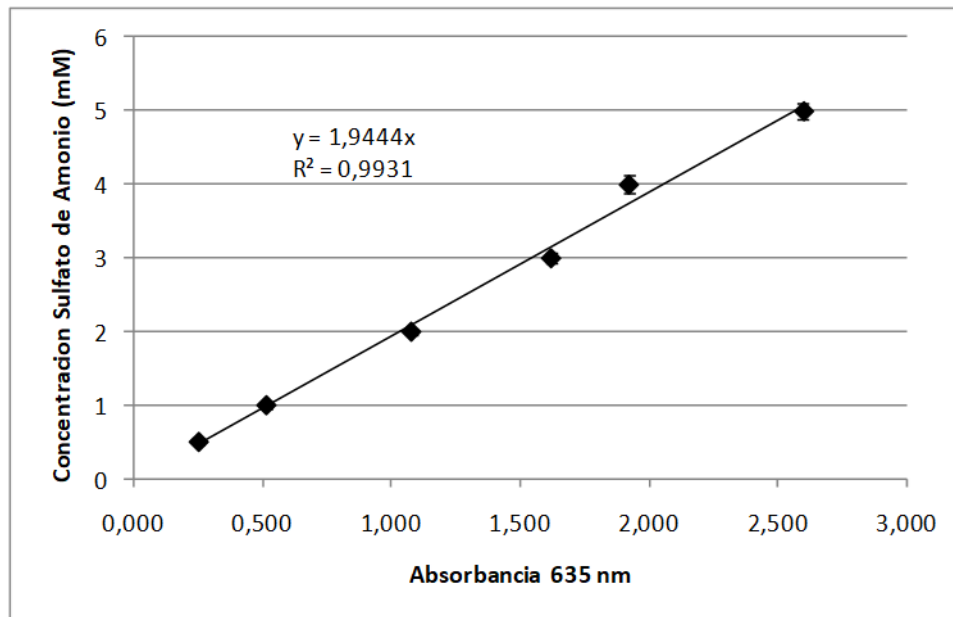


## 7.6 Medición de amonio residual

La cuantificación de amonio se basa en el método de Indofenol (Kaplan, 1969). En esta técnica, el amonio reacciona con hipoclorito de sodio, formándose la cloramina. Posteriormente, la cloramina reacciona con fenol para formar el cromógeno p-hidroxifenilimino-benzoquinona, el cual se cuantifica colorimétricamente a 635 nm.

Para el análisis de muestras libres de células se procede de la siguiente manera:

- Preparar dos soluciones con agua desionizada: solución A (fenol 0.106 M y nitroferricianuro de sodio 0.17 mM) y solución B (hidróxido de sodio 0.125 N e hipoclorito de sodio 11 mM).
- Preparar estándares a concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mM de sulfato de amonio a partir de una solución 6 mM.
- Adicionar 1 ml de la solución A en un tubo de rosca y se colocan 25  $\mu$ L de la muestra problema (estándares o caldo de fermentación). Posteriormente se agita en un vortex, se adiciona 1 ml de la solución B y se agita nuevamente.
- El tiempo de reacción de la mezcla es de 30 minutos. Leer en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU 650). Para la solución blanco se utiliza agua desionizada como muestra problema.
- Una vez realizadas las lecturas de absorbancia de los estándares, éstas se grafican contra su respectiva concentración y se construye una curva de calibración mediante el ajuste de los puntos por el método de los mínimos cuadrados.
- Obtener la pendiente y ordenada en el origen para calcular las concentraciones de amonio de las muestras problema. La curva de calibración se muestra en la gráfica a continuación.



*Curva de calibración de concentración de sulfato de amonio*

Se prepararon estándares de calibración 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM y 5 mM de sulfato de amonio. Se realizó el ensayo de calibración por triplicado y en la gráfica se muestra el promedio de los 3 ensayos.

