



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de un sistema bio- electroquímico de fermentación para la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerina cruda

Oscar Leonardo Aragón Caycedo I.Q. M.Sc.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología
Bogotá, Colombia

2023

Estudio de un sistema bio-electroquímico de fermentación para la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerina cruda

Oscar Leonardo Aragón Caycedo I.Q. M.Sc.

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

Doctor en Biotecnología

Directora:

Dolly Montoya Castaño Q.F. M.Sc. Ph.D.

Línea de Investigación:

Microorganismos solventogénicos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología

Bogotá, Colombia

2023

*A mi Hijo,
quien con su nacimiento
me enseñó que el infinito existe y
que el amor es la verdadera
razón de la existencia.
Gracias*

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.

OSCAR ARAGON CAYCEDO

Fecha 01/07/2023

Agradecimientos

A mis padres Julia y Víctor por su ejemplo de esfuerzo, resistencia y apoyo incondicional en tiempos difíciles.

A mi esposa Adriana y a mi hijo David por su apoyo y amor incondicional para seguir adelante.

A mi hermana Constanza por siempre tener una palabra de aliento y apoyo.

A la profesora Dolly Montoya Castaño de la Universidad Nacional por la guía y dirección en el proyecto.

Al profesor Gustavo Buitrago por sus valiosos aportes y sugerencias durante el desarrollo del proyecto.

A los integrantes de los grupos de investigación de Microorganismos Solventogénicos de la Universidad Nacional por sus constantes aportes e incondicional ayuda, en especial al profesor Mauricio Bernal y el ingeniero Luis Serrano.

Al profesor German Aroca por permitirme realizar mi pasantía en la Universidad Católica de Valparaíso.

A la Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Biotecnología y Doctorado Interfacultades de Biotecnología por su instrucción para ser Doctor en Biotecnología.

A Colciencias por su financiación mediante los préstamos condonables de apoyo a estudiantes de doctorado nacionales.

A todas las personas que trabajan en el Instituto de Biotecnología que de alguna u otra forma contribuyeron en este proceso.

Resumen

Estudio de un sistema bio-electroquímico de fermentación para la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerina cruda

Los azúcares y el glicerol pueden servir como sustratos de bajo costo en aplicaciones biotecnológicas para obtener varios intermediarios químicos con un alto valor agregado. La electrofermentación es una reciente tecnología con la que es posible mejorar y controlar la fermentación microbiana, especialmente con cepas del género *Clostridium*, aumentando la especificidad de las vías metabólicas. En este contexto, cepas bacterianas aisladas de suelos colombianos, y estrechamente relacionadas con *Clostridium butyricum*, se han identificado como eficientes productoras de solventes y ácidos, incluidos ácido acético, ácido butírico, etanol, butanol, acetona e hidrógeno a partir de glucosa o 1,3-propanodiol a partir de glicerol. En este trabajo se evalúa el efecto del suministro externo de electrones en la producción de metabolitos de interés comercial con una red metabólica de *C. butyricum*. Los resultados obtenidos de un modelo de simulación señalan que la interacción con el electrodo catódico mejora los rendimientos de productos reducidos. En concreto, utilizando glicerol como sustrato, la simulación indicó que el rendimiento medio del producto podría aumentar con 1,3-propanodiol (23%) e hidrógeno (45%). Por último, se estableció experimentalmente que la cepa nativa IBUN 158B es electroactiva y tiene la capacidad de incrementar los valores de rendimiento producto / sustrato de 1,3-PD (7 – 9%) cuando es sometida a la alimentación de pequeñas cantidades de electrones desde un cátodo en un proceso electrofermentación catódica y que el uso de transportadores de electrones como el Rojo Neutral incrementa los efectos de la electrofermentación alcanzando mayores valores de rendimiento cuando está presente en el medio de cultivo. En conclusión, la electrofermentación de *Clostridium butyricum* como técnica de cultivo bioelectroquímico tiene potencial como proceso de producción alternativo a la fermentación tradicional para controlar el estado redox durante la síntesis de bioquímicos y aumentar la producción de metabolitos de interés comercial. Pero se necesita más investigación básica y aplicada para dilucidar los mecanismos de transferencia de electrones y revelar los mecanismos reguladores subyacentes.

Palabras clave: 1,3-propanodiol, hidrógeno, glicerol, electrofermentación, cátodo, análisis de modo elemental, *Clostridium butyricum*, modelo metabólico central.

Abstract

Study of a bio-electrochemical fermentation system to produce 1,3-propanediol from crude glycerin.

