



Exploración *in silico* de estrategias de electro-fermentación en el diseño racional de bioprocesos

Andrés Vásquez-Restrepo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia
2022

Exploración *in silico* de estrategias de electro-fermentación en el diseño racional de bioprocesos

Andrés Vásquez-Restrepo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director:

PhD, Camilo A. Suárez Méndez

Línea de Investigación:

Diseño Racional de Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Flujos Reactivos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia

2022

Las lecciones más importantes de la vida se aprenden de la forma más inesperada.

Gracias Alejo.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Andrés Vásquez Restrepo

Nombre

Fecha

06/05/2022

Resumen

Exploración *in silico* de estrategias de electro-fermentación en el diseño racional de bioprocesos

La electro-fermentación es una estrategia emergente para optimizar los bioprocesos al regular el balance redox intracelular y redireccionar los flujos metabólicos. En el presente trabajo se evaluó *in silico* la electro-fermentación desde el marco del diseño racional de bioprocesos para determinar su efecto en el aprovechamiento de la energía biológicamente disponible y los rendimientos del proceso. Para lo cual, se desarrolló una metodología que permitió estimar sus costos energéticos asociados y evaluar su capacidad de redireccionamiento metabólico. Se definieron un conjunto de semirreacciones que permitieron utilizar los principios de la electroquímica para establecer los requerimientos energéticos del proceso, junto con su modelo de caja negra. Se encontró que la energía libre de Gibbs de reacción depende del voltaje aplicado y el potencial de reducción de la molécula aceptora interna de electrones. Además, se planteó un modelo metabólico que incluyó el transporte extracelular de electrones y permitió evidenciar los diferentes cambios metabólicos al cambiar el balance redox a través de la interacción con el electrodo. Finalmente, se evaluaron diferentes casos de estudio para evidenciar el desempeño de la metodología desarrollada, en donde se logró solucionar déficits de ATP y electrones a expensas de una pequeña desviación de carbonos hacia subproductos debido a la generación de un desbalance redox en el metabolismo celular. La presente metodología representa un primer intento de una estimación *in silico* de los requerimientos de corriente eléctrica y voltaje asociados a una electro-fermentación a partir de fundamentos teóricos.

Palabras clave: Omics, *In silico*, Ingeniería metabólica, Diseño racional, Bioprocesos, Biotermodinámica

Abstract

***In-silico* exploration of Electro-fermentation strategies in the Rational Design of Bioprocesses**

Electro-fermentation is a novel strategy for optimizing bioprocesses in which the intracellular redox balance is regulated to redirect the carbon metabolic flux towards a desired product. In this work, an *in-silico* evaluation of the electro-fermentation has been made within the frame of a methodology referred to as Rational Design of Bioprocesses to evaluate its effects on microbial bioenergetics and process performance. Here, a new methodology is proposed for estimating the associated Gibbs energy costs, the development of a black-box model and the evaluation of its capacity to redirect metabolic fluxes. A set of semi reactions are used to describe the interactions between the electrode and the microbe, where the Gibbs energy involved in the electro-fermentation process is associated to the electrode's poised voltage and the standard reduction potential of the internal electron acceptor. Besides, a new metabolic model is developed incorporating a set of reactions for the extracellular electron transfer mechanism. It has been proven that metabolic changes occur by an unbalanced NADH pool generated by the interaction of the microbe with a poised electrode. Finally, both thermodynamic and metabolic models are used in different study cases to evaluate the performance of the complete developed framework for electro-fermentations, where it has been proven that it can be used to solve ATP deficits in metabolic networks. To my knowledge, it is the first attempt of an *in-silico* based theoretical framework to describe the energy, current and voltage associated with electro-fermentations.

Keywords: Omics, *In silico*, Metabolic Engineering, Rational Design of Bioprocesses, Biothermodynamics.

Contenido

Declaración de obra original	VII
Resumen	IX
Abstract.....	X
Contenido	XI
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XVI
Lista de símbolos y abreviaturas	18
Introducción	25
1. Planteamiento del problema.....	29
1.1 Hipótesis.....	29
1.2 Objetivos.....	30
1.2.1 Objetivo general.....	30
1.2.2 Objetivos específicos.....	30
1.3 Seguimiento de los objetivos según metodología y resultados.	31
2. Marco Teórico.....	33
2.1 Generalidades de la termodinámica en los bioprocesos.	33
2.2 Diseño racional de bioprocesos	35
2.3 Metodología general del diseño racional de bioprocesos.....	37
2.4 Definición de la estequiometría de los bioprocesos utilizando un enfoque termodinámico	39
2.4.1 Definición de la reacción catabólica.....	39
2.4.2 Estimación del mantenimiento celular.....	41
2.4.3 Estimación de la formación de biomasa y crecimiento celular.....	42
2.4.4 Estimación de la reacción para producto anabólico	44
2.4.5 Estimación de las relaciones $q_{i\mu}$ y la estequiometría global del proceso.	46
2.5 Refinamiento de la estequiometría del proceso.	47
2.6 Modelos metabólicos de escala genómica.....	48
2.7 Transporte extracelular de electrones (EET).....	51
2.8 Tipos de transporte extracelular de electrones	51

XII Exploración *in silico* de estrategias de electro-fermentación en el diseño racional de bioprocesos

2.9	Sistemas bioelectroquímicos (<i>BES</i>).....	53
2.10	Fermentaciones con sistemas bioelectroquímicos: La electro-fermentación como estrategia para mejorar rendimientos en bioprocesos.	55
2.11	Cálculos asociados a los procesos bioelectroquímicos.	58
2.11.1	Costos energéticos.....	58
2.11.2	Eficiencia Coulómbica	58
2.11.3	Eficiencia de Electro-fermentación	59
2.12	Aplicaciones de la metodología del diseño racional de bioprocesos.....	60
3.	Metodología.....	63
3.1	Conceptualización y estimación del término adicional de la relación de Herbert-Pirt para cuantificar la energía libre de Gibbs en una electro-fermentación y la posterior estequiometría del proceso.....	63
3.1.1	Condiciones básicas y suposiciones	64
3.1.2	Consideraciones energéticas asociadas al proceso de transferencia de electrones.....	65
3.1.3	Definición de la estequiometría del proceso de electro-fermentación.	76
3.1.4	Inclusión del costo energético en los cálculos termodinámicos.	76
3.1.5	Estimación de los coeficientes de la relación de <i>Herbert-Pirt</i>	77
3.1.6	Estimación del flujo de corriente asociado al bioproceso.....	77
3.1.7	Análisis de sensibilidad.	77
3.2	Proposición de cambios metodológicos en la estrategia del diseño racional de bioprocesos para incluir el análisis de la electro-fermentación.	78
3.3	Construcción del modelo metabólico a escala genómica.....	78
3.3.1	Levantamiento de la información biológica base.	78
3.3.2	Selección del microorganismo chasis.....	79
3.3.3	Identificación de mecanismos para el transporte de electrones.....	79
3.3.4	Reconstrucción de la ruta metabólica.....	80
3.3.5	Construcción del modelo de escala genómica en COBRA.	80
3.4	Desempeño del desarrollo teórico planteado.....	81
3.4.1	Comparación de desempeño de la ruta complementada con la funcionalidad de la electro-fermentación.	81
3.4.2	Estimación de máximas titulaciones extracelulares, intensidad de corriente y eficiencia energética.....	82
4.	Resultados y discusión	83
4.1	Desarrollo teórico para la inclusión de los sistemas de electro-fermentación en el diseño racional de bioprocesos	83
4.1.1	Energía libre de Gibbs para la reacción catabólica.....	83
4.1.2	Estimación del requerimiento de electrones transferidos.....	90
4.1.3	Nuevas consideraciones para la construcción del modelo base de caja negra.....	100
4.1.4	Estimación de las relaciones <i>q_{iμ}</i> y la estequiometría global del proceso. ...	105
4.1.5	Estimación del requerimiento de corriente.....	107

4.1.6	Cálculo de la eficiencia Coulómbica.....	108
4.1.7	Cálculo de la eficiencia de la electro-fermentación.	109
4.1.8	Análisis de sensibilidad en la energía libre de Gibbs de la reacción catabólica.	109
4.2	Inclusión de la electro-fermentación como solución a problemas energéticos y redox en el diseño racional de bioprocesos.	115
4.3	Construcción del modelo metabólico a escala genómica.	118
4.3.1	Compartimentos	118
4.3.2	Selección del Microorganismo chasis.	119
4.3.3	Estequiometría de la reacción de formación de biomasa y fórmula C-mol para <i>E. coli</i>	120
4.3.4	Reconstrucción de las rutas metabólicas de interés	122
4.3.5	Inclusión de las reacciones que intervienen en el transporte extracelular de electrones en el modelo metabólico.....	127
4.3.6	Determinación de modificaciones genéticas en <i>E. coli</i> para los procesos de interés.....	129
4.3.7	Implementación del modelo metabólico de escala genómica.....	130
4.4	Análisis de casos de estudio y desempeño del desarrollo teórico planteado. ..	132
4.4.1	Cambio metabólico completo de Acetato a Propionato por <i>Propionibacterium acidi-propionici</i>	132
4.4.2	Cambio metabólico incompleto para la producción de Butanol y Butirato por <i>Clostridium pasteurianum</i>	145
4.4.3	Generación de ATP mediada por electro-fermentación de glicerol para la producción de Ácido 1-3 Indolacético	163
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	177
5.1	Conclusiones	177
5.2	Recomendaciones	184
Anexos	185
Anexo A.	Reconstrucción de los proteomas de <i>E. coli</i> y <i>G. sulfurreducens</i>	185
Anexo B.	Definición de la reacción de biomasa y fórmula C-mol para <i>E. coli</i>	187
Anexo C:	Reacciones incluidas en el modelo metabólico	189
Anexo D:	Metabolitos incluidos en el modelo metabólico	196
Anexo E:	Propiedades fisicoquímicas de los compuestos utilizados	201
Bibliografía	203

Lista de figuras

Figura 2-1.	Campos de la biotermodinámica según su escala de aplicación.	34
Figura 2-2.	Metodología básica para la definición de la estequiometría del proceso.	48
Figura 2-3.	Mecanismos de transporte extracelular de electrones. DET: Transporte directo de electrones. MET: Transporte mediado de electrones. IET: Transporte indirecto de electrones.	52
Figura 2-4.	Esquema general de un sistema bioelectroquímico.....	53
Figura 2-5.	Aplicaciones de la electro-fermentación en los bioprocesos. A) Conversión directa de un sustrato a un producto determinado. B) Control de la producción de subproductos mediante el control de <i>ORP</i> en el cultivo. C) Interacciones sintrópicas.	56
Figura 3-1.	Interacciones en el transporte mediado de electrones. A) Posibles reacciones relacionadas al transporte extracelular de electrones en una electro-fermentación catódica. B) Posibles reacciones relacionadas al transporte extracelular de electrones en una electro-fermentación Anódica.....	66
Figura 3-2.	Esquema del transporte directo de electrones para los microorganismos más estudiados.....	75
Figura 4-1.	Efecto del Voltaje y el aceptor interno de electrones en la energía libre de Gibbs de formación del electrodo.....	110
Figura 4-2.	Energía libre de Gibbs para la reacción entre <i>NADH</i> y los <i>citocromos a</i> en la membrana celular.....	114
Figura 4-3.	Esquema general del diseño racional de bioprocesos al incluir la electro-fermentación como herramienta de solución de desbalances redox y energéticos.	116
Figura 4-4.	Esquema gráfico de los compartimentos utilizados en el modelo metabólico.	118
Figura 4-5.	Reconstrucción del metabolismo del butanol y butirato.	123
Figura 4-6.	Reconstrucción del metabolismo del propionato y acetato.	124
Figura 4-7.	Reconstrucción para la biosíntesis del ácido 3-indolacético	125
Figura 4-8.	Reacciones que intervienen en el transporte extracelular de electrones en <i>E. coli</i>	127

Figura 4-9. Resultados experimentales para la electro-fermentación de Glucosa con <i>P. acidi-propionici</i> . A) Resultados experimentales para fermentación control. B) Resultados experimentales para electro-fermentación (-0.47 vs SHE)	134
Figura 4-10. Efecto del Voltaje en la Energía Libre de Gibbs de la reacción catabólica en la electro-fermentación de Propionato	136
Figura 4-11. Relación molar entre Acetato y Propionato como función de z.	140
Figura 4-12. Comparación de resultados experimentales con los resultados del modelo obtenido. A) Cinética de consumo de sustrato y producción de Propionato. B) Perfil de corriente para los datos modelados y experimentales. C) Resultados significativos.....	141
Figura 4-13. Reacciones de interés en el metabolismo de <i>Clostridium pasteurianum</i>	145
Figura 4-14. Resultados experimentales para la electro-fermentación de Glucosa con <i>Clostridium pasteurianum</i> . A) Resultados experimentales para fermentación control. B) Resultados experimentales para electro-fermentación (+0.045V vs SHE)	148
Figura 4-15. Comparación de resultados experimentales con los resultados del modelo obtenido. A) Cinética de consumo de sustrato y producción de butirato y butanol. B) Perfil de corriente para los datos modelados (Eje Izquierdo) y datos experimentales (Eje Derecho). C) Resultados significativos.	157
Figura 4-16. Cambios en los coeficientes estequiométricos del Butanol (ButOH) y Butirato (Buty) como función del coeficiente z.	161
Figura 4-17. Efecto del Voltaje en la Energía Libre de Gibbs de la reacción Catabólica para la electro-fermentación de Butanol y Butirato.	163
Figura 4-18. Energía libre de Gibbs para la reacción catabólica de producción de AIA en una electro-fermentación anódica.....	168
Figura 4-19. Energía libre de Gibbs para la reacción catabólica de producción de AIA en una electro-fermentación catódica.....	172

Lista de tablas

Tabla 1-1. Seguimiento de los objetivos a lo largo del documento de tesis según la metodología realizada y los resultados obtenidos.	31
Tabla 2-1. Clasificación de los sistemas bioelectroquímicos según su aplicación y tipo de electrodo.	55
Tabla 2-2. Diseño racional de bioprocesos aplicado al diseño de nuevos bioprocesos de interés para Colombia.	61
Tabla 4-1. Composición general de los compuestos de la reacción catabólica.	90
Tabla 4-2. Consideraciones para la construcción del modelo base de caja negra	101
Tabla 4-3. Reacción catabólica, de formación de biomasa y de producto anabólico para el modelo de caja negra.	105
Tabla 4-4. Relaciones de <i>Herbert-Pirt</i> para la reacción global del proceso.	106
Tabla 4-5. Potenciales de reducción de las semirreacciones relacionadas con la cadena transportadora de electrones. Datos tomados de [61]	112
Tabla 4-6. Mapeo y reconstrucción de los genomas de <i>E. coli</i> y <i>G. sulfurreducens</i> ..	119
Tabla 4-7. Reacciones de interés incluidas en el modelo metabólico.	126
Tabla 4-8. Reacciones de electro-fermentación incluidas en el modelo metabólico.	129
Tabla 4-9. Genes y enzimas relacionadas con la reconstrucción metabólica en el microorganismo chasis <i>E. coli</i>	130
Tabla 4-10. Reacciones clasificadas según su función metabólica.	131
Tabla 4-11. Balance de NADH producidos y consumidos en el metabolismo de <i>P. acidi-propionici</i> para la producción de Acetato y Propionato.	133
Tabla 4-12. Estimación de la reacción catabólica de <i>P. acidi-propionici</i> para la producción de Acetato y Propionato.	135
Tabla 4-13. Modelo de caja negra para la producción de Acetato y Propionato.	137
Tabla 4-14. Relaciones de <i>Herbert-Pirt</i> para la electro-fermentación de Butanol y Butirato.	138

Tabla 4-15. Comparación de los resultados obtenidos de los modelos de caja negra y modelo metabólico para el cambio metabólico de acetato a propionato por <i>Propionibacterium acidi-propionici</i>	139
Tabla 4-16. Parámetros y eficiencias asociadas al proceso de electro-fermentación de Propionato.	144
Tabla 4-17. Balance de NADH producidos y consumidos en el metabolismo de <i>Clostridium pasteurianum</i> para la producción de butanol, butirato y lactato.....	146
Tabla 4-18. Coeficientes $C_{0,i}$ para la relación de productos de electro-fermentación en el estado basal de Butirato a Butanol.	149
Tabla 4-19. Coeficientes CEF_i par la relación de productos de electro-fermentación en un cambio metabólico completo de Butirato a Butanol.	150
Tabla 4-20. Parámetros de proceso para la electro-fermentación de Butanol y Butirato.	153
Tabla 4-21. Relaciones de <i>Herbert-Pirt</i> para la electro-fermentación de Butanol y Butirato.	154
Tabla 4-22. Comparación de los resultados obtenidos del modelo de caja negra y modelo metabólico	155
Tabla 4-23. Reacción catabólica para la producción de AIA a partir de Glicerol.....	164
Tabla 4-24. Parámetros del modelo <i>black box</i> para la producción de AIA en una electro-fermentación catódica.	169
Tabla 4-25. Viabilidad metabólica del modelo termodinámico planteado para la electro-fermentación anódica de AIA.....	170
Tabla 4-26. Parámetros del modelo <i>black box</i> para la producción de AIA en una electro-fermentación catódica.....	173
Tabla 4-27. Viabilidad metabólica del modelo termodinámico planteado para la electro-fermentación catódica de AIA.....	174
Tabla 4-28. Comparación de resultados electro-fermentación anódica y catódica de AIA.	175

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad	Definición
C_S	Coeficiente Estequiométrico del sustrato en la reacción catabólica	<i>mol</i>	<i>Ec (2 – 1)</i>
C_N	Coeficiente Estequiométrico de la fuente de nitrógeno en la reacción catabólica	<i>mol</i>	<i>Ec (2 – 1)</i>
C_P	Coeficiente Estequiométrico del producto en la reacción catabólica	<i>mol</i>	<i>Ec (2 – 1)</i>
C_W	Coeficiente Estequiométrico del agua en la reacción catabólica	<i>mol</i>	<i>Ec (2 – 1)</i>
C_H	Coeficiente Estequiométrico de los protones en la reacción catabólica	<i>mol</i>	<i>Ec (2 – 1)</i>
C_C	Coeficiente Estequiométrico del CO ₂ en la reacción catabólica	<i>mol</i>	<i>Ec (2 – 1)</i>
ΔG°_{Rxn} <i>catabolism</i>	Energía libre de Gibbs de Reacción en condiciones estándar para el catabolismo	<i>kJ/mol</i>	<i>Ec (2 – 3)</i>
$\Delta G^{\circ\prime}_{Rxn}$ <i>catabolism</i>	Energía libre de Gibbs de Reacción en condiciones estándar y pH = 7 para el catabolismo	<i>kJ/mol</i>	<i>Ec (2 – 3)</i>

$\Delta G_{f_i}^o$	Energía libre de Gibbs de Formación en condiciones estándar para la molécula i	kJ/mol	—
$\Delta G_{f_i}^{o'}$	Energía libre de Gibbs de Formación en condiciones estándar y pH = 7	kJ/mol	—
ΔG°_{cat}	Energía libre de Gibbs catabólica	kJ/mol	<i>Ec</i> (2 – 4)
m_G	Energía requerida para el mantenimiento celular de 1 CmolX	$KJ/Cmolx - h$	<i>Ec</i> (2 – 5)
m_S	Coefficiente de mantenimiento celular	$molS/Cmolx - h$	<i>Ec</i> (2 – 6)
a_G	Energía requerida para la formación de 1 CmolX biomasa	$kJ/CmolX$	<i>Ec</i> (2 – 7)
a_{ana}	Sustrato requerido para la formación de 1 CmolX de biomasa (con base a los electrones)	$molS/CmolX$	<i>Ec</i> (2 – 9)
a_{cat}	Sustrato requerido para la formación de 1 CmolX de biomasa (con base a_G)	$molS/CmolX$	<i>Ec</i> (2 – 10)
a	Coefficiente de formación de biomasa	$molS/CmolX$	<i>Ec</i> (2 – 11)
X_S	Coefficiente Estequiométrico del sustrato en la reacción formación de biomasa	mol	<i>Ec</i> (2 – 12)
X_N	Coefficiente Estequiométrico de la fuente de nitrógeno en la reacción formación de biomasa	mol	<i>Ec</i> (2 – 12)
X_p	Coefficiente Estequiométrico del producto en la reacción formación de biomasa	mol	<i>Ec</i> (2 – 12)
X_w	Coefficiente Estequiométrico del agua en la reacción formación de biomasa	mol	<i>Ec</i> (2 – 12)

X_H	Coeficiente Estequiométrico de los protones en la reacción formación de biomasa	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 12)
X_c	Coeficiente Estequiométrico del CO ₂ en la reacción formación de biomasa	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 12)
X_X	Coeficiente Estequiométrico de la biomasa en la reacción formación de biomasa	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 12)
P_s	Coeficiente Estequiométrico del sustrato en la reacción formación de producto	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 13)
P_N	Coeficiente Estequiométrico de la fuente de nitrógeno en la reacción formación de producto	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 13)
P_p	Coeficiente Estequiométrico del producto en la reacción formación de producto	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 13)
P_w	Coeficiente Estequiométrico del agua en la reacción formación de producto	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 13)
P_H	Coeficiente Estequiométrico de los protones en la reacción formación de producto	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 13)
P_c	Coeficiente Estequiométrico del CO ₂ en la reacción formación de producto	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 13)
P_X	Coeficiente Estequiométrico de la biomasa en la reacción formación de producto	<i>mol</i>	<i>Ec</i> (2 – 13)
b_{min}	Coeficiente estequiométrico mínimo para la formación de producto	<i>molP/molS</i>	<i>Ec</i> (2 – 16)

b_{cat}	Coefficiente estequiométrico de acople catabólico para la formación de producto	$molP/molS$	$Ec (2 - 19)$
b_{TDF}	Coefficiente estequiométrico de polimerización para la formación de producto	$molP/molS$	$Ec (2 - 20)$
b	Coefficiente estequiométrico para la reacción de formación de producto	$molP/molS$	$Ec (2 - 18)$
n_p	Número de carbonos en producto	$molC/molP$	$Ec (2 - 20)$
z	Electrones transferidos por reacción	e	$Ec (2 - 22)$
f	Constante de Faraday	$Coulomb/mol e$	96485.33
CE	Eficiencia Coulómbica	%	$Ec (2 - 23)$
CO	Salida Coulómbica Inicial	$Coulomb$	$Ec (2 - 23)$
CI	Salida Coulómbica Final	$Coulomb$	$Ec (2 - 23)$
V	Voltaje	$Voltios$	
Q	Carga transferida	$Electrones$	$Ec (2 - 25)$
$\Delta G^\circ_{electrodo}$	Energía libre de Gibbs de la semirreacción del electrodo	kJ/mol	$Ec (3 - 2)$
$\Delta G^\circ_{mediador}$	Energía libre de Gibbs de la semirreacción del mediador	kJ/mol	$Ec (3 - 4)$
ΔG°_{IEA}	Energía libre de Gibbs de la semirreacción del aceptor interno de electrones	kJ/mol	$Ec (3 - 11)$
E°	Potencial de reducción estándar	$Voltios$	—
$E^{o'}$	Potencial de reducción estándar corregido a pH = 7	$Voltios$	—
ΔG°_{E-M}	Energía libre de Gibbs para la interacción electrodo-mediador	kJ/mol	$Ec (3 - 7)$
$\Delta G^\circ_{AIE-mediad.}$	Energía libre de Gibbs para la interacción aceptor interno de electrones - mediador	kJ/mol	$Ec (3 - 13)$

$\Delta G_{AIE-Mediada}^{o\text{corregido}}$	Energía libre de Gibbs corregida para formación de ATP en la interacción aceptor interno de electrones - mediador	<i>kJ/mol</i>	<i>Ec (3 – 14)</i>
ΔG_{AIE-V}^o	Energía libre de Gibbs para la reacción global de transferencia de electrones entre el electrodo y el aceptor interno de electrones	<i>kJ/mol</i>	<i>Ec (3 – 17)</i>
ΔC_i	Cambio al coeficiente estequiométrico de la molécula i	<i>Mol i/molS</i>	
e_p	Electrones requeridos para el cambio metabólico	<i>Electrones</i>	<i>Ec (4 – 33)</i>
e_{max}	Electrones requeridos para el cambio metabólico completo	<i>Electrones</i>	<i>Ec (4 – 34)</i>
z	Avance de la electro-fermentación	–	<i>Ec (4 – 30)</i>
q_i	Velocidad de producción específica para la molécula i	<i>mol i/Cmolx – h</i>	–

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad	Definición
μ	Tasa específica de crecimiento celular	h^{-1}	–
η	Coefficiente de acople metabolismo catabólico - anabólico	–	<i>Ec (2 – 19)</i>
γ_i	Grado de reducción de la molécula i	<i>mole/moli</i>	–
η_{EF}	Eficiencia de Electro-fermentación	–	<i>Ec (2 – 25)</i>

Subíndices

Subíndice	Término
<i>N</i>	Amoniaco
<i>p</i>	Producto
<i>w</i>	Agua
<i>H</i>	Hidrógeno
<i>c</i>	CO ₂
<i>X</i>	Biomasa
<i>min</i>	Mínimo
<i>max</i>	Máximo
<i>TDF</i>	Fuerza impulsora termodinámica
<i>cat</i>	Catabolismo
<i>ana</i>	Anabolismo
<i>e</i>	Electrones
<i>Electrodo</i>	Electrodo
<i>Mediador</i>	Mediador
<i>AIE</i>	Aceptor Interno de Electrones
<i>E – M</i>	Interacción electrodo - mediador
<i>AIE – Mediador</i>	Interacción aceptor interno de electrones - mediador
<i>Electrodo – AIE</i>	Interacción electrodo - aceptor interno de electrones
<i>red</i>	Molécula reducida
<i>ox</i>	Molécula oxidada
<i>0</i>	Condición inicial
<i>EF</i>	Condición de electro-fermentación
<i>exp</i>	Condición Experimental

Superíndices

Superíndice	Término
<i>o</i>	Condiciones estándar
<i>o'</i>	Condiciones estándar y pH = 7
<i>corregido</i>	Termino corregido a una condición específica.
<i>catódico</i>	Proceso catódico
<i>anódico</i>	Proceso anódico

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>EFS</i>	Sistema(s) de electro-fermentación(s)
<i>BES</i>	Sistema(s) bioelectroquímico(s)
<i>EET</i>	Transporte extracelular de electrones
<i>ORP</i>	Potencial de reducción de oxígeno
<i>TDF</i>	Fuerza impulsora termodinámica
<i>MEC</i>	Celda de electrolisis microbiana
<i>MES</i>	Celda de electro síntesis microbiana
<i>MFC</i>	Celda de combustible microbiana

Introducción

En la ingeniería química se ha utilizado tradicionalmente el análisis de procesos a partir de balances (materia, energía y cantidad de movimiento), cinéticas y principios de la termodinámica para el desarrollo racional y eficiente de procesos de transformación de la materia. Mientras tanto, el desarrollo de los bioprocesos, en múltiples ocasiones, se ha llevado a cabo con un alto grado de empirismo debido principalmente a la poca aplicación de estos principios básicos y estrategias sistemáticas de diseño tal como sucede con los procesos químicos tradicionales.

El desarrollo de bioprocesos se ha dado, en parte, gracias a una pequeña interacción de la ingeniería química con otras disciplinas como la microbiología y la biología molecular. No obstante, se necesita aún articular y aplicar de forma estricta y sistemática enfoques más robustos de la ingeniería química con las nuevas tecnologías “*omics*”, para obtener mayor y mejor información para el desarrollo de bioprocesos. Permitiendo el conocimiento de estequiometrías, mecanismos y cinéticas de reacción, condiciones de equilibrio y de direccionalidad de las reacciones bioquímicas, funcionamiento de los diferentes niveles del procesamiento celular, transporte de materiales a través de membranas celulares, entre otras, que conlleven un desarrollo racional y eficiente de procesos de biotransformación a partir de principios básicos y con una reducida cantidad de desarrollos experimentales.

Es así como el grupo de Bioprocesos y Flujos Reactivos de la Facultad de Minas, en especial el semillero de investigación en Diseño Racional e Intensificación de Bioprocesos (BIRD, *Bioprocess Intensification and Rational Design*) ha logrado, a través de proyectos de investigación financiados por entidades como la Universidad Nacional de Colombia y Minciencias, consolidar una metodología basada en el entendimiento de la

función celular y la aplicación de los principios de la ingeniería química a los sistemas de transformación biológica, integrando tecnologías “*omics*” con principios de termodinámica, estequiometría y cinéticas de reacción para el diseño de bioprocesos. Se ha logrado diseñar *in silico* rutas metabólicas potenciales para la transformación de glicerol en ácido 3 indol acético y ácido propiónico [1], [2]. También han propuesto diseños *in silico* para la conversión de gas de síntesis en etileno [3]. En la ejecución de estos proyectos se han encontrado diferentes restricciones metabólicas que implican una reducción significativa en los rendimientos esperados, debidos principalmente a una disparidad entre el flujo de carbono y el flujo de electrones predicho por la termodinámica. Este comportamiento radica aparentemente en una demanda extra de energía libre de Gibbs para suplir algunas disipaciones de energía en el proceso y para cumplir requerimientos de energía de activación, las cuales no pueden identificarse tempranamente durante la construcción del modelo de caja negra. El análisis de estas redes metabólicas identificó la necesidad de implementar un mecanismo de redistribución del flujo de electrones que tuviera impacto en la distribución del flujo de carbono con el propósito de mejorar los rendimientos.

El enfoque utilizado ha permitido evidenciar nuevas oportunidades de mejoramiento y retos tecnológicos que deben superarse con el fin de redistribuir los flujos de carbono y electrones en las rutas metabólicas para lograr un mejor aprovechamiento de la energía química disponible en los sustratos y convertirla en energía biológicamente utilizable. De ser así, se podrían mejorar los rendimientos de carbono al redirigir los flujos de carbono al producto deseado, disminuyendo la generación de subproductos y mejorando la eficiencia termodinámica, acercando sus rendimientos a los máximos teóricos.

A partir de la experiencia adquirida, se ha identificado la electro-fermentación como una gran oportunidad que permitiría superar diversos retos metabólicos. Esta es una ingeniosa técnica que está empezando a ser utilizada para direccionar el desempeño de los sistemas metabólicos toda vez que permite una redistribución de electrones a través de las redes metabólicas, utilizando un electrodo que puede servir de ánodo para disipar el exceso de electrones o como un cátodo como fuente de electrones [4].

En este orden de ideas, el presente trabajo plantea el desarrollo de un modelo *in silico* para evaluar la capacidad de las estrategias de electro-fermentación al redireccionar flujos metabólicos y permitiendo un mejor aprovechamiento de la energía disponible, disminuir la generación de subproductos y mejorar el rendimiento del proceso, todo esto dentro de un enfoque de diseño racional de bioprocesos

Para desarrollar lo anterior, se ha propuesto un modelo estequiométrico con base en fundamentos termodinámicos y un modelo metabólico de escala genómica que permite evidenciar los costos energéticos y de electrones asociados al proceso, en conjunto con los cambios metabólicos y termodinámicos que implican las electro-fermentaciones, incluyendo su aplicación en el enfoque del diseño racional de bioprocesos para resolver limitaciones metabólicas. Es así como este trabajo constituye un avance en el entendimiento teórico de los procesos de electro-fermentación y una extensión a la metodología del diseño racional de bioprocesos.

1.Planteamiento del problema

El presente trabajo buscó dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación: ¿Podría la electro-fermentación utilizarse como estrategia en el marco del diseño racional de bioprocesos para lograr un mejor aprovechamiento de la energía química disponible en los sustratos y convertirla en energía biológicamente utilizable, mejorando los rendimientos del proceso?

1.1 Hipótesis

“Dado que, en el enfoque del diseño racional de bioprocesos, se ha observado la existencia de limitaciones en los rendimientos, relacionadas principalmente con el transporte de electrones, la aplicación de estrategias de diseño, que tengan en cuenta la funcionalidad de la electro-fermentación, podrían presentar un efecto positivo en el aprovechamiento de la energía biológicamente disponible y una mejora en los rendimientos del proceso, acercándose a los máximos teóricos termodinámicos.”

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar *in silico* estrategias de electro-fermentación para redireccionar flujos metabólicos que permitan un mejor aprovechamiento de la energía disponible dentro de un enfoque de diseño racional de bioprocesos

1.2.2 Objetivos específicos

- I. Proponer un desarrollo teórico para la incorporación del concepto de electro-fermentación dentro una metodología de diseño racional de bioprocesos que permita el redireccionamiento de los flujos de electrones y de carbono en redes metabólicas con base en fundamentos termodinámicos de sistemas celulares y conceptos de ingeniería metabólica.
- II. Realizar al menos un diseño *in silico* de un microorganismo chasis con funcionalidad de electro-fermentación que dé cuenta de la funcionalidad metabólica requerida a partir de la identificación de estrategias potencialmente factibles tanto termodinámica como biológicamente mediante la reconstrucción de las rutas metabólicas deseadas
- III. Evaluar el desempeño del modelo metabólico *in silico* con la funcionalidad de electro-fermentación incorporada al aplicarlo en al menos un caso de estudio entre los trabajos previamente desarrollados al interior del semillero de

investigación de Intensificación y Racionalización de Bioprocesos (BIRD, por sus siglas en inglés): producción de ácido indolacético , ácido propiónico o etileno.

- IV. Identificar posibles objetivos metabólicos tendientes a incrementar los rendimientos de la bioconversión en términos de un mejor uso del carbono y los electrones disponibles a partir del análisis de los flujos metabólicos en el modelo metabólico.

1.3 Seguimiento de los objetivos según metodología y resultados.

En la **Tabla 1-1** se relacionan cada uno de los objetivos específicos con la metodología propuesta para su cumplimiento y su correspondiente resultado.

Tabla 1-1. Seguimiento de los objetivos a lo largo del documento de tesis según la metodología realizada y los resultados obtenidos.

Objetivo específico N.	Metodología relacionada	Resultado Obtenido
I	3.1	4.1
	3.2	4.2
II	3.3	4.3
III	3.4	4.4
IV	3.4	4.4

2.Marco Teórico

2.1 Generalidades de la termodinámica en los bioprocesos.

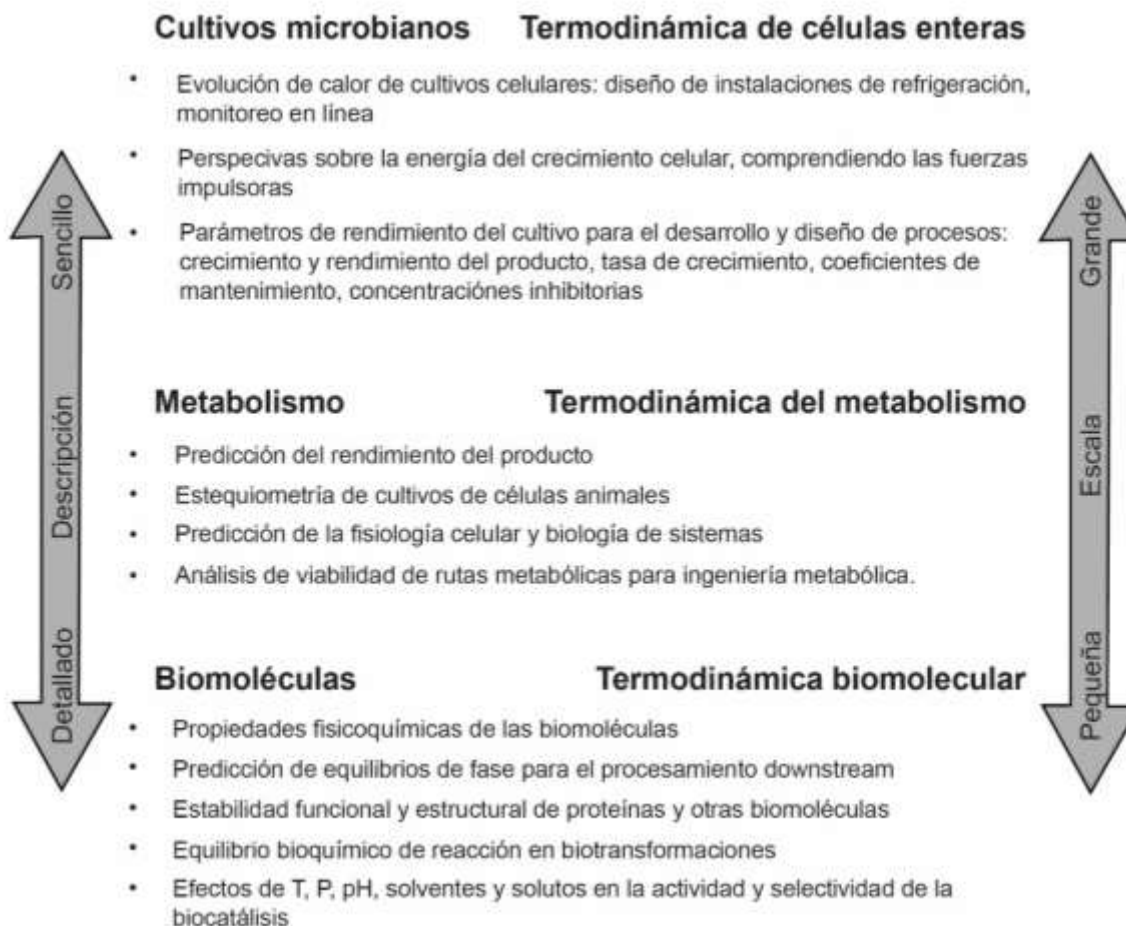
La aplicación de la termodinámica ha tenido un gran impacto en un significativo número de campos que cubren la química, biología, física, y particularmente la ingeniería química, en donde se ha sistematizado su aplicación permitiendo diseñar procesos petroquímicos con una reducida cantidad de trabajo experimental [5].

En el diseño de bioprocesos, la situación es completamente diferente. El requerimiento de trabajo experimental es esencial, en donde se hace un enfoque en diseños experimentales robustos, en vez, de cálculos previos, creando una alta dependencia de equipos y sistemas analíticos para su desarrollo e implementación [5], [6]. No obstante, al igual que con los procesos químicos tradicionales, se puede pensar que es posible reducir de manera substancial la cantidad de trabajo experimental requerido en los bioprocesos al aplicar la termodinámica de manera sistemática y robusta [5], [7].

Como se evidencia en la **Figura 2-1**, la biotermodinámica se puede dividir en 3 campos según su escala de aplicación [8]. En la escala más baja de los bioprocesos, encontramos las biomoléculas, en donde se puede analizar y estimar las diferentes

propiedades físicas y químicas de los compuestos. Conociendo la naturaleza de las moléculas se pueden describir los equilibrios de cambio de fase, adsorción y desorción, facilitando un mejor diseño de los procesos downstream. La aplicación de la termodinámica a las biomoléculas también puede llevar a la predicción de la estructura tridimensional, estabilidad y funcionalidad de las proteínas y enzimas, permitiendo realizar diferentes estudios de las biorreacciones catalizadas. Al igual que en las reacciones químicas, es posible conocer el equilibrio de las reacciones biológicas y su posible afectación por variables externas como el pH y la temperatura.

Figura 2-1. Campos de la biotermodinámica según su escala de aplicación.



Adaptado de: [5]

En la siguiente escala (en el intermedio de la gráfica) , encontramos el metabolismo celular, como el conjunto de reacciones biológicas que describen el funcionamiento celular. Las principales aplicaciones de la termodinámica a esta escala están estrechamente relacionadas con la ingeniería metabólica, buscando la predicción de máximos rendimientos y productividades de un proceso específico, teniendo en cuenta la factibilidad energética y termodinámica de las rutas metabólicas y el transporte de los compuestos. En esta escala se utilizan herramientas como los modelos metabólicos de escala genómica, haciendo uso de conceptos como el análisis de flujos metabólicos (FBA por sus siglas en inglés) y sus posibles restricciones termodinámicas.

Finalmente (en la parte alta), encontramos el análisis de la célula como un solo sistema, en donde la termodinámica puede dar perspectiva de la bioenergética del crecimiento celular, prediciendo parámetros de crecimiento y producción, así como las pérdidas de calor relacionadas, que facilitan el diseño de los sistemas de intercambio de calor.

Con el diseño racional de bioprocesos, se pretende unir estas tres escalas, con el objetivo de sistematizar el desarrollo de bioprocesos con base en la teoría termodinámica, de manera similar a como se aplica en la ingeniería química.

2.2 Diseño racional de bioprocesos

El diseño racional de bioprocesos es una metodología que busca aplicar la estrategia de diseño utilizada en la ingeniería química, en el desarrollo de bioprocesos. Lo anterior implica realizar estudios previos de factores termodinámicos y cinéticas de reacción, así como conocer los diferentes fenómenos de transporte que ocurren tanto en el reactor como al interior celular en los procesos de conversión fisicoquímica y biológica. No obstante, dado el origen biológico del catalizador, el conocimiento de su función biológica es de vital importancia. Este enfoque de diseño aún no se ha extendido ampliamente en Colombia, por lo cual, muchos de los proyectos encaminados a generar oportunidades de

desarrollo con base en la transformación de productos provenientes de la gran biodiversidad del país, terminan teniendo un alto grado de empirismo.

Esta estrategia radica en que el diseño racional de un bioproceso parte de las especificaciones técnicas y de la capacidad de producción necesaria para suplir una demanda establecida de producto. Luego se define la pareja sustrato/producto y la energía libre de Gibbs disponible para llevar a cabo dicha transformación. Como resultado de este paso puede ser necesario introducir energía libre de Gibbs extra al sistema lo que implicaría el uso de cosustratos o que se realicen modificaciones a nivel genómico y metabólico con el ánimo de hacer el proceso factible termodinámicamente [9].

Con esta información se define el microorganismo, la estequiometría y las condiciones de operación y el tipo de biorreactor a la escala industrial previamente determinada por la demanda del producto y/o la oferta de materias primas. Finalmente, se racionaliza el proceso mediante la identificación de objetivos metabólicos que conllevarán aumentos en rendimientos y productividades. Esto último se lleva a cabo utilizando herramientas de ingeniería metabólica [10], [11].

El diseño racional de un bioproceso debe conllevar al planteamiento de un número limitado de experimentos en laboratorio "*wet-lab experiments*", los cuales son resultado de simulaciones en computador "*dry-lab experiments*". Con este esquema, se logra hacer un desarrollo dirigido del proceso evitando un uso innecesario del recurso económico, de infraestructura y humano que se produciría si se inicia el desarrollo del bioproceso a partir de la experimentación directa en matraz y/o biorreactor [12], [13]. Justamente es este último punto el que presenta una mayor diferencia entre el diseño racional de bioprocesos y el método tradicional, ya que al partir de una experimentación directa se corre el riesgo de hacer un desarrollo empírico con alta probabilidad de que no sea aplicable luego a escala industrial.

Los experimentos propuestos como resultado del diseño racional del bioproceso deben permitir realizar análisis de sensibilidad dirigidos a las variables críticas de proceso teniendo en cuenta la escala industrial, y de esta manera, facilitar el escalado del proceso.

2.3 Metodología general del diseño racional de bioprocursos

Se han desarrollado los siguientes pasos para el desarrollo de la metodología [1], [2], [9], [14]:

- I. Se establece el tipo de producto deseado, el nivel de producción a escala industrial al cual se desea operar el bioproceso, las posibles materias primas y su disponibilidad. Se realiza un análisis preliminar del potencial económico con base en el costo de materias primas y el precio del producto terminado en mercados globales.
- II. Se establecen las especificaciones del bioproceso y parámetros requeridos para el cumplimiento de los supuestos definidos en el paso anterior (rendimientos, productividades y pureza requeridas). Es necesario identificar aspectos termodinámicos del proceso y consideraciones de transferencia de masa que puedan limitar los objetivos de proceso, como el requerimiento de aireación o la precipitación de alguno de los productos.
- III. Se realiza el reconocimiento y anotación de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas involucradas en el bioproceso (sustrato, producto y las demás moléculas que intervienen en el proceso, así como las moléculas que hagan parte del medio de cultivo).

- IV. Se identifican los microorganismos con actividad metabólica reconocida para llevar a cabo el proceso requerido y otros posibles microorganismos que puedan servir para el desarrollo de la plataforma metabólica, estos serían microorganismos “chasis” a los cuales, por medio de herramientas de Ingeniería Genética, se propone la modificación de sus rutas metabólicas con el fin de obtener el producto de interés. Usualmente estos últimos deben ser microorganismos para los cuales se tiene un amplio conocimiento de su genoma y sus capacidades metabólicas (ej. *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*).

- V. **Se define la estequiometría del proceso global utilizando un enfoque termodinámico** (en la sección 2.4 se describe la metodología para su desarrollo).

- VI. Se determina la fuerza motriz termodinámica para el proceso a partir de la pareja sustrato/producto elegidas, realizando un análisis de la energía libre de Gibbs disponible, con base en los datos obtenidos en el paso metodológico V.

- VII. Se realiza la reconstrucción de la red metabólica *in silico* del microorganismo plataforma para identificar los genes que codifican para las enzimas que han de catalizar las reacciones necesarias para la bioconversión del sustrato escogido y síntesis del producto de interés.

- VIII. Se diseña la red metabólica *in silico* a partir de la red plataforma definida en el paso anterior, incluyendo cada una de las reacciones requeridas para la bioconversión, seguido de un análisis termodinámico y redox para el establecimiento de objetivos metabólicos que puedan conllevar al mejoramiento del desempeño del proceso.

- IX. Se determinan las tasas de transporte requeridas para el óptimo desempeño del biocatalizador en biorreactor, proponiendo posibles configuraciones de operación y el tipo de biorreactor a ser utilizado.

- X. Se realiza una caracterización del régimen de operación a escala industrial a partir de un análisis de tiempos característicos y se establecen posibles factores que conllevarían a una respuesta metabólica no favorable por parte del microorganismo (e.g limitaciones a la transferencia de oxígeno).
- XI. Se plantea el diseño de experimentos a nivel de laboratorio que dé cuenta de los tiempos característicos estimados y que permita evaluar el desempeño del microorganismo diseñado con base en la información teórica.

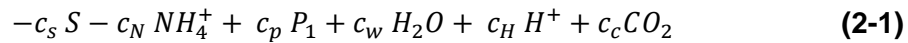
De estos pasos metodológicos, se resalta y hace énfasis en el paso **V**. Como su nombre lo indica, es precisamente en ese paso en donde se pueden dar las relaciones que permiten limitar los procesos con base en los datos termodinámicos disponibles, y acercarse al diseño de los procesos utilizando datos teóricos y disponibles en bases de datos.

2.4 Definición de la estequiometría de los bioprocesos utilizando un enfoque termodinámico

A continuación se describen los pasos y ecuaciones necesarias para definir el modelo de caja negra para el proceso (su estequiometría y relaciones de Herbert-Pirt), siguiendo la metodología propuesta por Heijnen y colaboradores [7]

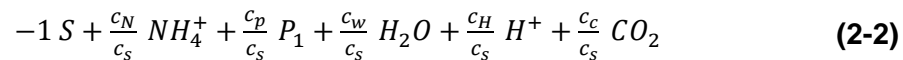
2.4.1 Definición de la reacción catabólica

Inicialmente se define la reacción catabólica para el proceso de interés. En esta se debe incluir la pareja sustrato/producto y las moléculas donadoras de carbonos y electrones. Una forma simplificada de esta reacción en los procesos biológicos se define en la reacción **(2-1)**.



En donde c_i corresponde al coeficiente estequiométrico (según los balances elementales o definido previamente en la literatura) para cada una de las moléculas en la reacción catabólica, S y P_1 son el sustrato y producto, respectivamente. Cabe resaltar que en esta reacción el sustrato es la misma fuente de carbono y electrones. Para casos diferentes, es necesario utilizar alguna modificación a la reacción catabólica y continuar con el proceso [7], [8]

Continuando con la metodología, la reacción **(2-1)** puede preferiblemente reescribirse por 1 mol de sustrato, por lo cual, se pueden operar los coeficientes anteriores para dar lugar a la reacción **(2-2)**



La energía libre de Gibbs de reacción $\Delta G_{Rxn}^{\circ \text{ catabolismo}}$ para la reacción **(2-2)** puede calcularse según las energías libres de formación para cada uno de los compuestos, según la ecuación **(2-3)**

$$\Delta G_{Rxn}^{\circ \text{ catabolismo}} = \sum \frac{c_i}{c_s} \Delta G_{f_i}^{\circ} \quad \left[\frac{kJ}{mols} \right] \quad (2-3)$$

La energía libre de Gibbs de formación $\Delta G_{f_i}^{\circ}$ en los compuestos orgánicos e inorgánicos se encuentra tabulada o puede ser calculada utilizando diferentes métodos [15]. Posteriormente, se define ΔG_{cat}° **(2-4)**.

$$\Delta G^{\circ}_{cat} = -\Delta G^{\circ}_{catabolismo} \left[\frac{kJ}{molS} \right] \quad (2-4)$$

2.4.2 Estimación del mantenimiento celular

Se parte inicialmente por calcular el parámetro m_G definido en la ecuación (2-5), en donde R es la constante ideal de los gases = $8.314 \frac{J}{mol.K}$ y T es la temperatura en kelvin. Este parámetro estima la cantidad de energía requerida kJ para las funciones de mantenimiento celular de $1 Cmol_x.h$ de biomasa.

$$m_G = 4.5 * e^{\left[\frac{-69000}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right]} \left[\frac{kJ}{Cmol_x.h} \right] \quad (2-5)$$

Consecuentemente, se utiliza el valor de m_G para calcular el parámetro m_S según la ecuación (2-6), en donde ΔG°_{cat} es el valor obtenido con la ecuación (2-4). Es de anotar que m_G depende exclusivamente de la temperatura a través de una expresión empírica tipo Arrhenius y no está asociado al tipo de microorganismo ni al sustrato utilizado.

$$m_S = m_G / \Delta G^{\circ}_{cat} \left[\frac{molS}{Cmol_x.h} \right] \quad (2-6)$$

Este parámetro m_S define la cantidad de sustrato requerida para cumplir con los requerimientos de biomasa estimados con el parámetro m_G teniendo en cuenta la energía disponible en el catabolismo celular. Este parámetro se conoce típicamente como coeficiente de mantenimiento celular.