## Anexo 5. Comandos Matlab para Modelo Feast & Famine y Optimización.

### 5.1 Modelo Feast & Famine

- Script

```
% toma de datos y definición de constantes y variables
global tt B P S1 S2 x0 ;
%data='modelibc27'\A2:E8';
data = [0 2.546000000000000 1.510000000000000 0.120000000000000 20;
        12 1.645000000000000 2.640000000000000 0.770000000000000 9.710000000000000;
        24 1.526000000000000 3.190000000000000 1.540000000000000 8.500000000000000;
        36 1.437000000000000 3.600000000000000 3.320000000000000 5.200000000000000;
        48 1.121000000000000 3.250000000000000 5.440000000000000 4.060000000000000;
        72 0.923000000000000 3.640000000000000 8.140000000000000 2.400000000000000;
        92 0.766000000000000 3.410000000000000 11.080000000000000 1.770000000000000];

tt=data(:,1);
B=data(:,3);
S1=data(:,5);
S2=data(:,2);
P=data(:,4);
x0=[B(1);S1(1);S2(1);P(1)];

% restricciones
% valores iniciales y limites para los parámetros del modelo
% param 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
14
% Umax Kscx Yp/s Upmax Kscp x Umax2 Upmax2 Tcam Yx/s Yx/sn Kscp2
Kscx2 mn
%15 Tadapt 16 mc 17 Ksn
liminf=[0.049;3.68; 1.37;0.083;11.85; 1.38;0.03;0.05; 11.90;0.18;2.97; 1; 1;
0.001; 14; 0.001;0.038];

limsup=[0.069;5.68; 1.37; 0.1; 13.85; 5.0; 0.05;0.25; 13.90;0.18;2.97;30; 70
; 0.0065;16; 1.0; 0.058];

% funcion de optimización

options = gaoptimset(@ga);
options = gaoptimset('Generations',60,'PopulationSize',200, 'Display','iter');
[p,fval]=ga(@lverr2,17,[],[],[],[],liminf,limsup,[],options);

% definición de parámetros para ser optimizados, estos se resuelven en la
% funcion de la ecuación diferencial, que resuelve iterativamente.
mumax=p(1);
Kscx=p(2);
Yps=p(3);
mupmax=p(4);
Kscp=p(5);
```



```

x=p(6);
mumax2=p(7);
mupmax2=p(8);
Tcambio=p(9);
Yxs=p(10);
Yxsn=p(11);
Kscp2=p(12);
Kscx2=p(13);
mn=p(14);
Tadapt=p(15);
mc=p(16);
Ksn=p(17);
params = p;
compara=[liminf';params;lmsup'];
%%función para resolver la ecuación con los parámetros ya obtenidos de la
optimización
tti=(0:1:96);
[tout,yout]=ode45(@lvrhs2,tti,x0,[],params);
%script para graficar
figure(1)
hold on
plot(tout,yout(:,1),'k-',tout,yout(:,2),'k--
',tout,yout(:,3),'k:',tout,yout(:,4),'k-.','LineWidth',2);
legend('Biomass','oleic acid','Ammonium sulfate','PHA','Biomass exp','oleic
acid exp','Ammonium sulfate exp','PHA exp','Location','EastOutside')
set(gca,'FontSize',20)
hold off

%obtención de valores de coeficiente de correlación r^2
[tout,yout]=ode45(@lvrhs2,tt,x0,[],params);
R2=corrcoef(B,yout(:,1));
R2X=R2(1,2)^2
R2=corrcoef(S1,yout(:,2));
R2S1=R2(1,2)^2
R2=corrcoef(S2,yout(:,3));
R2S2=R2(1,2)^2
R2=corrcoef(P,yout(:,4));
R2P=R2(1,2)^2

title('CINETICA','FontSize',14)
xlabel('Time (h)'), ylabel('Concentration (g/L)')

% grafica para correlación
figure(2)
hold on
x =linspace(0,max(yout(:,1)),13);
n=1*x;
subplot(2,2,1)
plot(x,n,B,yout(:,1),'o','MarkerFaceColor','b')
xlabel('Experimental data'), ylabel('Fitted data')
set(gca,'FontSize',13)
axis([0 max(max(yout(:,1)),max(B)) 0 max(max(yout(:,1)),max(B))])
title('Biomass')
hold off
hold on
x =linspace(0,max(yout(:,2)),13);
n=1*x;
subplot(2,2,2)