Sugars and glycerol can serve as low-cost substrates in biotechnological applications to obtain various chemical intermediates with high added value. Electrofermentation is a recent technology with which it is possible to improve and control microbial fermentation, especially with strains of the *Clostridium* genus, increasing the specificity of metabolic pathways. In this context, bacterial strains isolated from Colombian soils, and closely related to *Clostridium butyricum*. These strains have been efficient producers of solvents and acids, including acetic acid, butyric acid, ethanol, butanol, acetone, and hydrogen from glucose or 1,3-propanediol from glycerol. In this work, the production of commercial interest metabolites is assessed using an electron external supply with a metabolic network of *C. butyricum*. The simulation results show that the interaction with the cathode electrode improves the reduced product rates. Specifically, using glycerol as a substrate, the average yield of the product increases with 1,3-propanediol (23%) and hydrogen (45%). Finally, it was established experimentally that the native strain IBUN 158B is electroactive and has the capacity to increase the product/substrate yield values of 1,3-PD (7-9%) when it is submitted to the feeding of small amounts of electrons from a cathode in a cathodic electrofermentation process and that the use of electron carriers such as Neutral Red increases the effects of electrofermentation, reaching higher yield values when it is present in the culture medium. In conclusion, the electrofermentation of *Clostridium butyricum* as a bioelectrochemical culture technique has potential as an alternative production process to traditional fermentation to control the redox state during the synthesis of biochemicals and increase the production of metabolites of commercial interest. More basic and applied research is necessary to elucidate the mechanisms of electron transfer and reveal the underlying regulatory mechanisms.

Keywords: 1,3-propanediol, hydrogen, glycerol, electrofermentation, cathode, elementary mode analysis, *Clostridium butyricum*, central metabolic model.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Introducción	1
1. Capítulo 1 Estado del Arte	5
1.1 Biodiesel y Glicerol crudo	5
1.1.1 Situación en Colombia	5
1.1.2 Glicerol crudo y su uso industrial	6
1.2 1,3-propanodiol y su producción biotecnológica	8
1.2.1 Bioconversión de 1,3-propanodiol	8
1.2.2 Estrategias tradicionales de fermentación para 1,3-PD	11
1.2.3 Producción Industrial de 1,3-propanodiol y su mercado	15
1.2.4 Economía del proceso biotecnológico para 1,3-PD	15
1.3 Sistemas bioelectroquímicos de fermentación	17
1.3.1 Mecanismos de transferencia de electrones	19
1.3.2 Producción de 1,3-PD con sistemas bioelectroquímicos	20
1.3.3 Economía de procesos con sistemas bioelectroquímicos	23
1.3.4 Simulación de sistemas bioelectroquímicos (BES)	25
1.3.4.1 Modelos no estructurados	25
1.3.4.2 Modelos estructurados	27
1.4 Herramientas de álgebra lineal para analizar redes metabólicas	28
1.4.1 Análisis de flujo metabólico (MFA)	30
1.4.2 Análisis de balance de flujo (FBA)	31
1.4.3 Análisis de modo elemental (EMA)	31
1.5 Avances del grupo de Bioprocesos y Bioprospección	33
2. Capítulo 2 Objetivos	35
2.1 Objetivo general	36
2.1.1 Objetivos específicos	37
3. Capítulo 3 Metodología	39
3.1 Establecimiento de un modelo metabólico	39
3.1.1 Construcción de un modelo metabólico central	39
3.1.2 Validación del modelo metabólico central	41
3.1.3 Evaluación del suministro de electrones al metabolismo	42
3.2 Selección de una cepa nativa	43

3.2.1	Microorganismos nativos.....	43
3.2.2	Microorganismos patrón	44
3.2.3	Medios de cultivo de inóculo.....	45
3.2.4	Medios de cultivo de tamizaje con glicerol USP y crudo	45
3.2.5	Proceso de activación y desarrollo de inóculo	46
3.2.6	Condiciones de cultivo en vial sin control de pH	47
3.2.7	Inhibición a diferentes concentraciones de Rojo Neutral.	47
3.2.8	Determinación de parámetros cinéticos.....	48
3.3	Estandarización de la electrofermentación con cepa patrón	49
3.3.1	Voltamperometría cíclica para cultivo suspendido	49
3.3.2	Voltamperometría cíclica con electrodo fieltro de grafito.....	50
3.3.3	Condiciones de cultivo por lote en reactor H con pH controlado	51
4.	Resultados y discusión	53
4.1	Establecimiento de un modelo metabólico	53
4.1.1	Validación de modelo metabólico	53
4.1.2	Cambios en flujos metabólicos y rendimiento de productos.....	53
4.1.3	Modulación de la fermentación por suministro de electrones.....	60
4.2	Selección de una cepa nativa	63
4.2.1	Cultivos en vial con glicerol crudo.....	63
4.2.2	Cultivos en vial con transportador Rojo Neutral	65
4.2.3	Efecto de Rojo Neutral en rendimiento de 1,3-propanodiol.....	65
4.3	Estandarización electrofermentación con cepa patrón	68
4.3.1	Detección de actividad bioelectroquímica.....	68
4.3.2	Electrofermentación catódica en reactor H.....	70
4.4	Viabilidad de electrofermentación para 1,3-PD	74
5.	Conclusiones y recomendaciones	77
5.1	Conclusiones	77
5.2	Recomendaciones	78
	Bibliografía	81
A.	Anexo: Modelo metabólico central	105
B.	Anexo: Voltamperometría cíclica de cepa nativa y cepa patrón.....	109
C.	Anexo: Datos de electrofermentaciones en reactor H	111
D.	Anexo: Diagrama del proceso en reactor H.....	113