2.4.3 Estimación de la formación de biomasa y crecimiento celular.

La estimación de la cantidad de energía requerida para la síntesis de biomasa, expresada en el coeficiente a_G , depende únicamente de la fuente de carbono, el donador de electrones y si existe o no la necesidad de transporte inverso de electrones para la generación de poder reductor. En el caso de metabolismo heterotrófico, se define en la ecuación (2-7), en donde c es el número de átomos de carbono presentes en una mol de fuente de carbono y γ su grado de reducción.

$$a_G = 200 + 18 (6 - c)^{1.8} + e^{\left[\left(\left(3.8 - \frac{\gamma}{c} \right)^2 \right)^{0.16} * (3.6 + 0.4 c) \right]} \left[\frac{kJ}{Cmol_x} \right] \quad (2-7)$$

El parámetro a_{ana} determina la cantidad de sustrato requerida para la producción de un $Cmol_x$ de biomasa, definido con la ecuación (2-8) a partir de un balance de electrones, en donde γ_D es el grado de reducción del donador de electrones y γ_X el grado de reducción de la biomasa. Es importante recalcar que, de existir varios donadores de electrones en el sistema, se tienen que incluir en el balance de la ecuación (2-8).

$$\gamma_D \cdot a_{ana} + \gamma_X \cdot 1 = 0 \quad (2-8)$$

En donde despejando para a_{ana} se obtiene la ecuación (2-9) (Asumiendo que el donador de electrones es el sustrato).

$$|a_{ana}| = \frac{\gamma_X}{\gamma_S} \left[\frac{mols \text{ (usado en el anabolismo)}}{Cmol_x} \right] \quad (2-9)$$

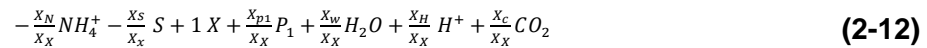
Continuando con la metodología, el parámetro a_{cat} da cuenta de la cantidad de sustrato requerida para obtener la energía libre de Gibbs necesaria para producir una $Cmol_x$, y se define en la ecuación (2-10).

$$|a_{cat}| = \frac{a_G}{\Delta G^\circ_{cat}} \left[\frac{mols \text{ (usado en el catabolismo)}}{Cmol_x} \right] \quad (2-10)$$

Finalmente, el aporte total del anabolismo y catabolismo se expresa con el coeficiente a (Ecuación (2-11))

$$|a| = a_{cat} + a_{ana} = \frac{a_G}{\Delta G^\circ_{cat}} + \frac{\gamma_x}{\gamma_S} \left[\frac{mols}{Cmol_x} \right] \quad (2-11)$$

Conociendo el valor de $|a|$ se puede plantear la siguiente reacción de formación de biomasa (similar a la reacción (2-2) de catabolismo) pero incluyendo la molécula correspondiente a 1 $cmol$ de biomasa X y su correspondiente coeficiente estequiométrico X_x .



En donde X_i es el coeficiente estequiométrico de las moléculas involucradas. Cabe resaltar que a diferencia de la reacción (2-2), la reacción (2-12) se encuentra escrita con base a 1 $cmolX$ y no 1 $mol S$.

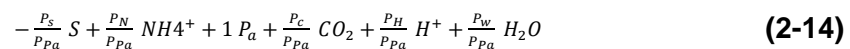
Los coeficientes estequiométricos X_i se encuentran planteando los balances elementales y de carga utilizando una ecuación adicional, que tiene en cuenta la relación entre $\frac{X_S}{X_X}$ y el parámetro a , según la ecuación **(2-13)**.

$$\frac{X_S}{X_X} = |a| \quad (2-13)$$

Definida la estequiometría para la reacción de formación de biomasa (Ecuación **(2-12)**), se tiene que corroborar que la energía libre de Gibbs de reacción $\Delta G_{Rxn}^{obiomasa} \ll 0$, es decir, cuenta con la energía suficiente para producir 1 *CmolX* según los parámetros definidos.

2.4.4 Estimación de la reacción para producto anabólico

Este apartado continua de manera similar al método de cálculo planteado por Heijnen y otros autores [5], [7], [9]. dando lugar a la reacción **(2-14)** para producción de producto anabólico P_a . y su correspondiente coeficiente estequiométrico para reacción de producto P_{Pa} .



En donde P_i es el coeficiente estequiométrico para reacción de producto de las moléculas involucradas. Además, se puede establecer la relación **(2-15)** para resolver los balances elementales y encontrar los coeficientes estequiométricos P_i ,

$$\frac{P_S}{P_{Pa}} = |b| \quad (2-15)$$

El cálculo de b es un proceso de 2 pasos. Inicialmente se plantea el parámetro b_{min} utilizando la ecuación (2-16), en donde γ_P y γ_S son el grado de reducción del producto y sustrato respectivamente.

$$|b_{min}| = \frac{\gamma_P}{\gamma_S} \quad (2-16)$$

Se toma este valor de $b_{min} = b$ y se calcula la energía libre de Gibbs de reacción para el producto anabólico $\Delta G_{Rxn}^{o\text{producto}}$ según la reacción (2-14) y la ecuación (2-15). Al realizar este cálculo se pueden presentar dos escenarios:

- Caso 1: $\Delta G_{Rxn}^{o\text{producto}} \ll 0$. En el cual la sola reacción del producto anabólico contiene suficiente energía y no requiere su acople al catabolismo celular. En este caso, se define b como en la ecuación (2-17).

$$|b| = b_{min} = \frac{\gamma_P}{\gamma_S} \quad (2-17)$$

- Caso 2: $\Delta G_{Rxn}^{o\text{producto}} > 0$. La reacción de producto tiene un requerimiento de energía adicional, en donde b puede definirse según la ecuación (2-18).

$$|b| = b_{min} + b_{cat} + b_{TDF} \quad (2-18)$$

En donde b_{cat} y b_{TDF} se definen en las ecuaciones (2-19) y (2-20). b_{cat} es un término que define un acople entre el anabolismo y el catabolismo celular, teniendo en cuenta una fracción η de energía catabólica que puede utilizarse para la formación de producto anabólico (típicamente $\eta \approx 0.5$).

$$b_{cat} = \frac{\Delta G_{Rxn}^{o\text{producto}}}{\Delta G_{Rxn}^{o\text{catabolismo}} * \eta} \quad (2-19)$$

b_{TDF} es un término que define la cantidad de energía necesaria para realizar la polimerización de las moléculas, en donde n_P es el número de carbonos en el producto anabólico.

$$b_{TDF} = \frac{10 * n_P}{\Delta G_{Rxn}^{o\text{catabolismo}} * \eta} \quad (2-20)$$

2.4.5 Estimación de las relaciones $q_i(\mu)$ y la estequiometría global del proceso.

La reacción global del proceso se define como una combinación lineal de las reacciones catabólicas y anabólicas (producción de biomasa y producto anabólico) como se describe en la reacción **(2-21)**

$$m_s \cdot (\text{Reacción}_{\text{Catabolica}}) + u \cdot (\text{Reacción}_{\text{Biomasa}}) + q_p(u) \cdot (\text{Reacción}_{\text{Producto anabolico}}) \quad (2-21)$$

En donde $q_p(u)$ es una función que relaciona la síntesis de producto anabólico con respecto a la tasa de crecimiento celular μ y m_s , el coeficiente de mantenimiento celular calculado en la ecuación **(2-6)**. La relación $q_p(u)$ puede ser determinada de forma experimental o teniendo en cuenta modelos matemáticos de síntesis de productos [8].

Al realizar balances por molécula, se pueden definir las funciones de Herbert-Pirt $q_i(\mu) \left[\frac{\text{mol}_i}{\text{CmolX} \cdot \text{h}} \right]$ para cada una de las moléculas.

2.5 Refinamiento de la estequiometría del proceso.

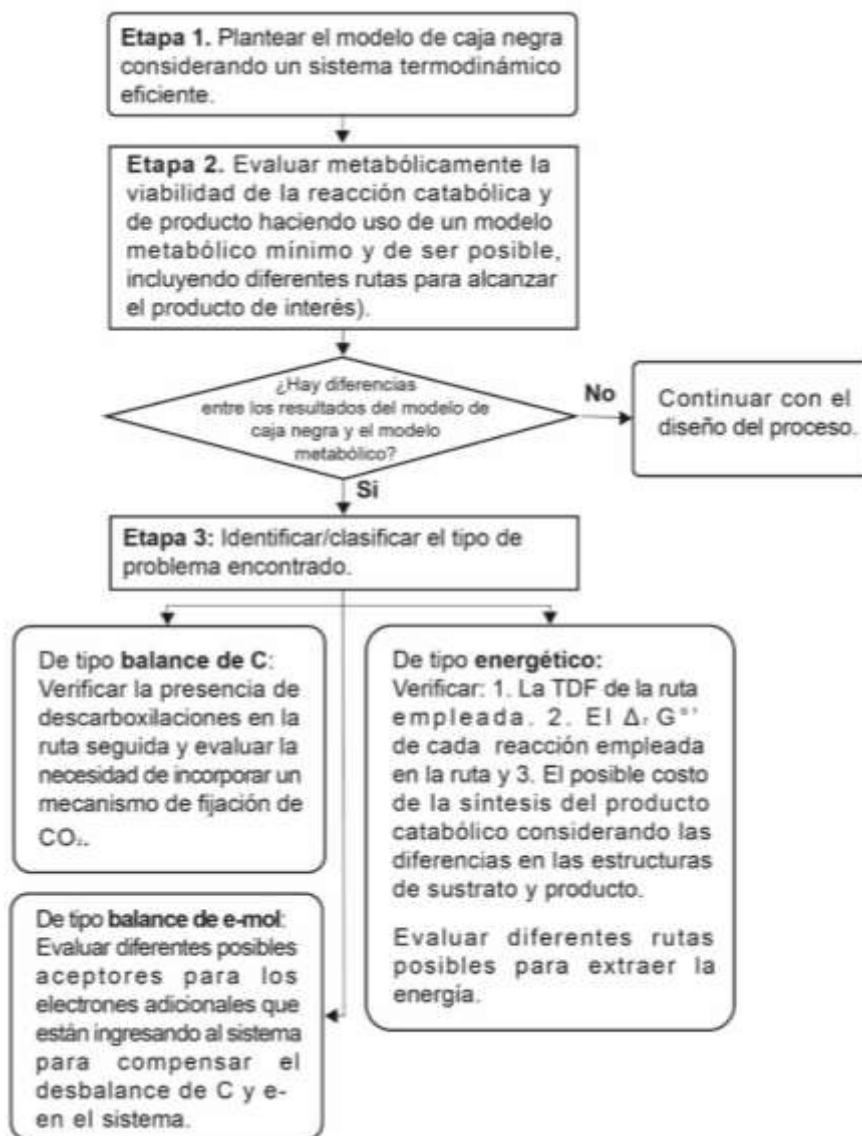
Con los diferentes trabajos realizados en el grupo de investigación de Bioprocesos y Flujos Reactivos, de la Facultad de Minas en la Universidad Nacional de Colombia, se ha logrado refinar los anteriores pasos metodológicos descritos en el numeral 2.4. Según Pedraza [1], se tienen que evaluar los siguientes panoramas en el momento de completar la estequiometría del proceso (**Figura 2-2**).

En primera instancia, se define el modelo de caja negra para el proceso y la estequiometría, siguiendo la metodología propuesta por Heijnen y explicada en el numeral anterior. Posteriormente, se diseña un modelo metabólico mínimo, definido como el mínimo conjunto de reacciones metabólicas necesarias para llevar a cabo un proceso en el marco del diseño racional de bioprocesos [1].

El objetivo de esto es analizar si existen diferencias o no con el modelo de caja negra, bajo la premisa de que tanto el modelo de caja negra como el modelo metabólico tienen que coincidir y reflejar los mismos resultados. De existir diferencias, se tiene que analizar la ruta metabólica en busca de desbalances en el flujo de carbono (debido a descarboxilaciones), desbalances en el estado redox (debido a la fuga o falta de electrones en el sistema) o desbalances energéticos (debido al déficit de ATP o energía biológicamente disponible). Una vez identificado y resuelto el desbalance, se continúa normalmente con los pasos metodológicos expuestos.

Con estos hallazgos, se plantean los pasos para la definición de la estequiometría global del proceso siguiendo un ejercicio iterativo, en donde se tienen que ir corrigiendo las restricciones termodinámicas con base en las limitaciones metabólicas encontradas con los modelos metabólicos de escala genómica y viceversa. Estos dos procesos representan dos escalas diferentes en el análisis de los bioprocesos (**Figura 2-2**) y son esenciales para una concordancia en el diseño.

Figura 2-2. Metodología básica para la definición de la estequiometría del proceso.



Adaptado de: [1]

2.6 Modelos metabólicos de escala genómica.

Un modelo metabólico de escala genómica o GEM por sus siglas en inglés, es una descripción exhaustiva del conjunto de reacciones bioquímicas y rutas metabólicas

contenidas en el genoma de un microorganismo, las cuales a partir de coeficientes estequiométricos pueden ser simuladas, permitiendo realizar evaluaciones y obtener predicciones del comportamiento celular [16], [17].

Entre los métodos que se encuentran disponibles hoy en día, se distinguen los modelos estequiométricos de escala genómica del metabolismo celular, y entre ellos los métodos de reconstrucción y análisis de redes metabólicas basados en restricciones (COBRA, por sus siglas en inglés)[17]. Estas estrategias se basan primeramente en el entendimiento de la función celular y de la bioquímica involucrada, para luego crear modelos matemáticos que permitan esclarecer el funcionamiento celular y dilucidar objetivos de mejoramiento metabólicos tendientes a incrementar los rendimientos y titulaciones de los productos deseados (metabolitos o moléculas). Los análisis de redes metabólicas permiten probar diferentes escenarios para predecir ciertos comportamientos de los sistemas biológicos, entre los que se encuentran: rendimientos teóricos, optimización de éstos mediante alteración del genoma o disminución en la producción de biomasa para dirigir los flujos metabólicos hacia los productos de interés, y finalmente introducir cambios regulatorios que permitan maximizar dichos rendimientos [12], [13].

Los modelos metabólicos de escala genómica se han vuelto una herramienta esencial para el entendimiento del metabolismo y sus aplicaciones en ingeniería metabólica. Estos modelos se reconstruyen a partir de colecciones extensas y procesos de curado de la información biológica, de la anotación y funcionamiento de genes, metabolitos, reacciones metabólicas, enzimas y sus interacciones dentro de un organismo dado [10]. Estas interacciones deben obedecer restricciones de tipo termodinámico, conservación de materia y energía, así como también cumplir con el entendimiento de la función biológica en todos sus niveles (genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma y fluxoma). Hoy en día, se cuenta con algoritmos computacionales tales como análisis de balance de flujos basados en restricciones (FBA por sus siglas en inglés), los cuales son esenciales para analizar sistemáticamente los modelos de escala genómica reconstruidos y se utilizan para entender los objetivos y funciones de la red metabólica [10]. De igual manera, los modelos COBRA son una potente herramienta que permite predecir las propiedades del fenotipo bajo perturbaciones genéticas y ambientales (ej.

condiciones de cultivo en biorreactor). En resumen, el enfoque de la ingeniería metabólica busca primeramente manipular microorganismos para mejorar la producción de productos químicos o mejorar las propiedades celulares mediante la modificación de la información genética, la composición de los medios de cultivo, y las condiciones de operación de los biorreactores. Principalmente utiliza enfoques genéticos para ajustar las redes metabólicas y su regulación en los biocatalizadores (microorganismos mediadores de la transformación química) para mejorar la producción de compuestos químicos deseados [11].

El proceso de desarrollo y análisis empieza con la identificación de las rutas biosintéticas para lo cual existen un gran número de bases de datos que describen reacciones catalizadas por enzimas conocidas, por ejemplo, KEGG, BioCyc, BRENDA, MetRxn y SEED. Estas bases de datos pueden ser utilizadas para desarrollar redes de reacciones específicas para un microorganismo [11], pueden ser utilizadas para identificar posibles reacciones que puedan ser catalizadas por otras enzimas que no necesariamente se expresan en el microorganismo de interés, e inclusive pueden ayudar a identificar pasos de conversión bioquímica que no se encuentran en la naturaleza pero que pueden ser obtenidas a través de herramientas como ingeniería dirigida de proteínas o biología sintética, reacciones *de novo*. Este tipo de reacciones pueden a su vez ser evaluadas con base en consideraciones termodinámicas y enzimáticas [9]. Los análisis termodinámicos principalmente incluyen análisis de factibilidad a partir de energías libres de Gibbs, direccionalidad de las reacciones mediante modificación de concentración de sustratos y/o productos o modificación de propiedades de transporte a nivel transmembranal [9]. Finalmente, la estrategia dirigida de la ingeniería metabólica permite dilucidar posibles modificaciones genéticas o regulaciones que existan en los diferentes niveles del funcionamiento celular.

2.7 Transporte extracelular de electrones (EET)

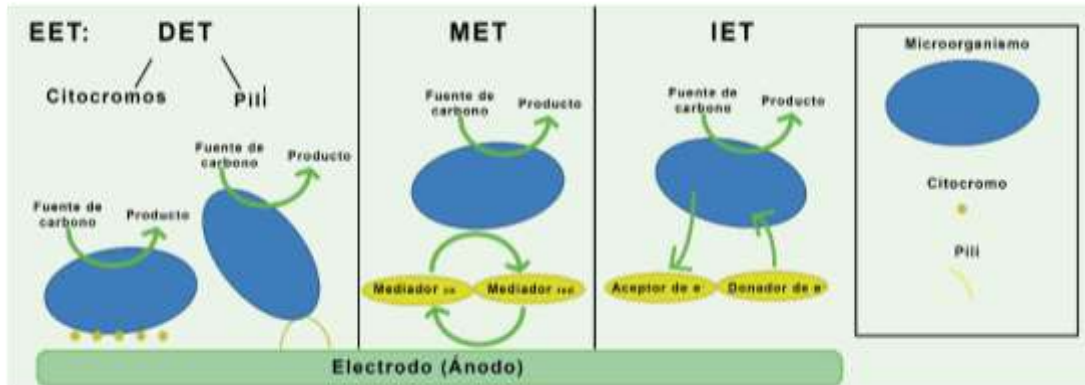
El flujo de electrones es natural en el metabolismo celular. En general, los microorganismos transfieren electrones desde un donador de electrones (con un potencial de reducción bajo) a un aceptor de electrones (con un potencial de reducción mucho más alto que el donador) [18]. Este aceptor de electrones puede ser externo, lo cual se define comúnmente como “respiración celular”, o interno, lo que se denominaría una “fermentación” [19].

En muchos casos, los aceptores de electrones solubles que interactúan en la respiración celular se acaban rápidamente (e.g O_2 en la cadena transportadora de electrones), para lo cual los microorganismos tienen la posibilidad de utilizar productos de fermentación como aceptores finales de electrones o en última opción aceptores insolubles. En este caso, los microorganismos tienen que transportar los electrones al exterior de la célula para lograr la reducción del aceptor insoluble, el cual es incapaz de ingresar al espacio intermembranal. A este proceso se le denomina transporte extracelular de electrones (*EET*). Su definición incluye el proceso en reversa, en el cual los microorganismos obtienen electrones a partir de donadores solubles, sin embargo, los electrones pueden también ingresar a la célula desde un donador de electrones insoluble [19], requiriendo su transporte desde el espacio extracelular a la membrana celular o el citoplasma. Este proceso se da naturalmente en muchos microorganismos denominados **microorganismos electroactivos** [20].

2.8 Tipos de transporte extracelular de electrones

El transporte extracelular de electrones juega un rol importante en la interacción del microorganismo con el electrodo [21]. Para explicar estas interacciones se han propuesto tres mecanismos diferentes: transporte directo de electrones (*DET*), transporte facilitado de electrones (*MET*) y transporte indirecto de electrones (*IET*) (**Figura 2-3**) [22].

Figura 2-3. Mecanismos de transporte extracelular de electrones. **DET:** Transporte directo de electrones. **MET:** Transporte mediado de electrones. **IET:** Transporte indirecto de electrones.



Adaptado de: [23]

En el *DET* participan una serie de proteínas de membrana, principalmente citocromos tipo c, que guían el transporte de electrones a través de la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana celular, facilitando su intercambio directo con el electrodo [22].

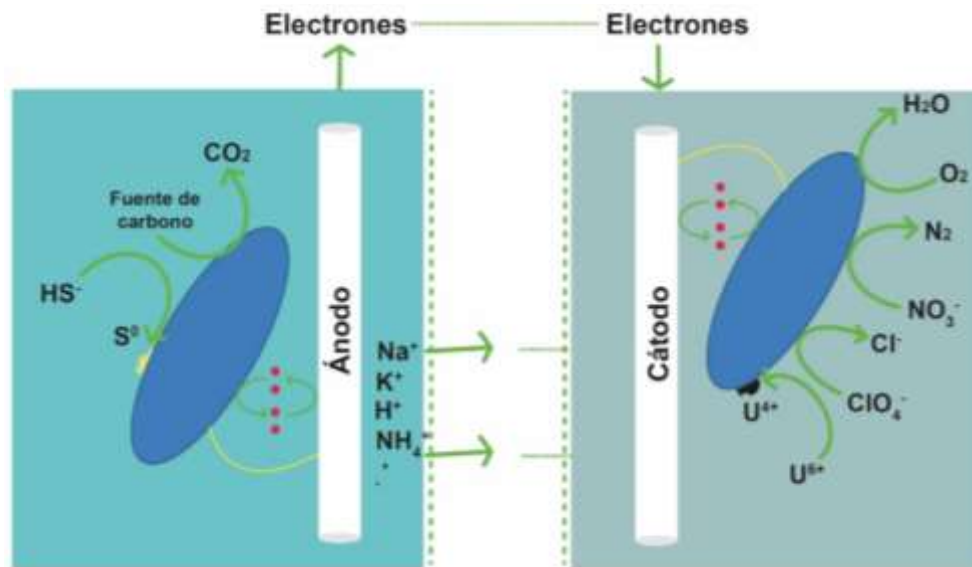
El uso de una molécula mediadora, soluble e inerte, capaz de servir como un aceptor/donador de electrones es el principio del transporte facilitado de electrones (*MET*). Algunos microorganismos secretan sustancias que naturalmente cumplen con estas características, como las flavinas producidas por *S. oneidensis* [24]. Otros, tienen la capacidad de utilizar mediadores artificiales agregados en el medio. En este caso el mediador no se consume en el tiempo, por lo que bajo la interacción con el electrodo, se podría considerar como un aceptor/donador de electrones ilimitado [25]. Sin embargo, cuando la molécula mediadora es producida por el mismo microorganismo, pero ésta sufre un proceso irreversible al interactuar con el electrodo, se considera como otra forma de transporte: el transporte indirecto de electrones. Su definición se extiende al

transporte facilitado por la síntesis de sustancias que individualmente sirven como aceptores o donadores de electrones, pero no ambas, en la cual esta molécula atraviesa un proceso de oxidación/reducción irreversible [21].

2.9 Sistemas bioelectroquímicos (BES)

Un sistema bioelectroquímico se caracteriza por utilizar electrodos como aceptores o donadores de electrones en el metabolismo celular [23], [26]. Dependiendo de la dirección del flujo de electrones, pueden ser clasificados en sistemas anódicos o catódicos (**Figura 2-4**). En los sistemas anódicos, como su nombre lo indica, el electrodo es un ánodo capaz de recibir electrones, con el cual se busca utilizarlo comoceptor final de electrones en el metabolismo celular, facilitando la oxidación de compuestos orgánicos y generando una corriente eléctrica útil [27], [28]. Por el contrario, en los sistemas catódicos, el electrodo actúa como cátodo, es decir, donador de electrones, los cuales puede utilizar la célula para la fabricación de macromoléculas o reducción de compuestos [29].

Figura 2-4. Esquema general de un sistema bioelectroquímico.



Adaptado de: [18]

Los sistemas bioelectroquímicos pueden ser clasificados según su ámbito de aplicación [30] (**Tabla 2-1**). Si lo que se busca es la generación de energía, o también conocida como electro génesis, se denomina celda de combustible microbiana o MFC [31] por sus siglas en inglés. Los *BESs* pueden ser utilizados también para electrólisis de compuestos, como la producción de H_2 a partir de H_2O en sistemas denominados celdas de electrólisis microbiana (*MEC*) [32]. Por otro lado, pueden ser utilizados para la síntesis de compuestos orgánicos utilizando CO_2 como fuente de carbono y electrones provenientes del electrodo en procesos similares a la electro síntesis utilizando sistemas de electro síntesis microbiana (*MES*) [33]. El común en estos procesos es que los electrones asociados con el electrodo de trabajo son el producto principal de la fermentación (es decir, se busca la generación de corriente eléctrica útil) o son la fuente principal de electrones del bioproceso para la formación de biomoléculas.

En los últimos años, un nuevo tipo de sistema bioelectroquímico ha sido foco de estudio: la electro-fermentación (*EF*). Este sistema puede definirse de forma simple como una fermentación realizada en la presencia de electrodos polarizados. La diferencia principal de las *EFs* con los otros sistemas se basa en que la corriente relacionada al proceso no es el producto de interés ni la principal fuente de energía y electrones.

Las *EFs* se clasifican principalmente en dos tipos dependiendo de la función del electrodo. En la electro-fermentación anódica estos electrodos se utilizan como una fuente suplementaria de aceptores de electrones para ayudar a la célula a disipar el exceso de electrones producto de la fermentación [34]. Por otro lado, la electro-fermentación catódica utiliza los electrodos como una fuente adicional de electrones para compensar la producción de metabolitos más reducidos que el sustrato [35].

Tabla 2-1. Clasificación de los sistemas bioelectroquímicos según su aplicación y tipo de electrodo.

Aplicación	Nombre	Abreviación	Descripción	Tipos de electrodos utilizados
Electro génesis	Celda de combustible microbiana	MFC	Producción de corriente eléctrica útil	Ánodo
Electrólisis	Celda de electrolisis microbiana	MEC	Producción de Hidrógeno.	Ánodo y cátodo
Electro síntesis	Sistemas de electro síntesis microbiana	MES	Producción de moléculas orgánicas	Cátodo

2.10 Fermentaciones con sistemas bioelectroquímicos: La electro-fermentación como estrategia para mejorar rendimientos en bioprocesos.

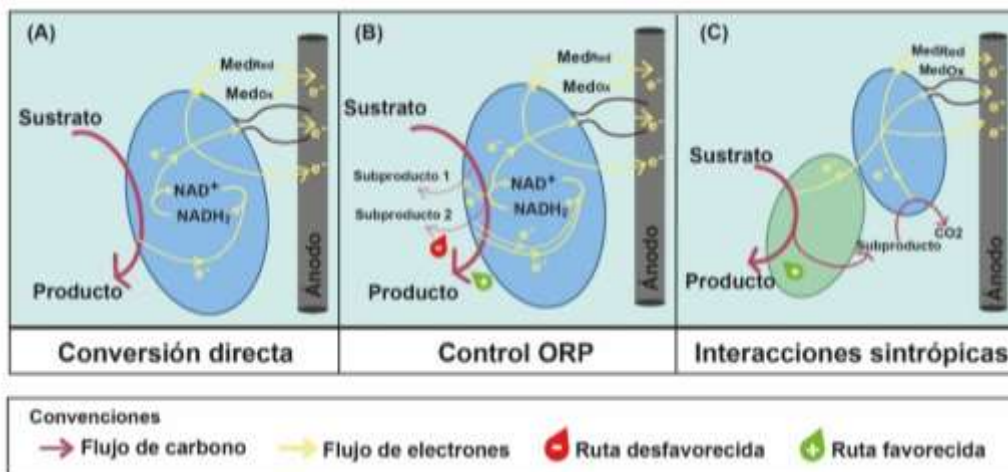
En estos sistemas se busca provocar diferentes cambios metabólicos que permitan a la fermentación realizarse bajo condiciones desbalanceadas y mejorar los rendimientos de producción [36]. En la **Figura 2-5** se describen posibles formas de conversión de sustrato por parte de los microorganismos al interactuar con electrodos y su aplicación en los bioprocesos. Inicialmente, se puede plantear la conversión de un producto que bajo condiciones basales (es decir, sin aplicación de ningún tipo de voltaje o corriente), no es posible su producción debido a desbalances en la producción de NADH o NAD⁺.

En los sistemas de electro-fermentación se puede fijar el voltaje o corriente deseada según el sistema aplicado para controlar el circuito eléctrico. Los sistemas tipo Potenciostato, utilizan un sistema de control que permite mantener constante el potencial (voltaje) del electrodo de trabajo con respecto a un electrodo de referencia al modificar la corriente en un electrodo auxiliar. Por el contrario, en un sistema tipo Galvanostato, se mantiene constante la corriente entre el electrodo de trabajo y auxiliar, al modificar el

potencial al cual se encuentra polarizado el electrodo con respecto al electrodo de referencia [37][38].

Con la introducción de un electrodo al sistema que permita la transferencia de electrones desde o hacia la célula, se balancea la producción de estas moléculas, permitiendo la producción de la molécula de interés (**Figura 2-5(A)**). No obstante, es posible que estos cambios en la producción de NADH o NAD⁺, permitan redireccionar el flujo de electrones hacia un producto de interés (**Figura 2-5.(B)**) Además, el uso de un electrodo puede generar cambios sutiles en el potencial de óxido reducción del medio (*ORP*) los cuales desencadenan cambios en el estado redox de la célula (*ORP* intracelular), generando cambios en la relación NAD⁺/NADH, de la cual se tiene evidencia que controla diferentes redes metabólicas y la regulación en la expresión de varios genes [39], permitiendo generar un control metabólico mediado por el *ORP* del sistema. Finalmente, las electro-fermentaciones pueden generar interacciones sintrópicas entre microorganismos, en donde debido a las diferentes interacciones de un cultivo mixto, puede verse favorecida la producción de un producto en específico (**Figura 2-5.(C)**).

Figura 2-5. Aplicaciones de la electro-fermentación en los bioprocesos. **A)** Conversión directa de un sustrato a un producto determinado. **B)** Control de la producción de subproductos mediante el control de *ORP* en el cultivo. **C)** Interacciones sintrópicas.



Adaptado de: [4]

Diferentes estudios han demostrado la eficiencia de las electro-fermentaciones para el mejoramiento en los rendimientos de producción. *Clostridium pasteurianum* mostró un aumento de casi tres veces en el rendimiento de butanol y disminución de la producción de butirato al utilizar una electro-fermentación anódica con un potencial en el electrodo de 0.045 V [34]. Este mismo estudio con *Clostridium pasteurianum* determinó un incremento en los rendimientos de 1,3-Propanediol del orden de dos veces mayor al control.

Otros procesos de interés han sido analizados bajo esta estrategia, por ejemplo, la producción de ácido propiónico por *Propionibacterium spp.* mostró una disminución de subproductos y un aumento en los rendimientos al utilizar un mediador de sepulcrato de cobalto y un electrodo trabajando con -0,47 V [40]. Con base en lo anterior, la electro-fermentación se visualiza como un campo de investigación novedoso para la mejora de bioprocesos y el uso de nuevos sustratos y biocatalizadores [41].

Las anteriores experiencias han demostrado el potencial de usar la electro-fermentación como una estrategia para el reacomodamiento del metabolismo celular, sin embargo, aún no está ampliamente entendido cómo se llevan a cabo estos cambios en el metabolismo, ni existe una amplia teoría que permita explicar exactamente lo que ocurre tanto al interior celular como en el exterior. Entender de una manera racional cuáles son los reales efectos de la electro-fermentación en el metabolismo, se convierte en un campo de investigación aún no explorado totalmente. Una de las principales tareas para lograr su entendimiento puede abordarse mediante la incorporación de los sistemas transportadores de electrones dentro de los modelos metabólicos de escala genómica. Esto último es una parte central a la realización de la presente tesis.

2.11 Cálculos asociados a los procesos bioelectroquímicos.

2.11.1 Costos energéticos

Los microorganismos extraen energía química contenida en los compuestos que metabolizan. Esta energía asociada a cada molécula donadora de electrones viene determinada por la cantidad de electrones que pueda transferir. La relación entre energía libre de Gibbs y el número de electrones a transferir está dada por la ecuación de *Nerst* **(2-22)** [42], la cual puede ser aplicada para estimar la energía libre de Gibbs de semirreacciones o conjuntos de reacciones redox. Además, cabe resaltar que esta ecuación se utiliza ampliamente en los cálculos relacionados con la cadena transportadora de electrones.

$$\Delta G^\circ = -z f(E^\circ) \quad \text{(2-22)}$$

En donde ΔG° es la energía libre de Gibbs de reducción de la molécula analizada, z es el número de electrones transferidos por reacción, f es la constante de Faraday, equivalente a $96485.33 \frac{\text{coulomb}}{\text{mol electrones}}$ o $\frac{J}{V-\text{mol } e}$ y E° es el potencial estándar de reducción de la molécula.

2.11.2 Eficiencia Coulómbica

La eficiencia coulómbica es un parámetro que define la fracción de energía eléctrica generada con respecto a la energía contenida en los sustratos. Este parámetro puede ser calculado según la ecuación **(2-23)** [43] y se utiliza ampliamente en sistemas de celdas microbianas para determinar su eficiencia en la generación de energía útil.

$$CE = \frac{CO}{CI} \times 100 \% \quad (2-23)$$

En donde CO es la salida coulombica total del sistema, obtenida al integrar la corriente sobre el tiempo, CI es la salida coulombica teórica, calculada con la ecuación (2-24)

$$CI = f \cdot \gamma_S \cdot V \cdot [S] \quad (2-24)$$

En donde f es la constante de Faraday, γ_S , es el grado de reducción del sustrato, V el volumen del reactor y $[S]$ la concentración inicial de sustrato.

2.11.3 Eficiencia de Electro-fermentación

La definición de la eficiencia de electro-fermentación η_{EF} propuesta por Moscoviz y colaboradores [4] se describe en la ecuación (2-25). Este es un parámetro que da cuenta de la relación entre la energía eléctrica requerida o generada en comparación con los productos sintetizados. Para una electro-fermentación Moscoviz y colaboradores definen que este parámetro se debe mantener entre 0 y 1, bajo la premisa de que la corriente relacionada al proceso no es el producto de interés ni la principal fuente de energía y electrones, por lo cual Q_p siempre debe ser mayor o igual a Q_e^- .

$$\eta_{EF} = \frac{Q_e^-}{Q_p} \quad (2-25)$$

En donde Q_{e-} es la carga total transferida desde o hacia el sistema y Q_p es el equivalente a la carga total en el producto (definida de forma análoga a la ecuación (2-24)).

2.12 Aplicaciones de la metodología del diseño racional de bioprocesos.

Como se evidencia en la **Tabla 2-2**, se ha implementado la estrategia del diseño racional de bioprocesos en diferentes escenarios. En primera instancia se utilizó para estudiar el glicerol como sustrato en la producción de metabolitos con alto valor agregado. En un primer acercamiento se planteó la bioconversión de glicerol a ácido 3-indolacético (AIA) usando como microorganismo chasis *Azospirillum brasilense*. Los resultados de este estudio indican que, aunque es un proceso viable termodinámicamente, existen déficits relacionados con la energía biológicamente disponible (ATP) y la liberación de los electrones contenidos en el sustrato que impiden alcanzar los rendimientos deseados bajo el ideal termodinámico [1].

Se ha evaluado también la posibilidad de utilizar un cultivo mixto para la valorización del glicerol mediante bioconversión a ácido propiónico bajo la misma metodología (**Tabla 2-2**). En este diseño se encontró que gran parte de los electrones y el carbono se estaban desviando hacia la producción de metano, reduciendo los rendimientos de ácido propiónico; debido a la tendencia de los sistemas celulares para obtener la mayor cantidad de energía posible de un sustrato [2].

Tabla 2-2. Diseño racional de bioprocesos aplicado al diseño de nuevos bioprocesos de interés para Colombia.

Sustrato	Producto	Microorganismo	Resultados principales
Glicerol	Ácido 3-indolacético (IAA)	<i>Azospirillum brasilense</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso termodinámicamente viable. • Déficit de energía biológica útil (ATP) • Problemas con la liberación del exceso de electrones
Glicerol	Ácido Propiónico	Cultivo Mixto	<ul style="list-style-type: none"> • El Flujo de carbonos y electrones se estaba redirigiendo a subproductos.
SynGas	Etileno	<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso con requerimiento energéticos altos. • Se pueden diseñar sistemas con fuentes de carbonos y electrones desligadas.

Fuente: Elaboración propia.

En otro estudio se planteó el diseño de una plataforma biosintética capaz de convertir el biogás en etileno a través de un microorganismo chasis con la implementación de la ruta *Wood-Ljungdahl* para la fijación de CO₂ y la adición de la enzima formadora de etileno (**Tabla 2-2**). Sin embargo, resultó ser un proceso energéticamente muy costoso para la célula por lo cual es necesario encontrar la expresión de diferentes complejos bioquímicos que le permitan capturar electrones de otras fuentes y convertirlos en energía biológicamente disponible, por ejemplo, mediante la reducción del CO₂ [3]. Lo anterior plantea la posibilidad de buscar fuentes de energía alternativas que las células

puedan transformar en energía biológicamente disponible y así disminuir los subproductos, aumentando las titulaciones de los productos de interés. [3].

Entendiendo las experiencias anteriores, es en donde la electro-fermentación toma lugar. Esta es una ingeniosa técnica que está empezando a ser utilizada para direccionar el desempeño de los sistemas metabólicos toda vez que permite una redistribución de electrones a través de las redes metabólicas al utilizar un electrodo que puede servir de ánodo para disipar el exceso de electrones o como un cátodo como fuente de electrones [4]. Además, su posible acople a sistemas de producción de ATP, presentan una opción para mejorar la cantidad de energía biológicamente disponible. Una correcta redistribución de los flujos metabólicos permitiría disminuir los subproductos y aumentar el rendimiento de los productos de interés [44].

3. Metodología

3.1 Conceptualización y estimación del término adicional de la relación de Herbert- Pirt para cuantificar la energía libre de Gibbs en una electro-fermentación y la posterior estequiometría del proceso.

A continuación, se plantean las concepciones teóricas básicas relacionadas con la cuantificación de los requerimientos energéticos asociados a los sistemas de electro-fermentación y su inclusión en la metodología base del diseño racional de bioprocesos.

La premisa principal de la teoría se basa en la **estimación de la energía libre de Gibbs relacionada con la transferencia de electrones desde o hacia el electrodo** para incluirla en la estimación de la energía catabólica disponible ΔG°_{cat} (Ecuación **(2-4)**)

Para esto, se calcularon los flujos netos de electrones de la red tanto en las reacciones de consumo como de producción y se determinó el desbalance de electrones. Se tuvo en cuenta la producción neta de NADH, incluidos los NADH producidos en la electro-fermentación y su acople a los sistemas generadores de ATP en la red metabólica. De esta manera se pudo calcular la demanda extra de electrones y su posterior equivalente de energía libre de Gibbs, la cual se traduce en un flux de electrones como $\mu\text{mol e}^{-}/\text{gDW-h}$.

Este análisis permitió estimar la cantidad de sustrato (donador de electrones) y/o la cantidad de corriente eléctrica requeridos para balancear los flujos electrónicos y determinar los respectivos coeficientes estequiométricos que definen las especificaciones propias del bioproceso a través del modelo de caja negra.

3.1.1 Condiciones básicas y suposiciones

- I. Estado estacionario.
- II. Condiciones anaerobias.
- III. Los valores de la energía libre de Gibbs son en condiciones biológicas estándar (concentración de 1 M para todos los productos y reactivos, pH 7.0, temperatura de 25°C y 1 atm de presión). No se tienen en cuenta cambios debido a concentraciones fuera de las condiciones estándar ni biológicas. Su efecto se toma en cuenta en el análisis de sensibilidad.
- IV. Los valores de energía libre de Gibbs por electrón transferido $\left(\frac{kJ}{mol e}\right)$ no varían entre compartimentos. No hay electrones transferidos que contengan más energía que otros ni se afecta por posibles gradientes redox.
- V. El modelo aplica para un sistema de potencióstato-galvanostato de 3 electrodos, en el cual se puede mantener constante el voltaje del electrodo de trabajo independiente del contraelectrodo. El electrodo de trabajo es inerte, es decir, se utiliza únicamente como fuente o sumidero de electrones y no de iones metálicos, por lo que no se ve afectado por cambios en el estado de la materia ni por la concentración de los iones en la solución. Como el electrodo únicamente transfiere electrones, existe un estado transitorio excitado en donde su carga equivale a -1 (dispone de electrones para donar) y +0 (sin electrones disponibles y con un nivel energético menor). Esto permite trabajar el electrodo en dos

estados hipotéticos independientes, correspondientes a un excitado y fundamental, con cargas -1 y 0, respectivamente.

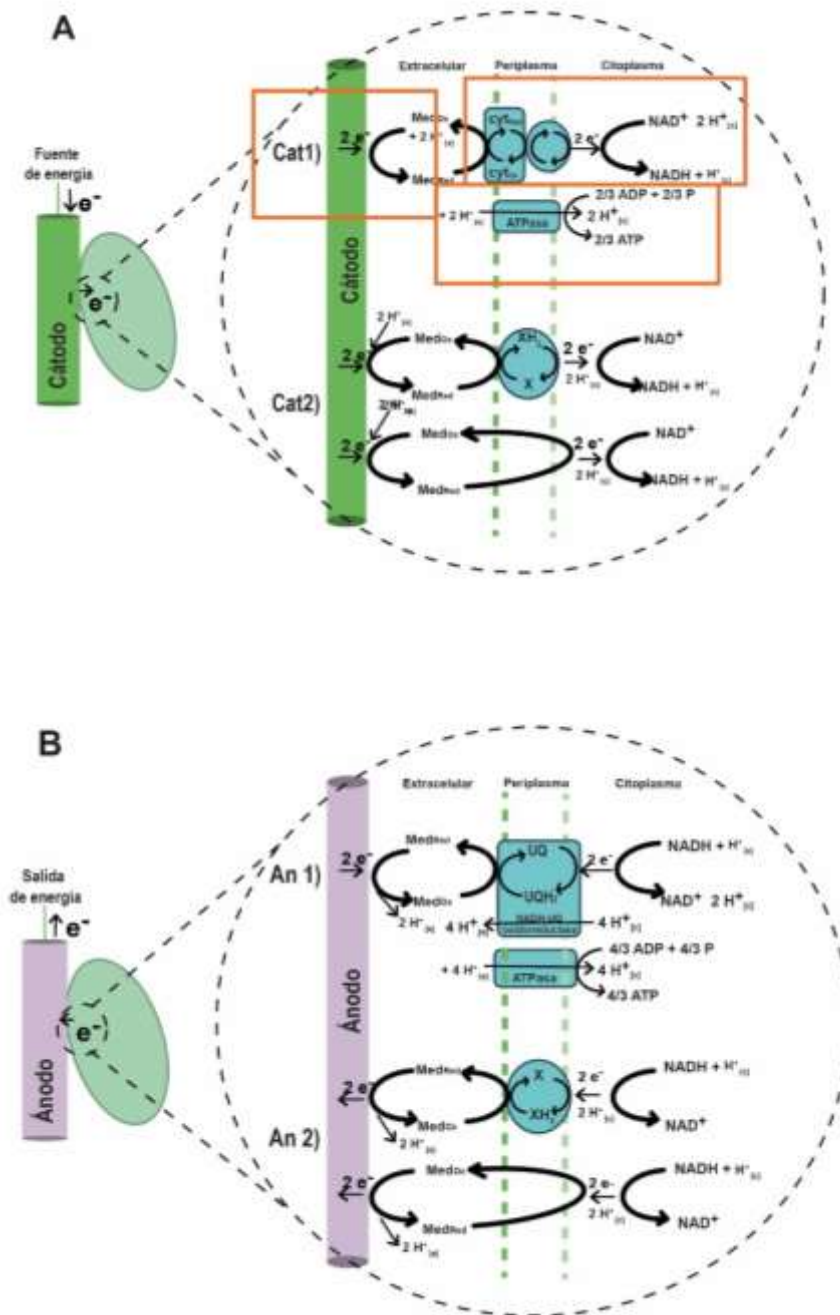
- VI. Todos los voltajes y potenciales de reducción utilizan como referencia el potencial estándar de reducción del electrodo de hidrógeno.

3.1.2 Consideraciones energéticas asociadas al proceso de transferencia de electrones

Transporte mediado de electrones

Según la **Figura 3-1** en el **transporte mediado de electrones (MET)**, se propuso dividir el proceso en 3 interacciones principales. En primera instancia, se planteó la interacción electrodo – mediador, en donde se da la transferencia de electrones entre el electrodo de trabajo (ya sea ánodo o cátodo) y la molécula mediadora. A continuación, la molécula mediadora tiene que ceder o recibir electrones a una molécula interna (denominada de forma genérica como el aceptor/receptor interno de electrones). Todo esto a través de diferentes cadenas transportadoras de electrones presentes en la membrana celular. Finalmente, se tiene la posibilidad de que este transporte de electrones a través de cadenas transportadoras y proteínas de membrana, pueda generar o consumir energía biológicamente útil (ATP) [27], [45], [46], convirtiéndose en la tercera posible interacción.

Figura 3-1. Interacciones en el transporte mediado de electrones. **A)** Posibles reacciones relacionadas al transporte extracelular de electrones en una electro-fermentación catódica. **B)** Posibles reacciones relacionadas al transporte extracelular de electrones en una electro-fermentación Anódica.



Adaptado de: [44]

Para la **interacción electrodo – mediador** se planteó la reacción de reducción para el electrodo (Ec **(3-1)**).

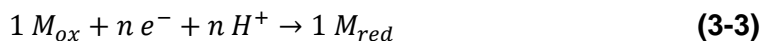


En donde Elec^* corresponde al electrodo en un estado excitado, el cual dispone de electrones para transferirse, gozando de mayor energía disponible con base a su estado elemental Elect (Revisar numeral V de la sección 3.1.1). Para esta semirreacción, según la ecuación de *Nerst* **(2-22)** y teniendo en cuenta el voltaje al cual se encuentre polarizado el electrodo en el sistema potenciostato-galvanostato, se puede definir su energía libre de Gibbs de reducción de la siguiente forma:

$$\Delta G^{\circ}_{\text{electrodo}} = -1 f (V_{\text{electrodo}}) \left[\frac{\text{kJ}}{\text{mol electrodo redox}} \right] \quad (3-2)$$

En donde $V_{\text{electrodo}}$ es el voltaje al cual se encuentra polarizado el electrodo con respecto al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) en el sistema galvanostato o potenciostato (si en condiciones experimentales se utiliza un electrodo de referencia diferente a SHE, se debe hacer su correspondiente corrección para reportarlo bajo el marco de referencia planteado y evitar incongruencias con respecto a los potenciales estándar de reducción de las demás moléculas relacionadas), $\Delta G^{\circ}_{\text{electrodo}}$ es la energía libre de Gibbs de reducción para la semirreacción y f la constante de Faraday.

De igual forma, para el mediador se planteó la siguiente semirreacción:



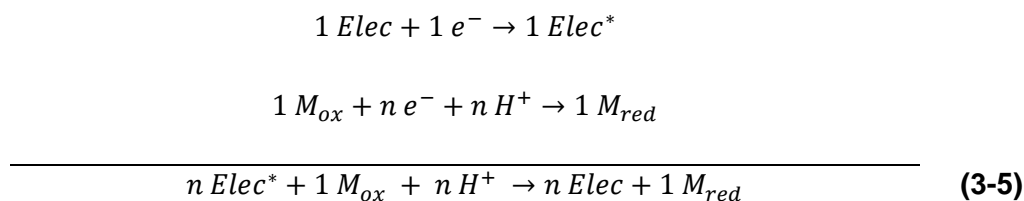
En donde M_{ox} y M_{red} es el mediador en su estado oxidado y reducido, respectivamente y n es el número de electrones que es capaz de recibir una molécula de mediador cuando se encuentra en su estado oxidado. Según la ecuación de *Nerst* (2-22), su energía libre de Gibbs de reducción se define a continuación:

$$\Delta G^{\circ}_{mediador} = -n f (E^{\circ}_{Mediador}) \left[\frac{kJ}{mol\ mediador} \right] \quad (3-4)$$

En donde $E^{\circ}_{Mediador}$ es el potencial estándar de reducción de la molécula mediadora, $\Delta G^{\circ}_{mediador}$ es la energía libre de Gibbs de reducción para la semirreacción y f la constante de Faraday.

Teniendo en cuenta que la electro-fermentación puede ser **anódica** o **catódica** la reacción global de estas dos semirreacciones puede variar.

En el caso de una electro-fermentación **catódica** (el electrodo actúa como donador de electrones), la reacción global para esta interacción se definió de la siguiente forma:



Para la reacción (3-5), su energía libre de Gibbs de reacción (ΔG°_{E-M}), se puede calcular teniendo en cuenta los aportes individuales de cada una de sus semirreacciones, así:

$$\Delta G^{\circ}_{E-M} = n (-\Delta G^{\circ}_{electrodo}) + \Delta G^{\circ}_{mediador} \left[\frac{kJ}{mol\ mediador} \right] \quad (3-6)$$

Como las energías libres de Gibbs para las semirreacciones en las ecuaciones **(3-2)** y **(3-4)** son para la reacción de reducción, se requiere trabajar con el negativo del valor calculado para la molécula que se oxida, en este caso, el electrodo. Siguiendo este orden de ideas, la ecuación que define la energía libre de Gibbs para la interacción electrodo – mediador en una electro-fermentación catódica se encuentra definida por:

$$\Delta G^{\circ}_{E-M} = -n f (E^{\circ}_{mediador} - V_{electrodo}) \left[\frac{kJ}{mol\ mediador} \right] \quad (3-7)$$

Según esta definición, para que este caso de interacción ocurra de forma espontánea, es importante que $E^{\circ}_{mediador} > V_{electrodo}$. Esta afirmación concuerda con la teoría de la cadena transportadora de electrones, en donde el flujo normal de electrones va de moléculas de bajo potencial de reducción (donan fácilmente sus electrones) a moléculas de alto potencial de reducción (reciben fácilmente electrones), como el caso de la transferencia de electrones del NADH ($-0.32\ V$) al oxígeno molecular ($+0.820\ V$) [47].