```

```

plot(x,n,S1,yout(:,2),'o','MarkerFaceColor','b')
xlabel('Experimental data'), ylabel('Fitted data')
set(gca,'FontSize',13)
axis([0 max(yout(:,2)) 0 max(yout(:,2))])
title('Oleic acid')
hold off
hold on
x =linspace(0,max(yout(:,3)),13);
n=1*x; subplot(2,2,3)
plot(x,n,S2,yout(:,3),'o','MarkerFaceColor','b')
xlabel('Experimental data'), ylabel('Fitted data')
set(gca,'FontSize',13)
axis([0 max(yout(:,3)) 0 max(yout(:,3))])
title('Ammonium sulfate')
hold off
hold on
x =linspace(0,max(yout(:,4)),13);
n=1*x;
subplot(2,2,4)
plot(x,n,P,yout(:,4),'o','MarkerFaceColor','b')
xlabel('Experimental data'), ylabel('Fitted data')
set(gca,'FontSize',13)
axis([0 max(max(yout(:,4)),max(P)) 0 max(max(yout(:,4)),max(P))])
title('Product')
hold off

```

- Modelo (lvrhs2)

```

%funcion que contiene las ecuaciones diferenciales
function valo = lvrhs(t,yout,p)

if t < p(9);
    mu = p(1)*(yout(2)/(p(2)+yout(2)))*(yout(3)/(p(17)+yout(3)));
    mup = p(4)*(yout(2)/(p(5)+yout(2)));
else
    mu = p(7)*(yout(2)/(p(13)+yout(2)))*(yout(3)/(p(17)+yout(3)));
    if t < p(9)+ p(15)
        mup = p(8)*(yout(2)/(p(12)+yout(2)))*((t - p(9))/p(15))^p(6);
    else
        mup = p(8)*(yout(2)/(p(12)+yout(2)));
    end
end
end
Xt=mu*yout(1);
S1t = -((1/p(10))*mu)+p(16)*yout(1) - ((1/p(3))*mup*yout(1));
S2t=-((1/p(11))*mu)+p(14)*yout(1);
Pt = mup*yout(1);
valo =[Xt S1t S2t Pt]';

end

```

- Función objetivo (lverr2).

```

%función para la solución de la ecuación diferencial y reducción del error
entre los datos del modelo y datos experimentales
function err = lverr(p)
global tt B P S1 S2 x0;
params = [p(1) p(2) p(3) p(4) p(5) p(6) p(7) p(8) p(9) p(10) p(11) p(12) p(13)
p(14) p(15) p(16) p(17)];

```



```
tiempo_calculo=cputime-aux3 ;
```

- Modelo

```
% FUNCION PARA RESOLVER ECUACIONES DIFERENCIALES
function dY=modelo(t,Y,FLAG,feed)
global interv Sfc Sfn adapt
% PARAMETROS DEL MODELO
mumax=0.068;
Kscx=3.68;
Yps=1.37;
mupmax=0.093;
Kscp=13.84;
x=2.72;
mumax2=0.03;
mupmax2=0.08;
Tcambio=13.45;
CNcambio=5.9;
Yxs=0.18;
Yxsn=2.97;
Kscp2=2.0;
Kscx2=64.40;
mn=0.0038;
Tadapt=12.86;
mc=0.001;
Ksn=0.038;
% ASIGNACION DE VALORES A LAS VARIABLES
X=Y(1); P=Y(2); Sc=Y(3); Sn=Y(4); Vol=Y(5);
% modelo
% adapt = 0;
if Sc/Sn > CNcambio;
    mu = mumax*(Sc/(Kscx+Sc))*(Sn/(Ksn+Sn));
    mup = mupmax*(Sc/(Kscp+Sc));
else
    if adapt < 1;
        Tcambio = t;
        adapt = 1;
    end
    mu = mumax2*(Sc/(Kscx2+Sc))*(Sn/(Ksn+Sn));
    if t < Tcambio+Tadapt;
        mup = mupmax2*(Sc/(Kscp2+Sc))*((t - Tcambio)/Tadapt)^x;
    else
        mup = mupmax2*(Sc/(Kscp2+Sc));
    end
end
phi=mu*X;
dX= phi- X*((feed(interv)+feed(11+interv))/Vol);
dP = mup *X- P*((feed(interv)+feed(11+interv))/Vol);
dSc = -(((1/Yxs)*mu)+mc)*X -((1/Yps)*mup*X)+ (Sfc*feed(interv)-
Sc*(feed(interv)+feed(11+interv)))/Vol;
dSn=-(((1/Yxsn)*mu)+mn)*X+ (Sfn*feed(11+interv)-
Sn*(feed(interv)+feed(11+interv)))/Vol;
dV = feed(interv)+feed(11+interv);
dY=[dX dP dSc dSn dV]';
end
```