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1:	Rutas catabólicas del metabolismo anaeróbico del glicerol.9
Figura 1-2:	Artículos científicos publicados para EF (1956 – 2023/01).....17
Figura 1-3:	Representación para un proceso de electrofermentación catódica.18
Figura 1-4:	Representación de mecanismos de transferencia de electrones.20
Figura 3-1:	Arreglo experimental para realización de Voltamperometría Cíclica.50
Figura 3-2:	Arreglo experimental para cultivo en reactor H por lote.....51
Figura 4-1:	Validación del modelo metabólico central para <i>Clostridium butyricum</i>54
Figura 4-2:	Cambio de flujos metabólicos por CEF.55
Figura 4-3:	Yp/s con diferentes mecanismos de transferencia de electrones.57
Figura 4-4:	Distribución del número de EM para el rendimiento de 1,3-PD.....62
Figura 4-5:	Distribución del número de EM para el rendimiento de H ₂62
Figura 4-6:	Efecto del Rojo Neutral sobre el rendimiento producto / sustrato66
Figura 4-7:	CV de <i>C. pasteurianum</i> en electrodo de fieltro de grafito.69
Figura 4-8:	CV de IBUN 158B en electrodo de fieltro de grafito.69
Figura 4-9:	Rendimientos en EF de <i>C. pasteurianum</i> con Glicerol USP y crudo.71
Figura 4-10:	Rendimientos en EF de IBUN 158B con Glicerol USP y crudo.72
Figura 4-11:	Rendimientos en EF de IBUN 158B con Glicerol crudo y Rojo Neutral ...73
Figura 5-1:	CV de IBUN 158B en cultivo suspendido.109
Figura 5-2:	CV de <i>C. pasteurianum</i> en cultivo suspendido.....109
Figura 5-3:	CV de sobrenadante sin biomasa en cultivo con fieltro de carbono.110
Figura 5-4:	Descripción esquemática de electrofermentación en este estudio.113

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Técnicas de fermentación de glicerol con <i>C. butyricum</i>	12
Tabla 3-1: Cepas nativas utilizadas en el estudio	43
Tabla 3-2: Cepas patrón utilizadas en el estudio	44
Tabla 3-3: Medio de cultivo RCM.....	45
Tabla 3-4: Componentes del medio 1	46
Tabla 3-5: Componentes de la solución de minerales.....	46
Tabla 3-6: Relaciones de detección HPLC y Biomasa	49
Tabla 4-1: Número de EM con rendimientos para 1,3-PD e hidrógeno	58
Tabla 4-2: Fermentaciones en vial con glicerol USP.....	64
Tabla 4-3: Fermentaciones en vial con glicerol crudo	64
Tabla 4-4: Porcentaje de inhibición por adición de Rojo Neutral.	65
Tabla 5-1: Lista de Metabolitos.....	105
Tabla 5-2: Lista de Reacciones.	107
Tabla 5-3: Concentraciones de electrofermentaciones en reactor H.....	111

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>1,3-PD</i>	1,3-Propanodiol
<i>3-HPA</i>	3-hidroxipropionaldehído
<i>3P</i>	3-fosfato
<i>AC</i>	Acetato
<i>ACCOA</i>	Acetil-CoA
<i>ADP</i>	Difosfato de adenosina
<i>AKG</i>	Ácido 2-cetoglutarico
<i>AQDS</i>	Antraquinona-2,6-disulfonato
<i>ATP</i>	Trifosfato de adenosina
<i>BES</i>	Bioelectrochemical system
<i>BGLUP</i>	Fosfato de beta glucosa
<i>BIOM</i>	Biomasa
<i>BULCOA</i>	Butiril-CoA
<i>BUT</i>	Butirato
<i>CEF</i>	Electrofermentación catódica
<i>CO₂</i>	Dióxido de carbono
<i>CV</i>	Voltamperometría cíclica
<i>DHA</i>	Dihidroxiacetona
<i>DHAK</i>	Dihidroxiacetona quinasa
<i>DHAP</i>	Fosfato de dihidroxiacetona
<i>DOE</i>	Department of Energy
<i>E-</i>	Electrón extracelular
<i>E4P</i>	Eritrosa 4-fosfato
<i>EET</i>	Extracellular electron transfer
<i>EF</i>	Electrofermentación
<i>EMA</i>	Elementary modes analysis
<i>EM</i>	Elementary modes
<i>ET</i>	Etanol
<i>ET1</i>	Mecanismo de transferencia de electrones 1
<i>ET2</i>	Mecanismo de transferencia de electrones 2
<i>F16DP</i>	Fructosa 1,6-difosfato
<i>F6P</i>	Fructosa 6-fosfato
<i>FAME</i>	Fatty Acid Methyl Esters
<i>FBA</i>	Flux balance analysis
<i>FDOX</i>	Ferredoxina oxidada
<i>FDRD</i>	Ferredoxina reducida
<i>FFA</i>	Free Fatty Acids
<i>FOR</i>	Formiato
<i>G13DP</i>	Gliceraldehído 1,3-difosfato
<i>G6P</i>	Glucosa 6-fosfato
<i>GA3P</i>	Gliceraldehído 3-fosfato
<i>GDH</i>	Glicerol deshidrogenasa
<i>GDHt</i>	Glicerol deshidratasa
<i>GENBANK</i>	NIH genetic sequence database
<i>GLY</i>	Glicerol
<i>GLYEX</i>	Glicerol extracelular
<i>H₂</i>	Hidrógeno gaseoso