Es importante recalcar el símil entre la ecuación **(3-7)** con la ecuación general para un potencial de celda electroquímica [42] **(3-8)**, en donde, se respeta el orden entre los potenciales de reducción. Esta similitud puede dar pie a evaluar la energía relacionada con estas interacciones como la energía libre de Gibbs de un potencial de celda

$$\Delta G^{\circ} = -n f (E^{\circ}_{molecula\ reducida} - E^{\circ}_{molecula\ oxidada}) \quad (3-8)$$

Realizando el mismo análisis para una electro-fermentación **anódica** (el electrodo actúa como receptor de electrones), la energía libre de Gibbs para esta interacción está dada por la ecuación **(3-9)**

$$\Delta G^{\circ}_{E-M} = -n f (V_{electrodo} - E^{\circ}_{mediador}) \left[\frac{kJ}{mol\ mediador} \right] \quad (3-9)$$

Para la **interacción mediador – aceptor/receptor interno de electrones** sin importar si es una electro-fermentación catódica o anódica (**Figura 3-1.A y Figura 3-1.B, respectivamente**) se puede plantear la siguiente semirreacción de reducción para el aceptor interno de electrones:

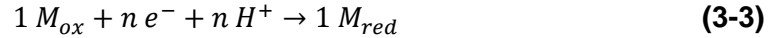


En donde AIE_{ox} y AIE_{red} son la forma oxidada y reducida del aceptor interno de electrones, respectivamente, y x es el número de electrones que puede intercambiar, por lo cual, la ecuación que describe la energía libre de Gibbs de reducción para esta semirreacción es:

$$\Delta G^{\circ}_{IEA} = -x f (E^{\circ}_{AIE}) \left[\frac{kJ}{molAIE} \right] \quad (3-11)$$

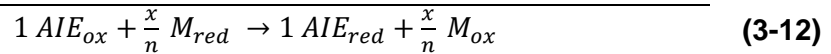
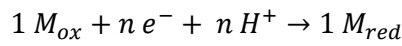
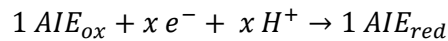
En donde ΔG°_{AIE} es la energía libre de Gibbs de reducción para el aceptor interno de electrones, x es el número de electrones que puede aceptar y E°_{AIE} su potencial estándar de reducción.

En esta interacción, la semirreacción y su correspondiente energía libre de Gibbs de reducción para el mediador es la misma descrita anteriormente en las ecuaciones (3-3) y (3-4)



$$\Delta G^{\circ}_{mediador} = -n f (E^{\circ}_{mediador}) \left[\frac{kJ}{mol\ mediador} \right] \quad (3-4)$$

Continuando con el caso de una electro-fermentación **catódica**, la reacción global para esta interacción estaría definida por la siguiente estequiometría:



La energía libre de Gibbs de reacción para la ecuación (3-12) se define bajo el mismo análisis realizado para la interacción mediador – electrodo en la ecuación (3-6), obteniendo:

$$\Delta G^{\circ}_{AIE-mediador} = \frac{x}{n} (-\Delta G^{\circ}_{mediador}) + \Delta G^{\circ}_{AIE}$$

$$\Delta G^{\circ}_{AIE-mediador} = -x f (E^{\circ}_{AIE} - E^{\circ}_{mediador}) \left[\frac{kJ}{molAIE} \right] \quad (3-13)$$

Como en la **interacción mediador – aceptor/receptor interno de electrones (Figura 3-1)** puede haber producción de ATP [44], la ecuación (3-13) puede modificarse para dar cuenta de la producción de ATP y su efecto en la energía biológicamente disponible para la célula, dando lugar a la ecuación (3-14).

$$\Delta G_{AIE-Mediador}^{o\text{corregido}} = -x f (E^{\circ}_{AIE} - E^{\circ}_{mediador}) + y \Delta G^{\circ}_{ATP} \left[\frac{kJ}{molAIE} \right] \quad (3-14)$$

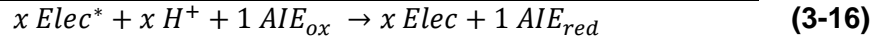
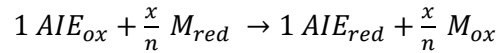
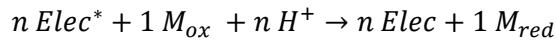
En este caso y es la relación de producción/consumo de ATP por mol del aceptor interno de electrones (e.g. 3 ATP formados por mol de NADH en la cadena transportadora de electrones). ΔG°_{ATP} es la energía libre de Gibbs de formación o hidrólisis por molécula de ATP. Por notación, si en la reacción de transferencia extracelular de electrones se presenta producción o consumo de *ATP*, y toma signo positivo o negativo, respectivamente.

De forma análoga, para la **interacción mediador – aceptor/receptor interno de electrones** en una electro-fermentación **anódica**, la ecuación que representa la energía libre de Gibbs se describe en la ecuación

$$\Delta G_{AIE-Mediador}^{o\text{corregido}} = -x f (E^{\circ}_{mediador} - E^{\circ}_{AIE}) + y \Delta G^{\circ}_{ATP} \left[\frac{kJ}{molAIE} \right] \quad (3-15)$$

Al igual que en la interacción electrodo – mediador, se debe tener cuidado con la selección de las moléculas mediadoras y el aceptor interno de electrones, para lograr que en ambos casos (electro-fermentación catódica o anódica) la reacción sea espontánea.

Para obtener la reacción del proceso completo, se realiza la suma de cada una de las interacciones. Así, para el proceso completo de electro-fermentación **catódica**, se obtiene lo siguiente:



Desarrollando la fórmula para su energía libre de Gibbs de reacción (ΔG°_{AIE-V}) se obtiene:

$$\Delta G^\circ = \frac{x}{n} (\Delta G^\circ_{mediador-electrodo}) + \Delta G^\circ_{AIE-mediador}$$

$$\Delta G^\circ = \frac{x}{n} [-n f (E^\circ_{mediador} - V_{electrodo})] + [(-x f (E^\circ_{AIE} - E^\circ_{mediador}) + y \Delta G^\circ_{ATP})]$$

$$\Delta G^\circ = -x f (E_{AIE} - E^\circ_{mediador} + E^\circ_{mediador} - V_{electrodo}) + y \Delta G^\circ_{ATP}$$

$$\Delta G^\circ_{AIE-V} = -x f (E^\circ_{AIE} - V_{electrodo}) + y \Delta G^\circ_{ATP} \left[\frac{kJ}{molAIE} \right] \quad (3-17)$$

Realizando este mismo análisis para la **reacción global** en una electro-fermentación **anódica**, se obtiene:



$$\Delta G^\circ_{AIE-V} = -x f (V_{electrodo} - E^\circ_{AIE}) + y \Delta G^\circ_{ATP} \left[\frac{kJ}{molAIE} \right] \quad (3-19)$$

Cabe resaltar que en ambos casos la energía libre de Gibbs de la reacción global no depende de la molécula mediadora, sin embargo, es importante tenerla en cuenta en el

momento del diseño, pues de ser posible, ambas interacciones debiesen ser espontáneas por sí solas para evitar cuellos de botella.

Transporte directo de electrones

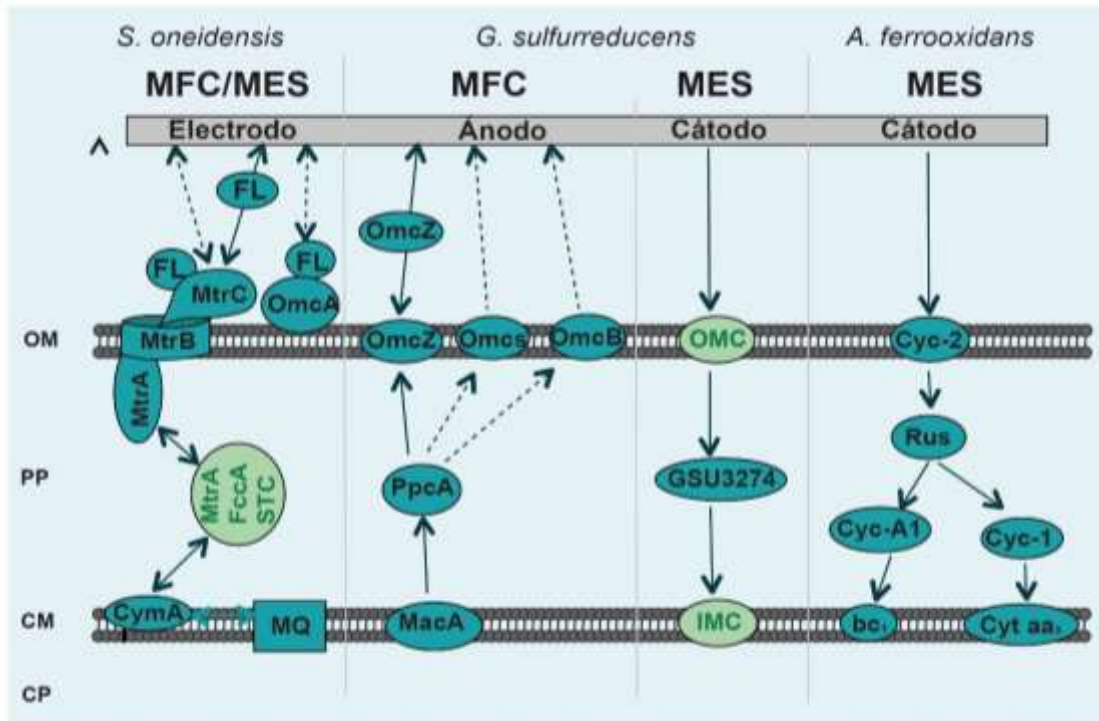
En la **Figura 3-2** se muestran las interacciones más importantes en el transporte directo de electrones. Si bien este tipo de transferencia se da gracias a una cadena de transporte de electrones a través de proteínas de membrana (específicas para cada microorganismo) y pilus (en algunos casos) [21], se planteó simplificar este fenómeno, teniendo en cuenta únicamente la reacción global. En este orden de ideas, las ecuaciones **(3-16)**, **(3-17)** y **(3-19)** desarrolladas para el transporte mediado de electrones, describen de igual forma la estequiometría y los consumos energéticos asociados al proceso del transporte directo de electrones.



$$\text{EF-catódica} \quad \Delta G^{\circ}_{AIE-V} = -x f (E^{\circ}_{AIE} - V_{electrodo}) + y \Delta G^{\circ}_{ATP} \left[\frac{kJ}{molAIE} \right] \quad (3-17)$$

$$\text{EF-anódica} \quad \Delta G^{\circ}_{AIE-V} = -x f (V_{electrodo} - E^{\circ}_{AIE}) + y \Delta G^{\circ}_{ATP} \left[\frac{kJ}{molAIE} \right] \quad (3-19)$$

Figura 3-2. Esquema del transporte directo de electrones para los microorganismos más estudiados.



Adaptado de: [21]

Teniendo en cuenta las ecuaciones (3-17) y (3-19) que definen los costos energéticos relacionados al proceso de transferencia extracelular de electrones, se es necesario plantear una metodología para su inclusión en el diseño racional de bioprocesos, lo cual es pieza clave en el desarrollo de este trabajo.

3.1.3 Definición de la estequiometría del proceso de electro-fermentación.

A partir de la reacción base catabólica planteada en la reacción (2-2), se planteó una nueva estequiometría teniendo en cuenta el cambio metabólico producido por la electro-fermentación y las nuevas moléculas que intervienen en el proceso catabólico. En este caso, a nivel extracelular, se planteó la inclusión de la forma reducida y oxidada del electrodo en la estequiometría de la reacción catabólica para dar cuenta de los electrones transferidos al microorganismo. Además, se propuso la síntesis de dos productos P_1 y P_2 , los cuales son objeto del cambio metabólico y su coeficiente varía dependiendo de los electrones ingresados al sistema.

Teniendo en cuenta que las reacciones se pueden balancear a partir de balances elementales, la inclusión de estos compuestos y coeficientes generó un sistema indeterminado, por lo cual, se plantearon una serie de suposiciones y ecuaciones que permiten su solución y la definición de la estequiometría del proceso catabólico.

3.1.4 Inclusión del costo energético en los cálculos termodinámicos.

Según la ecuación (2-3), el término $\Delta G_{reacción}^{ocatabólico}$ se calcula con base en las energías libres de Gibbs de formación de los compuestos presentes en la reacción (2-2). Teniendo en cuenta los desarrollos para las ecuaciones (3-17) y (3-19) se realizó un planteamiento teórico para incluir los costos energéticos asociados a la electro-fermentación, utilizando un enfoque de semi reacciones y potenciales de reducción. Para esto, se incluyeron los términos de energía libre de Gibbs de formación para los nuevos compuestos que participan en la reacción y se relacionan con los electrodos y electrones transferidos. La inclusión de estos términos, en conjunto con el establecimiento de la estequiometría del proceso de electro-fermentación, permitió la estimación de un $\Delta G_{reacción}^{ocatabólico}$ que da cuenta

de unos costos energéticos relacionados con el proceso redox de los electrodos y las moléculas que donan o aceptan los electrones al interior de la célula.

3.1.5 Estimación de los coeficientes de la relación de *Herbert-Pirt*

La reacción global del proceso se definió como una combinación lineal de las reacciones catabólicas y anabólicas (producción de biomasa y producto anabólico) como se describe en la reacción (2-21). Se plantearon cada uno de los balances por moléculas y se describieron las relaciones de *Herbert-Pirt* relacionadas, según el desarrollo teórico.

3.1.6 Estimación del flujo de corriente asociado al bioproceso.

Una vez estimados los parámetros de la relación de *Herbert-Pirt* que tienen en cuenta la energía libre de Gibbs extra, se propuso un desarrollo para calcular el flujo de electrones como $\frac{mole^-}{CmolX-h}$ y a partir de allí la intensidad de corriente eléctrica (*Amperios*) que debe pasar por el electrodo para una determinada masa celular (*gDW* o *CmolX*).

Además, se definieron las ecuaciones para calcular los parámetros propuestos para los sistemas bioelectroquímicos en las ecuaciones (2-23) y (2-25) con base en los parámetros y ecuaciones utilizadas en el marco del diseño racional de bioprocesos.

3.1.7 Análisis de sensibilidad.

Se realizaron análisis de sensibilidad para evaluar los cambios en la energía libre de Gibbs del proceso variando el voltaje y los aceptores de electrones según las ecuaciones y consideraciones obtenidas como resultado de los pasos metodológicos anteriores.

3.2 Proposición de cambios metodológicos en la estrategia del diseño racional de bioprocesos para incluir el análisis de la electro-fermentación.

A partir de los hallazgos encontrados en los pasos incluidos en el apartado 3.1, se planteó una modificación de la metodología general descrita anteriormente para el diseño racional de bioprocesos, en particular para el paso metodológico V, descrito detalladamente en el numeral 2.4. El desarrollo de esta actividad permitió establecer de manera sistemática un modelo de caja negra que tiene en cuenta los requerimientos de energía eléctrica en una electro-fermentación en el marco del diseño racional de bioprocesos para un redireccionamiento metabólico.

3.3 Construcción del modelo metabólico a escala genómica.

3.3.1 Levantamiento de la información biológica base.

El levantamiento de la información biológica base se hizo a partir de información anotada y curada en bases de datos para genomas, proteomas y rutas metabólicas, entre estas: *Genbank*, para el genoma, nucleótidos y aminoácidos de genes específicos; *Uniprot*, para la anotación del proteoma, *BRENDA*, *KEGG*, *BiGG* *BioCyC* y *SEED* para rutas metabólicas. Se realizó la identificación de las enzimas involucradas en la conversión de los compuestos claves (sustrato/producto) así como también aquellas involucradas en la expresión de proteínas/estructuras involucradas en el proceso del transporte extracelular de electrones.

3.3.2 Selección del microorganismo chasis

La selección del microorganismo chasis se realizó teniendo en cuenta los siguientes parámetros y consideraciones:

1. Versatilidad nativa del microorganismo: La cantidad de rutas metabólicas de interés presentes en el microorganismo de forma natural (sin modificaciones genéticas)
2. Facilidad de cultivo: Condiciones de cultivo variables con capacidad de crecer en entornos aerobios y anaerobios, sin necesidad de medios de cultivo con características especiales.
3. Capacidad de transferencia extracelular de electrones: Que presente o se haya reportado su habilidad para transferir o recibir electrones desde un electrodo sólido. Para este parámetro se incluyen todos los microorganismos a los cuales se les haya reportado la capacidad para realizar transporte mediado (a través de moléculas solubles en el medio de cultivo) o transporte directo de electrones.
4. Facilidad de modificaciones genéticas en donde se evidencien metodologías y protocolos establecidos para su fácil manipulación genética y expresión heteróloga de genes.

3.3.3 Identificación de mecanismos para el transporte de electrones.

A partir de la información anotada en las bases de datos listadas anteriormente y la información disponible en la literatura, se determinó un banco de mecanismos de transporte de electrones potenciales que puedan expresarse en la construcción del microorganismo chasis, privilegiando aquellos mecanismos que ya se han reportado para su uso en estrategias que involucran sistemas bioelectroquímicos, *BES* o más específicamente de electro-fermentación.

3.3.4 Reconstrucción de la ruta metabólica.

La reconstrucción de la ruta metabólica *in silico* se realizó a partir de los genes y enzimas identificados en los pasos metodológicos anteriores.

- I. Se construyó una base de datos donde se alojaron únicamente los genes reportados que codifican para las enzimas de la ruta metabólica, las cuales se seleccionaron a partir de las bases de datos anteriormente mencionadas.

- II. Se utilizaron herramientas de acceso libre en línea alojadas en la base de datos KEGG, especialmente la herramientas BLASTn, BLASTp ,KOALA y KEGG KO ANNOTATION, las cuales permitieron, a partir de datos en formato FASTA, hacer el respectivo análisis y determinar automáticamente qué rutas metabólicas están cubiertas en la información genética examinada.

- III. A partir de esta información fue posible hacer análisis complementarios de las rutas metabólicas en donde se determinó si se encuentran presentes en el microorganismo estudiado.

3.3.5 Construcción del modelo de escala genómica en COBRA.

Con base en la información generada en los sub-pasos metodológicos 3.3.1 a 3.3.4, se construyó un modelo de escala genómica *in silico* para la(s) ruta(s) metabólicas estudiadas, escrito en Excel e implementado utilizando la herramienta de importación de CobraToolbox en Matlab [48] y sus resultados se interpretaron visualmente utilizando la herramienta Escher [49]. En este se implementaron todas las reacciones

identificadas incluyendo todas aquellas asociadas al transporte extracelular de electrones.

Las actividades de reconstrucción de las rutas metabólicas y la construcción de los modelos de los microorganismos chasis son tareas que tienen un alto grado de simultaneidad y fue necesario realizar un proceso cíclico de revisión y curado para refinar aún más el modelo con el ánimo de obtener la funcionalidad deseada, es decir, que el microorganismo chasis pueda producir los metabolitos de interés que son objeto de estudio bajo las condiciones de entrada del modelo metabólico.

3.4 Desempeño del desarrollo teórico planteado

3.4.1 Comparación de desempeño de la ruta complementada con la funcionalidad de la electro-fermentación.

Utilizando la red metabólica reconstruida y el modelo termodinámico desarrollado, a los cuales se ha incorporado la funcionalidad de electro-fermentación, se realizaron simulaciones en computador para evaluar el desempeño frente a condiciones de proceso de datos reportados en la literatura y las rutas metabólicas ya diseñadas (sin electro-fermentación) que ya se probaron al interior del grupo. De allí se estableció el posible efecto positivo o negativo de incluir la nueva funcionalidad e identificar nuevos cuellos de botella y posibles objetivos metabólicos de mejoramiento para proponer modificaciones a nivel de ingeniería genética. Para el análisis de flujos metabólicos se utilizó la plataforma computacional COBRA, y el desarrollo de programas propios en las plataformas de simulación Matlab [9] y Spyder [50].

3.4.2 Estimación de máximas titulaciones extracelulares, intensidad de corriente y eficiencia energética.

Una vez refinado el modelo metabólico funcional y evaluados los diferentes escenarios de proceso, se realizó una estimación de las máximas titulaciones de producto que se podrían obtener en dichos escenarios. Adicionalmente, se estimaron las correspondientes intensidades de corriente y eficiencias energéticas previstas con el fin de establecer las especificaciones de diseño de un sistema de electro-fermentación a nivel de laboratorio.

4. Resultados y discusión

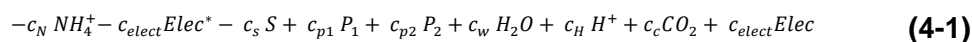
4.1 Desarrollo teórico para la inclusión de los sistemas de electro-fermentación en el diseño racional de bioprocesos

4.1.1 Energía libre de Gibbs para la reacción catabólica

Conocido el valor de energía libre de Gibbs para la reacción global de transferencia de electrones calculado en las ecuaciones (3-17) o (3-18) , es necesario desarrollar una metodología para su posterior inclusión en los cálculos de la energía catabólica disponible ΔG°_{cat} , definida en la ecuación (2-4).

Hasta el momento, el estado del arte apunta a que en una electro-fermentación se da un cambio metabólico que redirecciona los flujos de carbono y electrones hacia otros productos [51]–[53]. Este cambio metabólico podría dar lugar a la coproducción de un segundo metabolito P_2 junto a P_1 o un completo cambio metabólico en donde únicamente hay producción de P_2 y no hay producción de P_1 . Estos procesos tomarían el nombre de **cambio metabólico incompleto** y **cambio metabólico completo**, respectivamente (de los cuales se ahondará más en el siguiente apartado). En el marco del diseño racional de bioprocesos, P_1 .es el metabolito que se produce bajo condiciones basales de fermentación (es decir, sin aplicación de voltaje o corriente) y disminuye su rendimiento al

realizar la electro-fermentación y P_2 es el metabolito que aumenta su producción al introducir o retirar electrones del sistema. Los rendimientos finales de P_1 y P_2 dependen directamente de la cantidad de electrones transferidos al sistema, los cuales son proporcionados por el electrodo de trabajo. En este orden de ideas, para una electro-fermentación catódica su estequiometría se ve reflejada en la reacción **(4-1)** (para una electro-fermentación anódica, se invierte el orden de $Elect^*$ y $Elect$ entre productos y reactivos).

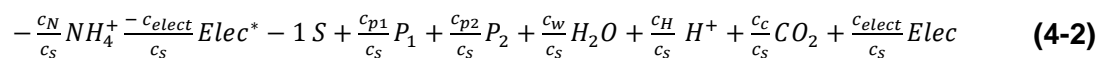


En donde C_i es el coeficiente estequiométrico para la molécula i . Es importante recalcar que C_{elect} es el coeficiente estequiométrico que da cuenta de los electrones que son transferidos a través del electrodo de trabajo. Cuando $C_{elect} = 0$, no hay transferencia de electrones desde o hacia el electrodo y pueden presentarse dos casos:

1. En condiciones basales existe únicamente producción de P_1 . El microorganismo es incapaz de producir P_2 sin interactuar con el electrodo. A medida que se reciben o transfieren electrones, el rendimiento de P_1 disminuye y P_2 aumenta proporcional a esa disminución, generando un **cambio metabólico incompleto**. La interacción microorganismo-electrodo, puede generar un intercambio de electrones que permita la completa eliminación de P_1 como producto y únicamente se presente producción de P_2 , provocando un **cambio metabólico completo**.
2. En condiciones basales se produce tanto P_1 como P_2 . En este caso, sin necesidad de interactuar con el electrodo, ya existe una coproducción de P_1 y P_2 . Como es el caso de la producción de propionato y acetato por *P. acidipropionici*, en donde un desbalance en la producción de NADH, provoca que, bajo condiciones basales, este microorganismo produzca propionato y acetato en

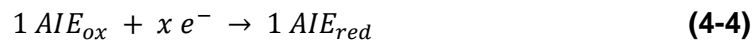
una relación estequiométrica de 2 a 1. A medida que se interactúa con el electrodo de trabajo, tanto el propionato como el acetato podrían disminuir o aumentar, dependiente del tipo de electro-fermentación realizada. Schuppert y colaboradores, mediante una electro-fermentación catódica, lograron disminuir la producción de acetato, para mejorar el rendimiento de propionato con *P. acidipropionici* [54]. En este mismo orden de ideas, la electro-fermentación permite modificar esa relación basal de 2 a 1 entre estos productos de fermentación y provocar un **cambio metabólico incompleto**, hasta lograr la completa eliminación de alguno de los dos productos, generando un **cambio metabólico completo**.

Para escribir la ecuación en concordancia con la metodología del diseño racional de bioprocesos, se reescribe la reacción (4-1) por mol de sustrato, dividiendo por la variable c_s , dando lugar a la reacción (4-2)



Es importante recordar que c_{elect} es el número de electrones requeridos en el proceso y su forma de cálculo se explica en la sección 4.1.2 más adelante. La energía libre de Gibbs $\Delta G_{Rxn}^{ocatabolismo}$ para esta reacción (4-2) puede calcularse según las energías libres de formación para cada uno de los compuestos, según la ecuación (2-3). La energía libre de Gibbs de formación ΔG_f^i en los compuestos orgánicos e inorgánicos se encuentra tabulada o puede ser calculada utilizando diferentes métodos [15]. Sin embargo, se hace necesario determinar un valor homólogo para $Elec^*$ y $Elec$, para realizar el cálculo, pues hasta el momento solo se conoce el valor de la energía libre de Gibbs de la reacción global de transferencia (3-17) o (3-18) y no su contribución energética a la reacción catabólica.

Sin importar el tipo de electro-fermentación realizada (anódica o catódica), el proceso global de transporte de electrones se podría escribir como una combinación de las siguientes dos semirreacciones de reducción **(4-3)** y **(4-4)**:



Retomando la ecuación de *Nerst* (Ecuación **(2-17)**), su correspondiente energía libre de Gibbs está dada por las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G^{\circ}_{Elect} = -1 f (V_{electrodo}) \left[\frac{kJ}{mol} \right] \quad (4-5)$$

$$\Delta G^{\circ}_{AIE} = -x f (E^{\circ}_{AIE}) \left[\frac{kJ}{mol} \right] \quad (4-6)$$

Además, teniendo en cuenta lo explicado en la interacción electrodo-mediador (Ecuación **(3-14)**), la reacción **(4-4)** depende de proteínas de membrana y podría estar relacionada con producción o consumo de ATP. La ecuación **(4-6)** se puede modificar para dar cuenta de la energía biológicamente disponible producida o consumida en el proceso global, según la ecuación **(4-7)**.

$$\Delta G^{\circ}_{AIE}{}^{corregido} = -x f (E^{\circ}_{AIE}) + y \Delta G^{\circ}_{ATP} \left[\frac{kJ}{mol} \right] \quad (4-7)$$

Teniendo en cuenta la estequiometría de las reacciones (4-3) y (4-4), la energía libre de Gibbs de la reacción puede reescribirse en términos de las energías libre de Gibbs de formación de cada uno de los productos y reactivos, dando lugar a las siguientes ecuaciones

$$\Delta G^{\circ}_{Elect} = \Delta G^{\circ}_{f^{Elec*}} - \Delta G^{\circ}_{f^{Elec}} - \Delta G^{\circ}_{f^{e^-}} \quad (4-8)$$

$$\Delta G^{\circ}_{AIE\text{ corregido}} = \Delta G^{\circ}_{f^{AIEred}} - \Delta G^{\circ}_{f^{AIEox}} - x \Delta G^{\circ}_{f^{e^-}} \quad (4-9)$$

En donde ΔG°_f , corresponde al valor de la energía libre de Gibbs de formación en condiciones estándar para el compuesto i (en donde i corresponde a e^- , AIE_{red} y AIE_{ox}). Para una mejor estimación, puede utilizarse valores de energía libre de Gibbs de formación en condiciones **bioquímicas** estándar ΔG°_f , siempre y cuando se corrijan los potenciales de reducción para $pH = 7$. Cabe resaltar que los valores de $\Delta G^{\circ}_{f^{AIEred}}$ y $\Delta G^{\circ}_{f^{AIEox}}$ son conocidos y se encuentran reportados en tablas o estimados numéricamente (El libro Lange's Handbook of Chemistry [15] y el modelo termodinámico publicado por Feist y colaboradores [55], son una excelente fuente de información para encontrar la energía libre de Gibbs de formación de compuestos orgánicos). **Cabe resaltar la importancia de revisar en la literatura las condiciones a las cuales se encuentra referenciado el potencial de reducción y la energía libre de Gibbs para evitar incongruencias.**

Por otro lado, la energía libre de Gibbs de la reacción (4-2), puede escribirse según la ecuación (4-10). Cabe resaltar que dicha reacción describe un proceso catódico en donde se necesita adicionar electrones adicionales para la producción de P_2 . Para el proceso anódico, se invierte el signo de $\Delta G^{\circ}_{f^{Elec}}$ y $\Delta G^{\circ}_{f^{Elec*}}$ de la ecuación (4-10).

$$\Delta G_{Rxn}^{\circ catabolismo} = \sum \frac{c_i}{c_s} \Delta G_f^i + \frac{c_{elect}}{c_s} (\Delta G_f^{\circ Elec} - \Delta G_f^{\circ Elec*}) \quad \left[\frac{kJ}{mols} \right] \quad (4-10)$$

En donde $\sum \frac{c_i}{c_s} \Delta G_f^i$ corresponde al producto de la energía libre de Gibbs de formación por el coeficiente $\frac{c_i}{c_s}$ de cada uno de los compuestos presentes en la reacción (4-2) diferentes a *Elec** y *Elec*. Ahora, se define $\Delta G_{catodico}^{\circ EF}$ y $\Delta G_{anodico}^{\circ EF}$ como se presenta a continuación

$$\Delta G_{catodico}^{\circ EF} = \Delta G_f^{\circ Elec} - \Delta G_f^{\circ Elec*} \quad (4-11)$$

$$\Delta G_{anodico}^{\circ EF} = \Delta G_f^{\circ Elec*} - \Delta G_f^{\circ Elec} \quad (4-12)$$

$$\Delta G_{catodico}^{\circ EF} = -\Delta G_{anodico}^{\circ EF} \quad (4-13)$$

Tomando las ecuaciones (4-5), (4-7) y reemplazando en (4-8), (4-9) con el fin de despejar las variables $\Delta G_f^{\circ e^-}$ de (4-9) y $\Delta G_f^{\circ Elec*} - \Delta G_f^{\circ Elec}$ de (4-12), se obtiene lo siguiente:

$$\Delta G_{anodico}^{\circ EF} = \Delta G_f^{\circ Elec*} - \Delta G_f^{\circ Elec} = -\frac{\Delta G_f^{\circ AIEox} - \Delta G_f^{\circ AIEred} + y * \Delta G_{ATP}^{\circ} - E^{\circ} AIE * f * x + f * V_{Electrodo} * x}{x} \quad (4-14)$$

$$\Delta G_f^{\circ e^-} = -\frac{\Delta G_f^{\circ AIEox} - \Delta G_f^{\circ AIEred} + y * \Delta G_{ATP}^{\circ} - E^{\circ} AIE * f * x}{x} \quad (4-15)$$

NOTA: Para el cálculo de $\Delta G^{\circ EF}_{anódico}$ y $\Delta G^{\circ EF}_{catódico}$, se debe tener cuidado al utilizar todas las energías libres de Gibbs de formación en las mismas condiciones bajo las cuales se estimaron los valores ΔG_f^i de los otros compuestos que intervienen en la reacción catabólica. Los valores para moléculas relacionadas con reacciones bioquímicas suelen reportarse bajo condiciones de concentración 1M, $pH = 7$ y fuerza iónica $I = 0$ (Como lo es el caso de los reportes para aceptores internos de electrones como el *NADH* y *Succinato*). Al igual que con los reportes de los potenciales estándar de reducción, los cuales pueden reportarse bajo condiciones estándar 1M, $pH = 0$ o condiciones bioquímicas 1M, $pH = 7$.

Finalmente, $\Delta G^{\circ catabolismo}_{Rxn}$ puede calcularse para una electro-fermentación con la siguiente ecuación **(4-16)**:

$$\Delta G^{\circ catabolismo}_{Rxn} = \sum \frac{c_i}{c_s} \Delta G_f^i + \left| \frac{c_{elect}}{c_s} \right| (\Delta G^{\circ EF}_{catódico \text{ o } anódico}) \left[\frac{kJ}{mols} \right] \quad \text{(4-16)}$$

En donde $\Delta G^{\circ EF}_{catódico \text{ o } anódico}$ corresponde al aporte en energía libre de Gibbs para la electro-fermentación definido con las ecuaciones **(4-14)** para un proceso anódico y al multiplicar por -1, se obtiene la energía para un proceso catódico (Ec **(4-13)**).

Con los valores de la energía libre de Gibbs de formación estimados con la ecuación **(4-14)**, solo falta conocer los coeficientes $\frac{c_i}{c_s}$ y especialmente, la cantidad de electrones transferidos que se requieren en el proceso, definidos por el coeficiente C_{elect} de la reacción **(4-2)** para completar el cálculo de la energía disponible en el catabolismo ΔG°_{cat} .

4.1.2 Estimación del requerimiento de electrones transferidos

Retomando la reacción (4-2), es necesario determinar cada uno de los coeficientes estequiométricos para completar el cálculo de la energía disponible en el catabolismo ΔG°_{cat} , especialmente el coeficiente C_{elec} , que da cuenta de la cantidad de electrones requeridos en el proceso.

En términos generales, cada uno de los compuestos pueden escribirse con base en su composición de Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno, Carga y Electrones como se describe en la **Tabla 4-1**. En esta tabla se tiene en cuenta dos suposiciones importantes: (1) el electrodo reducido toma una carga negativa debido al electrón disponible que contiene, consecuentemente (2) el electrodo oxidado no dispone de carga debido a que ya ha donado el electrón.

Tabla 4-1. Composición general de los compuestos de la reacción catabólica.

Compuesto	Composición					
	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>N</i>	<i>Carga</i>	<i>Electrones</i>
Sustrato (<i>S</i>)	S_c	S_H	S_O	S_N	S_{car}	γ_s
Producto 1 (P_1)	P_{1c}	P_{1H}	P_{1O}	P_{1N}	P_{1car}	γ_{p1}
Producto 2 (P_2)	P_{2c}	P_{2H}	P_{2O}	P_{2N}	P_{2car}	γ_{p2}
H_2O	0	2	1	0	0	0
H^+	0	1	0	0	1	0
CO_2	1	0	2	0	0	0
NH_4^+		4		1	1	
$ELECT_{red}$	0	0	0	0	-1	1
$ELECT_{ox}$	0	0	0	0	0	0

Los subíndices C,H,O,N y *car* corresponden al número de carbonos, hidrógenos, oxígenos, nitrógenos y, carga, respectivamente, de la molécula que lo antecede. γ_i es el grado de reducción del compuesto.

Teniendo en cuenta los coeficientes estequiométricos de la reacción **(4-2)** y la **Tabla 4-1**, se puede definir un sistema de ecuaciones con una matriz de coeficientes e incógnitas según las ecuaciones **(4-17)** y **(4-18)**.

$$\begin{bmatrix} S_C & P1_C & P2_C & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ S_H & P1_H & P2_H & 2 & 1 & 0 & 0 & 4 \\ S_O & P1_O & P2_O & 1 & 0 & 2 & 0 & 0 \\ S_N & P1_N & P2_N & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ S_{carga} & P1_{carga} & P2_{carga} & 0 & 1 & 0 & -1 & 1 \\ \gamma_s & \gamma_{p1} & \gamma_{p2} & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} = A \quad (4-17)$$

$$\begin{bmatrix} -1 \\ \frac{C_{P1}}{C_s} \\ \frac{C_s}{C_s} \\ \frac{C_{P2}}{C_s} \\ \frac{C_s}{C_s} \\ \frac{C_W}{C_s} \\ \frac{C_H}{C_s} \\ \frac{C_C}{C_s} \\ \frac{\pm C_{elect}}{C_s} \\ \frac{C_s}{C_s} \\ -\frac{C_N}{C_s} \end{bmatrix} = m \quad (4-18)$$

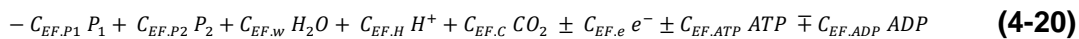
* \pm depende del tipo de electro-fermentación (anódica o catódica). Para EF catódica, toma un valor negativo, por ser un reactivo. De forma análoga, para EF anódica, toma valor positivo por ser un producto.

Para obtener finalmente el siguiente sistema de ecuaciones $A * m = 0$ con 8 incógnitas y 6 ecuaciones.

$$\begin{bmatrix}
 S_C & P1_C & P2_C & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\
 S_H & P1_H & P2_H & 2 & 1 & 0 & 0 & 4 \\
 S_O & P1_O & P2_O & 1 & 0 & 2 & 0 & 0 \\
 S_N & P1_N & P2_N & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\
 S_{carga} & P1_{carga} & P2_{carga} & 0 & 1 & 0 & -1 & 1 \\
 \gamma_s & \gamma_{p1} & \gamma_{p1} & 0 & 0 & 0 & 1 & 0
 \end{bmatrix}
 \begin{bmatrix}
 -1 \\
 \frac{C_{P1}}{C_s} \\
 \frac{C_{P2}}{C_s} \\
 \frac{C_W}{C_s} \\
 \frac{C_H}{C_s} \\
 \frac{C_C}{C_s} \\
 \frac{\pm C_{elec}}{C_s} \\
 \frac{-C_N}{C_s}
 \end{bmatrix}
 = 0 \quad (4-19)$$

Como $Rank(A) = 6$, se necesitan definir dos ecuaciones más para tener un sistema de ecuaciones determinado.

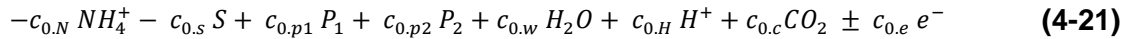
La primera restricción al sistema se denomina **reacción de productos de electro-fermentación**. Como se mencionó anteriormente, en la definición de la reacción (4-2), una electro-fermentación produce un cambio metabólico permitiendo la producción de un nuevo metabolito P_2 a expensas de la disminución de P_1 . Además, a nivel de metabolismo celular, existe una relación estequiométrica directa entre el consumo de P_1 y la producción de P_2 , definida por la reacción global de una ruta metabólica que los conecte. De esta forma se puede definir una reacción genérica como la reacción (4-20).



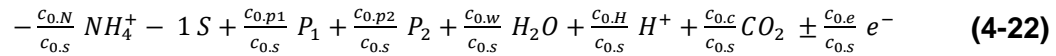
En donde $C_{EF,i}$ es el coeficiente estequiométrico para cada uno de los compuestos involucrados en el cambio metabólico determinados por la ruta metabólica escogida (Estos coeficientes se obtienen al definir la ruta metabólica entre P_1 y P_2 y sumar cada una de las reacciones hasta obtener la reacción global que relaciona a P_1 y P_2). Cabe resaltar que estos coeficientes son diferentes a los coeficientes anteriores establecidos

en la reacción **(4-2)**, son completamente conocidos y se encuentran balanceados, por lo cual no representan un aumento en las incógnitas del sistema.

Es importante recalcar el hecho de que como se habla de un “cambio” metabólico, es indispensable tener una condición inicial de base para la reacción global de electrofermentación. Esta reacción base **(4-21)** corresponde la reacción catabólica basal que se llevaría sin presencia de un electrodo, definida de forma similar a la reacción **(4-2)**.



O por mol de sustrato, según la reacción **(4-22)**



En donde $C_{0,i}$ define los coeficientes estequiométricos iniciales para cada uno de los compuestos involucrados. Estos coeficientes son **conocidos** y pueden estimarse mediante balances elementales, análisis de la ruta metabólica, de forma similar a la reacción **(2-2)**.

De esta forma, los coeficientes de la reacción **(4-2)** se podrían expresar como un cambio de una condición inicial $C_{0,i}$ a una final C_i mediante un cambio ΔC_i de la siguiente forma:

$$\frac{C_i}{C_s} = \frac{C_{0,i}}{c_{0,S}} \pm \Delta C_i \quad (4-23)$$

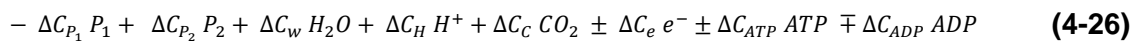
En donde ΔC_i expresa la cantidad de moles del compuesto i que reaccionan en la electro-fermentación por mol de sustrato requerido en la condición basal ($mol\ i/mol\ S.0$). En este orden de ideas, para los coeficientes estequiométricos de C_{P_1} y C_{P_2} , los cuales representan los productos entre los cuales se realiza el cambio metabólico, se desarrollan las ecuaciones **(4-24)** y **(4-25)**

$$\frac{C_{P_1}}{C_s} = \frac{C_{0.P_1}}{C_{0.S}} - \Delta C_{P_1} \quad \text{(4-24)}$$

$$\frac{C_{P_2}}{C_s} = \frac{C_{0.P_2}}{C_{0.S}} + \Delta C_{P_2} \quad \text{(4-25)}$$

En donde ΔC_{P_i} corresponde al cambio en el coeficiente estequiométrico como resultado de la electro-fermentación. En la reacción **(4-24)** se utiliza un signo - denotando la disminución del coeficiente estequiométrico. De forma análoga, en la ecuación **(4-25)** se utiliza un signo positivo para el aumento del coeficiente estequiométrico. Esta notación de signos fija a P_1 como el metabolito que disminuye su producción y P_2 como el que aumenta.

De la reacción **(4-20)** se tiene que el consumo de P_1 es directamente proporcional a la producción de P_2 determinada por los coeficientes estequiométricos que los relacionan. De la misma forma, los cambios estequiométricos ΔC_{P_i} para cada uno de los compuestos pueden verse en forma de reacción química como se muestra a continuación con la reacción **(4-26)**.



El cambio metabólico tiene que cumplir la reacción de electro-fermentación, por lo cual, al relacionar los coeficientes de las reacciones **(4-20)** y **(4-26)**, se puede establecer la siguiente relación:

$$\frac{\Delta C_{P_1}}{\Delta C_{P_2}} = \left| \frac{C_{EF.P_1}}{C_{EF.P_2}} \right| \quad (4-27)$$

Además, se sabe que el cambio máximo de ΔC_{P_1} está limitado por la relación molar $\frac{C_{0.P_1}}{C_{0.S}}$ según la ecuación **(4-24)**, bajo la premisa que ΔC_{P_1} no puede ser mayor a $\frac{C_{0.P_1}}{C_{0.S}}$, para evitar que el signo del coeficiente estequiométrico se invierta. Esto es de gran importancia, debido a que lo que se busca es producir el metabolito de interés y no su consumo. En este orden de ideas, se define el cambio máximo para P_1 con la ecuación

$$\Delta C_{P_1}^{max} = \frac{C_{0.P_1}}{C_{0.S}} \quad ; \quad (4-28)$$

Finalmente, se puede relacionar $\Delta C_{P_1}^{max}$ con ΔC_{P_1} de la siguiente forma:

$$\Delta C_{P_1} = \Delta C_{P_1}^{max} * z \quad ; \quad \Delta C_{P_1} > 0 \text{ y } 0 \leq z \leq 1 \quad (4-29)$$

En donde z es un parámetro en la electro-fermentación denominado **avance de la electro-fermentación**, el cual puede fijarse arbitrariamente según los requisitos de diseño o estimado a partir de datos experimentales con la ecuación **(4-30)**. Su valor es un número entre 0 y 1, en donde su magnitud permite clasificar la electro-fermentación en dos tipos. Para valores $0 \leq z < 1$, se clasifica como un **cambio metabólico incompleto**, en donde hay coproducción de ambos metabolitos P_1 y P_2 . Para $z = 1$, se

clasifica como **cambio metabólico completo**, en el cual cesa completamente la producción de P_1 y únicamente se produce P_2 . Cabe resaltar que $z = 0$, es el proceso en el cual no hay transferencia de electrones por medio de transporte extracelular y se estaría hablando del **estado basal**.

$$z = \frac{([P_1.exp.0] - [P_1.exp.EF])}{[P_1.exp.0]} ; \quad 0 \leq z \leq 1 \quad (4-30)$$

En donde $[P_1.exp.0]$ es la concentración de P_1 al realizar una fermentación sin presencia de electrodos polarizados y $[P_1.exp.EF]$ es la concentración final alcanzada de P_1 al realizar la electro-fermentación. Es necesario recalcar que $[P_1.exp.0] > [P_1.exp.EF]$, debido a que, bajo este planteamiento, P_1 es el producto que disminuye su rendimiento al realizarse una electro-fermentación.

NOTA: Si $C_{EF.ATP} \neq 0$ (Revisar reacción (4-20)) y $y = 0$ (Ecuación (4-14)), es decir, no hay producción de ATP debido al transporte extracelular de electrones (Revisar ecuaciones (3-15)(3-17)), pero existe déficit de ATP en la ruta metabólica, es necesario buscar otra alternativa para solucionar el déficit energético o proponer una modificación al sistema de electro-fermentación incluyendo la posibilidad de producción de ATP.

Conocido el valor de z , $C_{0.P_1}$, $C_{EF.P_1}$ y $C_{EF.P_2}$ y teniendo en cuenta las ecuaciones (4-27), (4-28), (4-29) y (4-30) se puede plantear finalmente la ecuación adicional de **relación de productos de electro-fermentación** al dividir la ecuación (4-24) entre la (4-25).

$$\left\{ \begin{array}{l} C_{P_2} = 0 \quad ; \quad z = 0 \\ \frac{C_{P_1}}{C_{P_2}} = \frac{\frac{C_{0.P_1} - \Delta C_{P_1}}{C_{0.S}}}{\frac{C_{0.P_2} + \Delta C_{P_2}}{C_{0.S}}} = \frac{C_{0.P_1} * (1-z)}{C_{0.P_2} + \left| \frac{C_{EF.P_2}}{C_{EF.P_1}} \right| * C_{0.P_1} * z} ; \quad 0 < z < 1 \\ C_{P_1} = 0 \quad ; \quad z = 1 \end{array} \right. \quad (4-31)$$

La ecuación **(4-31)** da cuenta de la proporción a la cual se producirán los productos P_1 y P_2 a lo largo de la electro-fermentación. Para cuestiones del diseño *in-silico* de bioprocesos, z puede definirse según la relación molar P_1/P_2 esperada utilizando la ecuación **(4-31)**. Es importante recalcar que cuando $z = 1$, no hay producción de P_1 , por lo cual $C_{P_1} = 0$ y el valor de C_{P_2} puede encontrarse a través de balances elementales.

Definido z , se puede hacer una primera estimación de cuántos electrones serán requeridos para el cambio metabólico planteado utilizando la ecuación **(4-34)**.

$$e_p = e_{max} * z * C_{0.P_1} ; \quad 0 \leq z \leq 1 \quad (4-32)$$

En donde e_p es el número real de electrones transferidos en la electro-fermentación. Adicionalmente, e_{max} se define con la ecuación **(4-33)**, para la cual γ_i es el grado de reducción del compuesto i .

$$e_{max} = |\gamma_{P_1} * C_{EF.P_1} - \gamma_{P_2} * C_{EF.P_2}| / C_{EF.P_1} \quad (4-33)$$

Esta ecuación **(4-33)** define la cantidad máxima de electrones que requieren ingresar al sistema para que se dé un cambio **metabólico completo** con base a la reacción de 1 mol de P_1 , en otras palabras, relaciona cuantos electrones son necesarios para convertir completamente 1 mol de P_1 en P_2 .

La segunda ecuación adicional se denomina **relación de electrones** y define la relación entre la producción de P_2 y el requerimiento total de electrones, permitiendo calcular *a priori* el requerimiento total de electrones en el proceso con base en la producción establecida para P_2 .

El coeficiente $C_{EF.e}$, puede encontrarse al realizar un balance de electrones en la reacción **(4-20)** dando lugar a la ecuación **(4-34)**. **NOTA:** Si existen otros compuestos en la reacción que contengan electrones disponibles, deben tenerse en cuenta al momento de realizar el balance.

$$\gamma_{P1} * C_{EF.P1} = \gamma_{P2} * C_{EF.P2} + 1 * C_{EF.e}$$

$$C_{EF.e} = \gamma_{P1} * C_{EF.P1} - \gamma_{P2} * C_{EF.P2} \quad \mathbf{(4-34)}$$

El valor de $C_{EF.e}$ da cuenta de la cantidad teórica necesaria de electrones que hay que transferir en el sistema para alcanzar la estequiometría de la reacción **(4-20)**.

Teniendo en cuenta la definición de la ecuación **(4-23)**, el coeficiente C_{elect} se puede calcular con la ecuación **(4-35)**. El termino $\pm \Delta C_e$ determina los electrones que ingresan o salen del sistema, por lo cual para una electro-fermentación catódica, en donde ingresan electrones, estos se trabajarían como reactivos, tomando un signo negativo (-) debido al consumo ($-\Delta C_e$), y positivo (+) para una electro-fermentación anódica ($+\Delta C_e$).

$$\frac{C_{elect}}{C_S} = \frac{C_{0,e}}{C_{0,s}} \pm \Delta C_e \quad (4-35)$$

Luego, de forma similar el desarrollo propuesto para la ecuación (4-31), se utiliza la estequiometría de las reacciones (4-20) y (4-26) para establecer la siguiente relación

$$\frac{\Delta C_e}{\Delta C_{P_2}} = \left| \frac{C_{EF,e}}{C_{EF,P_2}} \right| \quad (4-36)$$

Finalmente, dividiendo la ecuación (4-35) y (4-25), y utilizando la ecuación (4-27) que relaciona ΔC_{P_2} con ΔC_{P_1} y z , se obtiene la ecuación para la **relación de electrones (4-37)**, la cual define la cantidad de electrones que se requieren ingresar (o retirar) al microorganismo para el cambio metabólico planteado por cada mol de P_2 producido

$$\left\{ \begin{array}{l} C_{P_2} = 0 \quad ; \quad z = 0 \\ \frac{C_{elec}}{C_{P_2}} = \frac{\frac{C_{0,e} \pm \Delta C_e}{C_{0,s}}}{\frac{C_{0,P_2} + \Delta C_{P_2}}{C_{0,s}}} = \frac{\frac{C_{0,e} \pm \left| \frac{C_{EF,e}}{C_{EF,P_1}} \right| * \Delta C_{P_1}}{C_{0,s}}}{\frac{C_{0,P_2} + \left| \frac{C_{EF,P_2}}{C_{EF,P_1}} \right| * \frac{C_{0,P_1} * z}{C_{0,s}}} = \frac{C_{0,e} \pm \left| \frac{C_{EF,e}}{C_{EF,P_1}} \right| * C_{0,P_1} * z}{C_{0,P_2} + \left| \frac{C_{EF,P_2}}{C_{EF,P_1}} \right| * C_{0,P_1} * z} ; 0 < z < 1 \quad (4-37) \\ C_{P_1} = 0 \quad ; \quad z = 1 \end{array} \right.$$

Con la inclusión de las ecuaciones (4-31) y (4-37) es posible completar el sistema de ecuaciones propuesto en la ecuación (4-19) y encontrar el valor correspondiente a cada uno de los coeficientes C_i de la reacción (4-2), en donde i es el subíndice de cada compuesto asociado a la reacción.