- Función objetivo (FUN1)

```

function [F]=FUN1(feed)
% FUNCION OBJETIVO PARA LA OPTIMIZACION
global h N Z0 interv feedmax adapt
% INTEGRACION POR R-KUTA
Y0=Z0;
H=[];
L=[];
feeddot=[];
  tinterv=[0; 12; 12.01;24;24.01;36;36.01;48;48.01;72;72.01; 96];
adapt = 0;
for interv=1:N;
  ti=tinterv(interv);
  tf=tinterv(interv +1);
  tspan=[ti,tf];
  [t,Y]=ode23s('modelo',tspan,Y0,[],feed);
  % captura y ordenamiento de resultados
  H=[H;Y];
  L=[L;t];
  % integración siguiente a la solución anterior de intervalo
  aux=size(Y,1);
  Y0=Y(aux,:);
  feeddot=[feeddot;feed(interv)];
end
feeddot=[feeddot;feed(interv)];
fin=size(H,1);
% función objetivo (minimizar)
F=- (H(fin,2));
%restricción de volumen final
G=H(fin,5)-10;
Y=H;
t=L;
for i=1:fin
  CNgraf(i) = H(i,3)/H(i,4);
end
%GRAFICAS DE RESULTADOS
hold on
subplot(2,4,1),plot(t,Y(:,1)),ylabel('Biomasa (g/l)'), xlabel('Tiempo (h)');
subplot(2,4,2),plot(t,CNgraf),ylim([0 10]), ylabel('C/N (g/g)'),
xlabel('Tiempo (h)');
subplot(2,4,3),plot(t,Y(:,2)),ylabel('Producto (g/l)'), xlabel('Tiempo (h)');
subplot(2,4,4),plot(t,Y(:,3)),ylabel('Sustrato (g/l)'), xlabel('Tiempo (h)');
subplot(2,4,5),plot(t,Y(:,4)),ylabel('Nitrogeno (g/l)'), xlabel('Tiempo (h)');
tt=[0 12 12 12.01 12.01 24 24 24.01 24.01 36 36 36.01 36.01 48 48 48.01 48.01
72 72 72.01 72.01 96];
fedgraf=[0; 0; feeddot(2,1); feeddot(2,1); 0; 0; feeddot(4,1); feeddot(4,1); 0; 0;
feeddot(6,1); feeddot(6,1); 0; 0; feeddot(8,1); feeddot(8,1);
0; 0; feeddot(10,1); feeddot(10,1); 0; 0 ];
subplot(2,4,6),plot(tt,fedgraf),ylabel('flujo de alimentación C. (L/h)'),
xlabel('Tiempo (h)');
hold off
drawnow;

end