Abreviatura Término

<i>H₂CO₃</i>	Ácido carbónico
<i>IBUN</i>	Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
<i>KBASE</i>	Systems Biology Knowledgebase
<i>KEEG</i>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<i>LAC</i>	Lactato
<i>LCE</i>	Low carbon economy
<i>ModelSEED</i>	Metabolic Modeling Made Simple.
<i>MONG</i>	Matter Organic Non-Glycerol
<i>MES</i>	Microbial electrosynthesis
<i>MFC</i>	Microbial fuel cell
<i>MV</i>	Metil viológeno
<i>NAD</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido-oxidada
<i>NADH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido-reducida
<i>NADH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<i>NADP</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidada
<i>NADPH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-reducida
<i>NADPH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<i>NIH</i>	National Institutes of Health
<i>No E</i>	Sin Transferencia de electrones
<i>NR</i>	Rojo Neutral
<i>O.D.</i>	Densidad óptica
<i>OAA</i>	Ácido oxaloacético
<i>ORP</i>	Potencial de oxidación-reducción
<i>1,3-PD</i>	1,3-Propanodiol
<i>PABA</i>	Ácido Paraaminobenzoico
<i>PEP</i>	Fosfoenolpiruvato
<i>POR</i>	Propanodiol oxidorreductasa
<i>PYR</i>	Piruvato
<i>R5P</i>	Ribosa 5-fosfato
<i>RAST</i>	Rapid Annotations using Subsystem Technology
<i>RCM</i>	Reinforced Clostridial Medium
<i>RU5P</i>	Ribulosa 5-fosfato
<i>S7P</i>	Sedoheptulosa 7-fosfato
<i>SAM</i>	S -adenosil metionina
<i>X5P</i>	Xilulosa 5-fosfato
<i>Yp/s</i>	Rendimiento producto / sustrato

Introducción

El Acuerdo de París adoptado en 2016 refleja un esfuerzo internacional para reducir las emisiones de carbono y promueve nuevos procesos sostenibles de producción de combustibles y productos químicos que utilizan carbono "superficial" como materia prima [1]. Los productos de base biológica son el reemplazo futurista de los productos químicos de origen fósil y, considerablemente, la mejor manera de avanzar hacia una economía baja en carbono (LCE, por sus siglas en inglés) [2,3]. El material orgánico renovable de plantas y animales se puede convertir, a través de la fermentación, en varios productos químicos de valor agregado, como azúcares, alcoholes, glicerol, ácidos orgánicos, poliésteres, resinas y solventes [4]. Entre ellos, la glucosa y el glicerol son materias primas atractivas porque son renovables, están disponibles en grandes cantidades y tienen precios bajos [5,6].

El glicerol puede ser convertido microbianamente por cepas de *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Enterobacter* y *Clostridium* [7,8]. *Clostridium sp.* surge como un género importante de bacterias anaerobias capaces de metabolizar varios sustratos, como glucosa o glicerol, en productos valiosos, como etanol, butanol, acetona, 1,3-propanodiol, hidrógeno y ácido butírico [9]. Especialmente, *C. butyricum* es un buen productor de hidrógeno con lactato, butirato, acetato, etanol y CO₂ como los principales subproductos de la glucosa [9–11]. Además, produce eficientemente 1,3-propanodiol utilizando glicerol como sustrato junto con todos los demás subproductos [9,12–14].

El catabolismo del sustrato de *C. butyricum*, para las cepas silvestres, comprende vías paralelas de oxidación y reducción [15]. La vía de oxidación proporciona trifosfato de adenosina (ATP) y cofactores para sostener el crecimiento celular con la producción de subproductos oxidados. La vía de reducción proporciona mecanismos para reciclar cofactores y subproductos reducidos [16]. Estos cofactores, como NADH y NADPH, juegan un papel esencial en la transferencia de energía dentro de las células y la red reguladora de los organismos vivos [17] al proporcionar los transportadores redox necesarios para

numerosas reacciones metabólicas [18]. En células cultivadas con glucosa, la diferencia entre la tasa de producción específica de NADH y la tasa de consumo específico indica un exceso de NADH que fue oxidado por la NADH-ferredoxina reductasa y la ferredoxina reducida oxidada por hidrogenasa. Por el contrario, el crecimiento en glicerol indica que el NADH producido por la enzima glicerol deshidrogenasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no es suficiente para la formación de 1,3-PD y que parte de la ferredoxina reducida producida por la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa se oxida por la actividad de la ferredoxina-NAD reductasa para producir NADH [19]