Es importante recalcar que si bien, se podrían haber desarrollado otras ecuaciones al relacionar los demás coeficientes, las ecuaciones planteadas se prestan como posibles parámetros de diseño de los bioprocesos electro-fermentativos. La ecuación **(4-31)** nos permite definir la relación estequiométrica de los productos deseada en el bioproceso, definiendo los límites máximos que se puedan alcanzar en el cambio metabólico mediante el parámetro z . Este mismo parámetro, con la ecuación **(4-37)** nos permite conocer la cantidad de electrones que se requerirán para el cambio metabólico planteado por cada mol de P_2 producido

Con el desarrollo anterior propuesto para la estimación de los coeficientes C_i , se procede al cálculo de la energía libre de Gibbs para la reacción catabólica según la ecuación **(4-16)**. Posteriormente, se define ΔG°_{cat} utilizando la ecuación **(2-4)**. Este valor de ΔG°_{cat} es el que utilizará para las estimaciones del modelo de caja negra teniendo en cuenta una serie de consideraciones teóricas adicionales definidas en la siguiente sección.

4.1.3 Nuevas consideraciones para la construcción del modelo base de caja negra

Para esta sección se seguirán los pasos metodológicos para el desarrollo de modelos metabólicos de caja negra a partir de datos termodinámicos, explicado en el numeral 2.4 del presente trabajo, sin embargo, se plantean varias modificaciones para la inclusión de los procesos de electro-fermentación. En la **Tabla 4-2**, se resumen las ecuaciones utilizadas y las consideraciones asociadas.

Tabla 4-2. Consideraciones para la construcción del modelo base de caja negra

	Ecuación	N.	Consideraciones
Estimación del mantenimiento celular	$m_G = 4.5 * e^{\left[-\frac{69000}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298}\right)\right]} \left[\frac{kJ}{Cmol_x \cdot h} \right]$	(2-5)	Sin consideración adicional.
	$m_S = m_G / \Delta G^{\circ}_{cat} \left[\frac{molS}{Cmol_x \cdot h} \right]$	(2-6)	ΔG°_{cat} obtenido teniendo en cuenta ecuación (4-16) y (2-4) .
Estimación de la formación de biomasa y crecimiento celular	$a_G = 200 + 18 (6 - c)^{1.8} + e^{\left[\left(\left(3.8 - \frac{Y}{c}\right)^2\right)^{0.16} * (3.6 + 0.4 c)\right]} \left[\frac{kJ}{Cmol_x} \right]$	(2-7)	Sin consideración adicional.
	$\left(\gamma_S \pm \gamma_e \cdot \frac{C_e}{C_s}\right) \cdot a_{ana} + \gamma_x \cdot 1 = 0$	(2-8)	$\gamma_e \cdot \frac{C_e}{C_s} \cdot a_{ana} = 0$.
	$ a_{ana} = \frac{\gamma_x}{\gamma_S} \left[\frac{molS \text{ (usado en el anabolismo)}}{Cmol_x} \right]$	(2-9)	
	$ a_{cat} = \frac{a_G}{\Delta G^{\circ}_{cat}} \left[\frac{molS \text{ (usado en el catabolismo)}}{Cmol_x} \right]$	(2-10)	ΔG°_{cat} obtenido teniendo en cuenta ecuación (4-16) y (2-4) .
	$ a = a_{cat} + a_{ana} = \frac{a_G}{\Delta G^{\circ}_{cat}} + \frac{\gamma_x}{\gamma_S} \left[\frac{molS}{Cmol_x} \right]$	(2-11)	Sin consideración adicional.
Estimación de producto anabólico	$\frac{P_S}{P_{Pa}} = b $	(2-15)	Sin consideración adicional.
	$ b_{min} = \frac{\gamma_P}{\gamma_S}$	(2-16)	No se modifica debido a que los electrones no afectan las rutas metabólicas anabólicas.
	$ b = b_{min} + b_{cat} + b_{TDF}$	(2-18)	

Inicialmente, se plantea la ecuación **(2-5)**, sin ningún cambio o consideración adicional, pues desde su planteamiento, se define que la energía requerida para el mantenimiento celular depende de la temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso y no de otros factores como la fuente de carbono y electrones.

Consecuentemente, en la ecuación **(2-6)**, ΔG°_{cat} es el valor obtenido con la ecuación **(2-4)**, el cual contiene la estimación del requerimiento energético adicional involucrado en la electro-fermentación y calculado con la ecuación **(4-16)**. Con esta ecuación se está definiendo la electro-fermentación, desde un modelo de caja negra, como un proceso en

el cual se afecta la cantidad de energía biológicamente disponible y que se obtiene del catabolismo de un sustrato particular y unos electrones transferidos desde un electrodo.

Además, con la teoría del cambio metabólico entre P_1 y P_2 , se plantea que los electrones transferidos en la electro-fermentación modifican únicamente la reacción catabólica, especialmente la relación molar $\frac{P_1}{P_2}$, lo cual concuerda con lo expuesto por Zhou y colaboradores, en donde demostraron a partir de un balance de carbono y electrones durante la reducción de Glicerol que los electrones ingresados al sistema por transporte extracelular de electrones son integrados en el metabolismo celular y utilizados únicamente en el redireccionamiento de la ruta metabólica hacia la producción de 1-3 propanodiol [56].

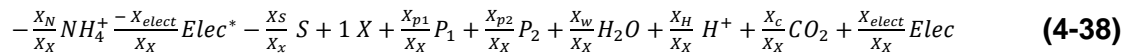
Mas aún, el estado del arte apunta a que los electrones que se transfieren en la electro-fermentación modifican la relación $NADH/NAD^+$ a través de su interacción con proteínas de membrana y no la relación $NADPH/NADP^+$ [4], [33], [44], [51], [57]. En consecuencia, las rutas metabólicas relacionadas con el anabolismo y generalmente incluidas en la formación de biomasa (como los aminoácidos y macromoléculas para formación de RNA y DNA), las cuales son dependientes de $NADPH$, no deberían verse afectadas. No obstante, en algunos microorganismos como *E. coli* es posible encontrar la enzima NADP transhidrogenasa que cataliza la reacción $NADH + 2 H_{(p)}^+ + NADP^+ \rightarrow NADPH + 2 H_{(c)}^+ + NAD^+$ [58]. Teniendo en cuenta la presencia de esta enzima, el microorganismo podría balancear su estado redox al convertir $NADH$ a $NADPH$ (o viceversa utilizando la enzima NAD transhidrogenasa), por lo cual sería posible modificar la producción de las macromoléculas relacionadas con la producción de biomasa y por ende su estequiometría final. No obstante, la enzima NADP transhidrogenasa está asociada a un gradiente de protones, al igual que la enzima ATPasa. Para esta reacción se requiere el bombeo de 2 protones H^+ desde el espacio periplásmico al citosol, los mismos protones que pueden ser utilizados por la enzima ATPasa para la producción de energía útil. Con esto en mente, la conversión de $NADH$ a $NADPH$ requiere de energía biológica útil, por lo cual, desde un punto de vista energético, es más probable que la célula intente

balancear el estado redox a través de algún metabolito fermentativo que no requiera la utilización de esta energía biológica útil.

En este orden de ideas, los electrones adicionales transferidos al sistema no se utilizarían en ninguna ruta anabólica o de formación de biomasa, por ende, la electro-fermentación y sus costos energéticos asociados no tienen un efecto directo sobre la energía requerida para la formación de biomasa establecida con el parámetro a_G , y este se calcula de forma usual según la ecuación **(2-7)**. Además, los electrones relacionados con la electro-fermentación no participan en ninguna ruta anabólica, por lo cual,

$$\gamma_e \cdot \frac{C_e}{C_s} \cdot a_{ana} = 0.$$

Ahora, la reacción global propuesta para el proceso de electro-fermentación, incluyendo la reacción de biomasa, se presenta en la reacción **(4-38)** (similar a la reacción **(2-12)**).



Para determinar los coeficientes de esta reacción se tuvo un sistema de ecuaciones (Ecuación **(4-39)**) con tres relaciones adicionales.

$$\begin{bmatrix}
 S_C & P1_C & P2_C & B_C & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\
 S_H & P1_H & P2_H & B_H & 2 & 1 & 0 & 0 & 4 \\
 S_O & P1_O & P2_O & B_O & 1 & 0 & 2 & 0 & 0 \\
 S_N & P1_N & P2_N & B_N & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\
 S_{carga} & P1_{carga} & P2_{carga} & B_{carga} & 0 & 1 & 0 & -1 & 1 \\
 \gamma_s & \gamma_{p1} & \gamma_{p2} & \gamma_B & 0 & 0 & 0 & 1 & 0
 \end{bmatrix}
 \begin{bmatrix}
 -\frac{X_S}{X_X} \\
 \frac{1}{X_X} \\
 1 \\
 \frac{X_{P1}}{X_X} \\
 \frac{X_{P2}}{X_X} \\
 \frac{X_W}{X_X} \\
 \frac{X_H}{X_X} \\
 \frac{X_H}{X_X} \\
 \frac{X_C}{X_X} \\
 \frac{X_C}{X_X} \\
 \pm X_{elect} \\
 \frac{X_X}{X_X} \\
 -\frac{X_N}{X_X} \\
 \frac{X_X}{X_X}
 \end{bmatrix}
 = 0 \quad (4-39)$$

La primera relación adicional está dada por la relación entre $\frac{X_S}{X_X}$ y el parámetro a , según la ecuación (2-13).

En la reacción (4-38), P_1 y P_2 se encuentran directamente relacionados con la reacción catabólica, y se tiene que cumplir de igual forma la **relación de productos de electro-fermentación (4-31) (relación adicional N.2)**. Por otro lado, el requerimiento de electrones está relacionado únicamente con P_2 , por lo cual, a este sistema de ecuaciones, se suma igualmente la **relación de electrones (4-37) (relación adicional N.3)**.

Con estas ecuaciones adicionales, es posible encontrar los coeficientes incógnita en la reacción (4-38) y completar el planteamiento de la reacción de biomasa.

Finalmente, como se mencionó anteriormente, en este modelo se plantea que la electro-fermentación no tiene efecto directo sobre los productos anabólicos o formación de biomasa. Por consiguiente, la metodología para este apartado continua de la misma forma planteada en la sección 2.4.4, dando lugar a la reacción (2-14) sin ningún cambio.

De donde se puede establecer la relación **(2-15)** para resolver los balances elementales y encontrar los coeficientes estequiométricos P_i .

4.1.4 Estimación de las relaciones $q_i(\mu)$ y la estequiometría global del proceso.

Teniendo en cuenta la reacción propuesta en **(2-21)** para la estequiometría global del proceso, es necesario retomar cada una de las reacciones (catabólica, biomasa y producto anabólico) con sus modificaciones para la inclusión de la electro-fermentación. En la **Tabla 4-3** se resumen cada una de sus estequiometrías, según el desarrollo teórico propuesto, para usarlas como base para estimar las relaciones de Herbert-Pirt en la **Tabla 4-4**.

Tabla 4-3. Reacción catabólica, de formación de biomasa y de producto anabólico para el modelo de caja negra.

Reacción	Estequiometría
Catabólica (4-2)	$-\frac{c_N}{c_s} NH_4^+ - \frac{c_{elect}}{c_s} Elec^* - 1 S + \frac{c_{p1}}{c_s} P_1 + \frac{c_{p2}}{c_s} P_2 + \frac{c_w}{c_s} H_2O + \frac{c_H}{c_s} H^+ + \frac{c_c}{c_s} CO_2 + \frac{c_{elect}}{c_s} Elec$
Biomasa (4-38)	$-\frac{X_N}{X_X} NH_4^+ - \frac{X_{elect}}{X_X} Elec^* - \frac{X_S}{X_X} S + 1 X + \frac{X_{p1}}{X_X} P_1 + \frac{X_{p2}}{X_X} P_2 + \frac{X_w}{X_X} H_2O + \frac{X_H}{X_X} H^+ + \frac{X_c}{X_X} CO_2 + \frac{X_{elect}}{X_X} Elec$
Producto Anabólico (2-14)	$-\frac{P_s}{P_{P3}} S - \frac{P_N}{P_{P3}} NH_4^+ + 1 P_3 + \frac{P_c}{P_{P3}} CO_2 + \frac{P_H}{P_{P3}} H^+ + \frac{P_w}{P_{P3}} H_2O$

Teniendo en cuenta las reacciones anteriores y la definición de la reacción global del proceso **(2-21)**, al realizar balances para cada uno de los compuestos involucrados, se

puede definir las relaciones $q_i(u)$ $\left[\frac{mol\ i}{Cmol_x \cdot h} \right]$ y obteniendo las ecuaciones de *Herbert-Pirt* como se describe en la **Tabla 4-4**.

Tabla 4-4. Relaciones de *Herbert-Pirt* para la reacción global del proceso.

Molécul a	Coeficiente estequiométrico			Ecuación de Herbert Pirt	
	Reacción Catabólica	Reacción Biomasa	Reacción Producto		
S	-1	$-\frac{X_S}{X_X}$	$-\frac{P_S}{P_{P_3}}$	$q_S(u) = -\frac{X_S}{X_X} \cdot u - 1 \cdot ms - \frac{P_S}{P_{P_3}} \cdot q_p(u)$	(4-40)
NH ₄	$-\frac{C_N}{c_s}$	$-\frac{X_N}{X_X}$	$-\frac{P_N}{P_{P_3}}$	$q_N(u) = -\frac{X_N}{X_X} \cdot u - \frac{C_N}{C_S} \cdot ms - \frac{P_N}{P_{P_3}} \cdot q_p(u)$	(4-41)
Elect _{red}	$-\frac{c_{elec}}{c_s}$	$-\frac{X_{elec}}{X_X}$	0	$q_{elect,red}(u) = -\frac{X_{elect}}{X_X} \cdot u - \frac{C_{elect}}{C_S} \cdot ms$	(4-42)
Elect _{ox}	$\frac{c_{elect}}{c_s}$	$\frac{X_{elect}}{X_X}$	0	$q_{elect,ox}(u) = -q_{elect,red}(u)$	(4-43)
P ₁	$\frac{c_{p1}}{c_s}$	$\frac{X_{p1}}{X_X}$	0	$q_{p1}(u) = \frac{X_{P_1}}{X_X} \cdot u + \frac{C_{P_1}}{C_S} \cdot ms$	(4-44)
P ₂	$\frac{c_{p2}}{c_s}$	$\frac{X_{p2}}{X_X}$	0	$q_{p2}(u) = \frac{X_{P_2}}{X_X} \cdot u + \frac{C_{P_2}}{C_S} \cdot ms$	(4-45)
P ₃	0	0	1	$q_{P_3}(u) = q_p(u)$	(4-46)
H ₂ O	$\frac{c_w}{c_s}$	$\frac{X_w}{X_X}$	$\frac{P_w}{P_{P_3}}$	$q_w(u) = \frac{X_W}{X_X} \cdot u + \frac{C_W}{C_S} \cdot ms + \frac{P_W}{P_{P_3}} \cdot q_p(u)$	(4-47)
H ⁺	$\frac{c_H}{c_s}$	$\frac{X_H}{X_X}$	$\frac{P_H}{P_{P_3}}$	$q_H(u) = \frac{X_H}{X_X} \cdot u + \frac{C_H}{C_S} \cdot ms + \frac{P_H}{P_{P_3}} \cdot q_p(u)$	(4-48)
CO ₂	$\frac{c_C}{c_s}$	$\frac{X_C}{X_X}$	$\frac{P_C}{P_{P_3}}$	$q_C(u) = \frac{X_C}{X_X} \cdot u + \frac{C_C}{C_S} \cdot ms + \frac{P_C}{P_{P_3}} \cdot q_p(u)$	(4-49)
X	0	1	0	$q_X(u) = u$	(4-50)

Las ecuaciones **(4-42)** y **(4-43)** son de gran importancia para el modelo de caja negra de una electro-fermentación, pues dan cuenta del flujo total de transferencia extracelular de electrones requerido para el proceso como *mol electrones / Cmolx.h*.

4.1.5 Estimación del requerimiento de corriente

Para determinar la corriente del proceso, se define el flujo total de electrones (q_e^{TOTAL}), con la ecuación (4-51)

$$q_e^{TOTAL} = \left| q_{elect_{red}} \right| = \left| q_{elect_{ox}} \right| \left[\frac{mol_{electrones}}{Cmol_x \cdot h} \right] \quad (4-51)$$

A continuación, se puede calcular la corriente en *Amperios* requerida por $CmolX$ de biomasa producida (q_I) utilizando la ecuación (4-52), en donde f es la constante de Faraday, equivalente a $96485.33 \frac{Coulomb}{mol_{electrones}}$

$$q_I = \frac{q_e^{TOTAL}}{3600} * f \left[\frac{Coulomb}{s \cdot Cmol_x} \right] \text{ ó } \left[\frac{A}{Cmol_x} \right] \quad (4-52)$$

Además, para tener en cuenta las pérdidas de carga en los sistemas electroquímicos experimentales, debido a (1) reacciones parasíticas, es decir, reacciones no contempladas que pueden afectar las reacciones de transferencia de electrones, generalmente por H_2O_2 o radicales libres $\cdot OH$ y $\cdot O_2$ [59], (2) otras moléculas donadoras/aceptoras diferentes a la pareja sustrato/producto principal, como lo es caso de adición de extracto de levadura en el medio de cultivo afectando el balance de carbono y electrones o (3) la producción de subproductos con contenido de electrones como el hidrógeno molecular H_2 , se hace necesario introducir un nuevo término que dé cuenta de las ineficiencias y pérdidas de carga del electrodo. De tal forma que la corriente q_I puede ser definida como la suma de la corriente efectiva observada experimentalmente en el electrodo $q_{I,obs}$ y el equivalente de corriente producida por otras reacciones $q_{I,otros}$. (Ecuación (4-53)).

$$q_I = q_{I.obs} + q_{I.otros} \quad (4-53)$$

Esta ecuación (4-53) plantea la posibilidad de que la corriente requerida para el cambio metabólico q_I puede ser obtenida a través de la interacción con el electrodo $q_{I.obs}$ y a través de otras moléculas presentes en el medio de cultivo con capacidad de donar o aceptar electrones, que sufren un proceso irreversible, como es el caso del transporte indirecto de electrones, en donde H_2 y algunas moléculas inorgánicas pueden ser utilizados por el microorganismo como fuente o sumidero de electrones.

4.1.6 Cálculo de la eficiencia Coulómbica

De forma análoga a la ecuación (2-23), teniendo en cuenta las variables definidas en este modelo, se puede redefinir CE con la ecuación

$$CE = \frac{q_e^{TOTAL} * f}{|q_S| * \gamma_S * f} * 100\% = \frac{q_e^{TOTAL}}{|q_S| * \gamma_S} * 100\% \quad (4-54)$$

En donde CE es la eficiencia coulómbica del proceso de electro-fermentación y puede tomar valores entre 0 y 100%. Es importante recordar que este parámetro define la eficiencia del sistema para la generación de energía útil al comparar la cantidad de electrones contenidos en el sustrato con los electrones transferidos con el electrodo que generan corriente y energía eléctrica útil, por lo cual, es de esperarse que en una electro-fermentación su valor sea bajo, pues, su objetivo es el redireccionamiento metabólico utilizando una pequeña cantidad de electrones, al contrario de una celda microbiana en donde su objetivo principal es la generación de energía y se busca obtener valores cercanos al 100%.

4.1.7 Cálculo de la eficiencia de la electro-fermentación.

Según las variables expuestas en este modelo, la definición de η_{EF} presente en la ecuación (2-25) podría extenderse a la ecuación (4-55).

$$\eta_{EF} = \frac{qe^{TOTAL}}{\gamma_{P_1}q_{P_1} + \gamma_{P_2}q_{P_2} + \gamma_{P_3}q_{P_3} + \dots + \gamma_{P_i}q_{P_i}} \quad (4-55)$$

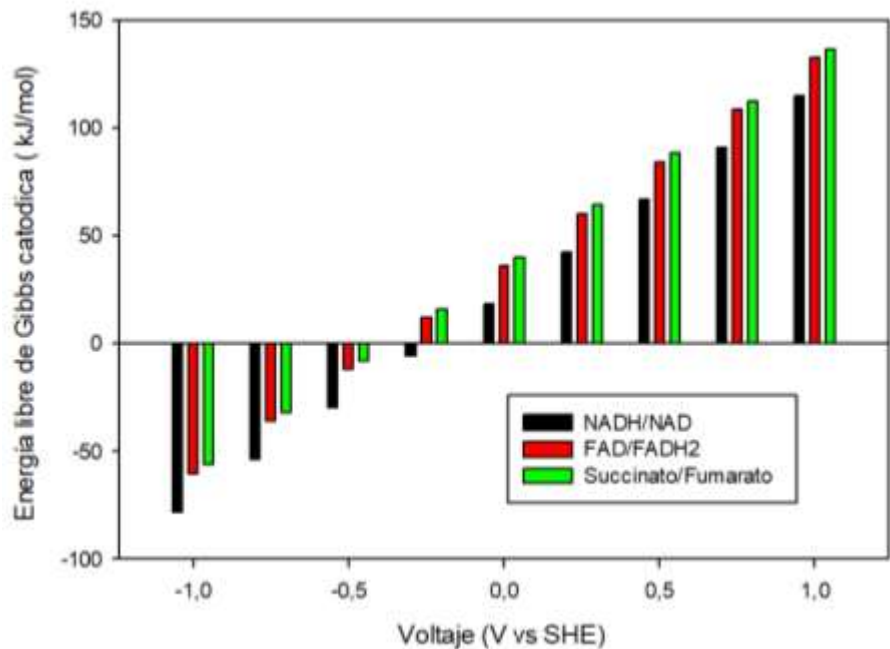
4.1.8 Análisis de sensibilidad en la energía libre de Gibbs de la reacción catabólica.

Según la ecuación (4-14), se plantea una relación directa del voltaje aplicado $V_{electrodo}$ y el potencial de reducción de la molécula aceptora interna de electrones (la cual puede cambiar según el modelo de intercambio extracelular presente en la célula) con el cambio en energía libre de Gibbs de formación del electrodo, el cual define los costos energéticos adicionales asociados a la electro-fermentación. En la **Figura 4-1** se presenta como cambia el valor de esta energía libre de Gibbs con base en diferentes escenarios de voltaje y moléculas aceptoras de electrones.

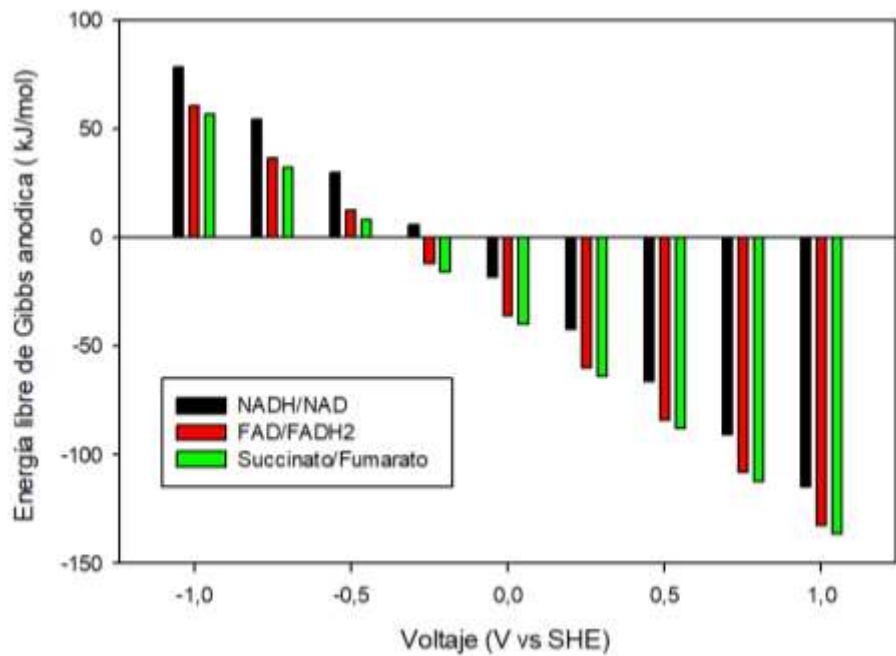
Tanto para una electro-fermentación catódica como anódica, se busca que el valor de $\Delta G_{catódico \text{ o } anódico}^{oEF}$ de la ecuación (4-16) sea menor a cero. Esta condición implica una espontaneidad en el proceso de transferencia extracelular de electrones, traducido en un aumento en la energía catabólica disponible. Una mala selección en el voltaje de trabajo del electrodo podría significar un esfuerzo adicional para la célula al realizar los redireccionamientos metabólicos planteados.

Figura 4-1. Efecto del Voltaje y el aceptor interno de electrones en la energía libre de Gibbs de formación del electrodo.

A) Electro-fermentación catódica



B) Electro-fermentación Anódica



Cuando se pretende realizar una electro-fermentación anódica, en donde el electrodo actúa como sumidero de electrones, se debe buscar trabajar con un voltaje $V_{electrodo}$ lo más alto posible con respecto a un electrodo de SHE, especialmente $V_{electrodo} > 0$ en donde para todos los posibles casos de aceptores internos de electrones se presenta un valor de energía libre de Gibbs menor a cero y un efecto positivo en la reacción catabólica. No obstante, se tiene que estudiar más a fondo el efecto de la polarización de los electrodos en las celdas de electro-fermentación para evitar un fenómeno de lisis celular electro-química debido a alto voltaje o alta corriente eléctrica [60]. Lo anterior plantea la existencia de unos parámetros V_{max} y $q_{e,max}$, que definen el voltaje y la corriente máxima, respectivamente, que un microorganismo puede soportar evitando la muerte celular.

Por otro lado, para este tipo de fermentaciones es ideal plantear mecanismos de transporte extracelular de electrones que relacionen la pareja *succinato/fumarato* ($E^0 = +0.031 V$), en donde se obtienen los menores valores de energía libre de Gibbs y aportan una mayor cantidad de energía a la reacción catabólica. La afirmación anterior es netamente teórica, pues se desconoce a cabalidad los mecanismos de transferencia extracelular de electrones y su relación con los metabolitos intracelulares, sin embargo, se presenta un futuro objetivo metabólico para el diseño de estrategias de electro-fermentación con base en diferentes metabolitos y proteínas de membrana involucradas que permitan la selección de estas moléculas en el diseño racional de bioprocesos.

Es importante recalcar que el flujo normal de electrones (según la espontaneidad del proceso de transferencia) va de moléculas de bajo potencial de reducción (donan fácilmente sus electrones) a moléculas de alto potencial de reducción (reciben fácilmente electrones), como el caso de la transferencia de electrones del NADH ($-0.32 V$) al oxígeno molecular ($+0.817 V$) [47]. En este caso, el oxígeno molecular posee un potencial de reducción lo suficientemente alto, no solo para aceptar los electrones del NADH, si no como para aceptar los electrones de las últimas proteínas que intervienen en la cadena transportadora de electrones, permitiendo que todo el proceso de transferencia se realice de forma espontánea. Con esto en cuenta, es importante analizar

la relación entre los potenciales de reducción de cada una de las moléculas de la cadena transportadora de electrones. En la **Tabla 4-5** se presentan las moléculas más comunes con su correspondiente potencial de reducción bajo condiciones bioquímicas estándar vs SHE (1 M, pH = 7).

Tabla 4-5. Potenciales de reducción de las semirreacciones relacionadas con la cadena transportadora de electrones. Datos tomados de [61]

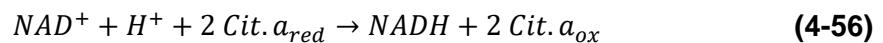
Semirreacción	$E^{\circ'}$
$2 H^+ + 2 e^- \rightarrow H_2$	-0.414
$NAD^+ + H^+ + 2 e^- \rightarrow NADH$	-0.320
$NADP^+ + H^+ + 2 e^- \rightarrow NADPH$	-0.324
$FMN + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow FMNH_2$	-0.300
<i>Ubiquinona</i> + $2 H^+ + 2 e^- \rightarrow$ <i>Ubiquinol</i>	0.045
<i>Citocromo b</i> (Fe^{+3}) + $e^- \rightarrow$ <i>Citocromo b</i> (Fe^{+2})	0.077
<i>Citocromo c₁</i> (Fe^{+3}) + $e^- \rightarrow$ <i>Citocromo c₁</i> (Fe^{+2})	0.220
<i>Citocromo c</i> (Fe^{+3}) + $e^- \rightarrow$ <i>Citocromo c</i> (Fe^{+2})	0.254
<i>Citocromo a</i> (Fe^{+3}) + $e^- \rightarrow$ <i>Citocromo a</i> (Fe^{+2})	0.29
<i>Citocromo a₃</i> (Fe^{+3}) + $e^- \rightarrow$ <i>Citocromo a₃</i> (Fe^{+2})	0.35
$\frac{1}{2} O_2 + 2 H^+ + 2 e^- \rightarrow H_2O$	0.817

Es importante recalcar que los *citocromos a* son reconocidos por ser los encargados del transporte extracelular de electrones [62], por lo cual, para una electro-fermentación utilizando transporte directo de electrones, el electrodo no solo tiene que estar polarizado en un voltaje tal que pueda recibir los electrones del *NADH* si no también, de los *citocromos a* en la membrana celular, es decir $V_{electrodo} > 0.35 V$. En voltajes $V_{electrodo} < 0.35 V$, si bien es posible que la energía libre de Gibbs para el proceso global sea mayor a cero, se tendría que vencer el valor de la energía de activación relacionada con la no espontaneidad de la transferencia entre el electrodo y los *citocromos a*. De forma similar,

para una electro-fermentación con transporte mediado de electrones, el mediador entra a ser parte de la cadena transportadora de electrones, por lo cual, idealmente se debe utilizar un mediador con un potencial de reducción entre los valores del *citocromos a* y el electrodo.

Ahora bien, para una electro-fermentación catódica, el flujo de electrones va en sentido contrario a la electro-fermentación anódica, pues ahora el electrodo actúa como fuente de electrones. En este escenario, es recomendable trabajar con un voltaje $V_{electrodo} < -0.5 V$ en donde para todos los aceptores internos de electrones se presentan valores de energía libre de Gibbs. En este caso, la transferencia de electrones entre los *citocromos a* ($E^0 = +0.35 V$) y el electrodo se puede realizar de forma espontánea, no obstante, el transporte subsecuente desde las proteínas de membrana hasta NADH representa un fenómeno no espontáneo que va desde moléculas de alto potencial de reducción hacia moléculas con un potencial menor, implicando nuevamente, altos requerimientos de energía de activación para el proceso.

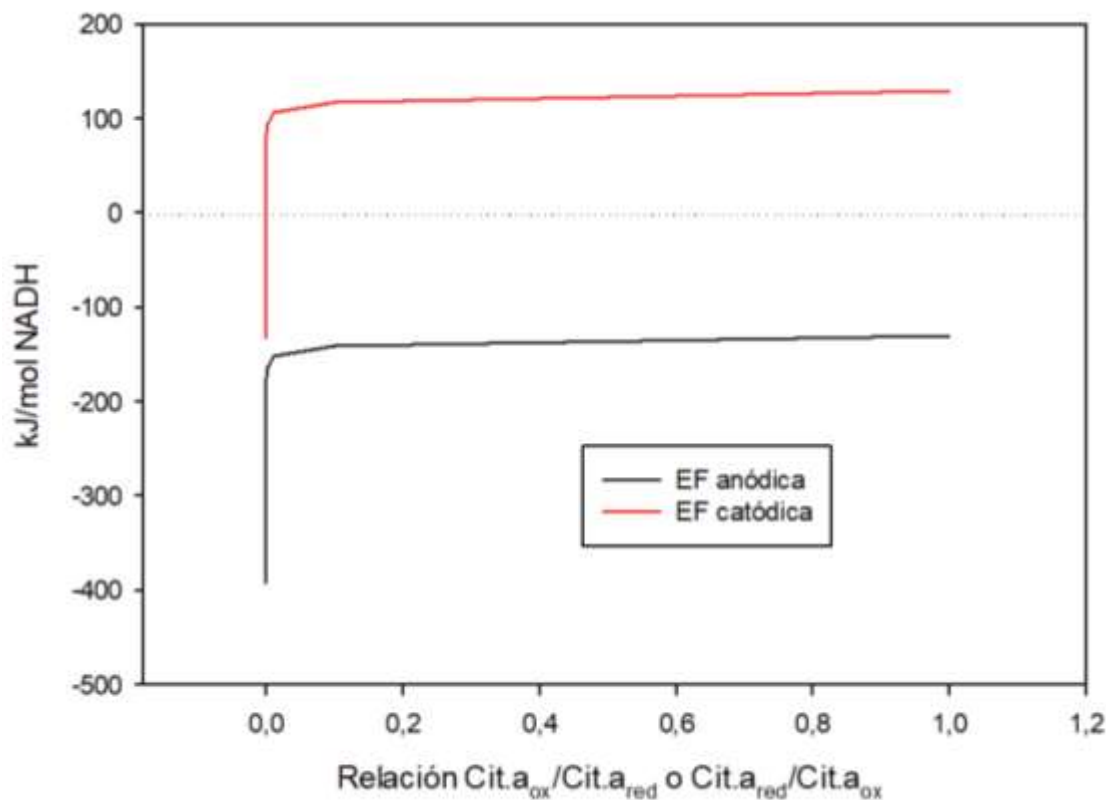
Según Korth y colaboradores [20], el electrodo de trabajo puede cambiar la relación de citocromos reducidos y oxidados en la membrana celular, posiblemente afectando la dirección de la reacción y permitiendo la generación de NADH. Este cambio se puede analizar planteando la reacción **(4-56)** y la ecuación **(4-57)** que describe el potencial de celda corregido.



$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{n \cdot f} \ln \left(\frac{[\text{Cit. } a_{ox}]^2}{[\text{Cit. } a_{red}]^2} \right) \quad (4-57)$$

La solución a la ecuación (4-57) para varias relaciones de concentración de *citocromos a* se describe en la **Figura 4-2**. En condiciones estándar (1 M), se espera el comportamiento anteriormente descrito, en donde la generación de moléculas de NADH requiere de energía útil (aproximadamente 129 kJ/mol). No obstante, entre menor sea el voltaje al cual se encuentre polarizado el electrodo vs SHE, debería ser mayor la cantidad de *Cit.a_{red}* presentes en la membrana [20]. Esta cantidad de *Cit.a_{red}* puede llegar a tal punto, que se puede revertir la direccionalidad de la reacción, haciendo factible la generación de NADH. Este mismo análisis puede aplicarse a una electro-fermentación anódica (invirtiendo la reacción (4-56) y modificando la ecuación (4-57) con base a la reacción invertida), en donde la polarización del electrodo genera un aumento en la cantidad de *Cit.a_{ox}*, generando un efecto positivo en la energía libre de Gibbs de la reacción.

Figura 4-2. Energía libre de Gibbs para la reacción entre *NADH* y los *citocromos a* en la membrana celular.



4.2 Inclusión de la electro-fermentación como solución a problemas energéticos y redox en el diseño racional de bioprocesos.

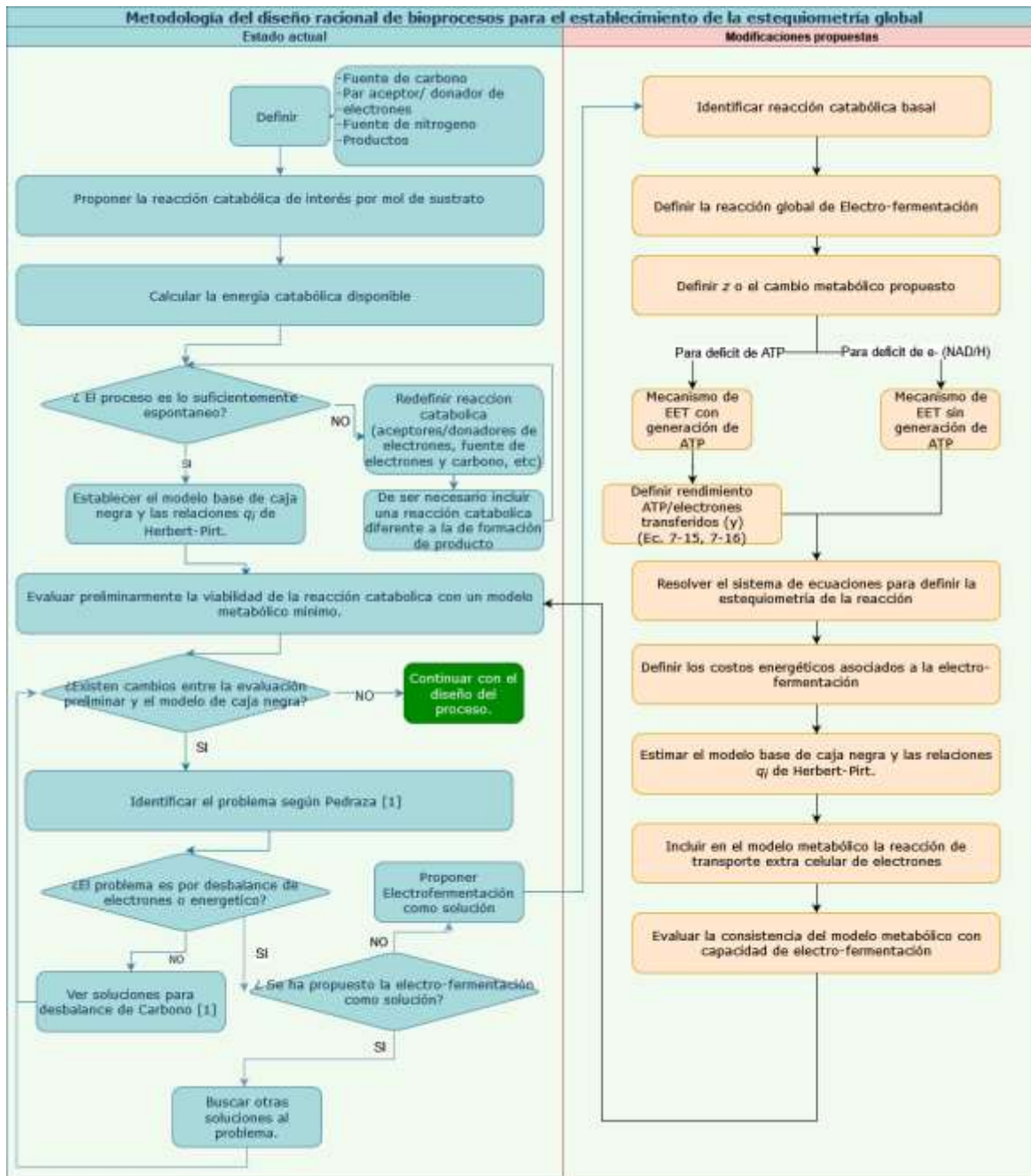
Según Pedraza [1], en el diseño racional de bioprocesos, pueden encontrarse tres tipos de problemas: desbalance de carbono, desbalance de electrones y desbalance de tipo energético (ATP). La electro-fermentación se presenta como una solución para el balance de electrones y energético teniendo en cuenta los electrones adicionales. En la **Figura 4-3** se presenta un esquema general del proceso propuesto.

Inicialmente, se parte con el diseño según la metodología actual del diseño racional de bioprocesos. De existir incoherencias entre el modelo metabólico y el modelo de caja negra, se debe reconocer si existen desbalances de electrones o energéticos (en forma de ATP) en el diseño preliminar. Los balances de tipo carbono, debido a descarboxilaciones no pueden solucionarse directamente con esta metodología, no obstante, la electro-fermentación puede plantearse como solución al alto requerimiento de electrones demandado por las rutas de fijación de CO_2 , una vez definida la ruta a seguir en la fijación y de existir un déficit de electrones.

Una vez identificado el problema como un desbalance de tipo electrones o energético, se presentan los siguientes pasos metodológicos para plantear una solución al problema:

1. Identificar la estequiometría y moléculas en la **reacción catabólica basal** (Reacción **(4-22)**). En este caso P_2 es el producto de interés para el diseño establecido y P_1 es un subproducto. Es importante recalcar que cuando se presenta un desbalance de electrones para una ruta metabólica específica, tiene que existir presencia de una segunda ruta metabólica que permita mantener el balance redox. Lo anterior se traduce en la generación del subproducto P_1 .

Figura 4-3. Esquema general del diseño racional de bioprocesos al incluir la electro-fermentación como herramienta de solución de desbalances redox y energéticos.



2. Definir la **reacción global de electro-fermentación** (Ecuación (4-20)).
3. Definir el valor de **z** o el cambio metabólico a realizar. Determinar si se desea un **cambio metabólico completo o incompleto** con una relación molar específica

entre P_1/P_2 y determinar el valor de las relaciones entre P_1/P_2 y $Elec/P_2$ con las ecuaciones adicionales (4-31) y (4-37). **NOTA:** Cuando se desea eliminar por completo la producción de un subproducto P_1 , se define $z = 1$.

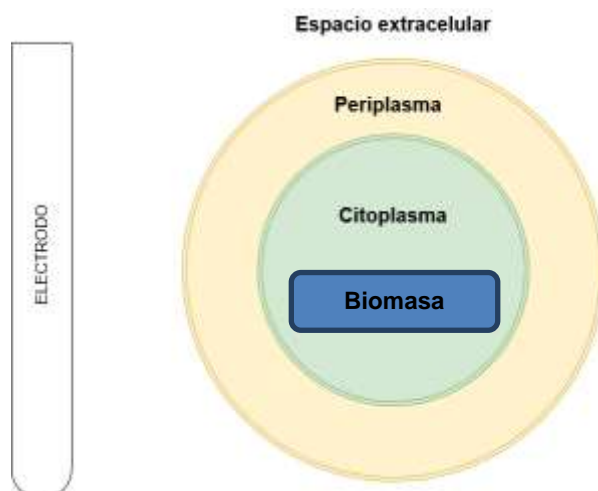
4. Resolver el sistema de ecuaciones (4-19) para determinar el valor de los **coeficientes de la reacción catabólica (4-2)**.
5. Definir el **mecanismo de transporte extracelular de electrones**. Se puede escoger entre transporte directo o mediado de electrones. Se debe definir el voltaje del electrodo de trabajo, la molécula mediadora (si aplica) y proponer la molécula aceptora interna de electrones.
6. Determinar el valor de $\Delta G_{catódico}^{oEF}$ y $\Delta G_{anódico}^{oEF}$, según corresponda (ecuaciones (4-13) y (4-14) respectivamente).
7. Calcular el valor de $\Delta G_{Rxn}^{ocatabolismo}$ (Ecuación (4-16)).
8. Realizar de nuevo la estimación de los parámetros para el modelo de caja negra según las consideraciones incluidas en la sección 4.1.3 , el cálculo de relaciones de *Herbert-Pirt* (Sección 4.1.4) y parámetros adicionales del proceso (Secciones 4.1.6 y 4.1.7)
9. Incluir en el modelo metabólico la reacción correspondiente al mecanismo de transporte extracelular de electrones definido en el paso metodológico número 5.
10. Evaluar el desempeño del nuevo modelo metabólico, el cual incluye la capacidad de electro-fermentación, con respecto al modelo termodinámico.
11. Determinar si el desbalance de electrones se resolvió. Se pueden definir nuevos objetivos metabólicos y la existencia de otros posibles desbalances.

4.3 Construcción del modelo metabólico a escala genómica.

4.3.1 Compartimentos

Para dar seguimiento al movimiento de los electrones a través de la membrana, el gradiente de protones y algunos procesos específicos de transporte, se construyó el modelo metabólico de escala genómica utilizando tres compartimentos principales: (1) Citoplasma, (2) Periplasma, y (3) Espacio extracelular (**Figura 4-4**), además de la inclusión de un cuarto compartimento (4) Biomasa, para dar cuenta de las moléculas que pasan a hacer parte del crecimiento celular y dejan de estar disponibles en el citoplasma.

Figura 4-4. Esquema gráfico de los compartimentos utilizados en el modelo metabólico.



4.3.2 Selección del Microorganismo chasis.

Inicialmente se plantean dos posibles microorganismos *Escherichia coli* y *Geobacter sulfurreducens*. Los resultados del mapeo y reconstrucción general para cada uno se muestran en la **Tabla 4-6**. En el Anexo A se hace una representación gráfica de los resultados obtenidos. Según la literatura *G. sulfurreducens* es uno de los microorganismos más estudiados en la rama de la bioelectroquímica con la capacidad de transferir electrones directamente a través de citocromos C en la membrana celular, sin embargo, debido a sus condiciones anaeróbicas estrictas de crecimiento, se debe invertir en equipos costosos y sofisticados para evitar problemas en las fermentaciones [63]. Por su poca diversidad metabólica, se requiere realizar modificaciones genéticas y la inclusión de rutas metabólicas completas para la fabricación de productos de interés [64]. Esto se puede confirmar al observar la diferencia de rutas metabólicas mapeadas en Koala y KEGG [65], así como la cantidad de proteínas encontradas relacionadas con procesos metabólicos importantes representadas en la **Tabla 4-6**. Por lo tanto, plantear una plataforma de electro-fermentación con *G. sulfurreducens*, no sería práctico debido a la complejidad en el escalado de los procesos y la inclusión de las rutas metabólicas de interés mediante herramientas de ingeniería genética.

Tabla 4-6. Mapeo y reconstrucción de los genomas de *E. coli* y *G. sulfurreducens*.

Rutas metabólicas mapeadas	Numero de reacciones involucradas identificadas	
	<i>E. coli</i>	<i>G. sulfurreducens</i>
Reacciones totales (Según KEGG y Koala)	844	508
Biosíntesis de metabolitos secundarios	308	236
Metabolismo energético	241	129
Metabolismo del carbono	95	85
Ciclo de Krebs	23	23
Metabolismo de ácidos grasos	19	13
Biosíntesis de aminoácidos	104	101
Biosíntesis de nucleótidos	41	35
Biosíntesis de cofactores	137	115
Degradación de compuestos aromáticos	17	3

Fuente: Construcción propia.

E. coli no es un microorganismo conocido ampliamente por su capacidad de interactuar con electrodos, sin embargo, se ha demostrado su capacidad de transferencia extracelular de electrones utilizando rojo neutral como mediador [46] o la posibilidad de modificarlo genéticamente para utilizar el transporte directo de electrones con un electrodo [62], [66]. Lo anterior, en conjunto con su versatilidad metabólica, lo hacen un buen candidato para su uso como microorganismo chasis en un sistema genérico de electro-fermentación.

En este orden de ideas, se escoge *E. coli* como microorganismo chasis para la construcción del modelo metabólico con su respectivo desarrollo de la reacción de formación de biomasa presentado en la sección 4.3.3. En la sección 4.3.6 se evalúa su capacidad para llevar a cabo los procesos de interés reconstruidos en las secciones 4.3.4 y 4.3.5, y se plantean las modificaciones genéticas pertinentes.

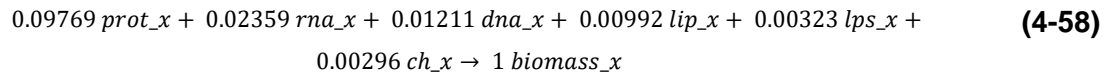
4.3.3 Estequiometría de la reacción de formación de biomasa y fórmula C-mol para *E. coli*.

Una vez definido el microorganismo chasis, se debe de definir una reacción que dé cuenta de la formación de biomasa para el microorganismo escogido, en este caso *E. coli*, y que se incluirá en el modelo metabólico.

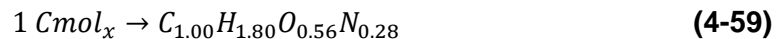
Se han reportado mapeos y reconstrucciones del metabolismo celular de *E. coli* e inclusive, se han publicado modelos metabólicos complejos incluyendo más de 1000 reacciones y metabolitos [55], [67]. Sin embargo, cada uno de estos tiene diferente estequiometría para la formación de biomasa. Es importante recordar que el modelo metabólico tiene que dar cuenta de cada una de las macromoléculas que componen la biomasa y sus consumos de ATP. Además, la suma total de cada uno de los elementos

presentes en estas macromoléculas da como resultado la composición elemental, la cual tiene que ser acorde a la utilizada en la determinación del modelo de caja negra. Si la reacción de biomasa del modelo metabólico da como resultado otra composición elemental diferente a la utilizada en el modelo termodinámico, se tendrán inconsistencias entre ambos modelos. Para evitar estas incoherencias se decide definir tanto la composición elemental y la reacción de biomasa con base en datos publicados.

Con base en la información presente en el Anexo B, se puede escribir la estequiometría de la formación de biomasa ($mol/cmolX$), como se presenta en la reacción **(4-58)**. Su aporte individual, la composición promedio y fórmula genérica de cada uno de estas se determinó utilizando los datos publicados por Neidhardt [68]. Los consumos de ATP asociados a la formación de cada una de las macromoléculas se tomaron de [69].



Además, utilizando la fórmula genérica de cada una de las macromoléculas (Anexo B), la composición elemental para *E. coli* se define en la reacción **(4-59)**. Esta composición es cercana a la reportada en la literatura. Según Roels [70], la fórmula elemental para *E. coli* es $CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}$ y el promedio, teniendo en cuenta más de 10 microorganismos, es $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$.