```



# Bibliografía

- Acosta, M. (2007). *Establecimiento de un modelo matemático a escala laboratorio del proceso de producción de un polímero tipo polihidroxialcanoato (pha), utilizando la cepa nativa Burkholderia Cepacia (Tesis de maestría)*. 137.
- Almeida A., Ruiz J., López N., Pettinari J. Biopásticos: una alternativa ecológica. *Revista Química Viva* (2004) No. 3, abril 2004.
- Amribt Z., Niu A., Bogaerts P. Macroscopic modelling of overflow metabolism and model based optimization of Hybridoma cell fed-batch cultures. 2013. *Biochemical Engineering Journal*. Vol 70, p 196-209.
- Anderson, A., J., Dawes, E., A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews* December, 1990. p. 450-472.
- Ashby, R. D. (2005). Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules*, 6(4), 2106–2112. <https://doi.org/10.1021/bm058005h>
- Ashby, R., Solaiman, D., Foglia, T. (2002). The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanolic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(November 2001), 147–153. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000231>
- Banga, J.R.; Balsa-Canto, E.; Moles, C.; Alonso, A. 2005. Dynamic optimization of bioprocesses: Efficient and robust numerical strategies. *Journal of Biotechnology* 117. pp. 407-419.
- Blanch, H., W. y Clark, D. S. 1996. *Biochemical engineering*. Marcel Dekker Ltda. Ney York. Pg. 162.
- Breuer, G., Evers, W. A. C., de Vree, J. H., Kleinegris, D. M. M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., Lamers, P. P. (2013). Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. *Journal of Visualized Experiments*, 5(80), 1–9. <https://doi.org/10.3791/50628>
- Camacho, D. De La Fuente, A., Mendes, P. 2005. The origin of correlation in metabolics data. *Metabolomics* Vol 1 No. 1 Enero 2005.
- Caramihai, M., Severin I. *Bioprocess modeling and control*. 2013. Capítulo 6.
- Chen, Y. J., Huang, Y. C., Lee, C. Y. (2014). Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.012>
- Chen, Z., Guo, Z., Wen, Q., Huang, L., Bakke, R., Du, M. (2015). A new method for polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria selection under physical selective pressure.

*International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1329–1334.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.027>.

Cinar, A., Parulekar, S., J., Undey, C y Birol, G. 2003. Batch fermentation: Modelling, monitoring and control. Marcel Dekker Ltd. Ney York.

Dawes, E. A. Novel Microbial Polymers: An Introductory Overview. In: *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, Dawes, E. A. (ed.), (1990). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 3-16.

De Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Morales, V., Dinjaski, N., Galán, B., García, J. L., Prieto, M. A. (2010). The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. *Environmental Microbiology*, 12(1), 207–221. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02061.x>

DeMarco S. Advances in polyhydroxyalkanoates production in bacteria for biodegradable plastics. MMG 445. Basic Biotechnology Journal. (2005).

Días, J. M. L., Oehmen, A., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Reis, M. A. M., Oliveira, R. (2008). Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures. *BMC Systems Biology*, 2, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-59>

Doi, Y., Segawa, A., Nakamura, S., and Kunioka, M. Production of biodegradable Copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. In: *Novel Biodegradable Microbial Polymers*. (1990).

Dunn J.J., Heinzle, E., Ingham J., Prenosil, J.E. Automatic bioprocess control fundamentals. Wiley-VCH, Weinheim. 2003. P.314-367.

Duran, P. (1999). Aceites y grasas. *Analíticos En Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis.*, 1–82.

Edwards, J. S., Covert, M., Palsson, B. (2002). Metabolic modelling of microbes: The flux-balance approach. *Environmental Microbiology*, 4(3), 133–140. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00282.x>

Escapa, I. F., García, J. L., Bühler, B., Blank, L. M., Prieto, M. A. (2012). The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 14(4), 1049–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02684.x>

Fang, K., Zhao, H., Sun, C., Lam, C. M. C., Chang, S., Zhang, K., Wang, J. (2011). Exploring the metabolic network of the epidemic pathogen *Burkholderia cenocepacia* J2315 via genome-scale reconstruction. *BMC Systems Biology*, 5(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-83>

Fernández, Isabel. (2012). Estudio del metabolismo de polihidroxialcanoatos en *Pseudomona putida*: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Fernie, A. R., Morgan, J. A. (2013). Analysis of metabolic flux using dynamic labelling and metabolic modelling. *Plant, Cell and Environment*, 36(9), 1738–1750. <https://doi.org/10.1111/pce.12083>