La electrofermentación (EF) es una nueva técnica de sistema bioelectroquímico (BES) que recientemente ha recibido mucha atención [20,21]. Esta nueva tecnología combina microbiología y electroquímica, abriendo la posibilidad de manipular las tasas de regeneración de los cofactores intracelulares para lograr la fisiología celular deseada. En esta tecnología, los electrones externos de una fuente de energía artificial son aceptados por bacterias electroactivas directa o indirectamente, cambiando el equilibrio redox intracelular y promoviendo la formación de productos reductores [22]. La electrofermentación aún se encuentra en su etapa inicial de desarrollo, pero es una estrategia prometedora para optimizar los metabolitos fermentativos mediante cultivos puros o mixtos [23].

La investigación experimental con cultivos puros, para la electrofermentación catódica, con especies del género *Clostridium* se ha centrado en algunas especies como *Clostridium pasteurianum* (butanol y 1,3-propanodiol a partir desde glucosa o glicerol) [24–26], *Clostridium acetobutylicum* (butanol a partir de glucosa) [27,28], *Clostridium tyrobutyricum* (butirato desde sacarosa) [29], *Clostridium beijerinckii* (butanol e hidrógeno desde glucosa) [30,31], *Clostridium glutamicum* (lisina desde glucosa) [32], *Clostridium autoethanogenum* (butanol y hexanol a partir desde dióxido de carbono) [33] *Clostridium ljungdahlii* (caproato, heptanoato o acetato desde dióxido de carbono) [34,35], *Clostridium aceticum* (acetato y 2-oxobutirato desde dióxido de carbono) [36] y *Clostridium kluyveri* (ácidos grasos de cadena media, caproato, butirato a partir acetato y etanol) [37,38].

Por lo tanto, considerando la importancia de la fermentación de glicerol de *Clostridium butyricum* [9,12,39,40], esta investigación tiene como objetivo evaluar por simulación a través del análisis de modos elementales y experimentalmente la respuesta de la red

metabólica de una cepa nativa cercanamente relacionada a *Clostridium butyricum* a un suministro externo de electrones desde un cátodo (electrofermentación catódica) y su efecto sobre los rendimientos de productos metabólicos utilizando glicerol como sustrato.

1. Capítulo 1 Estado del Arte

El propósito de este capítulo es presentar el contexto general para el glicerol crudo, 1,3-propanodiol y electrofermentación. Aquí, el metabolismo del glicerol para microorganismos anaeróbicos es descrito junto con parámetros de fermentación importantes y diferentes tipos de operación para el bioproceso. Por último, se presenta una revisión del avance mundial realizado para la electrofermentación, la producción de 1,3-propanodiol con esta tecnología y los avances realizados por el grupo de investigación Bioprocesos y Bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia.

1.1 Biodiesel y Glicerol crudo

Con el avance de la tecnología, los combustibles fósiles se utilizan a un ritmo alarmante, lo que lleva a una escasez de combustibles fósiles convencionales [41]. Este hecho ha permitido el desarrollo una nueva industria de biocombustibles alrededor del biodiesel y bioetanol [42]. Un aumento en la producción de biodiesel conlleva a la sobreoferta de glicerol crudo [43]. Esto puede amenazar significativamente el medio ambiente al acumularse en grandes cantidades [41]. Se espera que para el año 2024 se produzcan 6 millones de toneladas de glicerol crudo de los cuales 4 millones de toneladas se derivan de la industria del biodiesel. De estas aproximadamente 680.000 toneladas son de glicerol altamente impuro y no aptas para aplicaciones típicas de glicerol, como productos alimenticios y farmacéuticos [43].

1.1.1 Situación en Colombia

La producción industrial de biodiesel en Colombia comenzó en 2009. El aceite de palma se utiliza como único recurso para la producción de biodiesel en Colombia, por lo que la

mayoría de las plantas de procesamiento están ubicadas en los alrededores de plantaciones de palma aceitera. La capacidad instalada total del país es de 661.000 toneladas por año [44]. Actualmente hay 12 plantas de biodiesel operativas en Colombia utilizando aceite de palma, y solo una de ellas produce biodiesel a partir de materia prima de segunda generación (aceite de cocina) en pequeña escala [45]. Por cada 100 libras de biodiésel también se producen 10 libras de glicerol con una pureza al 80% p/p, que tiene un precio inferior a 10 centavos de dólar / kilogramo, lo cual lo convierte en una sustancia de difícil manejo y comercialización [46]. Para mejorar el desempeño ambiental y económico de la industria de biodiesel, se ha propuesto la valorización del glicerol crudo a través de métodos de purificación adecuados [43] o su conversión en productos útiles [47].