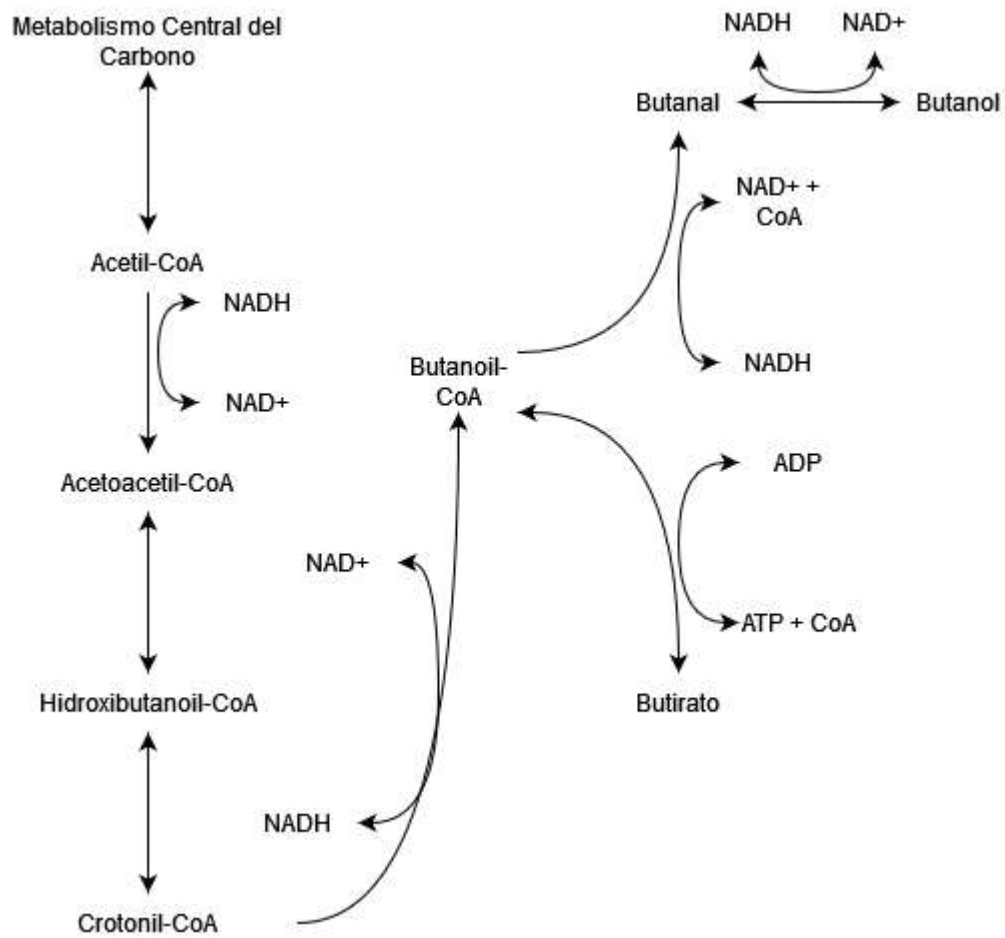
Conocida la reacción de biomasa y su fórmula elemental, el siguiente paso en la reconstrucción del metabolismo de *E. coli* es definir las rutas metabólicas básicas y de interés sobre las cuales se desea realizar el respectivo análisis.

4.3.4 Reconstrucción de las rutas metabólicas de interés

En este trabajo se creó un modelo sencillo *de novo* reconstruyendo las rutas metabólicas requeridas para 3 casos de estudio: (1) Electro-fermentación de butanol y butirato, (2) Electro-fermentación de acetato y propionato y (3) Electro-fermentación de ácido 3-indolacético. La lista completa de ecuaciones para el modelo se encuentra en el Anexo C.

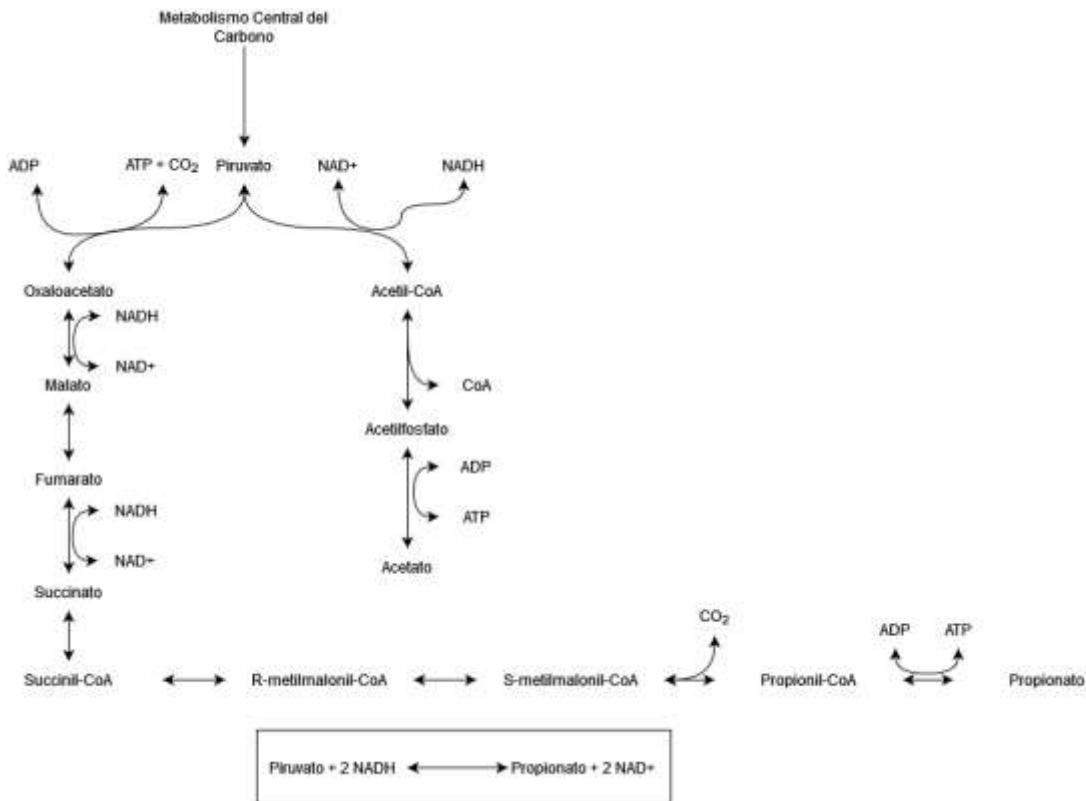
Electro-fermentación de butanol y butirato

En la **Figura 4-5** se describe el metabolismo del Butanol y Butirato en el microorganismo chasis. Es de resaltar que desde Butanoil-CoA el microorganismo puede optar por producir energía biológicamente útil (ATP) a través de la producción de Butirato, o continuar hacia Butanol para retomar el balance de NADH/NAD⁺ al interior del citoplasma y generación de agentes oxidantes (NAD⁺) esenciales en el catabolismo celular

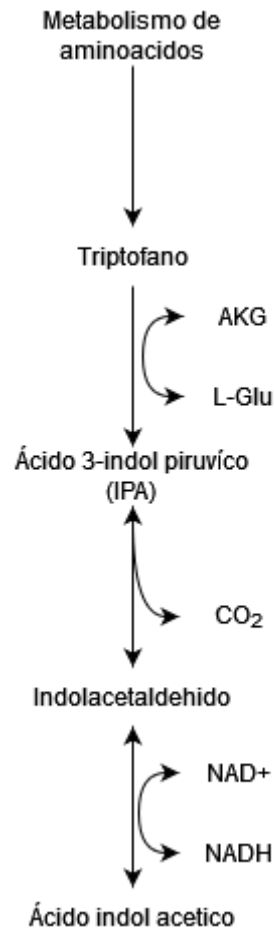
Figura 4-5. Reconstrucción del metabolismo del butanol y butirato.

Las rutas metabólicas que relacionan al propionato y acetato se presentan en la **Figura 4-6**. Nótese que, a partir de piruvato, al producir 1 molécula de Acetato se genera una molécula de NADH por la oxidación de piruvato a acetil-CoA, mientras que, para producir 1 molécula de Propionato, se requieren 2 moléculas de NADH desde el mismo precursor.

Figura 4-6. Reconstrucción del metabolismo del propionato y acetato.



La reconstrucción de la ruta metabólica para la biosíntesis del ácido 3-indolacético se presenta en la **Figura 4-7**.

Figura 4-7. Reconstrucción para la biosíntesis del ácido 3-indolacético

Finalmente, en la **Tabla 4-7**, se presentan cada uno de los procesos con sus respectivas reacciones utilizadas en el modelo metabólico. El análisis de estos casos de estudio según la metodología del Diseño Racional de Bioprocesos e incluyendo la característica de electro-fermentación y las rutas metabólicas que se relacionan se presenta en la sección 4.4 Análisis de casos de estudio y desempeño del desarrollo teórico planteado.

Tabla 4-7. Reacciones de interés incluidas en el modelo metabólico.

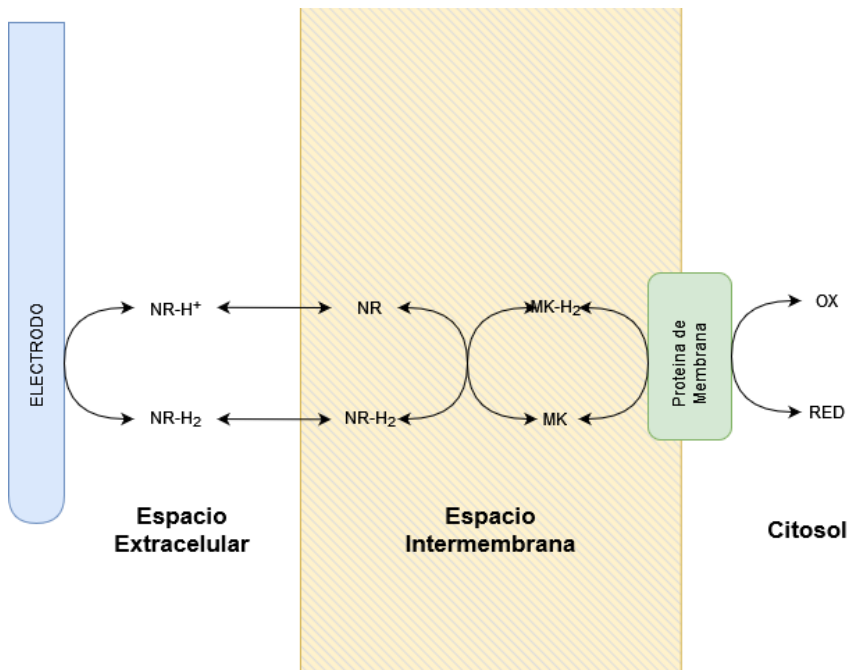
	Código	Descripción	Reacción
Metabolismo Butano/Butirato	<i>ACACT1r</i>	Acetil-CoA C-acetiltransferasa, Tiolasa	$2\text{ accoa}_c \rightleftharpoons \text{coa}_c + \text{aaccoa}_c$
	<i>HACD1i</i>	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	$\text{nad}_c + 3\text{hbcoa}_c \rightleftharpoons \text{nadh}_c + \text{h}_c + \text{aaccoa}_c$
	<i>ECOAH1</i>	3-hidroxiacil-CoA deshidratasa	$3\text{hbcoa}_c \rightleftharpoons \text{b2coa}_c + \text{h2o}_c$
	<i>ACOAD1</i>	Butiril-CoA deshidrogenasa	$\text{b2coa}_c + \text{nadh}_c + \text{h}_c \rightleftharpoons \text{btcoa}_c + \text{nad}_c$
	<i>BTCOAp</i>	Butanoato-CoA ligasa	$\text{btcoa}_c + \text{adp}_c + \text{pi}_c \rightleftharpoons \text{buty}_c + \text{atp}_c + \text{coa}_c$
	<i>BTCOARx</i>	Butiril-CoA reductasa	$\text{btcoa}_c + \text{h}_c + \text{nadh}_c \rightleftharpoons \text{btal}_c + \text{coa}_c + \text{nad}_c$
	<i>ALCD4</i>	Alcohol deshidrogenasa (butanol)	$\text{nad}_c + \text{btoh}_c \rightleftharpoons \text{btal}_c + \text{h}_c + \text{nadh}_c$
Metabolismo Propionato/Acetato	<i>PTAr</i>	Fosfato acetiltransferasa	$\text{accoa}_c + \text{pi}_c \rightleftharpoons \text{actp}_c + \text{coa}_c$
	<i>ACKr</i>	Acetato quinasa	$\text{ac}_c + \text{atp}_c \rightleftharpoons \text{actp}_c + \text{adp}_c$
	<i>PDH</i>	Piruvato deshidrogenasa	$\text{coa}_c + \text{nad}_c + \text{pyr}_c \rightleftharpoons \text{accoa}_c + \text{co2}_c + \text{nadh}_c + \text{h}_c$
	<i>PROPs</i>	Propanoato-CoA ligasa	$\text{pyr}_c + 2\text{ nadh}_c + 2\text{ h}_c \rightleftharpoons \text{prop}_c + 2\text{ nad}_c + \text{h2o}_c$
Metabolismo del Ácido 3-Indolacético	<i>IPAp</i>	IPA aminotransferasa	$\text{tryp}_L_c + \text{akg} \rightleftharpoons \text{glu}_L_c + \text{ipa}_c$
	<i>IAAldp</i>	Indolpiruvato descarboxilasa	$\text{ipa}_c \rightleftharpoons \text{iaald}_c + \text{co2}_c$
	<i>IAAs</i>	Indol-3-acetaldehido:NAD ⁺ oxidorreductasa	$\text{iaald}_c + \text{nad}_c \rightleftharpoons \text{iaa}_c + \text{nadh}_c + \text{h}_c$

4.3.5 Inclusión de las reacciones que intervienen en el transporte extracelular de electrones en el modelo metabólico.

Una vez reconstruidas todas las rutas metabólicas de interés, se requiere definir las reacciones, enzimas y compuestos que intervendrán en el transporte extracelular de electrones y que se incluirán en el modelo metabólico, permitiendo establecer el efecto de la electro-fermentación en la distribución de flujos metabólicos a través del análisis FBA.

Si bien todavía no se conoce a ciencia cierta cuál es el camino que siguen los electrones en la membrana celular, Harrington y colaboradores proponen un mecanismo para la interacción del Rojo Neutral con los electrodos en sistemas bioelectroquímicos utilizando *E. coli* [46]. Un esquema de este sistema se presenta en la **Figura 4-8**.

Figura 4-8. Reacciones que intervienen en el transporte extracelular de electrones en *E. coli*.



La premisa principal se basa en la interacción entre el electrodo de trabajo y un mediador, en este caso, el Rojo Neutral (*NR* o su forma reducida $NR - H_2$). Una vez este mediador ingresa al espacio intermembranal, es reducido por una molécula relacionada con la cadena transportadora de electrones. Esta molécula, puede ser menaquinona (*MK*) o menaquinol (MKH_2), las cuales, a través de una proteína de membrana (no específica, aunque generalmente proteínas tipo *Citrocromos c* [62]), pueden transferir los electrones entre un aceptor o donador interno de electrones (representado por las moléculas con simbología *RED* y *OX*, definiendo el estado reducido y oxidado del aceptor de electrones, respectivamente). En este modelo, no se fijó el mediador utilizado pues es una variable de diseño y depende del tipo de electro-fermentación a realizar, sin embargo, se usó la pareja NADH-NAD como aceptor interno de electrones (reemplazando las moléculas *RED* y *OX* de la **Figura 4-8**). Lo anterior, teniendo en cuenta que la electro-fermentación cambia la relación NADH/NAD al interior celular, afectando el estado redox de la célula y consecuentemente, sus rutas metabólicas [62], [71]. No obstante, estas moléculas en el citosol pueden ser las parejas Fumarato-Succinato, $NO_3^- - NO_2^-$, DMS-DMSO, entre otras [46].

Teniendo en cuenta lo anterior, en la **Tabla 4-8**, se resumen las reacciones adicionadas al modelo para dar cuenta de los electrones transferidos en el proceso de electro-fermentación, siguiendo el esquema de Harrington con las variaciones propuestas.

Tabla 4-8. Reacciones de electro-fermentación incluidas en el modelo metabólico.

Código	Descripción	Reacción
<i>EET</i>	Transporte Extracelular de Electrones	$2 med_red_e + nad_c \rightleftharpoons 2 med_ox_e + nadh_c + h_c$
<i>EMI</i>	Interacción Electrodo-Mediador	$med_red_e + elec_e \rightleftharpoons elec^*_e + med_ox_e + h_e$

Cabe resaltar que en las reacciones *EET* y *EMI* de la **Tabla 4-8**, se describe el transporte de los electrones entre el espacio extracelular y el citoplasma, en donde finalmente interactúan con la pareja de $NAD^+/NADH$. La reacción *EET* se plantea como una reacción global que toma lugar en dos compartimentos diferentes, en donde las moléculas de $NAD^+/NADH$ son metabolitos intracelulares, e interactúan con el mediador (en sus estados reducidos y oxidados) a través de la cadena transportadora de electrones (las reacciones intermedias correspondientes a esta cadena no se incluyen debido a que se utiliza la reacción global). Los electrones contenidos en las moléculas mediadoras posteriormente interactúan con el electrodo a través de la reacción *EMI*, oxidando o reduciendo el electrodo, generando sus dos estados hipotéticos (excitado y fundamental). Lo anterior permitió incluir la electro-fermentación en el modelo metabólico a través de la definición de un ingreso (*influx*) o salida (*efflux*) de electrones, controlando los límites superior e inferior de la reacción *EMI*

4.3.6 Determinación de modificaciones genéticas en *E. coli* para los procesos de interés.

Con base en las rutas de interés reconstruidas y reacciones identificadas en las secciones anteriores, se determinó la presencia o ausencia de las enzimas clave para *E. coli* con el fin de determinar las modificaciones genéticas necesarias para llevar a cabo el proceso. Estos resultados se encuentran en la **Tabla 4-9**.

Tabla 4-9. Genes y enzimas relacionadas con la reconstrucción metabólica en el microorganismo chasis *E. coli*.

	Código	Nombre	E.C	GEN	Organismo
Metabolismo Butanol/Butirato	<i>ACACT1r</i>	Acetil-CoA C-acetiltransferasa, Tiolasa	2.3.1.9	<i>yqeF</i>	<i>E. coli</i>
	<i>HACD1i</i>	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	1.1.1.35	<i>fadB</i>	<i>E. coli</i>
	<i>ECOAH1</i>	3-hidroxiacil-CoA deshidratasa	4.2.1.134	<i>fabB</i>	<i>E. coli</i>
	<i>ACOAD1</i>	Butiril-CoA deshidrogenasa	1.3.8.8	<i>ccr, ter</i>	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>
	<i>BTCOAp</i>	Butanoato-CoA ligasa	6.2.1.2	<i>Tess</i>	<i>E. coli</i>
	<i>BTCOARx</i>	Butiril-CoA reductasa	1.3.8.1	<i>Ter</i>	<i>T. denticola</i>
Metabolismo Propionato /Acetato	<i>ALCD4</i>	Alcohol deshidrogenasa (butanol)	1.1.2.9	<i>Adhs</i>	<i>E. coli</i>
	<i>PTAr</i>	Fosfato acetiltransferasa	2.3.1.8	<i>eutD</i>	<i>E. coli</i>
	<i>ACKr</i>	Acetato quinasa	2.7.2.1	<i>ackA</i>	<i>E. coli</i>
	<i>PDH</i>	Piruvato deshidrogenasa	1.2.4.1	<i>pdH</i>	<i>E. coli</i>
	<i>PROPs</i>	Propanoato-CoA ligasa	6.2.1.17	<i>prpE</i>	<i>E. coli</i>
Metabolismo del Ácido 3- Indolacético	<i>IPAp</i>	IPA aminotransferasa	2.6.1.-	<i>AAT</i>	<i>E. coli</i>
	<i>IAAldp</i>	Indolpiruvato descarboxilasa	4.1.1.74	<i>ipdC</i>	<i>A. brasilense</i>
	<i>IAAs</i>	Indol-3-acetaldehido: NAD ⁺ oxidorreductasa	1.2.1.3	<i>IPyA</i>	<i>A. brasilense</i>
Transporte extracelular de electrones	<i>EET</i>	Transporte Extracelular de Electrones	1.14.15.25 7.1.1.9 7.1.1.8	<i>CymA,</i>	<i>E. coli</i> o <i>S. baltica</i>
	<i>EMI</i>	Interacción electrodo mediador	No Aplica		

4.3.7 Implementación del modelo metabólico de escala genómica

El modelo tiene en cuenta 200 reacciones, 174 metabolitos y 4 compartimentos. Una descripción general del modelo se encuentra en la **Tabla 4-10** y su representación gráfica del metabolismo central en el Anexo C. La lista completa de reacciones y metabolitos se encuentra en los Anexos C y D, respectivamente.

Tabla 4-10. Reacciones clasificadas según su función metabólica.

Función metabólica	N. Reacciones
Metabolismo de aminoácidos	29
Rutas anapleróticas	4
Formación de ATP	3
Biomasa	1
Metabolismo del Butanol	7
Macromoléculas de carbono (Glucógeno)	2
Fijación de Carbono	1
Metabolismo Central del Carbono	12
Formación de DNA	3
Transporte Extracelular de Electrones	2
Cadena Transportadora de Electrones	2
Reacciones desbalanceadas (Exchange Reactions)	20
Productos de Fermentación	6
Metabolismo del Glicerol	5
Reacciones hipotéticas*	2
Metabolismo del Ácido Indolacético	3
Ciclo de Krebs	12
Formación de Lípidos	7
Formación de Lipopolisacáridos	9
Metabolismo de nucleótidos	14
Ruta de las pentosas fosfato	8
Metabolismo del propionato	1
Formación de proteína	2
Balance redox	2
Formación de RNA	3
Descarboxilación de piruvato	2
Transporte a espacio extracelular	20
Transporte al periplasma	18
Total, general	200

*Las reacciones hipotéticas se agregaron al modelo para facilitar la identificación de cualquier déficit de ATP y NADH en determinados escenarios (e.g. $NADH \leftrightarrow NAD^+$ y $ATP \leftrightarrow ADP$), pero se restringió su uso en el análisis final de los casos de estudio para evitar incongruencias en los resultados.

Se incluyó una reacción de fijación de carbono, con base en la ruta de Wood-Ljungdahl, para los casos en donde fuese necesario balancear los carbonos debido a descarboxilaciones o requerimientos adicionales, como el caso de la producción de Ácido Indolacético. No obstante, para el análisis de los datos experimentales se restringió su valor en cada una de las simulaciones. De igual forma, se agregaron 2 reacciones

hipotéticas de formación de ATP y NADH para determinar rápidamente si existían desbalances relacionados con estas dos moléculas.

4.4 Análisis de casos de estudio y desempeño del desarrollo teórico planteado.

Utilizando la red metabólica reconstruida y el modelo termodinámico desarrollado a los cuales se ha incorporado la funcionalidad de electro-fermentación, se realizaron simulaciones en computador para evaluar su desempeño frente a condiciones de proceso de datos reportados en la literatura y las rutas metabólicas ya diseñadas (sin electro-fermentación) desarrollados al interior del semillero de investigación de Intensificación y Racionalización de Bioprocesos (BIRD, por sus siglas en inglés), de la universidad nacional de Colombia. Con base en lo anterior, se analizaron 3 casos de estudio: (1) Electro-fermentación de acetato y propionato investigada por Schuppert y colaboradores [54], (2) Electro-fermentación de butanol y butirato reportada por Choi y colaboradores [51] y finalmente, (3) Electro-fermentación de ácido 3-indolacético, investigada por Pedraza a nivel teórico en el grupo de investigación BIRD [1].

4.4.1 Cambio metabólico completo de Acetato a Propionato por *Propionibacterium acidipropionici*.

Schuppert y colaboradores [54], reportaron una disminución total de la producción de *Acetato* y un aumento de 42% en la producción de *Propionato* al realizar una electro-fermentación con un electrodo polarizado a $-0.47 V$ vs SHE con *P. acidipropionici*. Los datos experimentales se presentan en la **Figura 4-9**, en donde se logró aumentar la concentración final de *Propionato* de 49 mM a 70 mM y disminuir la del *Acetato* de 23 mM a 0 mM.

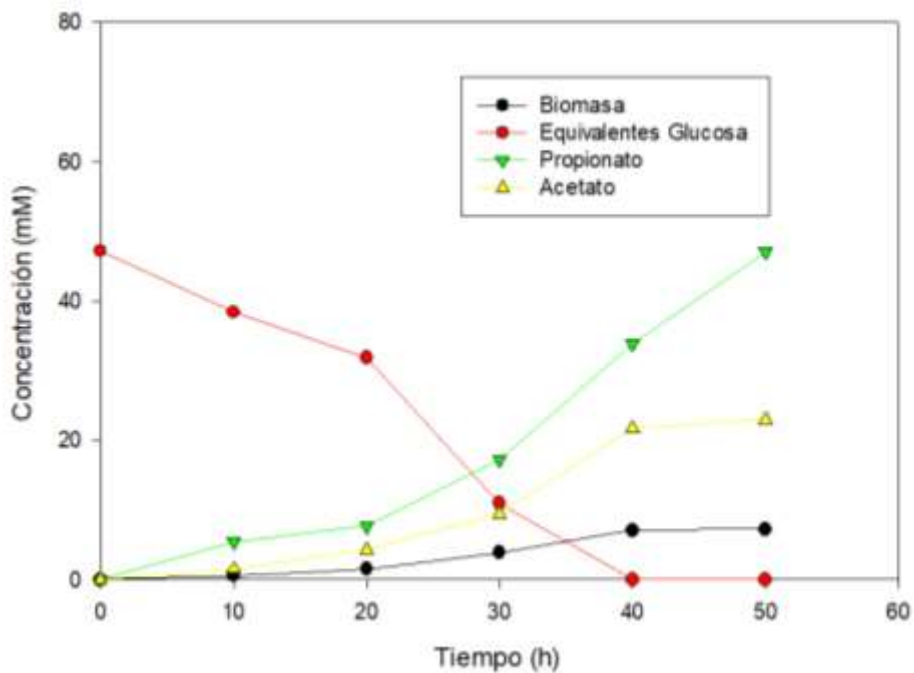
En este estudio se reportó que el *Acetato* y *Propionato* se producen en condiciones basales en una relación de 1:2, respectivamente. Al analizar las rutas metabólicas relacionadas (presentadas en la **Figura 4-6**) se encontró un desbalance de NADH para cada una de estas moléculas (**Tabla 4-11**). La producción de *Acetato* genera un adicional neto de 4 moléculas de NADH, a diferencia de la producción de *Propionato* en donde se presenta un déficit neto de 2 moléculas de NADH. Por lo cual, esta relación 1:2 se presenta en la condición basal (sin electro-fermentación) para permitir el balance de moléculas de NADH entre estas dos rutas metabólicas, en donde, por cada 1 mol de *Acetato* se tienen que producir 2 mol de *Propionato* para lograr un balance en el estado redox de la célula.

Tabla 4-11. Balance de NADH producidos y consumidos en el metabolismo de *P. acidipropionici* para la producción de Acetato y Propionato.

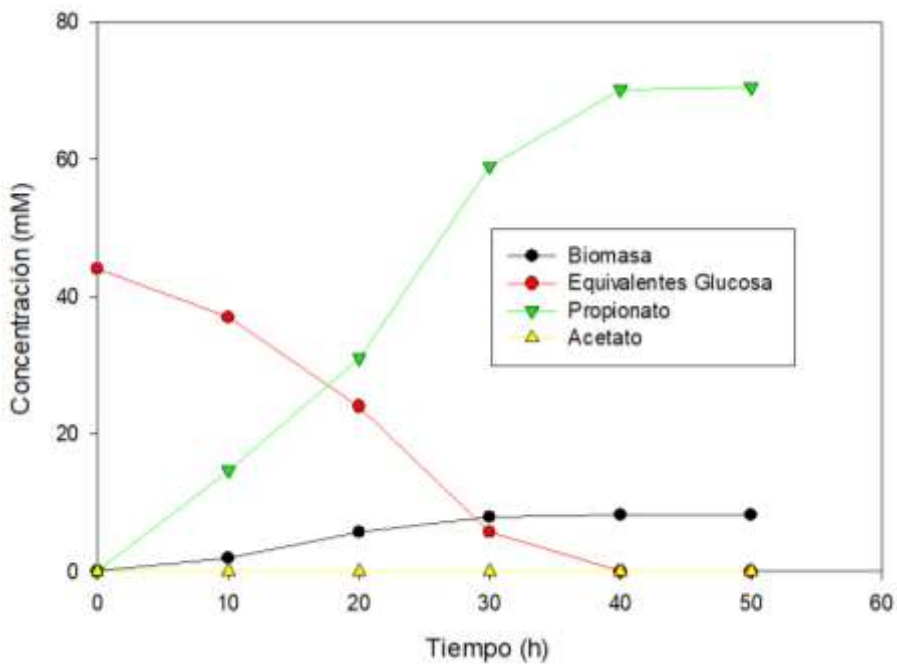
Producto	A partir de 1 mol de Glucosa		
	Generado	Consumido	Neto
Acetato	+4 NADH	0 NADH	+4 NADH
Propionato	+2 NADH	- 4 NADH	- 2 NADH

Figura 4-9. Resultados experimentales para la electro-fermentación por lotes de Glucosa con *P. acidipropionici*. A) Resultados experimentales para fermentación control. B) Resultados experimentales para electro-fermentación (-0.47 vs SHE) .

A)



B)



Adaptado de: [54]

Ahora, siguiendo la metodología propuesta en 4.1.3, en la **Tabla 4-12** se resumen los resultados para la estimación de la reacción catabólica.

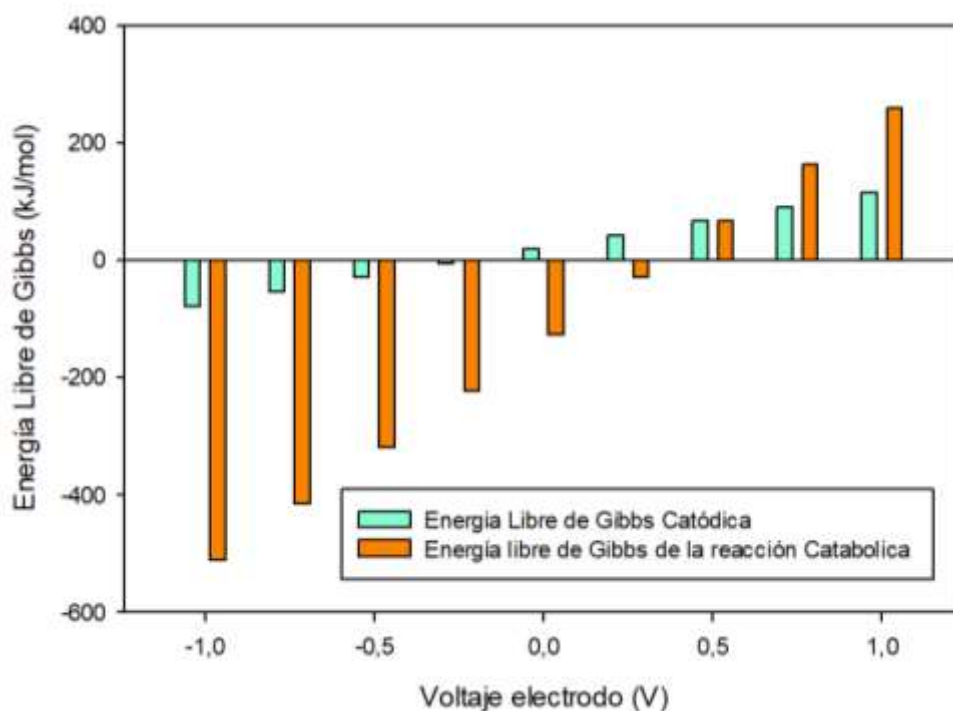
Tabla 4-12. Estimación de la reacción catabólica de *P. acidi-propionici*. para la producción de Acetato y Propionato.

Reacción basal	Reacción balanceada	$-1 \text{ Glu} + \frac{4}{3} \text{ Prop} + \frac{2}{3} \text{ Acet} + \frac{2}{3} \text{ CO}_2 + \frac{2}{3} \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$	
	Coeficientes	$C_{0,S} = -1$	$C_{0,p2} = \frac{4}{3}$
		$C_{0,p1} = \frac{2}{3}$	$C_{0,e} = 0$
Reacción de productos de electro-fermentación	Reacción balanceada	$-1 \text{ Acet} - 6 e^- - \text{CO}_2 + 1 \text{ Prop}$	
	Coeficientes	$C_{EF,p1} = -1$	$C_{EF,e} = -6$
		$C_{EF,p2} = 1$	
Reacción catabólica		$z = 1$	
		$C_{p1} = 0$ ($z = 1$, eliminación completa de P_1)	
	Ecuaciones adicionales	$\frac{C_{elect}}{C_{P_2}} = \frac{C_{0,e} - \left \frac{C_{EF,e}}{C_{EF,P1}} \right * C_{0,P_1} * z}{C_{0,P_2} + \left \frac{C_{EF,P2}}{C_{EF,P1}} \right * C_{0,P_1} * z} = \frac{0 - \left \frac{-6}{-1} \right * \left(\frac{2}{3} \right) * 1}{\frac{4}{3} + \left \frac{1}{-1} \right * \left(\frac{2}{3} \right) * 1} = \frac{-4}{2} = -2$	
	Reacción Balanceada	$-1 \text{ Glu} - 4 \text{ Elec}^* - 2 \text{ H}^+ + 2 \text{ Prop} + 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ Elec}$	
	$\Delta G^{\circ EF}_{catódico}$	-27.02 kJ/mol	
ΔG°_{cat}	-307.66 kJ/mol		

Es importante recalcar que los valores de ΔG°_{cat} para la reacción basal y de electro-fermentación son de -311.27 kJ/mol y -307.66 kJ/mol , respectivamente. En este caso, no se presentó una disminución significativa de la energía libre de Gibbs catabólica debido a que $\Delta G^{\circ EF}_{catódico} = -27.02 \text{ kJ/mol}$, es menor a cero y, por ende, la interacción con el electrodo aporta energía a la reacción catabólica en vez de requerir un gasto energético como en el caso *Butanol – Butirato* explicado más adelante. Lo anterior, se fundamenta en la teoría analizada en la sección 4.1.8 y aplicada a este caso de estudio en la **Figura 4-10**, en donde se presenta que para una electro-fermentación catódica, teniendo en cuenta los potenciales estándar de reducción de las moléculas involucradas, se debería trabajar con electrodos polarizados a valores negativos, en lo posible menores al potencial de reducción del aceptor interno de electrones y las moléculas de la cadena transportadora de electrones (generalmente citocromos) para ayudar a que el proceso de

transferencia extracelular de electrones se dé de manera espontánea y no se vea reflejado en un gasto energético por parte del microorganismo. Es importante recalcar que este proceso se volvería inviable ($\Delta G^{\circ}_{cat} > 0$) para voltajes cercanos a + 0.5 V.

Figura 4-10. Efecto del Voltaje en la Energía Libre de Gibbs de la reacción catabólica en la electro-fermentación de Propionato



Teniendo en cuenta el valor de ΔG°_{cat} de la **Tabla 4-12**, en la **Tabla 4-13**, se presenta el desarrollo de los parámetros para el modelo de caja negra y su correspondiente reacción de biomasa en la reacción **(4-60)**

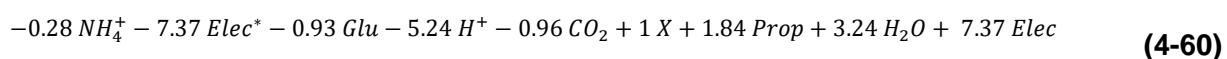


Tabla 4-13. Modelo de caja negra para la producción de Acetato y Propionato.

Cálculo de a_G y a		
Carbonos en sustrato (C)	6	<i>molC/molGlu</i>
Grado reducción sustrato (γ_s)	24	<i>Electrones/molGlu</i>
a_G	236.05	<i>kJ/Cmol - x</i>
Grado reducción biomasa (γ_X)	3.84	<i>Electrones/Cmol - x</i>
a_{cat}	0.77	<i>molGlu/Cmol - x</i>
a_{ana}	0.16	<i>molGlu/Cmol - x</i>
a	0.93	<i>molGlu/Cmol - x</i>
Cálculo m_G y m_s		
m_G	13.40	<i>kJ/Cmolx - h</i>
m_s	0.044	<i>molGlu/Cmolx - h</i>

Finalmente, los coeficientes de *Herbert-Pirt* para cada una de las moléculas involucradas se presentan en la **Tabla 4-14** .

Tabla 4-14. Relaciones de *Herbert-Pirt* para la electro-fermentación de Butanol y Butirato.

Molécula	Coeficiente estequiométrico			Ecuación de <i>Herbert Pirt</i> $\left(\frac{mol_i}{Cmolx.h}\right)$	
	Reacción Catabólica	Reacción Biomasa	Reacción Anabólica		
<i>Glu</i>	-1.00	-0.93	0	$q_S(u) = -0.93 u - 1 m_s$	(4-61)
<i>NH₄</i>	0.00	-0.28	0	$q_N(u) = -0.28 u$	(4-62)
<i>Elec*</i>	-4.00	-7.37	0	$q_{elect_{red}}(u) = -7.37 u - 4 m_s$	(4-63)
<i>Elec</i>	4.00	7.37	0	$q_{elect_{ox}}(u) = -q_{elect_{red}}(u)$	(4-64)
<i>Prop</i>	2.00	1.84	0	$q_{P1}(u) = 1.84 u + 2 m_s$	(4-65)
<i>Acet</i>	0.00	0.00	0	$q_{P2}(u) = 0$	(4-66)
<i>H₂O</i>	2.00	3.24	0	$q_W(u) = 3.24 u + 2 m_s$	(4-67)
<i>H⁺</i>	-2.00	-5.24	0	$q_H(u) = -5.24 u - 2 m_s$	(4-68)
<i>CO₂</i>	0.00	-0.96	0	$q_C(u) = -0.96 u$	(4-69)
<i>X</i>	0.00	1.00	0	$q_X(u) = 1.00 u$	(4-70)

Inicialmente, se planteó analizar la consistencia entre el modelo termodinámico (*Black box*) a comparación del modelo metabólico propuesto con el fin de evaluar la factibilidad metabólica del proceso (**Tabla 4-15**). En este caso, el modelo metabólico describió perfectamente el comportamiento de la reacción catabólica. No obstante, cuando se tuvo en cuenta el crecimiento, se presentó un error de 3.750 % en la estimación de la biomasa. Este error se debe a una limitación del modelo metabólico para producir las macromoléculas debido a un déficit en la producción de NADPH. Cabe resaltar, que producir NADPH a partir de NADH requiere un gasto metabólico en forma de traslocación de protones por medio de la NADH-NADP transhidrogenasa. Este gradiente de protones es producido por las moléculas pertenecientes a la cadena transportadora de electrones en la respiración celular (sea mediada por O_2 o minerales), los cuales, no se encuentran presentes en las condiciones evaluadas. En este orden de ideas, no sería posible

generar nuevo NADPH a partir del NADH generado y utilizar los electrones provenientes del electrodo en rutas con requerimientos de NADPH, es decir, las reacciones anabólicas. Lo anterior, soporta la suposición de no participación de los electrones en este tipo de reacciones, Por último, el error en la estimación de CO_2 tiene un valor aproximado de 0.004 mM de C, equivalentes a los 0.003 mM C representados por el error en la estimación de la biomasa. La pequeña discrepancia entre valores puede ser debido a redondeos en los cálculos realizados.

Tabla 4-15. Comparación de los resultados obtenidos de los modelos de caja negra y modelo metabólico para el cambio metabólico de acetato a propionato por *Propionibacterium acidipropionici*

Molécula	Reacción catabólica (u=0)			Con crecimiento (u=0.08)		
	Relación Herbert-Pirt	Modelo Metabólico	Error relativo	Relación Herbert-Pirt	Modelo Metabólico	Error relativo
<i>S</i>	-1.000	-1.000	0.000%	-0.118	-0.118	0.000%
<i>NH₄</i>	0.000	0.000	0.000%	-0.022	-0.022	0.000%
<i>Elec*</i>	-4.000	-4.000	0.000%	-0.763	-0.763	0.000%
<i>Elec</i>	4.000	4.000	0.000%	0.763	0.763	0.000%
<i>Propionato</i>	2.000	2.000	0.000%	0.234	0.234	0.000%
<i>Acetato</i>	0.000	0.000	0.000%	0.000	0.000	0.000%
<i>H₂O</i>	2.000	2.000	0.000%	0.346	0.346	0.000%
<i>H⁺</i>	-2.000	-2.000	0.000%	-0.507	-0.507	0.000%
<i>CO₂</i>	0.000	0.000	0.000%	-0.077	-0.073	5.195%
<i>X</i>	0.000	0.000	0.000%	0.080	0.077	3.750%

Los datos experimentales reflejan un cambio metabólico completo, sin embargo, tanto el modelo metabólico como el termodinámico, plantearon la posibilidad de modular la relación molar P_1/P_2 según se describe en la **Figura 4-11** con base en el cambio del coeficiente z entre 0 y 1. Es importante reconocer que para modular esta relación molar es importante controlar la cantidad de electrones que se están ingresando al microorganismo. En un sistema de 3 electrodos trabajando como potencióstato, únicamente se puede controlar el voltaje al cual se encuentra polarizado el electrodo y no la corriente eléctrica que pasa por el mismo. No obstante, en este mismo sistema, trabajando como galvanostato, es posible controlar la corriente (electrones) que fluyen a través del sistema. En este orden de ideas, se podría plantear un lazo de control por modelo predictivo, teniendo en cuenta los valores de corriente estimados según la tasa de crecimiento del microorganismo, y establecer para cada momento, la cantidad de corriente necesaria para lograr la relación molar requerida. Sin embargo, para obtener predicciones más acertadas, es necesario recalcular constantemente las relaciones de *Herbert-Pirt*, debido a que, en estos sistemas, el voltaje no es constante, generando cambios en la energía libre de Gibbs catabólica y afectando la estequiometría final del proceso.

Figura 4-11. Relación molar entre Acetato y Propionato como función de z .

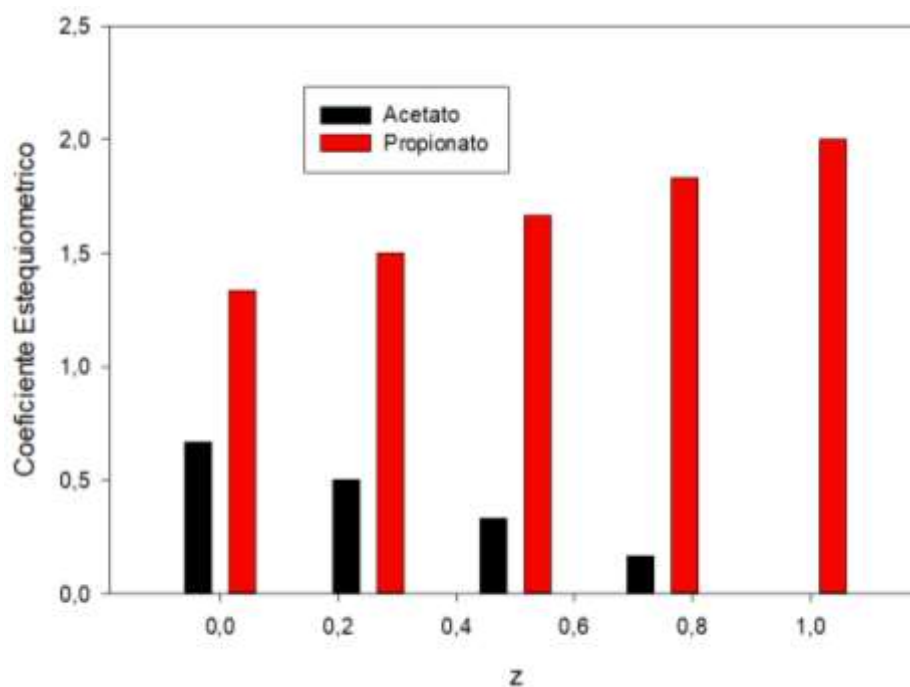
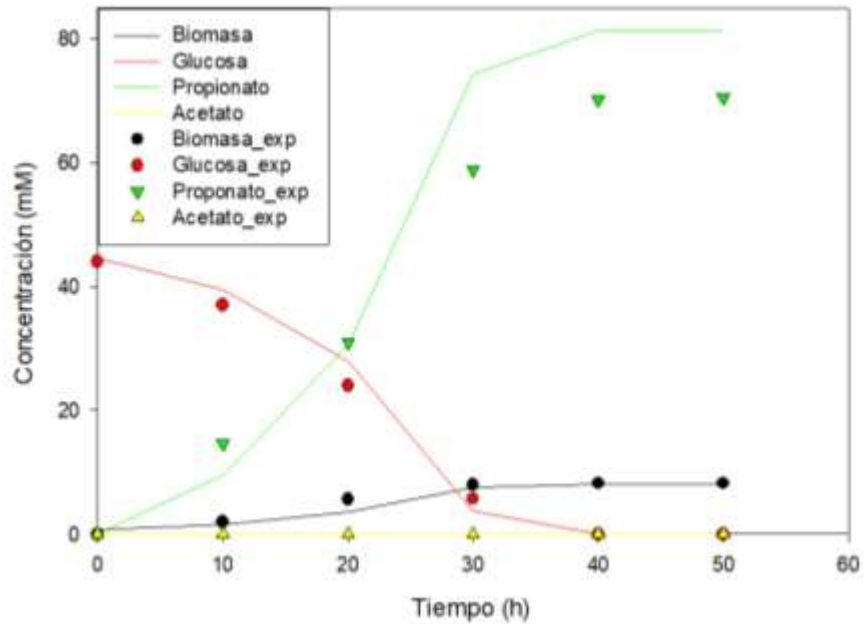
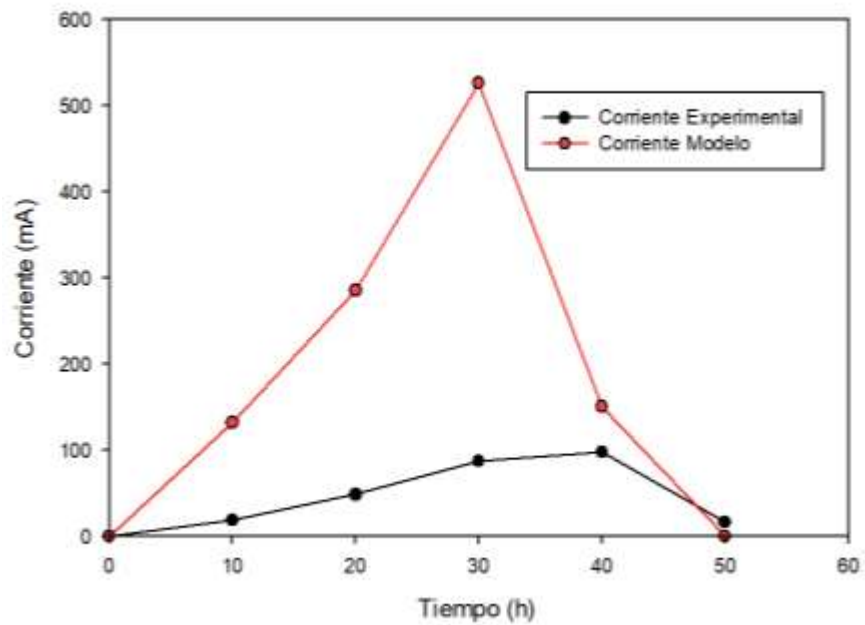


Figura 4-12. Comparación de resultados experimentales con los resultados del modelo obtenido. **A)** Cinética de consumo de sustrato y producción de Propionato. **B)** Perfil de corriente para los datos modelados y experimentales. **C)** Resultados significativos.

A)



B)



C)

	Datos Experimentales Reportados	Modelo	Error relativo
Glucosa [mM]	44.70	44.70	0.00%
Propionato [mM]	70.00	81.37	16.24%
Biomasa [mM]	32.76	32.23	1.61%
Electrones [mM]	95.60	285.06	
Corriente Máxima (mA)	100.00	526.39	-
Balance Carbono^a	90.51%	100.00%	-
Balance Electrones^a	94.64%	100.00%	-

^a En este cálculo se tienen en cuenta los electrones y átomos de carbono incluidos en los productos *Propionato, CO₂ y Biomasa (Biomasa expresada como CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2})* y donados por el electrodo.

Una vez validada la consistencia de los modelos desarrollados, se compararon los resultados con respecto a los datos experimentales (**Figura 4-12**). Con la presente metodología se logró una predicción de los rendimientos finales para Propionato y Biomasa con un error relativo del 16.24% y 1.61%, respectivamente. La corriente máxima requerida para el proceso de electro-fermentación se estimó en 526.39 mA equivalentes a un requerimiento total de 285.06 mM de electrones.

Teniendo en cuenta las moles de carbono, el error en la estimación del propionato es de 34.11 mM de C. No obstante, los datos experimentales reflejan un balance de carbono aproximado del 90.51%, equivalentes a 26 mM de C los cuales no se identificaron en los datos reportados. Además, de la Ec (4-69), se observa que, para el modelo planteado, el CO₂ aparece como reactivo, por lo cual fue necesario la inclusión de la ruta de *Wood-Ljungdahl* para fijación de CO₂ en el modelo metabólico. Según un análisis FBA, la fijación de carbono con esta ruta específica aporta 8.14 mM de C. En este orden de ideas, en las condiciones experimentales, *P. acidi-propionici*, no podría haber fijado estos

átomos de carbono adicionales, por ende, 26mM faltantes de C en el balance más 8.14 mM de Carbono fijados , equivalen a 34.14 mM, muy cercano a la sobreestimación para el propionato de 34.11mM de C. Lo anterior, podría explicar la discrepancia entre el modelo planteado y los datos experimentales reportados para el balance de carbono.

Por otro lado, el modelo arrojó un valor de electrones totales transferidos, aproximadamente $3x$ la cantidad de electrones reportados por el autor (95 mM vs 285 mM, para una diferencia total de aproximadamente 190 mM). No obstante, teniendo en cuenta que, para producir 1 mM de Propionato, se requieren 4 mM de electrones, la cantidad necesaria de electrones para producir el sobrestimado de propionato, es equivalente a 159.18 mM de electrones. Además, en los datos experimentales se presenta un desbalance de electrones estimado de 53.64 mM, por lo cual, a los datos experimentales se le puede adicionar un total aproximado de 212.82 mM de electrones correspondientes a lo requerido para producir 11.37 mM de propionato y a los electrones no incluidos en el balance. Si bien el valor de 212.82 mM no es exactamente igual a la diferencia encontrada de 190 mM, explica en gran parte su variación, disminuyendo el error de la estimación a un 8%.