- Fukui, T., Chou, K., Harada, K., Orita, I., Nakayama, Y., Bamba, T. Fukusaki, E. (2014). Metabolite profiles of polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha* H16. *Metabolomics*, 10(2), 190–202. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0567-0>
- Galán B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L. I., F., Sanz, J. M., García, J.L.y Prieto, M.A. (2011) Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoates granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Mol. Microbio.* 79:402-418.
- García, A., Ferrer, P., Albiol, J., Castillo, T., Segura, D., Peña, C. (2018). Metabolic flux analysis and the NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> ratios in chemostat cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0860-8>
- Gombert, A. K., Moreira, M. (2001). Network Identification and Flux Quantification in the Central Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under Different Conditions of Glucose Repression. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1441–1451. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1441>
- Gombert, A. K., Nielsen, J. (2003). *Quantification of Metabolic Fluxes*. Encyclopedia of Life Sciences, McMillan Publishers Ltda.
- Jacquel N., Lo C.W., Wei Y.H., Wu H.S., Wang S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). 2008. *Biochemical Engineering Journal*. 39, 15-27.
- Jaime-Infante, R. A., Hernández Martónez, Z., Triana-Dopico, J., Fosado Tellez, O., Montagud Aquino, A., Gamermann, D., Urchueguúa-Schölzel, J. F. (2014). Herramienta para la optimización de flujos metabólicos en un sistema biológico. *Investigacion Operacional*, 35(2), 96–103.
- Jiang, Y., Heby, M., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C. M. (2011). Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Water Research*, 45(3), 1309–1321. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.009>
- Jin Y., Shi L., Kawata Y. Metabolomics-based component profiling of *Halomonas* sp. KM-1 during different grow phases in poly(3-hydroxyalkanoates) production. 2013. *Bio resource Technology*. 140. P73-79.
- Jin, Y. X., Shi, L. H., Kawata, Y. (2013). Metabolomics-based component profiling of *Halomonas* sp. KM-1 during different growth phases in poly(3-hydroxybutyrate) production. *Bioresource Technology*, 140, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.059>
- Khanna S., Srivastava A. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. (2005) Vol 40, p. 607–619.
- Klappa M.J., Stephanopoulos G. Bioreactor engineering. Ed. K. Schugerl, in, Bellgardt K.H., Springer Verlag. Berlin. 2000. p.106-124.
- Koutinas M., Kiparissides A., Pistikopoulos E., Mantalaris A. Bioprocess system engineering: transferring traditional process engineering principles to industrial biotechnology. 2012. *Computational and structural biotechnology journal*. Vol. 3 Issue 4.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B., and Korsatko, W. Microbial Production of Poly-b-hydroxybutyric Acid. In: *Biotechnology*, Rehm, H. J. and Reed, G. (eds.), VCH Publishers, New York, (1988). 135-176.

- Lee S., Chang H., Chang Y. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*, Ann. N.Y. (1994) Acad. Sci. Vol.721, p 43–53.
- Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K., Nittami, T., Ngoh, G. C. (2015). Strategy for the biotransformation of fermented palm oil mill effluent into biodegradable polyhydroxyalkanoates by activated sludge. *Chemical Engineering Journal*, 269, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.01.103>
- Li, L., Wang, Z. J., Chen, X. J., Chu, J., Zhuang, Y. P., Zhang, S. L. (2014). Optimization of polyhydroxyalkanoates fermentations with on-line capacitance measurement. *Bioresource Technology*, 156, 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.042>
- Liu, C. C., Qi, L., Lucks, J. B., Segall-Shapiro, T. H., Wang, D., Mutalik, V. K., Arkin, A. P. (2012). An adaptor from translational to transcriptional control enables predictable assembly of complex regulation. *Nature Methods*, 9(11), 1088–1094. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2184>
- Maertens, J., Vanrolleghem, P. A. (2010). Modeling with a view to target identification in metabolic engineering: A critical evaluation of the available tools. *Biotechnology Progress*, 26(2), 313–331. <https://doi.org/10.1002/btpr.349>
- Martínez R., C. Optimización en ingeniería química y bioquímica. Análisis de procesos fermentativos.
- Mendes, P., Camacho D., De La Fuente A. 2005. Modelling and simulation for metabolomics data analysis. *Biochemical Society Transactions*. Vol 33, part 6.
- Méndez, D. A. (2016) Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de Polihidroxialcanoatos empleando la bacteria *Burkholderia cepacia* B27 a partir de ácidos grasos. MSc Tesis, Universidad Nacional de Colombia. Disponible en <https://bdigital.unal.edu.co/53725/>
- Méndez, D. A., Cabeza, I. O., Moreno, N. C., Riascos, C. A. M. (2016). Mathematical modelling and scale-up of batch fermentation with *Burkholderia cepacia* B27 using vegetal oil as carbon source to produce polyhydroxyalkanoates. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 277–282. <https://doi.org/10.3303/CET1649047>
- Moreno, N., Biopolab, Instituto de Biotecnología. 2015. Uso de plásticos verdes (polihidroxialcanoatos) para la fabricación rentable de empaques completamente biodegradables requeridos en la industria. Universidad Nacional de Colombia. Informe de avance.
- Ojumu, T.V., Yu, J., Solomon, B.O. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* Vol 3 (1) p 18-24.
- Pardelha F., Albuquerque M. G.E., Reis M., Oliviera R., Dias J. Dynamic metabolic modelling of volatile fatty acids conversion to polyhydroxyalkanoates by a mixed microbial culture. 2014. *New Biotechnology*. Vol. 31, 4.
- Pardelha, F., Albuquerque, M. G. E., Reis, M. A. M., Oliveira, R., Dias, J. M. L. (2014). Dynamic metabolic modelling of volatile fatty acids conversion to polyhydroxyalkanoates by a mixed microbial culture. *New Biotechnology*, 31(4), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.06.008>