1.1.2 Glicerol crudo y su uso industrial

Las impurezas típicas en el glicerol crudo son agua (también humedad), cenizas (es decir, sales inorgánicas que contienen potasio, fósforo, sodio, hierro entre otros) y MONG (materia orgánica que no es glicerol), que generalmente consiste en FFA (ácidos grasos libres), FAME (ésteres metílicos de ácidos grasos), glicéridos (mono, di y triglicéridos), alcoholes como metanol o etanol y jabones (ácidos grasos saponificados) [48] y otros compuestos orgánicos como aldehídos entre otros [49].

Por lo general, el glicerol crudo producido en las refinerías de biodiésel que utilizan aceites comestibles tiene una pureza aceptable (60–80 %) [50]. Sin embargo, recientemente existe una tendencia entre los productores a utilizar materias primas a base de residuos con alto contenido de grasas, aceites, grasas animales o sebo [43], debido a su bajo costo, disponibilidad, abundancia y sostenibilidad, ya que no compiten con los precios de alimentos como los aceites comestibles [51]. Su uso reduce el costo de la materia prima, pero altera la pureza del glicerol crudo, ya que disminuye hasta un 30 % en peso [43]. La menor pureza de este glicerol crudo puede ser un problema, ya que el incremento de impurezas como las cenizas inorgánicas pueden actuar como inhibidores principales en muchas aplicaciones biotecnológicas [52] y, a menudo, envenenan los catalizadores heterogéneos de las unidades de conversión química [53].

Así, para grandes plantas de biodiesel, la valorización de la glicerina cruda a glicerina técnica refinada es económicamente razonable, a pesar del costo existente de purificación y refinación [54], aunque, esta alternativa, a menudo, no es viable para las plantas de pequeña y mediana capacidad [55]. Esto ocurre especialmente para el glicerol derivado de plantas de biodiesel de segunda generación que presentan altos niveles de impurezas. Así, las tecnologías de purificación avanzadas, como la separación por membrana impulsada por presión, el intercambio iónico, la electrodiálisis o la destilación por membrana, han demostrado que funcionan, aunque el desarrollo de su tecnología requiere un mayor esfuerzo para reducir los problemas inherentes, como el ensuciamiento o el alto costo de la regeneración de la resina [43].

Por otra parte, la valorización del glicerol crudo sigue siendo un área de investigación, un desafío técnico y comercial que debe abordarse en el futuro considerando la cantidad de glicerol crudo proporcionado al mercado. Algunas áreas de uso de este glicerol crudo incluyen la alimentación del ganado, la incineración para la generación de energía o la digestión anaeróbica [56]. También, el glicerol se usa o está en proceso de investigación para producir productos químicos importantes como la epiclohidrina, el propilenglicol, el metanol y el ácido acrílico [57].

Paralelamente, investigadores de todo el mundo intentan desarrollar métodos novedosos de convertir el glicerol crudo en productos químicos de muy alto valor a través de rutas bioquímicas [43]. La ruta de bioconversión es una alternativa prometedora para la valorización del glicerol y puede hacer que las industrias de biodiesel sean económicamente sostenibles y respetuosas con el medio ambiente [58,59].

Entre los productos obtenidos biotecnológicamente a partir de glicerol crudo tenemos al ácido láctico. El mercado total de ácido láctico fue de 330.000 toneladas en 2015 y se espera que aumente un 10 % anual hasta 2025 [60]. Otro producto de interés, actualmente, es el hidrógeno. El hidrógeno puede reemplazar los combustibles fósiles convencionales, reducir las emisiones gaseosas y el material particulado generado [61]. El mayor costo de producción de hidrógeno se debe al largo tiempo de fermentación, al requerimiento de oxígeno y a los efectos inhibidores del crecimiento celular durante la fermentación. Los investigadores ahora se están enfocando en usar reactores de flujo continuo y enzimas aisladas para reducir el costo de producción [62]. Finalmente, se contempla el 1,3-

propanodiol. La bioconversión de 1,3-propanodiol ahorra un 40% de energía en comparación con el proceso químico convencional [63]. El mercado total de 1,3-propanodiol en 2020 fue de 400.000 toneladas por año y se espera que aumente un 10 % anual [62].

1.2 1,3-propanodiol y su producción biotecnológica

El 1,3-propanodiol (1,3-PD) es un diol líquido, viscoso, higroscópico, incoloro o amarillo de fórmula $C_3H_8O_2$. Este es un glicol usado como lubricante, solvente [64], estabilizador de detergentes, anticongelante, humectante de cosméticos, intermediario químico y principalmente como monómero en la síntesis de poliésteres y poliuretanos de alto valor agregado [58,65]. Tradicionalmente el 1,3-PD se produjo por síntesis química con la ruta de la acroleína por DuPont y la ruta del óxido de etileno por Shell, pero se ha obtenido recientemente a través de la bioconversión de glucosa con una cepa recombinante de *Escherichia coli* desarrollada por DuPont y Genencor [66]. Se espera que el tamaño del mercado de 1,3-PD alcance alrededor de \$1.4 mil millones de dólares en una década [67,68].