En la **Figura 4-12.A** , se observa que la sobreestimación de propionato se da entre las horas 20 y 30 de simulación, en dónde se espera se den los requerimientos máximos de corriente eléctrica, debido a la alta velocidad de crecimiento en la etapa exponencial. Lo anterior significa que los 159.18 mM de electrones adicionales requeridos para la producción de propionato, ingresaron al sistema en un periodo aproximado de 10 h, justamente en donde se espera tener el valor de corriente máxima. Utilizando la definición de corriente ($I = \frac{Q}{t}$), en donde $Q = 159.18 \text{ mM } e * 96.485 \frac{C}{\text{mM } e}$ y $t = 36000 \text{ s}$, se obtuvo un valor de 0.426 A o 426 mA. Este valor, corresponde a la diferencia encontrada entre la estimación teórica y la experimental, explicando en gran parte la discrepancia observada entre ellas.

Con base en los resultados anteriores, las eficiencias y parámetros relacionados para el proceso se presentan en la **Tabla 4-16**. Es importante recordar que según Moscoviz y colaboradores [4], el valor η_{EF} tiene que ser un número menor a 1 (<100%) para considerarse una electro-fermentación. En este caso un valor de 23.29 % cumple con este criterio. La eficiencia coulombica suele ser un indicativo que define qué tan bueno es un sistema para generar energía eléctrica útil, por lo cual, en celdas microbianas (MFC) suele buscarse obtener un valor cercano al 100%, en donde todos los electrones incluidos en el sustrato estarían pasando por el electrodo y generando corriente. En el caso de las electro-fermentaciones, se espera que este valor sea bajo (menor al 50%), pues su funcionalidad no es la producción de energía eléctrica, si no el redireccionamiento metabólico, en donde el ejemplo analizado cumple con este criterio (26.94%).

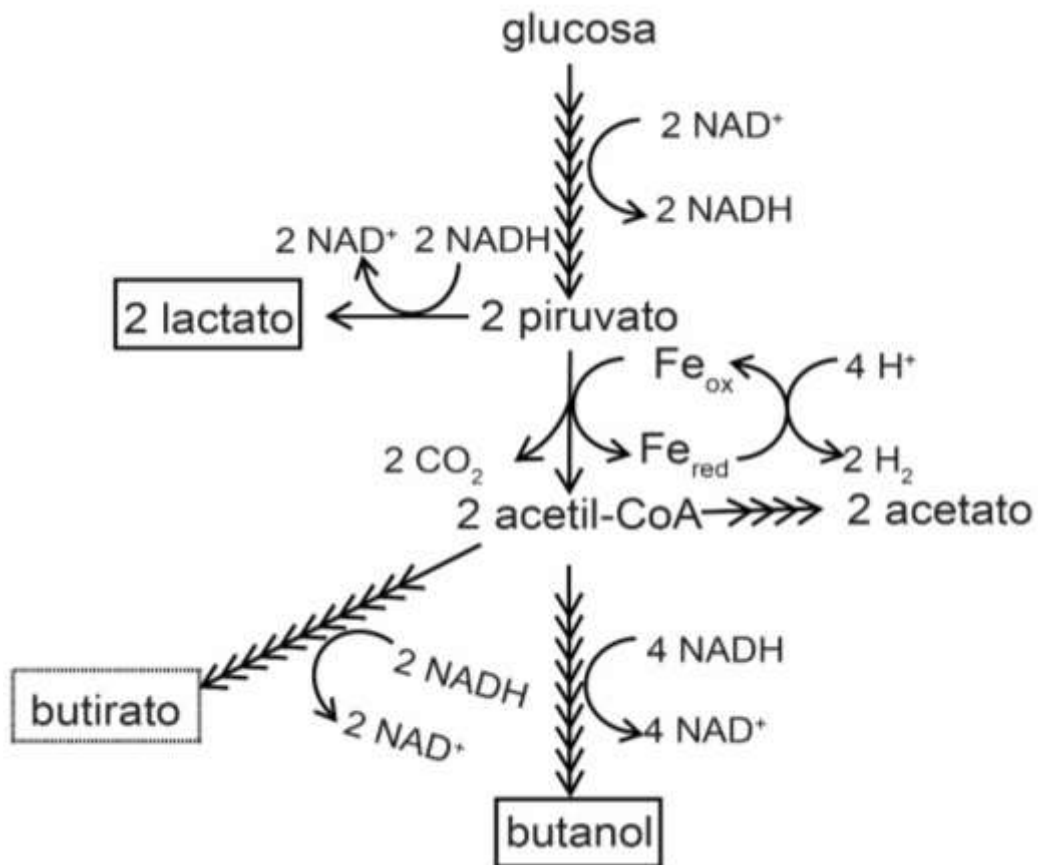
Tabla 4-16. Parámetros y eficiencias asociadas al proceso de electro-fermentación de Propionato.

Parámetro	Valor
q_e^{TOTAL}	$0.763 \frac{mol\ e}{cmolx - h}$
q_I	$20.44 \frac{mA}{cmolx}$
CE	26.94%
η_{EF}	23.29%

4.4.2 Cambio metabólico incompleto para la producción de Butanol y Butirato por *Clostridium pasteurianum*

En los reportes realizados por Choi y colaboradores [51], se presenta una electro-fermentación catódica con electrodo polarizado a +0.045 V vs SHE (Electrodo estándar de hidrógeno, SHE por sus siglas en inglés) utilizando Glucosa como sustrato y el microorganismo *Clostridium pasteurianum*. En este se determinó la concentración de glucosa, butirato, lactato y butanol en la electro-fermentación y se comparó con respecto a un control sin electrodos. Un esquema de la ruta metabólica de este proceso se presenta en la **Figura 4-13**.

Figura 4-13. Reacciones de interés en el metabolismo de *Clostridium pasteurianum*



En este caso, un análisis de la ruta metabólica de *Clostridium pasteurianum* y el balance de la cantidad de NADH producidos y consumidos se encuentra en la **Tabla 4-17**. En esta tabla se observa claramente como el butirato y el lactato son dos productos en los cuales su ruta metabólica se encuentra balanceada en cuanto a la producción de NADH, lo cual significa que, bajo condiciones normales sin electrodo, estos logran producirse sin inconvenientes a partir de glucosa como sustrato. No obstante, para lograr la conversión estequiométrica de la glucosa en butanol se presenta un desbalance por falta de 2 moléculas de NADH. Por ende, para producirlo, es necesario utilizar otras rutas metabólicas de generación de NADH o acoplarse a un segundo producto con un desbalance en la generación de NADH, permitiendo balancear los electrones necesarios para el proceso.

Tabla 4-17. Balance de NADH producidos y consumidos en el metabolismo de *Clostridium pasteurianum* para la producción de butanol, butirato y lactato.

Producto	A partir de 1 mol de Glucosa		
	Generado	Consumido	Neto
Butirato	+2 NADH	- 2 NADH	0
Lactato	+2 NADH	- 2 NADH	0
Butanol	+2 NADH	- 4 NADH	-2
Acetato	+2 NADH	0	+2

Los datos experimentales, para el control y la electro-fermentación se presentan en la **Figura 4-14**. Como se observa en esta figura, se reportó un aumento en la producción de butanol (2.1 a 12.2 mM) y disminución en la producción de ambos butirato y acetato (49.7 a 36.9 mM y 39.6 a 22.9 mM, respectivamente) al realizar la electro-fermentación. Este comportamiento concuerda con un **cambio metabólico incompleto** (Ver ecuaciones (4-30) y (4-29)), en donde se da un cambio de los productos de la fermentación debido a la presencia de electricidad y el cambio en el balance redox

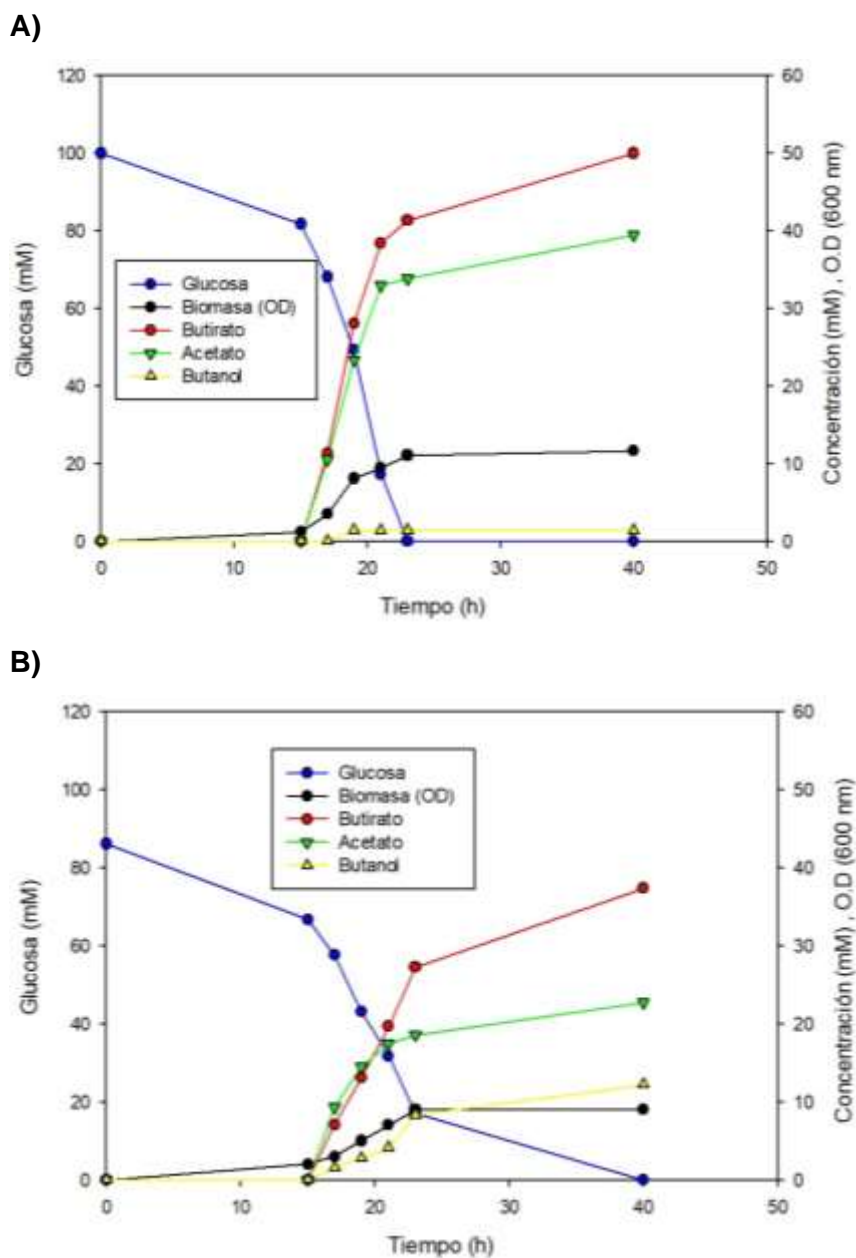
intracelular. Al ingresar electrones al metabolismo celular, se estimula la formación de moléculas de NADH adicionales, las cuales tienen que ser procesadas por rutas metabólicas con desbalance en electrones, en este caso, el metabolismo del Butanol (**Tabla 4-17**), explicando el aumento de su concentración. Además, el acetato en condiciones basales puede estar sirviendo como un sistema de balance redox, para producir poder reductor NADH (al tener una producción neta de +2 NADH). En este orden de ideas, si en la electro-fermentación se producen moléculas adicionales de NADH, se vería disminuida la producción de Acetato. Más aún, es posible que se presente alguna regulación en la expresión génica relacionada con el estado Redox, que modifique la concentración de las enzimas relacionadas con la producción de Acetato, contribuyendo a la disminución en su concentración en comparación al control.

Teniendo en cuenta que la metodología planteada solo estipula el cambio de un solo producto P_1 a un segundo P_2 , se realizó el análisis sobre el cambio total de carbonos en los productos de la fermentación, es decir $c * (\Delta [Acetato]) + c * (\Delta [Butirato])$ en donde c representa el número de carbonos en 1 mol de producto, y $\Delta [i]$ su cambio en la concentración con respecto al control y la electro-fermentación. En este caso, el butirato representó un cambio de 51.2 mM C y el acetato 33.4 mM C , para un cambio total de 84.6 mM C . Además, como el cambio molar fue mayor para el *Butirato*, se escogió como producto P_1 . Por lo cual, se planteó el cambio metabólico incompleto entre *Butirato* y *Butanol*.

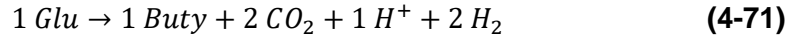
Para la estimación de la reacción catabólica que tenga en cuenta los requerimientos energéticos de la electro-fermentación (Ecuación **(4-2)**) se deben conocer las ecuaciones adicionales para la solución del sistema de ecuaciones, teniendo en cuenta lo siguiente: La concentración del butanol sin presencia de electrones externos es muy baja ($\approx 2 \text{ mM}$), se desprecia su aporte inicial a la ecuación catabólica base. ($C_{ButOH} = 0$ en ecuación **(4-21)**), lo cual dio origen a la reacción**(4-71)**, que representa la oxidación de glucosa en butirato, incluyendo el escape de electrones producido por el complejo de ferredoxinas y producción de H_2 en *Clostridium pasteurianum* (**Figura 4-13**). El trabajo posterior de la metodología del diseño racional de bioprocesos podría proponer para este caso en

específico, alternativas para este complejo de ferredoxinas y sustituirlo por alguna enzima que no presente producción de H_2 y pérdida de electrones, para mejorar los rendimientos del proceso.

Figura 4-14. Resultados experimentales para la electro-fermentación de Glucosa con *Clostridium pasteurianum*. A) Resultados experimentales para fermentación control. B) Resultados experimentales para electro-fermentación (+0.045V vs SHE) .



Adaptado de: [51]



En donde cada uno de estos coeficientes, representa el valor de las variables $C_{0,i}$ presentadas en el desarrollo teórico. Para la estimación de la **relación de productos de electro-fermentación (4-31)**, el valor de los coeficientes $C_{0,P1}$, $C_{0,P2}$ y $C_{0,S}$, se presenta en la **Tabla 4-18**.

Tabla 4-18. Coeficientes $C_{0,i}$ para la relación de productos de electro-fermentación en el estado basal de Butirato a Butanol.

Coeficiente	Valor
$C_{0,S}$ (Sustrato Glu)	-1
$C_{0,P1}$ (Producto 1 Buty)	1
$C_{0,P2}$ (Producto 2 Butanol)	0
$C_{0,e}$ (Electrones requeridos)	0

La reacción de electro-fermentación que dicta la relación entre la producción de Butanol y el consumo de Butirato para *Clostridium pasteurianum* se plantea de forma simplificada en la reacción **(4-72)**. Esta reacción se determinó a partir del análisis de la **Figura 4-13**,



Con base en esta reacción, los coeficientes $C_{EF,i}$ de la reacción **(4-20)** que se necesitan para el cálculo de la ecuación **(4-31)** se presentan en la **Tabla 4-19**. Además, $C_{EF,e}$ se define con la ecuación **(4-34)**, dando lugar a la ecuación **(4-73)**

$$C_{EF,e} = 20 * 1 - 24 * 1 = -4 \quad (4-73)$$

Tabla 4-19. Coeficientes $C_{EF,i}$ par la relación de productos de electro-fermentación en un cambio metabólico completo de Butirato a Butanol.

Coeficiente	Valor
$C_{EF,P1}$ (<i>Producto 1 Buty</i>)	-1
$C_{EF,P2}$ (<i>Producto 2 Butanol</i>)	1
$C_{EF,e}$ (<i>Electrones requeridos</i>)	-4

Ahora, se calculó z con la ecuación (4-30) a partir de los datos experimentales. Se sabe que para *Acetato* y *Butirato* su cambio total en moles de carbono equivale a 84.6 mM C al realizar la electro-fermentación con respecto al control. Además, su concentración basal de moles de carbono es de 278 mM C . Con estos datos, el parámetro z para los datos experimentales pudo estimarse con la ecuación (4-74).

$$z = \frac{(84.6 \text{ mM C})}{[278 \text{ mM C}]} = 0.304 \quad (4-74)$$

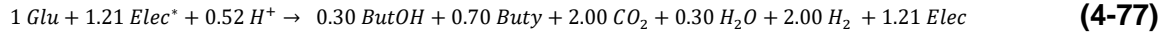
Luego, la **relación de productos de electro-fermentación** se calculó con la ecuación (4-31), dando como resultado la ecuación (4-75)

$$\frac{C_{P1}}{C_{P2}} = \frac{C_{0,P1} - C_{0,P1} * z}{C_{0,P2} + \left| \frac{C_{EF,P2}}{C_{EF,P1}} \right| * C_{0,P1} * z} = \frac{1 - 1 * 0.304}{0 + \left| \frac{1}{-1} \right| * 1 * 0.304} = 2.29 \quad (4-75)$$

Además, la **relación de electrones** (Ecuación (4-37) para electro-fermentación catódica) se presenta en la ecuación (4-76)

$$\frac{C_{elect}}{C_{P_2}} = \frac{C_{0.e} - \left| \frac{C_{EF.e}}{C_{EF.P1}} \right| * C_{0.P1} * Z}{C_{0.P_2+} \left| \frac{C_{EF.P2}}{C_{EF.P1}} \right| * C_{0.P1} * Z} = \frac{0 - \left| \frac{-4}{-1} \right| * 1 * 0.304}{0 + \left| \frac{1}{-1} \right| * 1 * 0.304} = -4 \quad (4-76)$$

Definidas las ecuaciones adicionales necesarias para resolver los balances elementales, la reacción catabólica para la electro-fermentación de butirato y butanol se presenta en la reacción (4-77). Cabe resaltar que en esta ecuación no se refleja de forma explícita el posible cambio del *Acetato*, toda vez que asumimos que el cambio metabólico ocurre solamente desde butirato a butanol. No obstante, hay que recalcar que el aporte del acetato se tuvo en cuenta al momento de calcular el parámetro z .



El valor de energía libre de Gibbs para una electro-fermentación catódica se calcula utilizando las ecuaciones (4-14) y (4-13). Inicialmente el modelo no plantea producción de ATP en el mecanismo de transporte extracelular de electrones ($y = 0$). El aceptor interno de electrones según el mecanismo escogido es el NADH ($x = 2$, $E^{\circ}_{AIE} = -0.32 \text{ V}$, $\Delta G^{\circ}_{f \text{ AIE}_{ox}} = -2215.428 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$, $\Delta G^{\circ}_{f \text{ AIE}_{red}} = -2244.716 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$) y el voltaje del electrodo de trabajo según reportado es +0.045V vs SHE.

$$\Delta G^{\circ}_{anodico} = - \frac{\Delta G^{\circ}_{f \text{ AIE}_{ox}} - \Delta G^{\circ}_{f \text{ AIE}_{red}} + y * \Delta G^{\circ}_{ATP} - E^{\circ}_{AIE} * f * x + f * V_{Electrodo} * x}{x} = -22.66 \text{ kJ/mol} \quad (4-78)$$

$$\Delta G^{\circ}_{catódico} = -\Delta G^{\circ}_{anódico} = 22.66 \text{ kJ/mol} \quad (4-79)$$

Teniendo en cuenta las energías libres de Gibbs de formación para los demás compuestos presentes (Anexo E), la energía libre de Gibbs catabólica (Ecuaciones **(2-3)** y **(2-4)**) para la reacción **(4-77)** se presenta a continuación

$$\Delta G^{\circ}_{cat} = -187.56 \text{ kJ/molS} \quad \text{(4-80)}$$

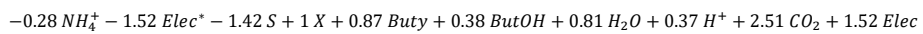
Es importante, recalcar que, en este caso, ΔG°_{cat} cumple con la siguiente condición $\Delta G^{\circ}_{cat} > \Delta G^{\circ}_{basal} \left(-224.11 \frac{\text{kJ}}{\text{molS}} \right)$. Este valor corresponde a la energía libre de Gibbs de la oxidación anaeróbica completa de glucosa a butirato (condición basal), el cual, en términos absolutos ($|\Delta G^{\circ}|$), es mayor al valor de la energía libre de Gibbs de la reacción catabólica al incluir la electro-fermentación $\left(224.11 \frac{\text{kJ}}{\text{molS}} > 187.56 \frac{\text{kJ}}{\text{molS}} \right)$, por lo cual **la adición de electrones al metabolismo celular y redireccionamiento de las rutas metabólicas mediante electro-fermentación requiere de un consumo de energía útil para el caso evaluado con respecto a su condición basal.**

Con este valor de ΔG°_{cat} se calcularon los parámetros para estimar la estequiometría del proceso y las relaciones de *Herbert-Pirt*, como se desarrolló en la sección 4.1.4. En la **Tabla 4-20** se presentan los resultados de la estimación de parámetros y las reacciones asociadas. Tanto el Butanol como Butirato son productos catabólicos, por lo cual, desde un inicio no se planteó la síntesis de producto anabólico ($b = 0$).

Tabla 4-20. Parámetros de proceso para la electro-fermentación de Butanol y Butirato.

Cálculo de a_G y a		
Carbonos en sustrato (C)	6	<i>molC/molGlu</i>
Grado reducción sustrato (γ_s)	24	<i>Electrones/molGlu</i>
a_G	236.05	<i>kJ/Cmol - x</i>
Grado reducción biomasa (γ_X)	3.84	<i>Electrones/Cmol - x</i>
a_{cat}	1.26	<i>molGlu/Cmol - x</i>
a_{ana}	0.16	<i>molGlu/Cmol - x</i>
a	1.42	<i>molGlu/Cmol - x</i>
Cálculo m_G y m_s		
m_G	13.40	<i>kJ/Cmolx - h</i>
m_s	0.071	<i>molGlu/Cmolx - h</i>

Teniendo en cuenta los parámetros anteriores, la estequiometría de la reacción de biomasa se presenta en la reacción **(4-81)** .

**(4-81)**

Finalmente, los coeficientes de *Herbert-Pirt* para cada una de las moléculas involucradas se presentan en la **Tabla 4-21**.

Tabla 4-21. Relaciones de *Herbert-Pirt* para la electro-fermentación de Butanol y Butirato.

Molécul a	Coeficiente estequiométrico			Ecuación de <i>Herbert Pirt</i> $\left(\frac{mol_i}{Cmol \cdot h}\right)$	
	Reacción Catabólica	Reacción Biomasa	Reacción Anabólica		
S	-1.00	-1.42	0	$q_S(u) = -1.42 u - 1.00 m_s$	(4-82)
NH ₄	0.00	-0.28	0	$q_N(u) = -0.28 u$	(4-83)
Elec*	-1.22	-1.53	0	$q_{elect_{red}}(u) = -1.53 u - 1.22 m_s$	(4-84)
Elec	1.22	1.53	0	$q_{elect_{ox}}(u) = -q_{elect_{red}}(u)$	(4-85)
Butirato	0.70	0.87	0	$q_{P1}(u) = 0.87 u + 0.70 m_s$	(4-86)
Butanol	0.30	0.38	0	$q_{P2}(u) = 0.38 u + 0.30 m_s$	(4-87)
H ₂ O	0.30	0.84	0	$q_W(u) = 0.84 u + 0.30 m_s$	(4-88)
H ⁺	-0.52	-0.37	0	$q_H(u) = -0.37 u - 0.52 m_s$	(4-89)
CO ₂	2.00	2.49	0	$q_C(u) = 2.49 u + 2.00 m_s$	(4-90)
X	0.00	1.00	0	$q_X(u) = 1.00 u$	(4-91)

Para comprobar la factibilidad de estas relaciones, se presenta su comparación con respecto al modelo metabólico *in silico*, en la **Tabla 4-22**.

Tabla 4-22. Comparación de los resultados obtenidos del modelo de caja negra y modelo metabólico

Molécula	Sin crecimiento ($\mu = 0$)			Con crecimiento ($\mu = 0.08$)		
	Relación Herbert-Pirt	Modelo Metabólico	Error relativo	Relación Herbert-Pirt	Modelo Metabólico	Error relativo
<i>S</i>	-1.000	-1.000	0.000%	-0.426	-0.426	0.000%
<i>NH₄</i>	0.000	0.000	0.000%	-0.070	-0.066	5.714%
<i>Elec*</i>	-1.216	-1.216	0.000%	-0.467	-0.465	0.428%
<i>Elec</i>	1.216	1.216	0.000%	0.467	0.465	0.428%
<i>Butirato</i>	0.696	0.696	0.000%	0.267	0.267	0.000%
<i>Butanol</i>	0.304	0.304	0.000%	0.117	0.117	0.000%
<i>H₂O</i>	0.304	0.304	0.000%	0.224	0.224	0.000%
<i>H⁺</i>	-0.520	-0.520	0.000%	-0.130	-0.131	-0.769%
<i>CO₂</i>	2.000	2.000	0.000%	0.770	0.785	-1.948%
<i>X</i>	0.000	0.000	0.000%	0.250	0.236	5.600%

En este análisis se obtuvo un error en la estimación de la biomasa de aproximadamente 5.6%, equivalentes aproximadamente a 0.014 mM de biomasa. Este desbalance es debido a la falta de reacciones relacionadas con la fijación de CO_2 producto de descarboxilaciones, los cuales representan una fuga de carbonos para el sistema, explicando la sobrestimación en la producción de CO_2 (0.015 mM C) y disminuyendo el rendimiento de la biomasa. Este error, genera un efecto directo sobre la estimaciones del NH_4^+ , en donde el error de 0.004 mM de esta molécula son las requeridas para formar 0.014 mM de biomasa faltantes. Finalmente, la diferencia en la estimación de los electrones requeridos en el sistema puede ser debido a la incertidumbre de los cálculos debido a los decimales.

Con estas relaciones $q_i(u)$ de la **Tabla 4-21**, se estimó la corriente necesaria para la electro-fermentación (Revisar ecuación **(4-52)**) y sus eficiencias asociadas (Revisar ecuaciones **(4-54)** y **(4-55)**). El valor η_{EF} de la ecuación **(4-95)** tiene un valor de 5.7 % y cumple con el criterio propuesto por Moscoviz y colaboradores [4]. De igual forma, el valor de CE (Ec **(4-94)**) demuestra una baja producción de energía eléctrica útil con un valor de 4.6%.

$$q_eTOTAL = 0.467 \frac{mol_e}{Cmol_X-h} \quad (4-92)$$

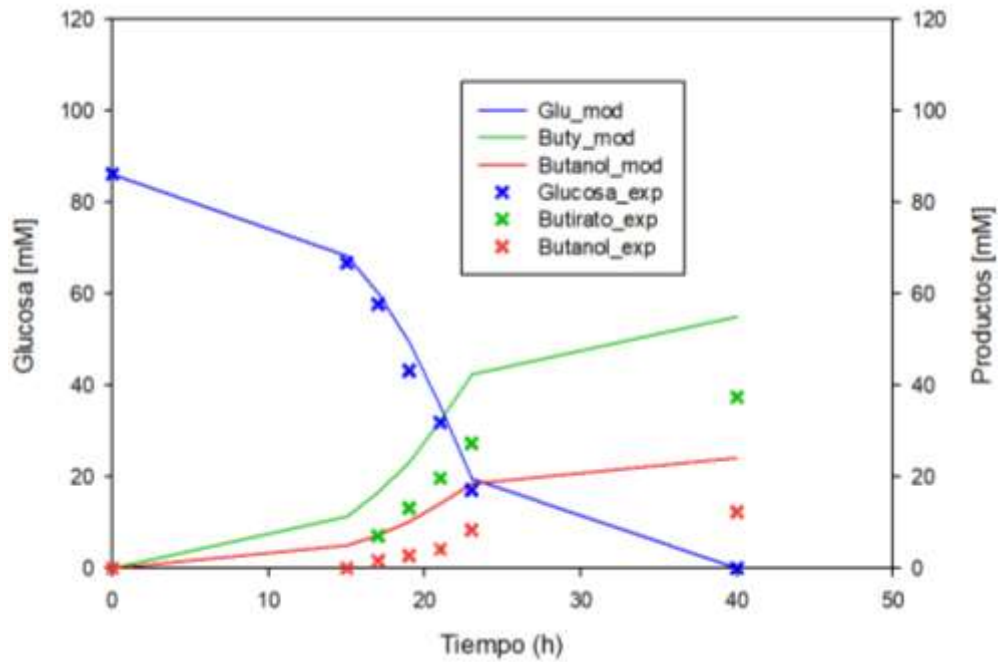
$$q_I = \frac{q_eTOTAL}{3600} * f = \frac{0.339}{3600} * 96485.33 = 12.5162 \frac{mA}{Cmol_x} \quad (4-93)$$

$$CE = \frac{q_eTOTAL}{|q_S| * \gamma_S} = \frac{0.467}{0.426 * 24} = 0.046 = 4.6\% \quad (4-94)$$

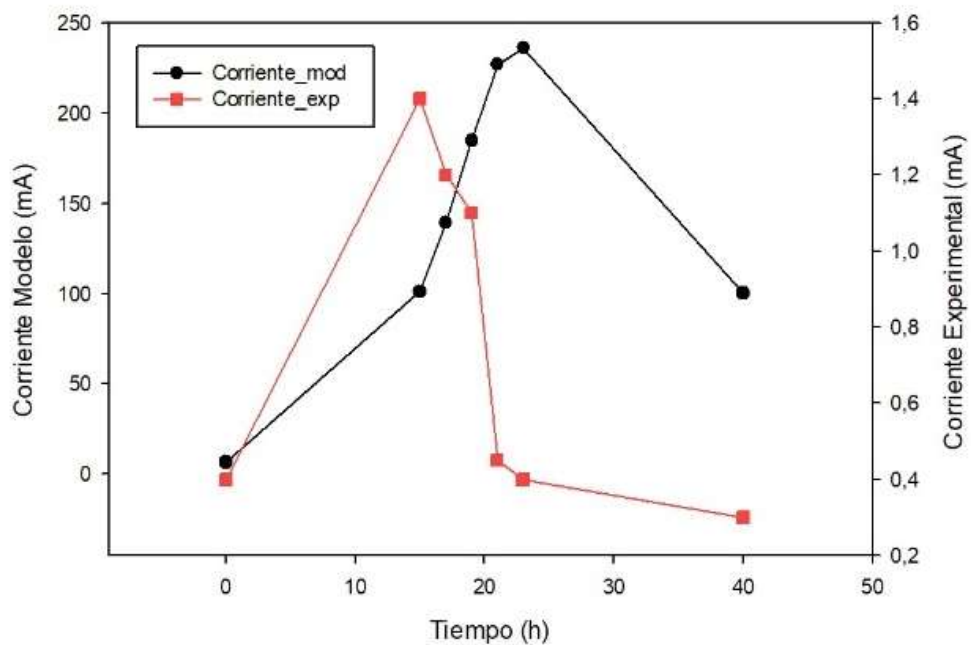
$$\eta_{EF} = \frac{q_eTOTAL}{\gamma_{P1}q_{P1} + \gamma_{P2}q_{P2} + \gamma_{P3}q_{P3}} = \frac{0.467}{20 * 0.267 + 24 * 0.117} = 0.057 = 5.7\% \quad (4-95)$$

Figura 4-15. Comparación de resultados experimentales con los resultados del modelo obtenido. **A)** Cinética de consumo de sustrato y producción de butirato y butanol. **B)** Perfil de corriente para los datos modelados (Eje Izquierdo) y datos experimentales (Eje Derecho). **C)** Resultados significativos.

A)



B)



C)

	Datos Experimentales	Modelo	Error relativo
Glucosa [mM]	86.17	86.17	0%
Butirato [mM]	37.39	55.01	47%
Butanol [mM]	12.23	24.03	96%
μ_{max} (h^{-1})	0.25	0.234	1%
Corriente Máxima (mA)	1.44	236.04	-
Balance Carbono^a	78.92%	100%	-
Balance Electrones^a	75.10%	100%	-

^a En este cálculo se tuvieron en cuenta los electrones y átomos de carbono incluidos en los productos *Butanol*, *Butirato*, *Acetato*, CO_2 , *Biomasa* y H_2 . Los valores para CO_2 , *Biomasa* y H_2 producidos en condiciones experimentales se tomaron de los datos reportados en la información adicional del artículo. Para el modelo teórico, se incluyó en la simulación la ecuación correspondiente a q_{CO_2} y q_{H_2} .

En la **Figura 4-15** se muestran los resultados de una simulación dinámica utilizando los valores $q_i(u)$ de la **Tabla 4-21** y su comparación con los datos experimentales. Como no se disponía de valores en mM de biomasa inicial, se realizaron varias simulaciones hasta obtener valores cercanos a los datos experimentales.

De manera general, se encontró que el modelo planteado describe el comportamiento del consumo de sustrato. No obstante, para los productos (butirato y butanol), el modelo sobrestima los valores obtenidos comparados con los datos experimentales (de 37.39 a 55.01 mM y 12.23 a 24.03 mM para el butirato y butanol, respectivamente). Es importante recalcar que la estimación a partir del diseño racional de bioprocesos es una aproximación a los máximos teóricos posibles. Señalando así, la concentración máxima que se podría alcanzar en un escenario sin ineficiencias ni pérdidas de energía. No obstante, se realizó un balance de carbonos para los datos experimentales con una recuperación de aproximadamente el 78.92%, lo que se transforma 108.94 mM de

Carbono que hacen falta en el sistema y se redistribuyeron en productos de fermentación no analizados. Además, la sobreestimación entre las concentraciones de butirato y el butanol de los datos experimentales y teóricos equivale a 117.68 mM de Carbono, por lo cual, se plantea que esta sobreestimación en concentraciones es debido a las pérdidas en carbono no cuantificadas en los datos experimentales y que son tenidas en cuenta en los balances teóricos para la producción de butirato y butanol.

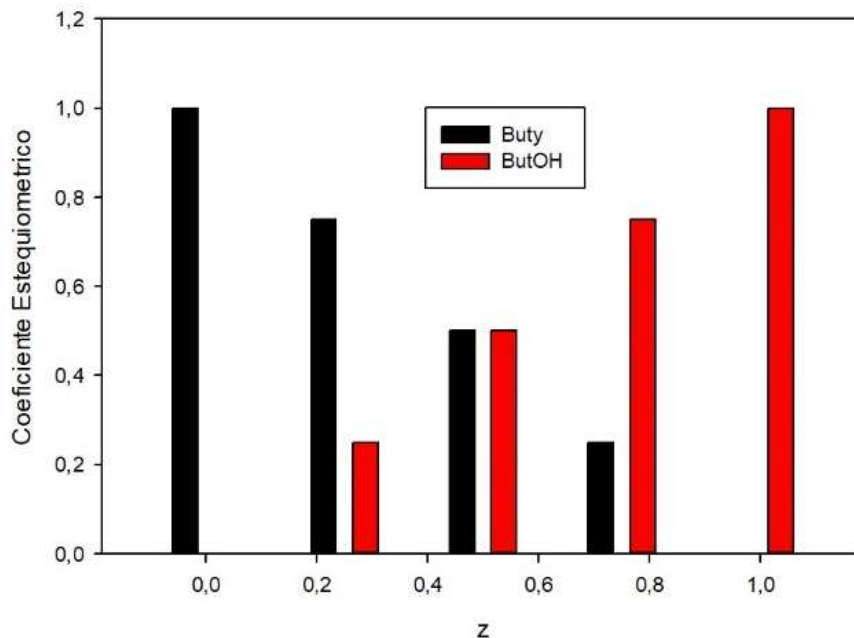
En el caso de los electrones, se evidencia como el modelo sobrestimó la corriente necesaria para el cambio metabólico en $\approx 150x$ el valor experimental (236 mA para el desarrollo teórico vs 1.4 mA para los datos experimentales). No obstante, de igual forma que en el balance de carbonos, el balance de electrones para los datos experimentales determina una recuperación de electrones de aproximadamente el 75.10%, presentando un desbalance de aproximadamente 514 mM de electrones que se distribuyeron en el metabolismo celular en productos diferentes a los determinados experimentalmente, no obstante, para la realización del cambio metabólico se requieren únicamente 48.8 mM de electrones, los cuales bajo el planteamiento presentado provienen únicamente del electrodo, sin embargo, en condiciones experimentales pueden haber sido suministrados por algún cambio metabólico en una de las rutas correspondientes a los productos no medidos y explicarían la poca corriente requerida en el proceso.

Además, puede existir un ingreso de electrones no cuantificado debido a la presencia de compuestos químicamente no definidos en el medio de cultivo y que no son tomados en cuenta en los balances de electrones (inclusive de carbonos) como el extracto de levadura (e.g 1 g/L de extracto de levadura aporta aproximadamente 175mM de electrones), aminoácidos, peptona, etc. Siguiendo esta lógica es necesario plantear diseños experimentales con medios químicamente definidos con mediciones de metabolitos que permitan un balance de carbono y electrones con recuperaciones cercanas al 100% para complementar, revisar y revalidar el modelo planteado.

Ahora bien, entendiendo que la cadena transportadora de electrones se utiliza para transferir electrones desde un donador a un receptor o viceversa, la selectividad de los complejos enzimáticos por esta pareja donadora/receptora y la cantidad de los mismos, interfieren en el proceso de transferencia de electrones [7]. En este orden de ideas, es lógico pensar, por ejemplo, que la selectividad de los citocromos C en la membrana celular por el Oxígeno, no es la misma que al ferrocianuro, además de sus diferencias en potencial de reducción ($O_2 = +0.86 V$ vs SHE, Ferrocianuro = $+0.453 V$ vs SHE inclusive con el $Fe^{+3} = +0.77 V$ que utilizan las bacterias reductoras de metales), todo esto, disminuyendo la energía libre de Gibbs disponible, la efectividad del proceso de electro-fermentación, la corriente relacionada y eficiencias coulombicas, pues los microorganismos no se encuentran optimizados para su interacción con electrodos sólidos.

Si bien la hipótesis principal de la electro-fermentación se basa en el desbalance de la relación NADH/NAD⁺ [29], [44], [52], [71], son varios los reportes de autores en donde se reportan incrementos en los rendimientos mayores al máximo posible que se puede alcanzar con la corriente y electrones medidos en los sistemas experimentales (como lo es el caso reportado de Butanol y Butirato). Sin embargo, el modelo metabólico confirma que la adición de electrones al metabolismo celular realiza un cambio metabólico proporcional a la cantidad de electrones ingresada para mantener balanceado el estado redox. En la **Figura 4-16**, se describe cómo puede variar la proporción entre Butanol y Butirato como función del coeficiente z al ingresar electrones al sistema.

Figura 4-16. Cambios en los coeficientes estequiométricos del Butanol (ButOH) y Butirato (Buty) como función del coeficiente z .



Con base en lo anteriormente expuesto, se puede plantear como objeto de nuevas investigaciones la realización de experimentos con cinéticas de cultivo en medios químicamente definidos en donde se tenga resuelto el balance de carbonos y electrones en una cantidad cercana al 100% para dar cuenta del flujo correcto de los electrones al interior y exterior celular. De esta forma se podría confirmar lo encontrado y definido en el modelo metabólico y en la estequiometría de los procesos de electro-fermentación. Adicionalmente, para estos procesos, se podría evaluar la expresión heteróloga de diferentes complejos de transporte de electrones y su efecto en la corriente generada.

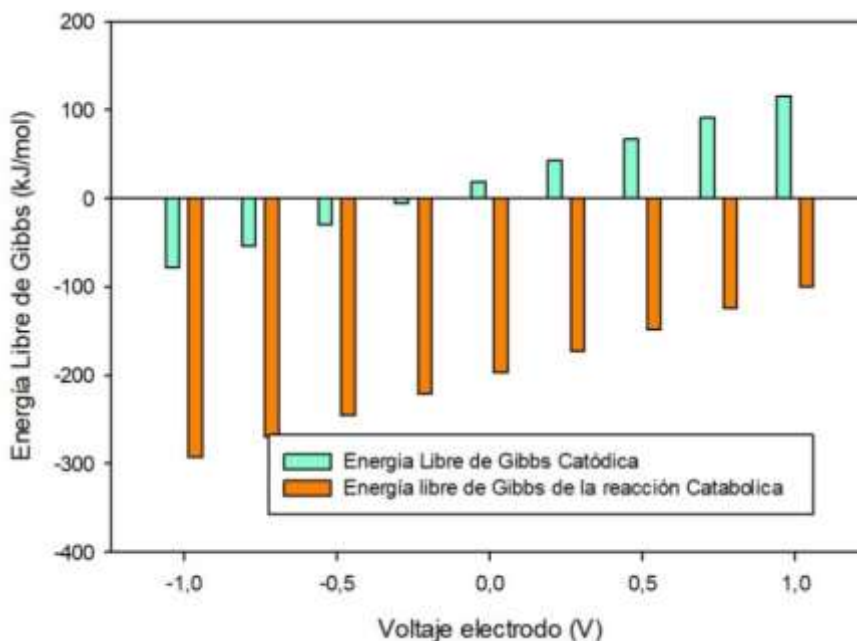
Efecto del voltaje en la energía libre de Gibbs catabólica

Según la ecuación (4-14), se plantea una relación directa del voltaje aplicado $V_{electrodo}$ y la energía libre de Gibbs de formación del electrodo. El valor de esta energía y su efecto en la energía catabólica con base en diferentes escenarios para la electro-fermentación de Butanol y Butirato se presentan en la **Figura 4-17**.

Como es de esperarse, entre menor sea el voltaje al cual se ha polarizado el electrodo, con mayor facilidad donará los electrones y la energía libre de Gibbs catabólica será mayor. Existe un punto de voltaje en el proceso de transferencia extracelular de electrones en el cual, en vez de consumir energía, puede aportarla, actuando como una fuente adicional de energía útil para la célula y aumentar el valor de energía libre de Gibbs. Lo anterior, plantea un criterio de diseño muy importante en las electro-fermentaciones pues el voltaje al cual se polarice el electrodo afectara de forma positiva o negativa la energía libre de Gibbs disponible y, por ende, la estequiometría del proceso, sus rendimientos y productividades.

Es importante reconocer que, de forma general, se busca reducir el valor del parámetro α para aumentar el valor del coeficiente estequiométrico de los productos de fermentación, por lo tanto, si la electro-fermentación tiene un efecto positivo en el catabolismo y aumenta la energía libre de Gibbs catabólica (en vez de disminuirla), se logra una disminución en el parámetro α_{cat} y por consiguiente en el parámetro α .

Figura 4-17. Efecto del Voltaje en la Energía Libre de Gibbs de la reacción Catabólica para la electro-fermentación de Butanol y Butirato.



4.4.3 Generación de ATP mediada por electro-fermentación de glicerol para la producción de Ácido 1-3 Indolacético

El presente caso de estudio se analiza en aras de solucionar las limitaciones metabólicas y de energía biológica útil (ATP) encontradas por Pedraza [1], en el diseño *in silico* de un proceso de valoración del glicerol (*Gly*) en Ácido 1-3 Indolacético (AIA). Esta sección se realizó con un enfoque diferente a los dos casos anteriores, pues su objetivo es revisar la capacidad de la electro-fermentación para solucionar problemas encontrados previamente en los diseños *in-silico*, relacionados con un desbalance específico y esclarecer el posible efecto negativo o positivo de su aplicación.

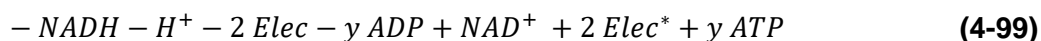
En la **Tabla 4-23**, se muestra la reacción catabólica según resultados de simulaciones FBA y el modelo de caja negra para la producción de AIA desde *Gly*. Las reacciones (4-96) y (4-97) se basan en los resultados de Pedraza utilizando como microorganismo chasis *Azospirillum brasilense*. En esta reacción únicamente se presenta déficit de ATP y

el estado redox se encuentra balanceado (tanto NADH como NADPH). La reacción **(4-98)** es la estimada utilizando el modelo desarrollado en el presente trabajo. En esta se encontró un déficit de ATP mayor (4.3 mol), debido a que el presente modelo no permite producción de ATP relacionado con la ATP sintasa. La inclusión del compartimento periplásmico permite incluir la producción de ATP únicamente por los protones trasladados a dicho compartimento e ignora los expulsados al espacio extracelular como resultado del transporte por simportador de moléculas cargadas.

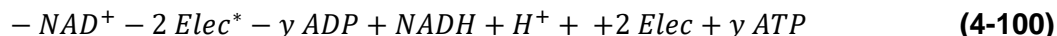
Tabla 4-23. Reacción catabólica para la producción de AIA a partir de Glicerol.

Modelo	Ref.	Reacción catabólica	Ec
Termodinámico	[1],	$-Gly - \frac{1}{3} NH_4^+ - \frac{1}{3} CO_2 + \frac{1}{3} AIA^- + 3 H_2O + \frac{2}{3} H^+$	(4-96)
Metabólico	[1],	$-Gly - \frac{1}{3} NH_4^+ - 3.7 ATP - \frac{1}{3} CO_2 + \frac{1}{3} AIA^- + 3 H_2O + \frac{2}{3} H^+ + 3.7 ADP$	(4-97)
Metabólico	Este Trabajo	$-Gly - \frac{1}{3} NH_4^+ - 4.3 ATP - \frac{1}{3} CO_2 + \frac{1}{3} AIA^- + 3 H_2O + \frac{2}{3} H^+ + 4.3 ADP$	(4-98)

Para solucionar el desbalance de ATP, se propone la utilización de un mecanismo de electro-fermentación que permita la formación de ATP al interactuar con el electrodo. La reacción neta que describe la electro-fermentación **anódica** se presenta en la ecuación **(4-99)**, en donde y es el rendimiento en producción de ATP por mol de NADH. En este modelo, se utilizó un rendimiento $y = 2.7$ mol de ATP por mol de NADH, acorde al análisis realizado por Zhang para *E. coli* [61].



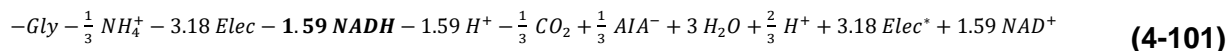
De forma análoga, para la electro-fermentación **catódica**, se describe su estequiometría en la reacción **(4-100)**.



El parámetro y puede variar dependiendo de la proteína de la cadena transportadora de electrones en donde se da la interacción con el electrodo o el mediador, con rendimientos desde 0 a 2.7 mol ATP/mol NADH tanto para electro-fermentaciones catódicas como anódicas [61]. Lo anterior, permite establecer un antecedente en donde a través de herramientas de la ingeniería metabólica, se podrían dirigir las interacciones entre el electrodo y el microorganismo para la optimización de los bioprocesos mediante la modulación de la producción de ATP.

Electro-fermentación anódica para la producción de AIA

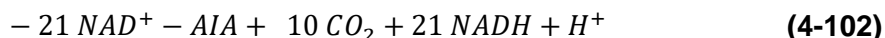
Para tener en cuenta una electro-fermentación anódica, se opera la reacción (4-99) para eliminar los requerimientos de ATP de la reacción (4-98) y obtener la reacción (4-101)



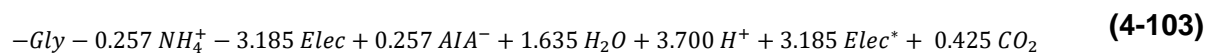
Ahora la reacción catabólica (4-101) no presenta déficit de ATP, pero si un desbalance redox. En esta se observa cómo se produce un déficit de NADH al realizar la electro-fermentación anódica. Este comportamiento es de esperarse, pues la ruta para producción de AIA no presenta desbalance redox y precisamente, en este tipo de electro-fermentaciones, se da un consumo neto de NADH debido al transporte de electrones a través de la cadena transportadora de electrones al electrodo. Es importante reconocer que este desbalance redox no puede ser balanceado por la misma electro-fermentación, pues para producir NADH, se requiere una electro-fermentación catódica, no obstante,

hasta el momento, no se tiene evidencia de poder trabajarse en paralelo en conjunto con una electro-fermentación anódica.

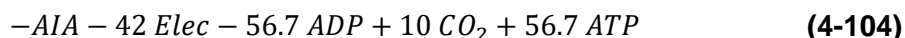
Para solucionarlo, se planteó un redireccionamiento metabólico entre AIA y un subproducto altamente oxidado para eliminar los requerimientos de NADH. En este caso, se opta por utilizar la oxidación de AIA a CO_2 , expresada de forma simplificada en la reacción **(4-102)** (teniendo en cuenta únicamente los productos P1 (AIA) y P2 (CO_2) y los electrones relacionados).



Ahora, operando las reacciones **(4-101)** y **(4-102)** se obtuvo la reacción catabólica final para el proceso de electro-fermentación anódica (Reacción **(4-103)**), en dónde los coeficientes para $-H_2O, H^+, NH_4^+$ se obtuvieron a partir de balances elementales.



Para conocer el parámetro z , se operan las reacciones **(4-99)** y **(4-102)** para eliminar los términos NADH y NAD^+ , dando origen a la ecuación **(4-104)**.



Bajo este escenario, se requiere la transferencia de $42 \text{ mol electrones} / \text{mol AIA}$ para la eliminación completa de AIA como producto. No obstante, según la ecuación **(4-103)** únicamente se realiza la transferencia de $12.39 \text{ mol electrones} / \text{mol AIA}$ ($3.185 / 0.257$).