- Queirós, D., Rossetti, S., Serafim, L. S. (2014). PHA production by mixed cultures: A way to valorize wastes from pulp industry. *Bioresource Technology*, 157, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.099>
- Riascos, C. A. M., Pinto, J. M. (2004). Optimal control of bioreactors: A simultaneous approach for complex systems. *Chemical Engineering Journal*, 99(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2003.09.002>
- Riedel, S. L., Lu, J., Stahl, U., Brigham, C. J. (2014). Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: Relevance for the biotechnological production of value-added products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(4), 1469–1483. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5430-8>
- Simpson, Troy W., Follstad, Brian D.; Stephanopoulos, Gregory. (1999). Analysis of the pathway structure of metabolic networks. *J. Biotechnology*. 71, pp 207-223
- Sudesh, K., Abe, H., Doi Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. Elsevier (25) 1503-1555.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 25(10), 1503–1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Suriyamongkol P. et al. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants: Review. *Biotechnological Advances*. 25 (2007) 148-175.
- Tamis, J., Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M. C. M., Kleerebezem, R. (2014). Modeling PHA-producing microbial enrichment cultures-towards a generalized model with predictive power. *New Biotechnology*, 31(4), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.11.007>
- Teixeira A.P, Alves C., Alves P.M., Carrondo J.T., Oliveira R. *BMC informatics*. 2007. 8,30-41.
- Thakor, N., Trivedi, U., Patel, K. C. (2005). Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96(17), 1843–1850. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.030>
- Thompson, R. C., Y. Olsen, R. P. Mitchell, A. Davis, S. J. Rowland, A. W. John, D. McGonigle, and A. E. Russell. 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304:838.
- Tsugawa, H., Tsujimoto Y., Arita M., Bamba T., Fukusaki E. GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). 2011. *BMC bioinformatics*. 12, 131.
- Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., Fukusaki, E. (2011). GC/MS based metabolomics: Development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics*, 12(1), 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-131>
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., Seeger, M. (2014). Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001>
- Valentino, F., Beccari, M., Fraraccio, S., Zanaroli, G., Majone, M. (2014). Feed frequency in a Sequencing Batch Reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs)

- from volatile fatty acids. *New Biotechnology*, 31(4), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.006>
- Wang L., Hatzimanikates W. Metabolic engineer. 2006. 8,133-141, In, Caramihai, M., Severin I. Bioprocess modeling and control. 2013. Capitulo 6. Intech
- Wang, H. H., Zhou, X. R., Liu, Q., Chen, G. Q. (2011). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1497–1507. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2964-x>
- Wang, J., Yue, Z.-B., Sheng, G.-P., Yu, H.-Q. (2010). Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Cupriavidus necator* with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.02.005>
- Wang, Y. J., Hua, F. L., Tsang, Y. F., Chan, S. Y., Sin, S. N., Chua, H., Ren, N. Q. (2007). Synthesis of PHAs from waster under various C:N ratios. *Bioresource Technology*, 98(8), 1690–1693. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.039>
- Wang, Y., Yin, J., Chen, G. Q. (2014). Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.001>