1.2.1 Bioconversión de 1,3-propanodiol

La bioconversión de 1,3-PD se descubrió por August Freund en 1881, quien identificó el 1,3-propanodiol en la fermentación del glicerol, usando *Clostridium pasteurianum* [69,70]. Las especies silvestres anaerobias y aerobias facultativas que se han identificado como productoras de 1,3-propanodiol incluyen a *Klebsiella* (*K. pneumoniae* y *K. oxytoca*), *Clostridia* (*C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. bifermentans*, *C. saccharobutylicum*, *C. diolis*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*), *Citrobacter* (*C. freundii*), *Halófilos Halanaerobium* (*H. saccharolyticum*), *Caloramator* (*C. viterbensis*) y *Lactobacilli* (*L. brevis*, *L. buchneri* y *L. diolivorans*) [7,8,79–83,71–78]

Dependiendo del microorganismo involucrado la distribución de los productos varía ([Figura 1-1](#)). En el caso de *Klebsiella pneumoniae* además del 1,3-propanodiol se produce 2,3-butanodiol, acetato, lactato y etanol por la vía del piruvato [84–86]. En las fermentaciones realizadas por *Clostridium butyricum* los productos principales son el 1,3-propanodiol, acetato y butirato [9,13,87–89].

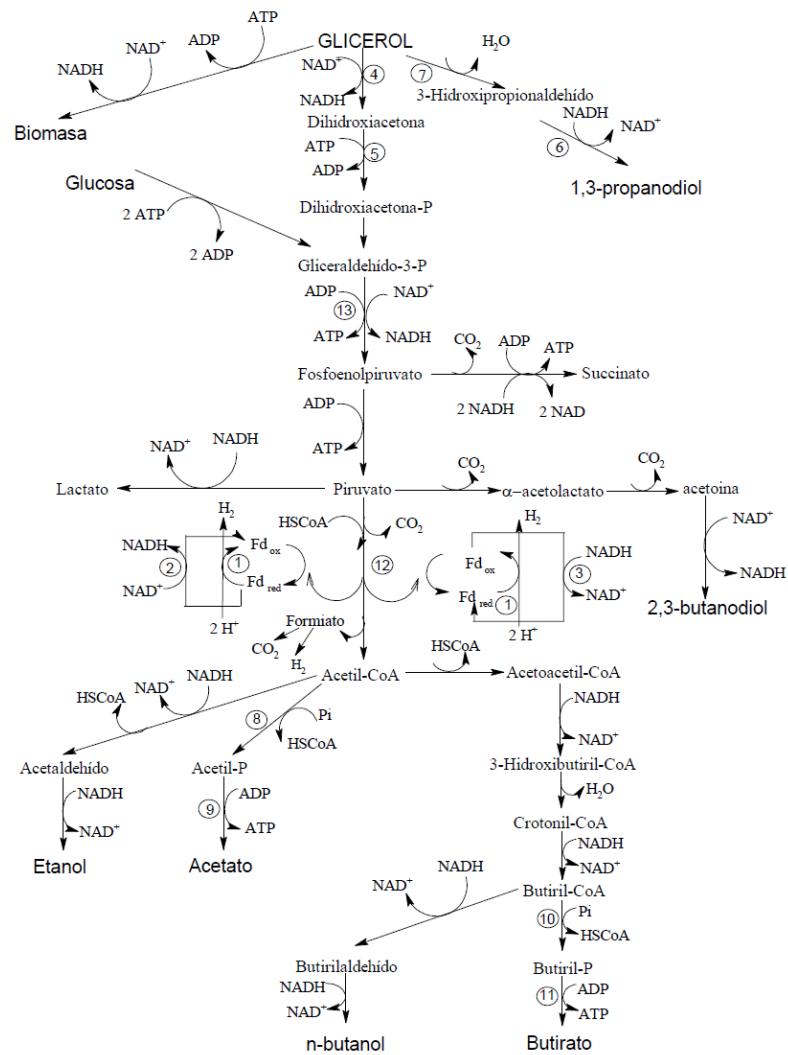


Figura 1-1: Rutas catabólicas del metabolismo anaeróbico del glicerol.

(1) Hidrogenasa, (2) Ferredoxina-NAD reductasa, (3) NADH-ferredoxina reductasa, (4) Glicerol deshidrogenasa, (5) DHA-quinasa, (6) 1,3-PD deshidrogenasa, (7) Glicerol deshidratasa, (8) Fosfotransacetilasa, (9) Acetato quinasa, (10) Fosfotransbutirilasa, (11) Butirato quinasa, (12) Piruvato-ferredoxina oxidorreductasa, (13) Gliceraldehído-3P-deshidrogenasa [69,90].

El glicerol entra a la célula y se metaboliza por dos vías paralelas. En la primera, denominada ruta oxidativa, el glicerol es oxidado a dihidroxiacetona (DHA), por la enzima glicerol deshidrogenasa (GDH) dependiente de NAD⁺ y se acopla a la formación de equivalentes reducidos (NADH). Posteriormente la DHA se fosforila por dos quinasas DHA

(DHAK I dependiente de ATP y DHAK II dependiente de PEP) y posteriormente se transforma en subproductos que se forman para la obtención de energía y poder reductor [16,64,69,91–93].