Por consiguiente, $z = \frac{12.39}{42} = 0.29$. Si bien z se utiliza para estimar la reacción catabólica

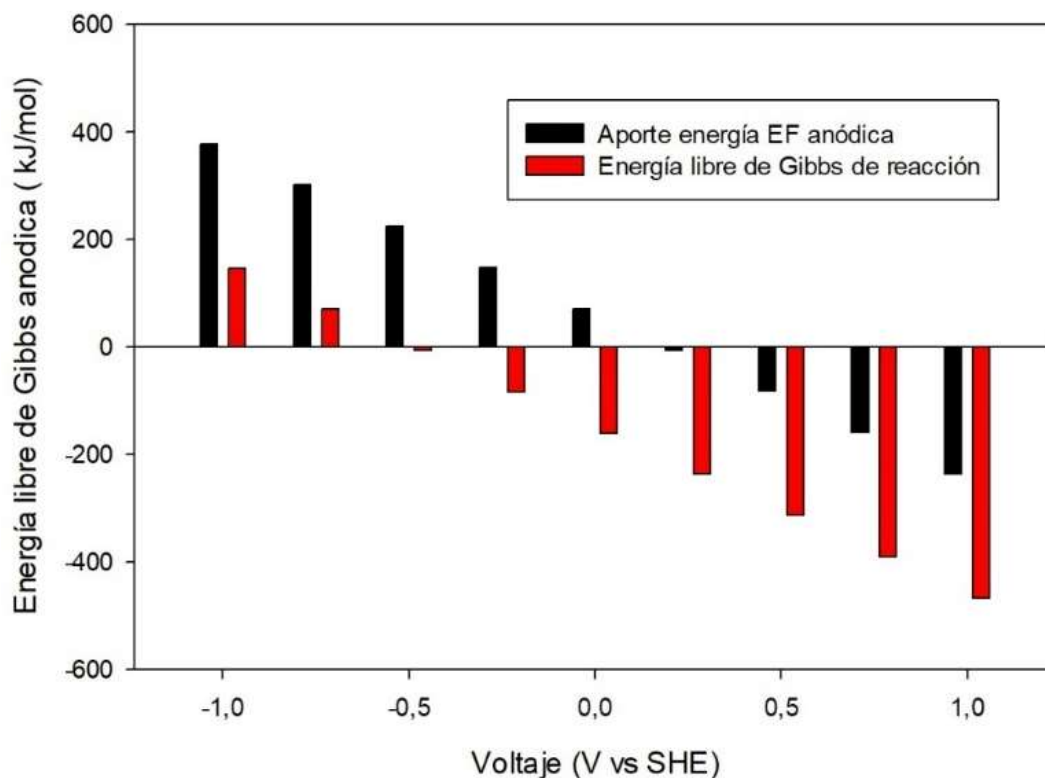
(la cual se conocía de antemano, según el análisis anterior), su valor también es de utilidad al estimar los coeficientes estequiométricos de la formación de biomasa. De igual forma, de la ecuación **(4-103)**, pueden obtenerse los valores de las ecuaciones adicionales requeridas para la **relación de productos de electro-fermentación (Ec (4-105))** y la **relación de electrones (Ec (4-106))**. Sin embargo, de acuerdo a Pedraza [1], el mayor rendimiento de AIA se da en tasas de crecimiento cercanas a cero (*zero growth kinetics*), por lo que no se consideró el crecimiento de biomasa.

$$\frac{C_{P1}}{C_{P2}} = \frac{0.257}{0.425} = 0.604 \quad \text{(4-105)}$$

$$\frac{C_{elec}}{C_{P2}} = \frac{3.185}{0.425} = 7.494 \quad \text{(4-106)}$$

Continuando con la estimación del modelo *black box*, en la **Figura 4-18**, se muestran los resultados del valor de la energía libre de Gibbs para la reacción catabólica como función del voltaje. Se evidencia claramente como a voltajes positivos, el proceso de interacción entre el electrodo y el aceptor interno de electrones tiende a ser espontáneo ($\Delta G_{anodico}^{oEF} < 0$), generando un efecto positivo sobre la energía libre de Gibbs de reacción y permitiendo su viabilidad termodinámica ($\Delta G_{rxn}^o < 0$).

Figura 4-18. Energía libre de Gibbs para la reacción catabólica de producción de AIA en una electro-fermentación anódica.



Utilizando arbitrariamente como voltaje de trabajo $V = 0.5 V vs SHE$, se obtiene una energía libre de Gibbs catabólica ($\Delta G_{cat}^{\circ} = -\Delta G_{rxn}^{\circ}$) de $314.234 kJ/mol$. A partir de este valor, los parámetros para el modelo *black box* se presentan en la **Tabla 4-24**.

Tabla 4-24. Parámetros del modelo *black box* para la producción de AIA en una electro-fermentación catódica.

Cálculo de a_G y a		
Carbonos en sustrato (C)	3	$molC/molGlu$
Grado reducción sustrato (γ_s)	14	$Electrones/molGlu$
a_G	305.25	$kJ/Cmol - x$
Grado reducción biomasa (γ_x)	3.84	$Electrones/Cmol - x$
a_{cat}	0.97	$molGlu/Cmol - x$
a_{ana}	0.27	$molGlu/Cmol - x$
a	1.24	$molGlu/Cmol - x$
Cálculo m_G y m_s		
m_G	13.40	$kJ/Cmolx - h$
m_s	0.043	$molGlu/Cmolx - h$

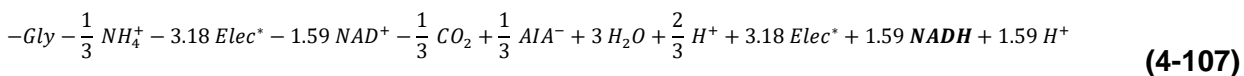
Finalmente, se evalúa la viabilidad metabólica del modelo termodinámico planteado, al realizar su comparación con respecto al modelo metabólico. La **Tabla 4-25** muestra como el modelo metabólico cumple con la estequiometría de la reacción catabólica propuesta. Por lo cual, con el presente modelo se logró solucionar el problema de déficit de ATP presentado por Pedraza [1], obteniendo rendimientos en carbono del 86%. Este resultado es una clara mejora al proceso del diseño racional de bioprocesos, pues sin esta metodología, sería inviable la producción de AIA utilizando glicerol como sustrato bajo condiciones anaeróbicas.

Tabla 4-25. Viabilidad metabólica del modelo termodinámico planteado para la electro-fermentación anódica de AIA

Molécula	Concentración [mM]		Error relativo (%)
	Modelo Termodinámico	Modelo Metabólico	
<i>Glycerol</i>	-1.000	-1.000	0
<i>IAA</i>	0.257	0.257	0
<i>Elec *</i>	3.185	3.185	0
<i>Elec</i>	-3.185	-3.185	0
<i>NH4 +</i>	-0.257	-0.257	0
<i>CO2</i>	0.425	0.425	0
<i>H +</i>	3.700	3.700	0
<i>H2O</i>	1.635	1.635	0

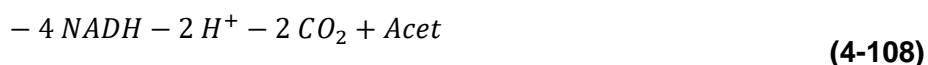
Electro-fermentación catódica para la producción de AIA

La reacción **(4-107)** describe la producción de AIA mediante una electro-fermentación catódica, la cual se obtuvo realizando el mismo procedimiento planteado para la electro-fermentación anódica. En esta se observa como, a diferencia del caso anterior, se produce un exceso de NADH al realizar la electro-fermentación catódica. Lo anterior, debido a que el flujo de electrones en este caso se da en el sentido contrario, generando una producción neta de NADH en vez de su consumo.



Para solucionar este desbalance, se propuso utilizar ese *plus* de NADH para aumentar la fijación de CO_2 . No obstante, como el AIA utiliza NADPH, el CO_2 adicional no puede ser dirigido a aumentar su producción, por lo cual, fue necesario adicionar un subproducto

relacionado con el metabolismo fermentativo. En este orden de ideas, se utilizó la fijación de CO_2 para producción de *Acetato* (Ec **(4-108)**). La selección de este par de moléculas no fue aleatoria, pues la ruta metabólica que los relaciona no tiene consumo neto de ATP, (para el butanol, propionato, butirato y ácido fórmico, se generaba un consumo neto de $1 \text{ mol ATP} / \text{mol subproducto}$, lo cual desbalanceaba nuevamente el requerimiento de ATP).



Finalmente, la reacción catabólica balanceada se presenta en la reacción **(4-109)** y su energía libre de Gibbs de reacción como función del voltaje en la **Figura 4-19**. Se observa claramente cómo a medida que se utilizan voltajes más negativos, el proceso tiende a una mayor energía libre de Gibbs disponible, como producto del aporte energético de la electro-fermentación.

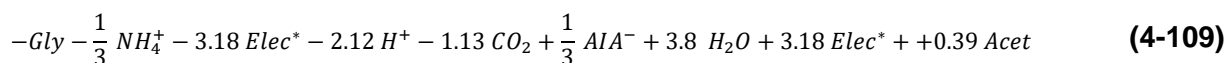
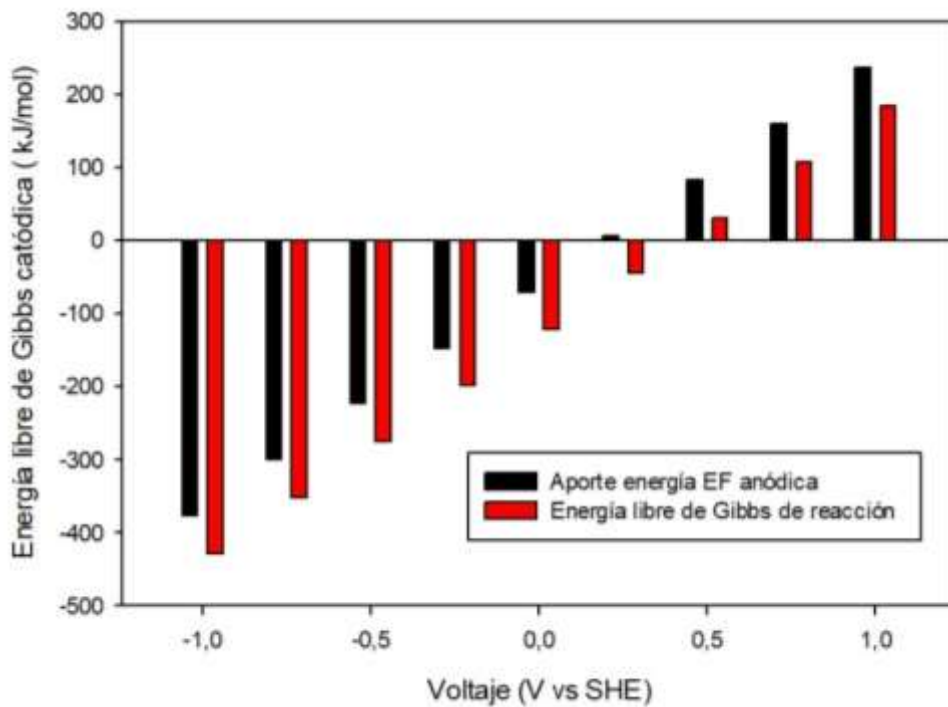


Figura 4-19. Energía libre de Gibbs para la reacción catabólica de producción de AIA en una electro-fermentación catódica



A manera de comparación, se calcularon los parámetros del modelo *black-box* utilizando -0.5 V , $\Delta G^{\circ}_{cat} = 275.66\text{ kJ/mol}$ (Tabla 4-26). Este análisis implica la misma diferencia de voltaje, pero en sentido contrario al utilizado en el ejemplo de la electro-fermentación anódica, no obstante, su energía libre de Gibbs catabólica es diferente, debido a los cambios en la estequiometría.

Tabla 4-26. Parámetros del modelo *black box* para la producción de AIA en una electro-fermentación catódica.

Cálculo de a_G y a		
Carbonos en sustrato (C)	3	$molC/molGlu$
Grado reducción sustrato (γ_s)	14	$Electrones/molGlu$
a_G	305.25	$kJ/Cmol - x$
Grado reducción biomasa (γ_x)	3.84	$Electrones/Cmol - x$
a_{cat}	1.10	$molGlu/Cmol - x$
a_{ana}	0.27	$molGlu/Cmol - x$
a	1.38	$molGlu/Cmol - x$
Cálculo m_G y m_s		
m_G	13.40	$kJ/Cmolx - h$
m_s	0.049	$molGlu/Cmolx - h$

Al igual que en el ejemplo anterior, se encontró que el modelo metabólico describe plenamente a la perfección la estequiometría propuesta y soluciona el déficit de ATP relacionado al proceso (**Tabla 4-27**).

Tabla 4-27. Viabilidad metabólica del modelo termodinámico planteado para la electro-fermentación catódica de AIA.

Molécula	Concentración [mM]		Error relativo (%)
	Modelo Termodinámico	Modelo Metabólico	
<i>Glycerol</i>	-1.000	-1.000	0
<i>IAA</i>	0.333	0.333	0
<i>Elec *</i>	-3.185	-3.185	0
<i>Elec</i>	3.185	3.185	0
<i>NH4 +</i>	-0.333	-0.333	0
<i>CO2</i>	-1.130	-1.130	0
<i>Acetato</i>	0.398	0.398	
<i>H +</i>	-2.120	-2.120	0
<i>H2O</i>	3.800	3.800	0

En la **Tabla 4-28** se resumen los resultados más significativos para los dos escenarios de producción de AIA. La electro-fermentación catódica permite obtener una mayor producción de AIA debido a la fijación de CO_2 , la cual no ocurre en el escenario de producción anódica. Sin embargo, este último escenario, presenta una mayor energía libre de Gibbs catabólica, lo que se traduce en coeficientes α y m_s menores, beneficiando el crecimiento de biomasa. En ambos casos se logró la producción de AIA con una recuperación de carbono en producto mayor al 72%, siendo mayor en la electro-fermentación anódica, toda vez que no tiene producción de acetato o ningún subproducto adicional al CO_2 .

Tabla 4-28. Comparación de resultados electro-fermentación anódica y catódica de AIA .

	EF anódica	EF catódica	Unidad	
Producción	<i>Glyc</i>	-1.000	-1.000	mM
	<i>AIA</i>	0.257	0.333	mM
	<i>Elec</i>	3.185	-3.185	mM
	<i>Elec*</i>	-3.185	3.185	mM
	NH_4^+	-0.257	-0.333	mM
	CO_2	0.425	-1.130	mM
	<i>Acet</i>	-	0.398	mM
	H^+	3.700	-2.120	mM
	H_2O	1.635	3.800	mM
RC*	0.85	0.72		
Estimación parámetros Herbert-Pirt	ΔG°_{cat}	314.234	275.66	<i>kJ/mol</i>
	Carbonos en sustrato (C)	3	3	<i>cmol</i>
	Grado reducción sustrato (γ_s)	14	14	$\frac{mole}{mols}$
	a_G	305.25	305.25	<i>kJ/Cmol – x</i>
	Grado reducción biomasa (γ_X)	3.84	3.84	<i>Electrones/Cmol – x</i>
	a_{cat}	0.97	1.1	<i>molGly/Cmol – x</i>
	a_{ana}	0.27	0.27	<i>molGly/Cmol – x</i>
	a	1.24	1.38	<i>molGly/Cmol – x</i>
	m_G	13.4	13.4	<i>kJ/Cmolx – h</i>
	m_s	0.043	0.049	<i>molGly/Cmolx – h</i>

*RC: recuperación de carbono en producto (moles de carbono contenidas en el producto / moles de carbono totales ingresadas al sistema).

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

En el desarrollo de la presente tesis de investigación se realizó la evaluación *in silico* de la electro-fermentación desde el marco del diseño racional de bioprocesos, teniendo en cuenta principios termodinámicos de sistemas celulares y electroquímicos. Para esto se desarrolló una metodología que permitió estimar sus costos energéticos asociados y evaluar su capacidad de redireccionamiento metabólico. Con este trabajo se logró cumplir los objetivos específicos planteados y se presentan las siguientes conclusiones por cada uno de los objetivos.

- **Objetivo específico I:** *“Proponer un desarrollo teórico para la incorporación del concepto de electro-fermentación dentro una metodología de diseño racional de bioprocesos que permita el redireccionamiento de los flujos de electrones y de carbono en redes metabólicas con base en fundamentos termodinámicos de sistemas celulares y conceptos de ingeniería metabólica”.*

La metodología propuesta se presenta en la sección 4.1 del presente trabajo. El analizar la electro-fermentación como un conjunto de interacciones y semirreacciones permitió aplicar los principios básicos de la electroquímica y la ecuación de *Nerst* para estimar los costos energéticos asociados al proceso de electro-fermentación, en donde se encontró que la energía libre de Gibbs asociada a este proceso depende en gran parte del voltaje aplicado y el potencial de reducción de la molécula aceptora interna de electrones. Una mala selección en el voltaje de trabajo del electrodo podría significar un esfuerzo adicional para la célula al realizar los redireccionamientos

metabólicos planteados. En general, una electro-fermentación catódica se ve favorecida al utilizar voltajes menores a cero (con respecto a SHE). Inclusive, este tipo de electro-fermentación puede llegar a generar cambios en la direccionalidad de la cadena transportadora de electrones, debido al cambio en la relación entre los citocromos c reducidos y oxidados en la membrana celular. Por otro lado y de forma análoga, una electro-fermentación anódica se ve favorecida al utilizar voltajes mayores a cero, con la ventaja de que este tipo de electro-fermentación no presenta inconvenientes relacionados con la energía libre de Gibbs de activación requerida para llevar a cabo el proceso, toda vez que los electrones siguen el flujo normal de la cadena transportadora de electrones. Asimismo, para ambos tipos de electro-fermentación, se tiene que estudiar más a fondo el efecto de la polarización de los electrodos para evitar un fenómeno de lisis celular electroquímica debido a alto voltaje o corriente eléctrica

En cuanto a la estequiometría del proceso, la inclusión de un segundo producto P_2 en la metodología del diseño racional de bioprocesos (como resultado de los cambios metabólicos producto de la electro-fermentación) generó un sistema de ecuaciones indeterminado con dos grados de libertad, el cual pudo resolverse con la inclusión de las relaciones de electro-fermentación y de electrones, relacionadas con el parámetro z , el cual se planteó como un parámetro que define del avance de la electro-fermentación y el cambio metabólico realizado. Al resolver el sistema y conocer los costos energéticos, fue posible estimar el modelo de caja negra y los coeficientes para las relaciones de Herbert-Pirt, bajo la suposición principal de que los electrones relacionados al proceso de electro-fermentación no participan en procesos anabólicos. Esta suposición fue soportada con los hallazgos del modelo metabólico, en donde debido a la inhabilidad de transformar NADH en NADPH, los electrones adicionales proporcionados por el electrodo no pueden utilizarse en la biosíntesis anabólica sin un gradiente de protones propio de la respiración aerobia. De estas relaciones de Herbert-Pirt y parámetros del modelo de caja negra, la relación perteneciente a los electrones transferidos es de gran importancia, pues permite la estimación de la corriente asociada al proceso y los diferentes parámetros involucrados.

Entre estos parámetros se encuentra la eficiencia coulombica, la cual suele ser un indicativo que define qué tan bueno es un sistema para generar energía eléctrica útil. En celdas microbianas suele buscarse obtener un valor cercano al 100%, en donde todos los electrones incluidos en el sustrato estarían pasando por el electrodo y generando corriente. En el caso de las electro-fermentaciones, su valor tiene que ser bajo, pues su funcionalidad no es la producción de energía eléctrica, si no el redireccionamiento metabólico al utilizar una pequeña cantidad de electrones, los cuales permiten el balanceo de las relaciones redox en las rutas metabólicas de interés. Se logró la definición de la eficiencia de la electro-fermentación y eficiencia coulombica a partir de las variables definidas en el modelo y su aplicación es coherente a lo reportado en la literatura.

Para este trabajo fue de gran importancia la estimación de la relación de Herbert-Pirt conectada con los electrones adicionales en el proceso, denominada como $q_e \left[\frac{\text{mol } e}{\text{CmolX-h}} \right]$. Esta relación se utilizó como base para conocer *a priori* el requerimiento de electrones necesario para lograr las especificaciones del proceso planteado y traducirlo en una estimación de la corriente requerida.

Es así como la metodología presentada representa un primer intento de una estimación *in silico* de los requerimientos de corriente eléctrica y voltaje asociados a una electro-fermentación con base a la unión de la termodinámica, la ingeniería metabólica y la electroquímica, a partir de propiedades reportadas y sin la necesidad de realizar experimentación ni ajuste de parámetros a resultados experimentales. Cabe resaltar que el modelo presentado se limita a la utilización de una única fuente de carbono y dos productos de fermentación. A partir de esto, se crea la necesidad de extender el presente modelo para casos de estudios con utilización simultanea de múltiples fuentes de carbono y múltiples productos de fermentación.

- **Objetivo específico II:** *“Realizar al menos un diseño in silico de un microorganismo chasis con funcionalidad de electro-fermentación que dé cuenta de la funcionalidad metabólica requerida a partir de la identificación de estrategias potencialmente factibles tanto termodinámica como biológicamente mediante la reconstrucción de las rutas metabólicas deseadas”*

Los resultados relacionados con este objetivo se presentan en la sección 4.3 y Anexos A, B, C y D. Se logró la inclusión de la funcionalidad de electro-fermentación en un microorganismo chasis basado en la reconstrucción metabólica de *E. coli*. La reacción relacionada con el sistema de transporte extracelular de electrones se planteó con base en los genes nativos de *E. coli*, los cuales le dan la habilidad de transferir electrones a un electrodo a través de moléculas mediadoras y un sistema de Ubiquinonas, las cuales hacen parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aerobia y siguen el mismo patrón de flujo de electrones regulado por los potenciales estándar de reducción de cada una de las moléculas y proteínas involucradas. El modelo metabólico desarrollado es consistente con la metodología desarrollada para la estimación de la estequiometría del proceso y describe los resultados de la reacción catabólica y de biomasa de todos los casos de estudio evaluados. Sin embargo, las diferentes formas de transporte extracelular todavía son objeto de estudio y no se ha logrado esclarecer por completo los mecanismos de entrada y salida de los electrones al microorganismo, lo cual puede generar cambios a futuro en el modelo. Por otro lado, se realizó la identificación de genes y se propusieron todas las modificaciones genéticas necesarias para utilizar el modelo metabólico como herramienta de estudio para diferentes casos experimentales y teóricos.

- **Objetivo específico III:** *“Evaluar el desempeño del modelo metabólico in silico con la funcionalidad de electro-fermentación incorporada al aplicarlo en al menos un caso de estudio desarrollados previamente al interior del semillero de investigación BIRD”*

Los resultados relacionados con este objetivo se encuentran en la sección 4.4. del presente documento. La aplicación de la electro-fermentación se evaluó para la producción de ácido 1-3 indolacético a partir de glicerol como sustrato como una solución a los déficits de ATP reportados previamente que impedían la biosíntesis catabólica del metabolito en cuestión. Se logró solucionar el déficit de 4.3 mol de ATP mediante la aplicación de estrategias de electro-fermentación catódicas y anódicas, no obstante, en ambos casos, la inclusión o retiro de nuevos electrones al sistema, generó un desbalance de NADH, el cual se corrigió mediante la generación de subproductos. La electro-fermentación catódica permite obtener una mayor producción de AIA debido a la fijación de CO_2 , lo cual no ocurre en el escenario de producción anódica. Sin embargo, este último escenario, presenta una mayor energía libre de Gibbs catabólica, lo que se traduce en coeficientes a y m_s menores, beneficiando el crecimiento de biomasa. En ambos casos se logró la producción de AIA con una recuperación de carbono en producto mayor al 72%, siendo mayor en la electro-fermentación anódica (85%), toda vez que no tiene producción de acetato o ningún subproducto adicional al CO_2 .

Las estimaciones en la estequiometría del modelo termodinámico planteado fueron consistentes con las predicciones del modelo metabólico, indicando la viabilidad teórica del proceso. Estos resultados son una clara mejora al proceso del diseño racional de bioprocesos, pues sin esta metodología, sería inviable la producción de AIA utilizando glicerol como sustrato.

Adicionalmente, se analizaron dos casos de estudio a partir de datos experimentales para evaluar el desempeño del modelo planteado con respecto a la información disponible reportada en bases de datos. Aplicando la metodología propuesta al cambio metabólico presentado en la producción de propionato y acetato por *Propionibacterium acidi-propionici*, se evidenció una sobrestimación en la concentración final de propionato de 11.37 mM con respecto a los datos experimentales, la cual se encuentra relacionada con la inhabilidad del microorganismo para fijar CO_2 y un desbalance en la recuperación de carbonos

encontrada para los datos experimentales. El modelo metabólico fue consistente con la estequiometría propuesta y se evidenció el aumento en la producción de propionato y disminución en el acetato al ingresar electrones al sistema, en donde se evidenció que el proceso de transferencia de electrones es espontáneo y aporta energía a la reacción catabólica. No obstante, la corriente requerida estimada con el modelo fue aproximadamente 5 veces la reportada en los datos experimentales (526 mA vs 100mA, respectivamente). Los errores en esta estimación están relacionados con la sobrestimación del propionato, la cual explica el aumento de 426 mA a lo largo de la etapa de producción máxima (10 h en total). En cuanto a los parámetros de eficiencia Coulómbica y de electro-fermentación se encontró que sus valores se encuentran en los rangos esperados para este tipo de procesos (26.94% y 23.29%, respectivamente).

Al analizar el cambio metabólico de Butirato y Butanol por *Clostridium pasteurianum*, se encontró una gran discrepancia entre los datos experimentales y los estimados en el modelo propuesto, con errores del 47% y 96% para cada uno de los metabolitos, respectivamente. La falta en la recuperación de carbonos y electrones de los datos experimentales no permitió distinguir con claridad el cambio metabólico reportado, y la sobrestimación en corriente y concentración parece ser debido a las pérdidas en carbono no cuantificadas en los datos experimentales y que son tenidas en cuenta en los balances teóricos para la producción de butirato y butanol, por lo cual, se es necesario plantear diseños experimentales con medios químicamente definidos, incluyendo mediciones de metabolitos para alcanzar un balance de carbono y electrones cercanos al 100%, los cuales permitan evidenciar los cambios metabólicos ocurridos. Esta experimentación permitiría complementar, revisar y revalidar el modelo planteado.

- **Objetivo específico IV:** *“Identificar posibles objetivos metabólicos tendientes a incrementar los rendimientos de la bioconversión en términos de un mejor uso del carbono y los electrones disponibles a partir del análisis de los flujos metabólicos en el modelo metabólico.”*

Los resultados relacionados con este objetivo se desarrollan en el capítulo 4 a medida que se realizó la discusión de los resultados. La existencia de diferentes mecanismos de transferencia extracelular de electrones plantea la posibilidad de realizar un diseño dirigido de la electro-fermentación, apuntando a proteínas y metabolitos específicos, que permitan, por ejemplo, la generación de energía biológica útil (ATP), a través de la implementación de reacciones que generen un gradiente de protones o una optimización de la energía obtenida al utilizar moléculas aceptoras de electrones alternativas como la pareja *Succinato/Fumarato* o diferentes moléculas mediadoras con valores distintos de potencial de reducción. Este diseño dirigido puede ir de la mano con un nuevo concepto de modulación metabólica, en donde a través del cambio en el coeficiente z , se puede modificar la relación P_1/P_2 de los productos de interés en la electro-fermentación. Es importante reconocer que para modular esta relación molar es importante controlar la cantidad de electrones que se están ingresando al microorganismo, en donde se podría plantear un lazo de control por modelo predictivo, teniendo en cuenta los valores de corriente estimados según la tasa de crecimiento del microorganismo, y establecer para cada momento, la cantidad de corriente necesaria para lograr la relación molar requerida.

5.2 Recomendaciones

Las principales recomendaciones para futuras investigaciones y trabajos son:

1. Se es necesario continuar con la aplicación del modelo propuesto a los datos experimentales publicados en la literatura para evaluar su desempeño y plantear correcciones y mejoras que permitan refinar sus estimaciones. Se debe tener cuidado al escoger los trabajos pues una mala recuperación de carbonos o electrones en los resultados reportados puede generar errores en la estimación del modelo al no tener claridad sobre el cambio metabólico generado.
2. Para verificar las sobrestimaciones en corriente, se es necesario plantear un desarrollo experimental que permita evidenciar un balance de carbonos y electrones cercano al 100% en donde sea posible corroborar los cambios metabólicos adicionales a los planteados en el modelo teórico, que aportan electrones al producto y generan una disminución en la corriente real requerida.
3. Se debe evaluar el efecto de altos voltajes y corriente en la viabilidad celular a través de diseños experimentales que permitan estimar los máximos valores posibles en los que se pueden trabajar los sistemas de electro-fermentación y evitar la lisis celular.
4. Se es necesario ampliar el modelo para su aplicación en diseños de bioprocesos con utilización simultánea de diferentes fuentes de carbono y producción de múltiples productos

Anexos

Anexo A. Reconstrucción de los proteomas de *E. coli* y *G. sulfurreducens*

Figura A.1 Representación gráfica de las rutas metabólicas presentes en *E. coli*. Las líneas verdes representan las rutas metabólicas reconstruidas con base en el proteoma y la anotación de KEGG y KOALA.

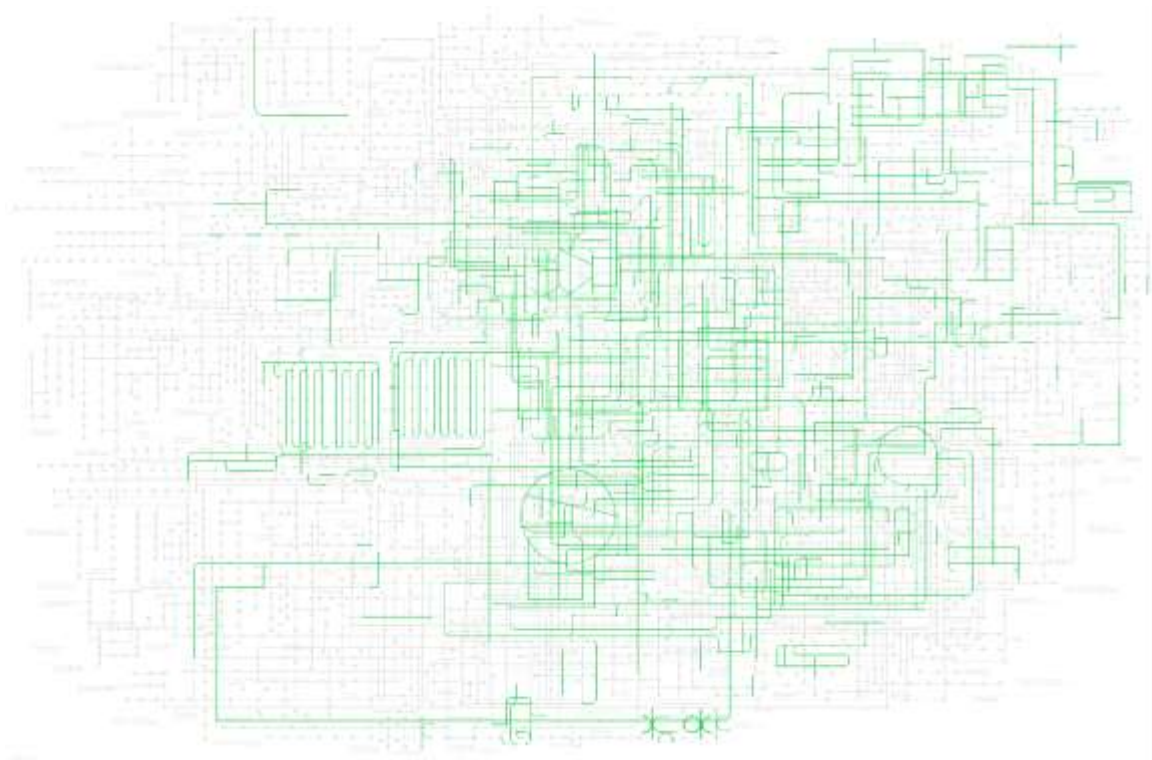
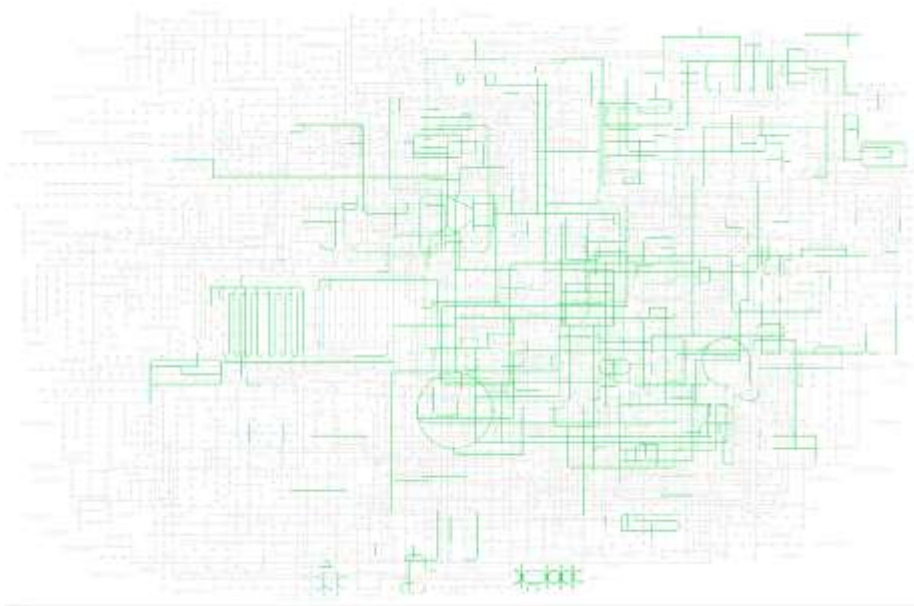


Figura A.2 Representación gráfica de las rutas metabólicas presentes en *G. sulfurreducens*. Las líneas verdes representan las rutas metabólicas reconstruidas con base en el proteoma y la anotación de KEGG y KOALA



Anexo B. Definición de la reacción de biomasa y fórmula C-mol para *E. coli*.

Tabla B.1. Resumen de la composición macromolecular de *E. coli* y su respectiva reacción de formación.

Macromolécula	% (g/gDW)	Bloque	Formula genérica	ATP	mol/cmolX	Macromolécula	Reacción de bloque	Inclusión en la biomasa
Proteína	0.55	AM	$C_{4.79}H_{9.67}N_{1.37}O_{2.40}$	4.31	0.09769	prot	0.096 ala__l_c + 0.055 arg__l_c + 0.045 asn__l_c + 0.045 asp__l_c + 0.017 cys__l_c + 0.049 glu__l_c + 0.049 gln__l_c + 0.115 gly__l_c + 0.018 his__l_c + 0.054 ileu__l_c + 0.084 leu__l_c + 0.064 lys__l_c + 0.029 met__l_c + 0.035 phen__l_c + 0.041 pro__l_c + 0.040 ser__l_c + 0.047 thr__l_c + 0.011 tryp__l_c + 0.026 tyr__l_c + 0.079 val__l_c + --> 1.000 am__l_c	1 AM + 4.306 ATP --> 1 prot_x
RNA	0.205	NMP	$C_{9.80}H_{13.57}N_{3.95}O_{7.95}$	1.37	0.02359	rna	0.262 amp_c + 0.322 gmp_c + 0.200 cmp_c + 0.216 ump_c + --> 1.000 nmp_c	1 NMP + 1.372 ATP --> 1 ma_x
DNA	0.031	dNMP	$C_{9.81}H_{13.73}N_{4.07}O_{6.79}$	0.40	0.01211	dna	0.398 damp_c + 0.229 dgmp_c + 0.187 dcmp_c + 0.187 dtmp_c + --> 1 dnmp_c	1 dNTP + 0.4 ATP --> 1 dna_x
Lípidos	0.091	LIP	$C_{13.84}H_{28.50}N_{0.19}O_{2.64}$	0.00	0.00992	lip	0.312 gly_c + 0.188 etn_c + 0.760 oa_c + --> 1.000 lip_c	1 LIP + 0 ATP --> 1 lip_x
Lipopolisacáridos	0.034	LPS	$C_{8.25}H_{16.90}N_{0.25}O_{4.80}$	0.00	0.00323	lps	0.100 g6p_c + 0.100 glun6p_c + 0.150 etn_c + 0.050 rha_c + 0.150 h7p_c + 0.150 kdo8p_c + 0.300 mir_a_c + --> 1.000 lps_c	1 LPS + 0 ATP --> 1 lps_x
Glucógeno	0.025	CARBOH	$C_{6.00}H_{12.00}N_{0.00}O_{6.00}$	0.00	0.00296	ch	1,000 Residuos Glucosil + --> 1,000 CARBOH	1 CARBOH + 0 ATP --> 1 ch_x

Tabla B.2. Composición elemental de *E. coli*. calculada.

	Coeficiente (mol/CmolX)	Formula Genérica			
		C	H	N	O
Proteína	0.098	4.793	9.669	1.370	2.396
RNA	0.024	9.800	13.571	3.952	7.954
DNA	0.012	9.813	13.729	4.067	6.789
Lípidos	0.010	13.837	28.497	0.188	2.644
Lipopolisacáridos	0.003	8.250	16.900	0.250	4.800
Glucógeno	0.003	6.000	12.000	0.000	6.000
Formula molecular biomasa		1.000	1.804	0.279	0.563

Anexo C: Reacciones incluidas en el modelo metabólico

Abreviación	Descripción	Reacción	Subsistema
<i>GLUDy</i>	Glutamate dehydrogenase (NADP)	$glu_L_c + h2o_c + nadp_c \rightleftharpoons ak_g_c + h_c + nadph_c + nh4_c$	Aminoacid Metabolism
<i>GLUSy</i>	Glutamate synthase (NADPH)	$ak_g_c + gln_L_c + h_c + nadph_c \rightleftharpoons 2.0\ glu_L_c + nadp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>GLUN</i>	Glutaminase	$gln_L_c + h2o_c \rightleftharpoons glu_L_c + nh4_c$	Aminoacid Metabolism
<i>GLNS</i>	Glutamine synthetase	$atp_c + glu_L_c + nh4_c \rightleftharpoons adp_c + gln_L_c + pi_c$	Aminoacid Metabolism
<i>PROs</i>	Proline Synthesis	$glu_L_c + atp_c + 2\ nadph_c + 2\ h_c \rightleftharpoons pro_L_c + adp_c + 2\ nadp_c + pi_c$	Aminoacid Metabolism
<i>ARGs</i>	Arginine Synthesis	$2\ glu_L_c + accoa_c + 4\ atp_c + nadph_c + h_c + carp_c + asp_L_c \rightleftharpoons arg_L_c + coa_c + ak_g_c + ac_c + 4\ adp_c + fum_c + nadp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>CARPs</i>	Carbamyl Synthesis	$nh4_c + atp_c + co2_c \rightleftharpoons carp_c + adp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>LYSs</i>	Lysine Synthesis	$2\ glu_L_c + accoa_c + 3\ atp_c \rightleftharpoons lys_L_c + coa_c + ak_g_c + co2_c + 3\ adp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>SERs</i>	Serine Synthesis	$3pg_c + glu_L_c + nadp_c \rightleftharpoons ser_L_c + ak_g_c + nadph_c + h_c$	Aminoacid Metabolism
<i>GLYs</i>	Glycine Synthesis	$ser_L_c + thf_c \rightleftharpoons gly_L_c + methf_c$	Aminoacid Metabolism
<i>FTHFs</i>	FTHF Synthesis	$thf_c + nadph_c + h_c + atp_c + co2_c \rightleftharpoons fthf_c + nadp_c + adp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>MYTHFs</i>	MYTHF Synthesis	$thf_c + 3\ nadph_c + 3\ h_c + co2_c \rightleftharpoons mythf_c + 3\ nadp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>METHFs</i>	METHF Synthesis	$thf_c + 2\ nadph_c + 2\ h_c + co2_c \rightleftharpoons methf_c + 2\ nadp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>CYSs</i>	Cystein Synthesis	$ser_L_c + accoa_c + 4\ nadph_c + 4\ h_c + atp_c \rightleftharpoons cys_L_c + ac_c + coa_c + 4\ nadp_c + adp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>ASPs</i>	Aspartate Synthesis	$oaa_c + glu_L_c \rightleftharpoons asp_L_c + ak_g_c$	Aminoacid Metabolism
<i>ASNs</i>	Asparagine Synthesis	$asp_L_c + nh4_c + 2\ atp_c \rightleftharpoons asn_L_c + 2\ adp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>HOMs</i>	Homoserine Synthesis	$asp_L_c + atp_c + 2\ nadph_c + 2\ h_c \rightleftharpoons hom_c + adp_c + 2\ nadp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>THRs</i>	Threonine Synthesis	$hom_c + atp_c \rightleftharpoons thr_L_c + adp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>METs</i>	Metionine Synthesis	$hom_c + succoa_c + cys_L_c + mythf_c + atp_c \rightleftharpoons met_L_c + coa_c + succ_c + pyr_c + nh4_c + adp_c + thf_c$	Aminoacid Metabolism
<i>ILEUs</i>	Isoleusine Synthesis	$thr_L_c + pyr_c + nadph_c + h_c + glu_L_c \rightleftharpoons ileu_L_c + nh4_c + nadp_c + co2_c + ak_g_c$	Aminoacid Metabolism
<i>ALAs</i>	Alanine Synthesis	$pyr_c + glu_L_c \rightleftharpoons ala_L_c + ak_g_c$	Aminoacid Metabolism
<i>AKIs</i>	Isovalerate Synthesis	$2\ pyr_c + nadph_c + h_c \rightleftharpoons aki_c + nadp_c + co2_c$	Aminoacid Metabolism
<i>VALs</i>	Valine Synthesis	$aki_c + glu_L_c \rightleftharpoons val_L_c + ak_g_c$	Aminoacid Metabolism
<i>LEUs</i>	Leusine Synthesis	$aki_c + accoa_c + glu_L_c + nadp_c + atp_c \rightleftharpoons leu_L_c + ak_g_c + coa_c + co2_c + nadph_c + h_c + adp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>CHOs</i>	Chorismate Synthesis	$2\ pep_c + e4p_c + nadph_c + h_c + atp_c \rightleftharpoons cho_c + adp_c + nadp_c$	Aminoacid Metabolism
<i>PHENs</i>	Phenilalanine Synthesis	$cho_c + glu_L_c \rightleftharpoons phen_L_c + ak_g_c + co2_c$	Aminoacid Metabolism
<i>TYRs</i>	Tyrosine Synthesis	$cho_c + glu_L_c + nadp_c \rightleftharpoons tyr_L_c + ak_g_c + co2_c + nadph_c + h_c$	Aminoacid Metabolism
<i>TRYPs</i>	Tryptophane Synthesis	$cho_c + gln_L_c + prpp_c + ser_L_c \rightleftharpoons tryp_L_c + co2_c + g3p_c + glu_L_c + pyr_c$	Aminoacid Metabolism
<i>HISs</i>	Histidine Synthesis	$prpp_c + 3\ atp_c + nh4_c + gln_L_c + co2_c \rightleftharpoons his_L_c + 3\ adp_c + ak_g_c$	Aminoacid Metabolism
<i>PPC</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase	$co2_c + h2o_c + pep_c \rightleftharpoons oaa_c + pi_c$	Anaplerotic
<i>PPCK</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	$atp_c + oaa_c \rightleftharpoons adp_c + co2_c + pep_c$	Anaplerotic
<i>ME1</i>	Malic enzyme (NAD)	$mal_L_c + nad_c \rightleftharpoons co2_c + nadh_c + pyr_c + h_c$	Anaplerotic

<i>ME2</i>	Malic enzyme (NADP)	$mal_L_c + nadp_c \rightleftharpoons co2_c + nadph_c + pyr_c + h_c$	Anaplerotic
<i>ADK1</i>	Adenylate kinase	$amp_c + atp_c \rightleftharpoons 2.0\ adp_c$	ATP
<i>ATPM</i>	ATP maintenance requirement	$atp_c + h2o_c \rightleftharpoons adp_c + pi_c$	ATP
<i>ATPS4r</i>	ATP synthase (three protons for one ATP)	$adp_c + pi_c + 3.0\ h_p \rightleftharpoons atp_c + 3.0\ h_c + h2o_c$	ATP
<i>Biomass</i>	Biomass Rxn	$0.09769\ prot_x + 0.02359\ ma_x + 0.01211\ dna_x + 0.00992\ lip_x + 0.00323\ lps_x + 0.00296\ ch_x \rightleftharpoons 1\ biomass_x$	Biomass
<i>ACACT1r</i>	Acetyl-CoA C-acetyltransferase	$2\ accoa_c \rightleftharpoons coa_c + aaccoa_c$	Butanol Metabolism
<i>HACD1i</i>	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	$nad_c + 3hbcoa_c \rightleftharpoons nadh_c + h_c + aaccoa_c$	Butanol Metabolism
<i>ECOAH1</i>	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase (3-hydroxybutanoyl-CoA)	$3hbcoa_c \rightleftharpoons b2coa_c + h2o_c$	Butanol Metabolism
<i>ACOAD1</i>	Acyl-CoA dehydrogenase (butanoyl-CoA)	$b2coa_c + nadh_c + h_c \rightleftharpoons btcoa_c + nad_c$	Butanol Metabolism
<i>BTCOAp</i>	Butyrate Formation	$btcoa_c + adp_c + pi_c \rightleftharpoons buty_c + atp_c + coa_c$	Butanol Metabolism
<i>BTCOARx</i>	Butyryl-coA reductase (NADH)	$btcoa_c + h_c + nadh_c \rightleftharpoons btal_c + coa_c + nad_c$	Butanol Metabolism
<i>ALCD4</i>	Alcohol dehydrogenase (butanol)	$nad_c + btol_c \rightleftharpoons btal_c + h_c + nadh_c$	Butanol Metabolism
<i>CHs</i>	Carbohydrate Synthesis	$g6p_c + atp_c \rightleftharpoons ch_c + adp_c$	Carbohydrates Formation
<i>CH_biomass</i>	CH Biomass	$ch_c \rightleftharpoons ch_x$	Carbohydrates Formation
<i>HEX1</i>	Hexokinase (D-glucose:ATP)	$atp_c + glc_D_c \rightleftharpoons adp_c + g6p_c$	Central Carbon
<i>PGI</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	$g6p_c \rightleftharpoons f6p_c$	Central Carbon
<i>PFK</i>	Phosphofructokinase	$atp_c + f6p_c \rightleftharpoons adp_c + fdp_c$	Central Carbon
<i>FBP</i>	Fructose-bisphosphatase	$fdp_c + h2o_c \rightleftharpoons f6p_c + pi_c$	Central Carbon
<i>FBA</i>	Fructose-bisphosphate aldolase	$fdp_c \rightleftharpoons dhap_c + g3p_c$	Central Carbon
<i>TPI</i>	Triose-phosphate isomerase	$dhap_c \rightleftharpoons g3p_c$	Central Carbon
<i>GAPD</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	$g3p_c + nad_c + pi_c \rightleftharpoons 13dpg_c + h_c + nadh_c$	Central Carbon
<i>PGK</i>	Phosphoglycerate kinase	$3pg_c + atp_c \rightleftharpoons 13dpg_c + adp_c$	Central Carbon
<i>PGM</i>	Phosphoglycerate mutase	$2pg_c \rightleftharpoons 3pg_c$	Central Carbon
<i>ENO</i>	Enolase	$2pg_c \rightleftharpoons h2o_c + pep_c$	Central Carbon
<i>PYK</i>	Pyruvate kinase	$adp_c + pep_c \rightleftharpoons atp_c + pyr_c$	Central Carbon
<i>PPS</i>	Phosphoenolpyruvate synthase	$1\ atp_c + h2o_c + pyr_c \rightleftharpoons 1\ amp_c + pep_c + pi_c$	Central Carbon
<i>dNMPs</i>	dNMP Synthesis	$0.398\ damp_c + 0.229\ dgm_c + 0.187\ dcmp_c + 0.187\ dtmp_c \rightleftharpoons 1\ dnmp_c$	DNA Formation
<i>dNTPs</i>	dNTP Synthesis	$1\ dnmp_c + 2\ atp_c \rightleftharpoons 1\ dnpt_c + 2\ adp_c$	DNA Formation
<i>DNA_biomass</i>	DNA Biomass	$dnpt_c + 1.372\ atp_c \rightleftharpoons dna_x + 1.372\ adp_c$	DNA Formation
<i>EET</i>	Extracellular electron Transport	$2\ med_red_p + nad_c \rightleftharpoons 2\ med_ox_p + nadh_c + h_c$	EET
<i>EMI</i>	Mediator Electrode Interaction	$med_red_e + elect_ox_e \rightleftharpoons elect_red_e + med_ox_e + h_e$	EET
<i>EET_hypo</i>	Extracellular electron Transport	$2\ med_red_p + nad_c + 2.5\ adp_c \rightleftharpoons 2\ med_ox_p + nadh_c + h_c + 2.5\ atp_c$	EET
<i>NADH16</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone-8 & 3 protons)	$4.0\ h_c + nadh_c + q8_c \rightleftharpoons nad_c + q8h2_c + 3.0\ h_p$	ETC
<i>CYTBD</i>	Cytochrome oxidase bd (ubiquinol-8: 2 protons)	$2.0\ h_c + 0.5\ o2_c + q8h2_c \rightleftharpoons h2o_c + q8_c + 2.0\ h_p$	ETC
<i>EX_glc_D_e</i>	D-Glucose exchange	$glc_D_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_lac_D_e</i>	D-lactate exchange	$lac_D_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_h_e</i>	H+ exchange	$h_e \rightleftharpoons$	Exchange

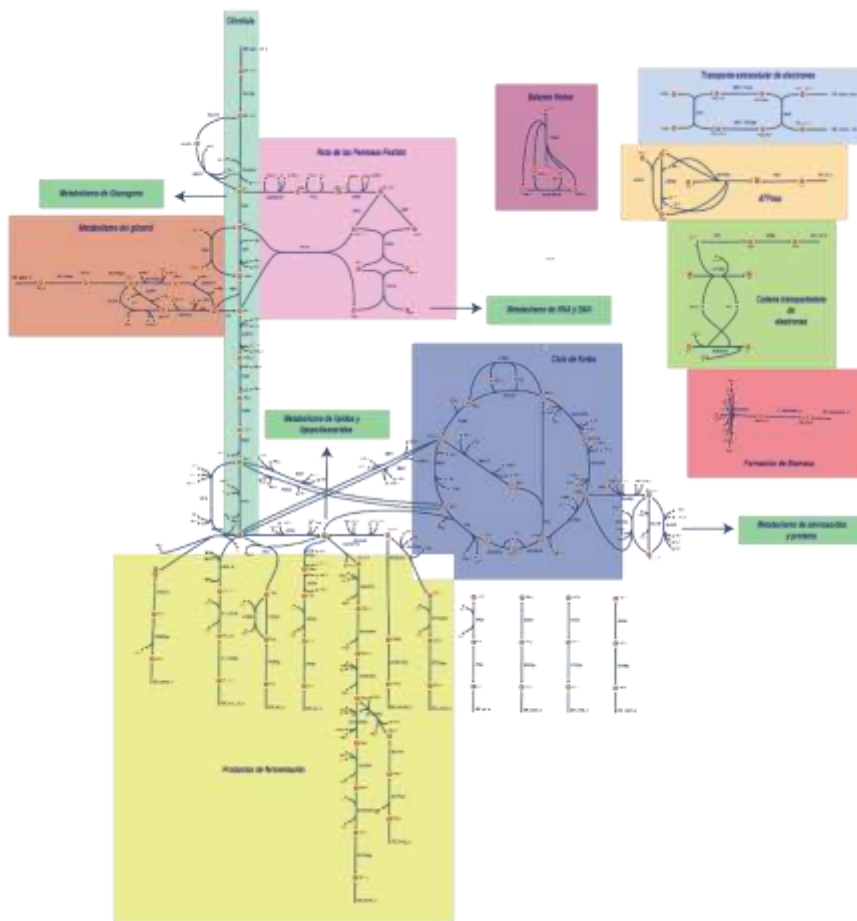
<i>EX_ac_e</i>	Acetate exchange	$ac_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_acald_e</i>	Acetaldehyde exchange	$acald_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_etoh_e</i>	Ethanol exchange	$etoh_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_pi_e</i>	Phosphate exchange	$pi_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_h2o_e</i>	H2O exchange	$h2o_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_co2_e</i>	CO2 exchange	$co2_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_nh4_e</i>	Ammonia exchange	$nh4_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_o2_e</i>	O2 exchange	$o2_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_elect_ox_e</i>	Electrode oxidized Exchange	$elect_ox_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_elect_red_e</i>	Electrode reduced Exchange	$elect_red_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_buty_e</i>	Butyrate Exchange	$buty_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_glyc_e</i>	Glycerol exchange	$glyc_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_btoh_e</i>	Butanol Exchange	$btoh_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_for_e</i>	Formate exchange	$for_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_biomass_e</i>	Biomass Exchange	$biomass_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_prop_c</i>	Propionate Exchange	$prop_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>EX_iaa_c</i>	IAA Exchange	$iaa_e \rightleftharpoons$	Exchange
<i>LDH_D</i>	D-lactate dehydrogenase	$lac_D_c + nad_c \rightleftharpoons h_c + nadh_c + pyr_c$	Fermentation
<i>PTAr</i>	Phosphotransacetylase	$accoa_c + pi_c \rightleftharpoons actp_c + coa_c$	Fermentation
<i>ACKr</i>	Acetate kinase	$ac_c + atp_c \rightleftharpoons actp_c + adp_c$	Fermentation
<i>ACALD</i>	Acetaldehyde dehydrogenase (acetylating)	$acald_c + coa_c + nad_c \rightleftharpoons accoa_c + h_c + nadh_c$	Fermentation
<i>ALCD2x</i>	Alcohol dehydrogenase (ethanol)	$etoh_c + nad_c \rightleftharpoons acald_c + h_c + nadh_c$	Fermentation
<i>PFL</i>	Pyruvate formate lyase	$coa_c + pyr_c \rightleftharpoons accoa_c + for_c$	Fermentation
<i>GLYCDx</i>	Glycerol dehydrogenase	$glyc_c + nad_c \rightleftharpoons dha_c + h_c + nadh_c$	Glycerol Metabolism
<i>DHAPT</i>	Dihydroxyacetone phosphotransferase	$dha_c + pep_c \rightleftharpoons dhap_c + pyr_c$	Glycerol Metabolism
<i>GLYK</i>	Glycerol kinase	$atp_c + glyc_c \rightleftharpoons adp_c + glyc3p_c$	Glycerol Metabolism
<i>G3PT</i>	Glycerol-3-phosphatase	$glyc3p_c + h2o_c \rightleftharpoons glyc_c + pi_c$	Glycerol Metabolism
<i>G3PD2</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NADH)	$glyc3p_c + nad_c \rightleftharpoons dhap_c + h_c + nadh_c$	Glycerol Metabolism
<i>CF</i>	Carbon Fixation Hipotetic	$2 co2_c + 4 nadph_c + 4 h_c + coa_c + atp_c \rightleftharpoons accoa_c + 4 nadp_c + adp_c + pi_c$	Hypothetical
<i>ATP_hypothethic</i>	ATP deficit	$adp_c \rightleftharpoons atp_c$	Hypothetical
<i>NADH_hypo</i>	NADH balance	$nadh_c + h_c \rightleftharpoons nad_c$	Hypothetical
<i>NADH_NADP_hyj</i>	NADPH production from NADH	$nadh_c + nadp_c \rightleftharpoons nadph_c + nad_c$	Hypothetical
<i>IPAp</i>	IPA production	$tryp_L_c + akg \rightleftharpoons glu_L_c + ipa_c$	IAA
<i>IAAIdp</i>	IAAId synthesis	$ipa_c \rightleftharpoons iaald_c + co2_c$	IAA
<i>IAAs</i>	IAA synthesis	$iaald_c + nad_c \rightleftharpoons iaa_c + nadh_c + h_c$	IAA
<i>CS</i>	Citrate synthase	$accoa_c + h2o_c + oaa_c \rightleftharpoons cit_c + coa_c$	Krebbs Cycle
<i>ACONTa</i>	Aconitase (half-reaction A, Citrate hydro-lyase)	$cit_c \rightleftharpoons acon_C_c + h2o_c$	Krebbs Cycle
<i>ACONTb</i>	Aconitase (half-reaction B, Isocitrate hydro-lyase)	$acon_C_c + h2o_c \rightleftharpoons icit_c$	Krebbs Cycle
<i>ICL</i>	Isocitrate lyase	$icit_c \rightleftharpoons glx_c + succ_c$	Krebbs Cycle
<i>MALS</i>	Malate synthase	$accoa_c + glx_c + h2o_c \rightleftharpoons coa_c + mal_L_c$	Krebbs Cycle
<i>ICDHyr</i>	Isocitrate dehydrogenase	$icit_c + nadp_c \rightleftharpoons akg_c + co2_c + nadph_c + h_c$	Krebbs Cycle

(NADP)			
<i>AKGDH</i>	2-Oxoglutarate dehydrogenase	$akg_c + coa_c + nad_c \rightleftharpoons co2_c + nadh_c + h_c + succoa_c$	Krebs Cycle
<i>SUCOAS</i>	Succinyl-CoA synthetase (ADP-forming)	$atp_c + coa_c + succ_c \rightleftharpoons adp_c + pi_c + succoa_c$	Krebs Cycle
<i>SUCDi</i>	Succinate dehydrogenase (irreversible)	$q8_c + succ_c \rightleftharpoons fum_c + q8h2_c$	Krebs Cycle
<i>FRD7</i>	Fumarate reductase	$fum_c + q8h2_c \rightleftharpoons q8_c + succ_c$	Krebs Cycle
<i>FUM</i>	Fumarase	$fum_c + h2o_c \rightleftharpoons mal_L_c$	Krebs Cycle
<i>MDH</i>	Malate dehydrogenase	$mal_L_c + nad_c \rightleftharpoons h_c + nadh_c + oaa_c$	Krebs Cycle
<i>PALS</i>	Palmitic Acid Synthesis	$accoa_c + 7 malcoa_c + 14 nadph_c + 14 h_c \rightleftharpoons pal_a_c + 7 co2_c + 6 h2o_c + 8 coa_c + 14 nadp_c$	Lipid Formation
<i>OLEs</i>	Oleic Acid Synthesis	$accoa_c + 8 malcoa_c + 16 nadph_c + 16 h_c \rightleftharpoons ole_a_c + 8 co2_c + 7 h2o_c + 9 coa_c + 16 nadp_c$	Lipid Formation
<i>MALCOAs</i>	MalonylCoa Synthesis	$accoa_c + atp_c + co2_c \rightleftharpoons malcoa_c + adp_c + pi_c$	Lipid Formation
<i>OAs</i>	Organic Acid Synthesis	$0.760 pal_a_c + 0.240 ole_a_c + \rightleftharpoons 1 oa_c$	Lipid Formation
<i>ETNs</i>	Ethanolamine Synthesis	$ser_L_c \rightleftharpoons co2_c + etn_c$	Lipid Formation
<i>LIPs</i>	Generic Lypid Synthesis	$0.312 glyc_c + 0.188 etn_c + 0.760 oa_c \rightleftharpoons 1.000 lip_c$	Lipid Formation
<i>LIP_biomass</i>	LIP Biomass	$1.000 lip_c \rightleftharpoons 1 lip_x$	Lipid Formation
<i>GLUN6Ps</i>	Glucosamine 6p Synthesis	$f6p_c + gln_L_c \rightleftharpoons glu_L_c + glun6p_c$	LPS Formation
<i>RHAs</i>	Rhamnose Synthesis	$g6p_c + nadph_c + h_c + dttp_c \rightleftharpoons rha_c + nadp_c + dtdp_c + 2 pi_c$	LPS Formation
<i>dTDPdp</i>	dTDP dephosphorilation	$dtdp_c + adp_c \rightleftharpoons dtmp_c + atp_c$	LPS Formation
<i>dTTPs</i>	dTTP Synthesis	$dtmp_c + 2 atp_c \rightleftharpoons dttp_c + 2 adp_c$	LPS Formation
<i>H7Ps</i>	Heptose 7 Phosphate Synthesis	$s7p_c \rightleftharpoons h7p_c$	LPS Formation
<i>MIRs</i>	Miristic Acid Synthesis	$accoa_c + 6 malcoa_c + 12 nadph_c + 12 h_c \rightleftharpoons mir_a_c + 6 co2_c + 5 h2o_c + 7 coa_c + 12 nadp_c$	LPS Formation
<i>KDOs</i>	KDO Synthesis	$ru5p_D_c + pep_c \rightleftharpoons kdo8p_c + pi_c$	LPS Formation
<i>LPSs</i>	LPS Synthesis	$0.100 g6p_c + 0.100 glun6p_c + 0.150 etn_c + 0.050 rha_c + 0.150 h7p_c + 0.150 kdo8p_c + 0.300 mir_a_c + 0.45 atp_c \rightleftharpoons 1.000 lps_c + 0.45 adp_c + 0.45 pi_c$	LPS Formation
<i>LPS_biomass</i>	LPS Biomass	$1.000 lps_c + 1.000 atp_c \rightleftharpoons 1.000 lps_x + 1.000 adp_c$	LPS Formation
<i>PRPPs</i>	PRPP Synthesis	$r5p_c + 2 atp_c \rightleftharpoons prpp_c + 2 adp_c$	Nucleotide Metabolism
<i>IMPs</i>	IMP Synthesis	$prpp_c + 2 gln_L_c + gly_L_c + 4 atp_c + asp_L_c + 2 fthf_c + co2_c \rightleftharpoons imp_c + 4 adp_c + 2 glu_L_c + 2 thf_c + fum_c$	Nucleotide Metabolism
<i>AMPs</i>	AMP Synthesis	$imp_c + asp_L_c + atp_c \rightleftharpoons amp_c + adp_c + fum_c$	Nucleotide Metabolism
<i>GMPs</i>	GMP Synthesis	$imp_c + nadp_c + 2 atp_c + gln_L_c \rightleftharpoons gmp_c + 2 adp_c + glu_L_c + nadph_c + h_c$	Nucleotide Metabolism
<i>UMPs</i>	UMP Synthesis	$gln_L_c + prpp_c + 2 atp_c + asp_L_c + nadp_c \rightleftharpoons ump_c + 2 adp_c + glu_L_c + nadph_c + h_c$	Nucleotide Metabolism
<i>UTPs</i>	UTP Synthesis	$ump_c + 2 atp_c \rightleftharpoons utp_c + 2 adp_c$	Nucleotide Metabolism
<i>CTPs</i>	CTP Synthesis	$utp_c + gln_L_c + atp_c \rightleftharpoons ctp_c + adp_c + glu_L_c$	Nucleotide Metabolism
<i>CMPs</i>	CMP Synthesis	$ctp_c + 2 adp_c \rightleftharpoons cmp_c + 2 atp_c$	Nucleotide Metabolism
<i>TMPs</i>	TMP Synthesis	$ump_c + atp_c + nadph_c + h_c + h2o_c + methf_c \rightleftharpoons tmp_c + nadp_c + pi_c + adp_c + thf_c$	Nucleotide Metabolism
<i>dAMPs</i>	dAMP Synthesis	$amp_c + nadph_c + h_c \rightleftharpoons damp_c + nadp_c$	Nucleotide Metabolism
<i>dGMPs</i>	dGMP Synthesis	$gmp_c + nadph_c + h_c \rightleftharpoons dgmp_c + nadp_c$	Nucleotide Metabolism
<i>dCMPs</i>	dCMP Synthesis	$cmp_c + nadph_c + h_c \rightleftharpoons dcmp_c + nadp_c$	Nucleotide Metabolism
<i>dTMPs</i>	dTMP Synthesis	$tmp_c + nadph_c + h_c \rightleftharpoons dtmp_c + nadp_c$	Nucleotide Metabolism
<i>UMPk</i>	UMP phosphorilation	$ump_c + atp_c \rightleftharpoons udp_c + adp_c$	Nucleotide Metabolism
<i>G6PDH2r</i>	Glucose 6-phosphate dehydrogenase	$g6p_c + nadp_c \rightleftharpoons 6pgl_c + h_c + nadph_c$	Pentose phosphate

<i>PGL</i>	6-phosphogluconolactonase	$6pgl_c + h2o_c \rightleftharpoons 6pgc_c$	Pentose phosphate
<i>GND</i>	Phosphogluconate dehydrogenase	$6pgc_c + nadp_c \rightleftharpoons co2_c + nadph_c + ru5p_D_c + h_c$	Pentose phosphate
<i>RPE</i>	Ribulose 5-phosphate 3-epimerase	$ru5p_D_c \rightleftharpoons xu5p_D_c$	Pentose phosphate
<i>RPI</i>	Ribose-5-phosphate isomerase	$r5p_c \rightleftharpoons ru5p_D_c$	Pentose phosphate
<i>TKT1</i>	Transketolase	$r5p_c + xu5p_D_c \rightleftharpoons g3p_c + s7p_c$	Pentose phosphate
<i>TALA</i>	Transaldolase	$g3p_c + s7p_c \rightleftharpoons e4p_c + f6p_c$	Pentose phosphate
<i>TKT2</i>	Transketolase	$e4p_c + xu5p_D_c \rightleftharpoons f6p_c + g3p_c$	Pentose phosphate
<i>PROPs</i>	Propionate synthesis	$pyr_c + 2 nadh_c + 2 h_c \rightleftharpoons prop_c + 2 nad_c + h2o_c$	Propionate metabolism
<i>AMs</i>	AM Synthesis	$0.096 ala_L_c + 0.055 arg_L_c + 0.045 asn_L_c + 0.045 asp_L_c + 0.017 cys_L_c + 0.049 glu_L_c + 0.049 gln_L_c + 0.115 gly_L_c + 0.018 his_L_c + 0.054 ileu_L_c + 0.084 leu_L_c + 0.064 lys_L_c + 0.029 met_L_c + 0.035 phen_L_c + 0.041 pro_L_c + 0.040 ser_L_c + 0.047 thr_L_c + 0.011 tryp_L_c + 0.026 tyr_L_c + 0.079 val_L_c \rightleftharpoons 1.000 am_L_c$	Protein Formation
<i>PROT_biomass</i>	PROT Biomass	$1 am_L_c + 4.306 atp_c \rightleftharpoons 1 prot_x + 4.306 adp_c$	Protein Formation
<i>NADTRHD</i>	NAD transhydrogenase	$nad_c + nadph_c \rightleftharpoons nadh_c + nadp_c$	Redox
<i>THD2</i>	NAD(P) transhydrogenase	$nadh_c + nadp_c + 2.0 h_p \rightleftharpoons 2.0 h_c + nad_c + nadph_c$	Redox
<i>NMPs</i>	NMP Synthesis	$0.262 amp_c + 0.322 gmp_c + 0.200 cmp_c + 0.216 ump_c \rightleftharpoons 1.000 nmp_c$	RNA Formation
<i>NTPs</i>	NTP Synthesis	$1 nmp_c + 2 atp_c \rightleftharpoons 1 ntp_c + 2 adp_c$	RNA Formation
<i>RNA_biomass</i>	RNA Biomass	$1 ntp_c + 0.4 atp_c \rightleftharpoons 1 ma_x + 0.4 adp_c$	RNA Formation
<i>SINK_H_c</i>	H sink	$h_c \rightleftharpoons$	Sink
<i>SINK_Pi_c</i>	Pi Sink	$pi_c \rightleftharpoons$	Sink
<i>SINK_H2O_c</i>	Water Sink	$h2o_c \rightleftharpoons$	Sink
<i>PDH</i>	Pyruvate dehydrogenase	$coa_c + nad_c + pyr_c \rightleftharpoons accoa_c + co2_c + nadh_c + h_c$	Transition
<i>PDH2</i>	Pyruvate dehydrogenase No NADH	$coa_c + pyr_c \rightleftharpoons accoa_c + co2_c$	Transition
<i>GLYCtx</i>	Glycerol transport via diffusion (extracellular to periplasm)	$glyc_p \rightleftharpoons glyc_e$	Transport to Extracellular space
<i>D_LACtp</i>	D lactate transport via diffusion (Extracellular)	$lac_D_p \rightleftharpoons lac_D_e + h_e$	Transport to Extracellular space
<i>ACTp</i>	Acetate transport via diffusion (Extracellular)	$ac_p \rightleftharpoons ac_e + h_e$	Transport to Extracellular space
<i>BUTYtp</i>	Butyrate transport via diffusion (Extracellular)	$buty_p \rightleftharpoons buty_e + h_e$	Transport to Extracellular space
<i>GLCtp</i>	Glucose transport via diffusion (Extracellular)	$glc_D_p \rightleftharpoons glc_D_e$	Transport to Extracellular space
<i>BTOHtp</i>	Butanol transport via diffusion (Extracellular)	$btoh_p \rightleftharpoons btoh_e$	Transport to Extracellular space
<i>ACALDtp</i>	Acetaldehyde transport via diffusion (Extracellular)	$acald_p \rightleftharpoons acald_e$	Transport to Extracellular space
<i>ETOHtp</i>	Ethanol transport via diffusion (Extracellular)	$etoh_p \rightleftharpoons etoh_e$	Transport to Extracellular space
<i>Pitp</i>	Phosphate transport via diffusion (Extracellular)	$pi_p \rightleftharpoons pi_e$	Transport to Extracellular space
<i>H2Otp</i>	H2O transport via diffusion (Extracellular)	$h2o_p \rightleftharpoons h2o_e$	Transport to Extracellular space
<i>CO2tp</i>	CO2 transporter via diffusion (Extracellular)	$co2_p \rightleftharpoons co2_e$	Transport to Extracellular space
<i>NH4tp</i>	Ammonia reversible transport (Extracellular)	$nh4_p + h_e \rightleftharpoons nh4_e$	Transport to Extracellular space
<i>O2tp</i>	O2 transport diffusion (Extracellular)	$o2_p \rightleftharpoons o2_e$	Transport to Extracellular space
<i>MET_REDtp</i>	Mediator reduced transporter via diffusion (Extracellular)	$med_red_p \rightleftharpoons med_red_e$	Transport to Extracellular space
<i>MET_Oxtp</i>	Mediator oxidized transporter via diffusion	$med_ox_p \rightleftharpoons med_ox_e$	Transport to Extracellular space

	(Extracellular)		
<i>Htp</i>	Proton transporter via protein membrane or diffusion	$h_p \Leftrightarrow h_e$	Transport to Extracellular space
<i>FORtp</i>	Formate transport via diffusion (Extracellular)	$for_p \Leftrightarrow for_e + h_e$	Transport to Extracellular space
<i>T_biomass_e</i>	Biomass Transformation	$biomass_x \Leftrightarrow biomass_e$	Transport to Extracellular space
<i>PROpte</i>	Propionate Extracellular Transport	$prop_p \Leftrightarrow prop_e + h_e$	Transport to Extracellular space
<i>IAAte</i>	IAA Extracellular Transport	$iaa_p \Leftrightarrow iaa_e + h_e$	Transport to Extracellular space
<i>GLCpts</i>	D-glucose transport via PEP:Pyruvate PTS	$pep_c + glc_D_p \Leftrightarrow g6p_c + pyr_c$	Transport to Periplasm
<i>GLCt1</i>	Glucose transport uniport	$glc_D_p \Leftrightarrow glc_D_c$	Transport to Periplasm
<i>D_LACt2</i>	D lactate transport via proton symport (Periplasm)	$lac_D_p \Leftrightarrow lac_D_c$	Transport to Periplasm
<i>ACT2r</i>	Acetate reversible transport via proton symport	$ac_p \Leftrightarrow ac_c$	Transport to Periplasm
<i>ACALDt</i>	Acetaldehyde reversible transport	$acald_p \Leftrightarrow acald_c$	Transport to Periplasm
<i>ETOHt2r</i>	Ethanol reversible transport via diffusion	$etoh_p \Leftrightarrow etoh_c$	Transport to Periplasm
<i>PIt2r</i>	Phosphate reversible transport via symport	$pi_p \Leftrightarrow pi_c$	Transport to Periplasm
<i>H2Ot</i>	H ₂ O transport via diffusion	$h2o_p \Leftrightarrow h2o_c$	Transport to Periplasm
<i>CO2t</i>	CO ₂ transporter via diffusion	$co2_p \Leftrightarrow co2_c$	Transport to Periplasm
<i>BUTYt</i>	Butyrate Transport	$buty_c \Leftrightarrow buty_p$	Transport to Periplasm
<i>NH4t</i>	Ammonia reversible transport	$nh4_p \Leftrightarrow nh4_c$	Transport to Periplasm
<i>O2t</i>	O ₂ transport diffusion	$o2_p \Leftrightarrow o2_c$	Transport to Periplasm
<i>GLYCtpp</i>	Glycerol transport via channel (periplasm)	$glyc_c \Leftrightarrow glyc_p$	Transport to Periplasm
<i>BTOHt2rpp</i>	Butanol transport via proton symport (periplasm)	$btoh_p \Leftrightarrow btoh_c$	Transport to Periplasm
<i>FORti</i>	Formate transport via diffusion	$for_p \Leftrightarrow for_c$	Transport to Periplasm
<i>FORt2</i>	Formate transport in via proton symport	$for_p \Leftrightarrow for_c$	Transport to Periplasm
<i>PROPt</i>	Propionate Periplasm Transport	$prop_c \Leftrightarrow prop_p$	Transport to Periplasm
<i>IAAt</i>	IAA Periplasm Transport	$iaa_c \Leftrightarrow iaa_p$	Transport to Periplasm

Figura C-1. Representación gráfica del metabolismo central reconstruido en el modelo metabólico de escala genómica.



Anexo D: Metabolitos incluidos en el modelo metabólico

Abreviación	Descripción	Compartimento
13dpg_c	3-Phospho-D-glyceroyl phosphate	Cytoplasm
2pg_c	D-Glycerate 2-phosphate	Cytoplasm
3hbcoa_c	(S)-3-Hydroxybutanoyl-CoA	Cytoplasm
3pg_c	3-Phospho-D-glycerate	Cytoplasm
6pgc_c	6-Phospho-D-gluconate	Cytoplasm
6pgl_c	6-phospho-D-glucono-1,5-lactone	Cytoplasm
aaccoa_c	Acetoacetyl-CoA	Cytoplasm
ac_c	Acetate	Cytoplasm
ac_e	Acetate	Extracellular
acald_c	Acetaldehyde	Cytoplasm
acald_e	Acetaldehyde	Extracellular
accoa_c	Acetyl-CoA	Cytoplasm
acon_C_c	Cis-Aconitate	Cytoplasm
actp_c	Acetyl phosphate	Cytoplasm
adp_c	ADP C10H12N5O10P2	Cytoplasm
akg_c	2-Oxoglutarate	Cytoplasm
amp_c	AMP C10H12N5O7P	Cytoplasm
atp_c	ATP C10H12N5O13P3	Cytoplasm
b2coa_c	Crotonyl-CoA	Cytoplasm
btal_c	Butanal C4H8O	Cytoplasm
btcoa_c	Butanoyl-CoA	Cytoplasm
btoh_c	Butanol	Cytoplasm
btoh_e	Butanol	Extracellular
cit_c	Citrate	Cytoplasm
co2_c	CO2	Cytoplasm
co2_e	CO2 CO2	Extracellular
coa_c	Coenzyme A	Cytoplasm
dha_c	Dihydroxyacetone	Cytoplasm
dhap_c	Dihydroxyacetone phosphate	Cytoplasm
e4p_c	D-Erythrose 4-phosphate	Cytoplasm
elect__ox_e	Electrode Oxidized	Extracellular
elect__red_e	Electrode Reduced	Extracellular
etoh_c	Ethanol	Cytoplasm
etoh_e	Ethanol	Extracellular
f6p_c	D-Fructose 6-phosphate	Cytoplasm
fdp_c	D-Fructose 1,6-bisphosphate	Cytoplasm
fum_c	Fumarate	Cytoplasm
g3p_c	Glyceraldehyde 3-phosphate	Cytoplasm
g6p_c	D-Glucose 6-phosphate	Cytoplasm

glc_D_c	D-Glucose	Cytoplasm
glc_D_e	D_glucose_external	Extracellular
glx_c	Glyoxylate	Cytoplasm
glyc_c	Glycerol	Cytoplasm
glyc_e	Glycerol	Extracellular
glyc_p	Glycerol	Periplasm
glyc3p_c	Glycerol 3-phosphate	Cytoplasm
h_c	H+	Cytoplasm
h_e	H+	Extracellular
h_p	H+	Periplasm
h2o_c	H2O	Cytoplasm
h2o_e	H2O	Extracellular
icit_c	Isocitrate	Cytoplasm
lac_D_c	D-Lactate	Cytoplasm
lac_D_e	D-Lactate	Extracellular
mal_L_c	L-Malate	Cytoplasm
med_ox_e	Mediator Oxidiced	Extracellular
med_red_e	Mediator Reduced	Extracellular
nad_c	Nicotinamide adenine dinucleotide	Cytoplasm
nadh_c	Nicotinamide adenine dinucleotide - reduced	Cytoplasm
nadp_c	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Cytoplasm
nadph_c	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced	Cytoplasm
nh4_c	Ammonium	Cytoplasm
nh4_e	Ammonium	Extracellular
o2_c	O2	Cytoplasm
o2_e	O2	Extracellular
oaa_c	Oxaloacetate	Cytoplasm
pep_c	Phosphoenolpyruvate	Cytoplasm
pi_c	Phosphate	Cytoplasm
pi_e	Phosphate	Extracellular
pyr_c	Pyruvate	Cytoplasm
q8_c	Ubiquinone-8	Cytoplasm
q8h2_c	Ubiquinol-8	Cytoplasm
r5p_c	Alpha-D-Ribose 5-phosphate	Cytoplasm
ru5p_D_c	D-Ribulose 5-phosphate	Cytoplasm
s7p_c	Sedoheptulose 7-phosphate	Cytoplasm
succ_c	Succinate	Cytoplasm
succoa_c	Succinyl-CoA	Cytoplasm
xu5p_D_c	D-Xylulose 5-phosphate	Cytoplasm
lac_D_p	D-Lactate	Periplasm
ac_p	Acetate	Periplasm
glc_D_p	D-Glucose	Periplasm
btoh_p	Butanol	Periplasm
acald_p	Acetaldehyde	Periplasm

pi_p	Phosphate	Periplasm
co2_p	CO2	Periplasm
etoh_p	Ethanol	Periplasm
h2o_p	H2O	Periplasm
nh4_p	Ammonium	Periplasm
o2_p	O2	Periplasm
med__ox_p	Mediator Oxidiced	Periplasm
med__red_p	Mediator Reduced	Periplasm
for_c	Formate	Cytoplasm
for_p	Formate	Periplasm
for_e	Formate	Extracellular
glu__L_c	L-Glutamate	Cytoplasm
gln__L_c	L-Glutamine	Cytoplasm
pro__L_c	L-Proline	Cytoplasm
carp_c	Carbamyl Phosphate	Cytoplasm
asp__L_c	L-asparatate	Cytoplasm
arg__L_c	L-arginine	Cytoplasm
lys__L_c	L-lysine	Cytoplasm
ser__L_c	L-serine	Cytoplasm
thf_c	Tetrahydrofolate	Cytoplasm
ftfh_c	Formyl-tetrahydrofolate	Cytoplasm
mythf_c	Methyl-tetrahydrofolate	Cytoplasm
methf_c	Methylen-tetrahydrofolate	Cytoplasm
cys__L_c	L-Cisteine	Cytoplasm
gly__L_c	L-Glycine	Cytoplasm
asn__L_c	L-asparagine	Cytoplasm
hom_c	Homoserine	Cytoplasm
thr__L_c	L-Threonine	Cytoplasm
met__L_c	L-Metionine	Cytoplasm
ileu__L_c	L-Isoleucine	Cytoplasm
ala__L_c	L-Alanine	Cytoplasm
aki_c	Alfa-ketoisovalerate	Cytoplasm
val__L_c	L-Valine	Cytoplasm
leu__L_c	L-Leusine	Cytoplasm
cho_c	Chorismate	Cytoplasm
phen__L_c	L-Phenylalanine	Cytoplasm
tyr__L_c	L-Tyrosine	Cytoplasm
tryp__L_c	L-Tryptophan	Cytoplasm
prpp_c	5-Phosphoribosil-1-pirophosphate	Cytoplasm
his__L_c	L-Histidine	Cytoplasm
imp_c	Inosine-5-monophosphate	Cytoplasm
gmp_c	Guanosine-5-monophosphate	Cytoplasm
ump_c	Uridine-5-monophosphate	Cytoplasm

utp_c	Uridine-5-triphosphate	Cytoplasm
ctp_c	Citidine-5-triphosphate	Cytoplasm
cmp_c	Citidine-5-monophosphate	Cytoplasm
tmp_c	Timidine-5-monophosphate	Cytoplasm
damp_c	Deoxyadenosine-5-monophosphate	Cytoplasm
dgmp_c	Deoxiguanosine-5-monophosphate	Cytoplasm
dcmp_c	Deoxycitidine-5-monophosphate	Cytoplasm
dtmp_c	Deoxitimidine-5-monophosphate	Cytoplasm
dntp_c	Deoxi triphosphate generic nucleotide	Cytoplasm
dna_x	DNA	Biomass
biomass_e	Biomass	Extracellular
dnmp_c	Deoxi monophosphate generic nucleotide	Cytoplasm
nmp_c	Monophosphate generic nucleotide	Cytoplasm
ntp_c	Triphosphate generic nucleotide	Cytoplasm
rna_x	RNA	Biomass
am_L_c	Generic aminoacid	Cytoplasm
prot_x	Protein	Biomass
pal_a_c	Palmitic Acid	Cytoplasm
ole_a_c	Oleic Acid	Cytoplasm
malcoa_c	MalonilCoA	Cytoplasm
LIP_c	Lipids	Cytoplasm
etn_c	Ethanolamine	Cytoplasm
oa_c	Generic organic Acid	Cytoplasm
lip_c	Lipids	Cytoplasm
lip_x	Lipids	Biomass
glun6p_c	Glucosamine-6P	Cytoplasm
rha_c	Rhamnose	Cytoplasm
dtdp_c	Deoxditimidin diphosphate	Cytoplasm
dttp_c	Deoxditimidin triphosphate	Cytoplasm
h7p_c	Heptose-7P	Cytoplasm
mir_a_c	Miristic acid	Cytoplasm
kdo8p_c	KDO	Cytoplasm
lps_c	Lipopolisacharyd	Cytoplasm
lps_x	<i>Lipopolisacharyd</i>	Biomass
ch_c	Carbohydrate	Cytoplasm
ch_x	Carbohydrate	Biomass
om_c	Generic pectidoglycan	Cytoplasm
om_x	Generic pectidoglycan	Biomass
biomass_x	Biomass	Biomass
udp_c	Uridin diphosphate	Cytoplasm
buty_c	Butirate	Cytoplasm
buty_e	Butirate	Cytoplasm
buty_p	Butirate	Periplasm
prop_c	Propionate	Cytoplasm

prop_e	Propionate	Extracellular
prop_p	Propionate	Periplasm
ipa_c	IPA	Cytoplasm
iaald_c	Indolacetaldehyde	Cytoplasm
iaa_c	Indolacetic acid	Cytoplasm
iaa_p	Indolacetic acid	Periplasm
iaa_e	Indolacetic acid	Extracellular

Anexo E: Propiedades fisicoquímicas de los compuestos utilizados

Molécula	Formula	Formulada Cargada	Carga	C	H	O	N	ΔG_f° (kJ/mol)	Peso Molecular (g/mol)	Electrones Disponibles	Grado de reducción
Glucosa	C6H12O6	C6H12O6	0	6	12	6	0	-917.22	180.15	24.00	4.00
Butirato	C4H8O6	C4H7O6-	-1	4	7	2	0	-352.63	88.10	20.00	5.00
CO2	CO2	CO2	0	1	0	2	0	-394.35	44.01	0.00	0.00
H2O	H2O	H2O	0	0	2	1	0	-237.18	18.01	0.00	0.00
H+	H+	H+	1	0	1	0	0	-39.87	1.01	0.00	0.00
Acetato	C2H4O2	C2H3O2-	-1	2	3	2	0	-369.41	60.05	8.00	4.00
Butanol	C4H10O	C4H10O	0	4	10	1	0	-154.08	74.12	24.00	6.00
Propionato	C3H6O2	C3H5O2-	-1	3	5	2	0	-361.08	74.08	14.00	4.67
Lactato	C3H6O3	C3H5O3-	-1	3	5	3	0	-517.18	90.08	12.00	4.00
Biomasa	C4H7O3	CH1,8O0,5N0,2	0	1	1.80	0.56	0.28	-67.00	26.71	3.84	3.84
NH4+	NH4+	NH4+	1	0	4	0	1	-79.37	18.04	0.00	0.00
H2	H2	H2	0	0	2	0	0	0.00	2.02	2.00	2.00
Electrones	e	e	-1	0	0	0	0		0.00	1.00	1.00
AIA	C10H9N02	C10H8NO2	-1	10	8	2	1	-145.00	175.18	42.00	4.20
Oxígeno	O2	O2	0	0	0	2	0	0.00	32.00	-4.00	4.00
Glicerol	C3H8O3	C3H8O3	0	3	8	3	0	-488.52	92.09	14.00	4.67
Etanol	C2H6O	C2H6O	0	2	6	1	0	-181.18	46.07	12.00	6.00
Formato	CH2O2	CHO2	-1	1	1	2	0	-372.50	46.02	2.00	2.00

Bibliografía

- [1] L. Pedraza, “Análisis metabólico y termodinámico in silico para la biosíntesis de ácido 3-indolacético (AIA) a partir de glicerol en *Azospirillum brasilense*,” Universidad Nacional de Colombia, 2019.
- [2] D. Puerta, “Diseño *in silico* de una red metabólica, a partir de cultivos microbianos mixtos, para un microorganismo chasis capaz de producir ácido propiónico a partir de glicerol crudo: aproximación desde la termodinámica y la ingeniería metabólica,” Universidad Nacional de Colombia, 2019.
- [3] L. Avendaño, “Diseño *in silico* de una plataforma biosintética que permita la valoración del gas de síntesis mediante su conversión en etileno, implementando herramientas de ingeniería metabólica,” Universidad Nacional de Colombia, 2019.
- [4] R. Moscoviz, J. Toledo-Alarcón, E. Trably, and N. Bernet, “Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 856–865, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.04.009.
- [5] U. von Stockar, *The Role of Thermodynamics in Biochemical Engineering*. 2013.
- [6] U. Von Stockar and L. A. M. Van Der Wielen, “Thermodynamics in biochemical engineering,” *J. Biotechnol.*, vol. 59, no. 1–2, pp. 25–37, Dec. 1997, doi: 10.1016/S0168-1656(97)00167-3.
- [7] M. C. Flickinger, J. J. Heijnen, and R. Kleerebezem, “Bioenergetics of Microbial Growth,” in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [8] U. Von Stockar, “Biothermodynamics of live cells: A tool for biotechnology and biochemical engineering,” *J. Non-Equilibrium Thermodyn.*, vol. 35, no. 4, pp. 415–475, Dec. 2010, doi: 10.1515/JNETDY.2010.024/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [9] H. F. Cueto-Rojas, A. J. A. van Maris, S. A. Wahl, and J. J. Heijnen,

- “Thermodynamics-based design of microbial cell factories for anaerobic product formation,” *Trends in Biotechnology*, vol. 33, no. 9. Elsevier Ltd, pp. 534–546, Sep. 01, 2015, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.010.
- [10] B. Kim, W. J. Kim, D. I. Kim, and S. Y. Lee, “Applications of genome-scale metabolic network model in metabolic engineering,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 42, no. 3, pp. 339–348, Jan. 2015, doi: 10.1007/s10295-014-1554-9.
- [11] M. R. Long, W. K. Ong, and J. L. Reed, “Computational methods in metabolic engineering for strain design,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 34. Elsevier Ltd, pp. 135–141, Aug. 01, 2015, doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.019.
- [12] Z. A. King, C. J. Lloyd, A. M. Feist, and B. O. Palsson, “Next-generation genome-scale models for metabolic engineering,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 35. Elsevier Ltd, pp. 23–29, Dec. 01, 2015, doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.016.
- [13] C. A. Suarez-Mendez, M. Hanemaaijer, A. ten Pierick, J. C. Wolters, J. J. Heijnen, and S. A. Wahl, “Interaction of storage carbohydrates and other cyclic fluxes with central metabolism: A quantitative approach by non-stationary ¹³C metabolic flux analysis,” *Metab. Eng. Commun.*, vol. 3, pp. 52–63, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.meteno.2016.01.001.
- [14] J. Jordà *et al.*, “Glucose-methanol co-utilization in *Pichia pastoris* studied by metabolomics and instationary ¹³C flux analysis,” *BMC Syst. Biol.*, vol. 7, Feb. 2013, doi: 10.1186/1752-0509-7-17.
- [15] J. Speight, *Lange’s Handbook Of Chemistry, Sixteenth Edition*. 2005.
- [16] W. J. Kim, H. U. Kim, and S. Y. Lee, “Current state and applications of microbial genome-scale metabolic models,” *Curr. Opin. Syst. Biol.*, vol. 2, pp. 10–18, 2017, doi: 10.1016/j.coisb.2017.03.001.
- [17] H. U. Kim, T. Y. Kim, and S. Y. Lee, “Metabolic flux analysis and metabolic engineering of microorganisms,” *Mol. Biosyst.*, vol. 4, no. 2, pp. 113–120, 2008, doi: 10.1039/b712395g.
- [18] K. Rabaey *et al.*, “Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities,” *ISME J.*, vol. 1, pp. 9–18, 2007, doi: 10.1038/ismej.2007.4.
- [19] K. Rabaey, “Bioelectrochemical Systems: From Extracellular Electron Transfer to

- Biotechnological Application,” *Water Intell. Online*, vol. 8, p. undefined-undefined, Dec. 2009, doi: 10.2166/9781780401621.
- [20] B. Korth and F. Harnisch, “Spotlight on the energy harvest of electroactive microorganisms: The impact of the applied anode potential,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. JUN, Jun. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01352.
- [21] A. Sydow, T. Krieg, F. Mayer, J. Schrader, and D. Holtmann, “Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 20, pp. 8481–8495, 2014, doi: 10.1007/s00253-014-6005-z.
- [22] M. Firer-Sherwood, G. S. Pulcu, and S. J. Elliott, “Electrochemical interrogations of the Mtr cytochromes from *Shewanella*: opening a potential window,” *J Biol Inorg Chem*, vol. 13, pp. 849–854, 2008.
- [23] A. Sydow, T. Krieg, F. Mayer, J. Schrader, and D. Holtmann, “Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 20, pp. 8481–8495, 2014, doi: 10.1007/s00253-014-6005-z.
- [24] C. Bücking, M. Schicklberger, and J. Gescher, “The Biochemistry of Dissimilatory Ferric Iron and Manganese Reduction in *Shewanella oneidensis*,” in *Microbial Metal Respiration*, A. Kappler and J. Gescher, Eds. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- [25] K. Rabaey, L. Angenent, U. Schröder, and J. Keller, *Bioelectrochemical systems: from extracellular electrons transfer to biotechnological application*. London: IWA Publishing, 2010.
- [26] F. Harnisch, L. F. M. Rosa, F. Kracke, B. Viridis, and J. O. Krömer, “Electrifying white biotechnology: Engineering and economic potential of electricity-driven bioproduction,” *ChemSusChem*, vol. 8, no. 5, pp. 758–766, 2015, doi: 10.1002/cssc.201402736.
- [27] M. Aghababaie, M. Farhadian, A. Jeihanipour, and D. Biria, “Effective factors on the performance of microbial fuel cells in wastewater treatment—a review,” *Environ. Technol. Rev.*, vol. 4, no. 1, pp. 71–89, 2015, doi: 10.1080/09593330.2015.1077896.

- [28] C. I. Torres, A. K. Marcus, H.-S. Lee, P. Parameswaran, R. Krajmalnik-Brown, and B. E. Rittmann, "A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 34, no. 1, pp. 3–17, Jan. 2010, doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00191.x.
- [29] P. Arbter, W. Sabra, T. Utesch, Y. Hong, and A. Zeng, "Metabolomic and kinetic investigations on the electricity-aided production of butanol by *Clostridium pasteurianum* strains," *Eng. Life Sci.*, p. elsc.202000035, Dec. 2020, doi: 10.1002/elsc.202000035.
- [30] U. Schroder, "Microbial Fuel Cells and Microbial Electrochemistry: Into the Next Century!," *ChemSusChem*, vol. 5, pp. 959–961, 2012, doi: 10.1002/cssc.201200319.
- [31] D. R. Lovley, "Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 17, pp. 327–332, 2006.
- [32] Y. Zhang and I. Angelidaki, "Microbial electrolysis cells turning to be versatile technology: recent advances and future challenges," *Water Res.*, vol. 56, pp. 11–25, 2014.
- [33] K. Rabaey and R. A. Rozendal, "Microbial electrosynthesis— revisiting the electrical route for microbial production," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, pp. 706–716, 2010.
- [34] O. Choi, T. Kim, H. M. Woo, and Y. Um, "Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*," *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 1, p. 6961, May 2015, doi: 10.1038/srep06961.
- [35] O. Choi, Y. Um, and B. I. Sang, "Butyrate production enhancement by *Clostridium tyrobutyricum* using electron mediators and a cathodic electron donor," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 10, pp. 2494–2502, Oct. 2012, doi: 10.1002/bit.24520.
- [36] J. M. Flynn, D. E. Ross, K. A. Hunt, D. R. Bond, and J. A. Gralnick, "Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode- interfaced bacteria," *MBio*, vol. 1, no. 5, Nov. 2010, doi: 10.1128/mBio.00190-10.
- [37] "Basic overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT)- Electrochemical cell setup."
- [38] R. Emde and B. Schink, "Enhanced Propionate Formation by *Propionibacterium*

- freudenreichii* subsp. *freudenreichii* in a Three-Electrode Amperometric Culture System Downloaded from,” 1990. Accessed: Jan. 31, 2021. [Online]. Available: <http://aem.asm.org/>.
- [39] C. G. Liu, C. Xue, Y. H. Lin, and F. W. Bai, “Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations,” *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 2. Elsevier, pp. 257–265, Mar. 01, 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.11.005.
- [40] R. Emde and B. Schink, “Enhanced propionate formation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, pp. 2771–2776, 1990.
- [41] R. Moscoviz, J. Toledo-Alarcón, E. Trably, and N. Bernet, “Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 11, pp. 856–865, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.04.009.
- [42] B. Korth and F. Harnisch, “Modeling microbial electrosynthesis,” in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 167, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2019, pp. 273–325.
- [43] H. Rismani-Yazdi, A. D. Christy, S. M. Carver, Z. Yu, B. A. Dehority, and O. H. Tuovinen, “Effect of external resistance on bacterial diversity and metabolism in cellulose-fed microbial fuel cells,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 278–283, 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.012.
- [44] F. Kracke and J. O. Krömer, “Identifying target processes for microbial electrosynthesis by elementary mode analysis,” 2014, doi: 10.1186/s12859-014-0410-2.
- [45] F. Kracke, B. Lai, S. Yu, and J. O. Krömer, “Balancing cellular redox metabolism in microbial electrosynthesis and electro fermentation – A chance for metabolic engineering,” *Metabolic Engineering*, vol. 45. Academic Press Inc., pp. 109–120, Jan. 01, 2018, doi: 10.1016/j.ymben.2017.12.003.
- [46] T. D. Harrington *et al.*, “The mechanism of neutral red-mediated microbial electrosynthesis in *Escherichia coli*: menaquinone reduction,” 2015, doi:

- 10.1016/j.biortech.2015.06.037.
- [47] Y. Anraku, "BACTERIAL ELECTRON TRANSPORT CHAINS," <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.000533>, vol. 57, pp. 101–132, Nov. 2003, doi: 10.1146/ANNUREV.BI.57.070188.000533.
- [48] L. Heirendt *et al.*, "Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0," *Nat. Protoc.* 2019 143, vol. 14, no. 3, pp. 639–702, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41596-018-0098-2.
- [49] Z. A. King, A. Dräger, A. Ebrahim, N. Sonnenschein, N. E. Lewis, and B. O. Palsson, "Escher: A Web Application for Building, Sharing, and Embedding Data-Rich Visualizations of Biological Pathways," *PLOS Comput. Biol.*, vol. 11, no. 8, p. e1004321, Aug. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1004321.
- [50] P. Raybaut, "Spyder-documentation." 2009, [Online]. Available: pythonhosted.org.
- [51] O. Choi, T. Kim, H. M. Woo, and Y. Um, "Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*," *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2014, doi: 10.1038/srep06961.
- [52] I. Vassilev, G. Gießelmann, S. K. Schwechheimer, C. Wittmann, B. Virdis, and J. O. Krömer, "Anodic electro-fermentation: Anaerobic production of L-Lysine by recombinant *Corynebacterium glutamicum*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 115, no. 6, pp. 1499–1508, 2018, doi: 10.1002/bit.26562.
- [53] C. G. Liu, C. Xue, Y. H. Lin, and F. W. Bai, "Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 2, pp. 257–265, 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.11.005.
- [54] B. Schuppert, B. Schink, and W. Trösch, "Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidipropionici* in a three-electrode amperometric culture system," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 37, no. 5, pp. 549–553, Aug. 1992, doi: 10.1007/BF00240723.
- [55] A. M. Feist *et al.*, "A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 3, no. 1, p. 121, Jan. 2007, doi: 10.1038/MSB4100155.
- [56] M. Zhou, J. Chen, S. Freguia, K. Rabaey, and J. Keller, "Carbon and electron

- fluxes during the electricity driven 1,3-propanediol biosynthesis from glycerol,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 19, pp. 11199–11205, Oct. 2013, doi: 10.1021/ES402132R/SUPPL_FILE/ES402132R_SI_001.PDF.
- [57] C. Kim *et al.*, “Anodic electro-fermentation of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by recombinant *Klebsiella pneumoniae* L17 in a bioelectrochemical system,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, no. 1, p. 199, Aug. 2017, doi: 10.1186/s13068-017-0886-x.
- [58] A. M. Feist *et al.*, “A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 3, 2007, doi: 10.1038/MSB4100155.
- [59] A. Özcan, Y. Şahin, A. Savaş Kopal, and M. A. Oturan, “Carbon sponge as a new cathode material for the electro-Fenton process: Comparison with carbon felt cathode and application to degradation of synthetic dye basic blue 3 in aqueous medium,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 616, no. 1–2, pp. 71–78, May 2008, doi: 10.1016/J.JELECHEM.2008.01.002.
- [60] S. Wang, Y. Zhu, Y. Yang, J. Li, and M. R. Hoffmann, “Electrochemical cell lysis of gram-positive and gram-negative bacteria: DNA extraction from environmental water samples,” *Electrochim. Acta*, vol. 338, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2020.135864.
- [61] T. Zhang, R. O. Louro, J. O. Krömer, F. Kracke, and I. Vassilev, “Microbial electron transport and energy conservation-the foundation for optimizing bioelectrochemical systems Microbial electron transport in bioelectrochemical systems,” *Front. Microbiol. | www.frontiersin.org*, vol. 1, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00575.
- [62] K. Sturm-Richter *et al.*, “Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells,” *Bioresour. Technol.*, vol. 186, pp. 89–96, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.02.116.
- [63] J. P. O’Brien and N. S. Malvankar, “A Simple and Low-Cost Procedure for Growing *Geobacter sulfurreducens* Cell Cultures and Biofilms in Bioelectrochemical Systems,” *Curr. Protoc. Microbiol.*, vol. 43, no. 1, p. A.4K.1-A.4K.27, Nov. 2016,

- doi: 10.1002/CPMC.20.
- [64] C. Koch, B. Korth, and F. Harnisch, "Microbial ecology-based engineering of Microbial Electrochemical Technologies," *Microb. Biotechnol.*, vol. 11, no. 1, pp. 22–38, Jan. 2018, doi: 10.1111/1751-7915.12802.
- [65] M. Kanehisa, Y. Sato, and M. Kawashima, "KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data," *Protein Sci.*, vol. 31, no. 1, pp. 47–53, Jan. 2022, doi: 10.1002/PRO.4172.
- [66] J. M. Flynn, D. E. Ross, K. A. Hunt, D. R. Bond, and J. A. Gralnick, "Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode- interfaced bacteria," *MBio*, vol. 1, no. 5, Nov. 2010, doi: 10.1128/mBio.00190-10.
- [67] J. M. Monk *et al.*, "Genome-scale metabolic reconstructions of multiple *Escherichia coli* strains highlight strain-specific adaptations to nutritional environments," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 50, pp. 20338–20343, Dec. 2013, doi: 10.1073/PNAS.1307797110/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [68] F. C. Neidhardt, "Chemical Composition of *Escherichia Coli*," *Escherichia coli Salmonella typhimurium - Cell. Mol. Biol.*, p. 2822, 1987, [Online]. Available: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/416059>.
- [69] J. Pramanik and J. D. Keasling, "Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: Incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 56, no. 4, pp. 398–421, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19971120)56:4<398::AID-BIT6>3.0.CO;2-J.
- [70] J. A. Roels, "Application of Macroscopic Principles To Microbial Metabolism," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 369, no. 1, pp. 113–134, 1981, doi: 10.1111/j.1749-6632.1981.tb14182.x.
- [71] F. Kracke, B. Viridis, P. V. Bernhardt, K. Rabaey, and J. O. Krömer, "Redox dependent metabolic shift in *Clostridium autoethanogenum* by extracellular electron supply," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1186/s13068-016-0663-2.