En la segunda vía (denominada vía reductiva) el glicerol es deshidratado a 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA) [72,79,94], por una deshidratasa (GDHt) dependiente de coenzima B12 (Adenosil cobalamina) en la mayoría de las especies bacterianas y S-adenosil metionina (SAM) para *Clostridium butyricum* [95,96]. Finalmente, el 3-HPA es convertido en 1,3-PD por una deshidrogenasa dependiente de NADH también conocida como la enzima 1,3-PD oxidorreductasa (POR) [16,58,69,97].

Los productos típicos de la fermentación del glicerol incluyen 1,3-propanodiol, etanol, 2,3-butanodiol, ácido acético, ácido butírico y ácido láctico [12,97–99]. Estas rutas metabólicas compiten entre ellas por los NADH producidos durante el crecimiento de la biomasa y el rendimiento del 1,3-PD se puede ver disminuido, si las moléculas de NADH liberadas durante la formación de piruvato son utilizadas en las vías de producción de etanol, butanol, ácido butírico e hidrógeno gaseoso [65,86,100]. El máximo rendimiento de 1,3-PD calculado, se produce cuando su producción es acompañada con ácido acético como único subproducto de la ruta oxidativa [101,102]. El rendimiento teórico es de 64% molar del total del glicerol consumido con generación de H₂ gaseoso y 72% sin generación de H₂ [69]. El ácido butírico es formado, después de la condensación de 2 moléculas de acetil-CoA, en una secuencia de reacciones que involucra dos pasos en los cuales el NADH es oxidado, y se genera una molécula de ATP [90,103]. En *Clostridium pasteurianum*, además de los anteriores productos, también se ha reportado que se produce butanol en cantidades significativas [94,104].

El principal inhibidor de crecimiento en la fermentación del glicerol es el 3-hidroxi propionaldehído. Este compuesto es normalmente un intermediario intracelular que no se acumula. Sin embargo, bajo condiciones de alto exceso de glicerol, puede ser excretado al medio de cultivo en algunas especies [12,105–107]. El 1,3-PD es el producto menos tóxico, específicamente *C. butyricum* puede tolerar hasta 83,7 g/L de 1,3-PD cuando es adicionado externamente [9,88,108,109]

1.2.2 Estrategias tradicionales de fermentación para 1,3-PD

Durante las últimas décadas se han realizado estudios buscando los valores que optimicen la producción de 1,3-PD por vía microbiológica desde glicerol crudo. Dentro de los géneros más utilizados para este propósito, se encuentran *Klebsiella* (aerobio facultativo) [69,110] y *Clostridium* (anaerobio estricto) [1,89,111,112].

Para *Clostridium butyricum*, se han aplicado variadas estrategias de cultivo (lote, lote repetido, lote alimentado y continuo en una y dos etapas para evaluar la producción de 1,3-PD con diferentes cepas ([Tabla 1-1](#)).

Más específicamente, comparando cada una de estas estrategias de cultivo se puede decir que el cultivo por lote parece ser una estrategia simple para la producción, pero tiene el inconveniente de alcanzar una baja concentración de 1,3-PD en la parte final de la fermentación debido a la inhibición por producto y limitación por sustrato. [113,114]. Se han examinado los efectos del pH, la temperatura, la velocidad de agitación, y la concentración de glicerol en rendimiento y la productividad de 1,3-propanodiol. Las mejores condiciones para la conversión de glicerol en 1,3-propanodiol se encontraron en un intervalo de pH de 6.9 - 7,1, una temperatura entre 33 y 38.5 °C, una velocidad de agitación de 110-180 rpm y una concentración de glicerol de 39-49 g/L.

La fermentación por lotes se llevó a cabo a un pH de 7,0, una temperatura de 35 °C, una velocidad de agitación de 150 rpm, y una concentración de glicerol de 40 g/L con lo cual se produjo 20,4 g/L de 1,3-propanodiol, con una productividad volumétrica máxima de 2,92 g/L.h y un rendimiento de 0,51 g/g. Los principales subproductos fueron ácido acético (aproximadamente 7,0 g/L) y formiato (aproximadamente 3,7 g/L) [115]. *C. butyricum* con glicerol crudo para cultivo por lote ha alcanzado concentraciones hasta 63,4 g/L, pero con una productividad inferior a 1 g/L.h [113].

En las fermentaciones por lote alimentado se metaboliza más glicerol, al eliminar la inhibición por sustrato, por lo que se obtiene más biomasa, lo que conlleva a una alta concentración de 1,3-PD y una mayor productividad comparada con las fermentaciones por lote.

Tabla 1-1: Técnicas de fermentación de glicerol con *C. butyricum*

Cepa	Tipo Glicerol	Cultivo	Escala (L)	Concentración (g 1,3-PD/L)	Rendimiento (g 1,3-PD/g Glicerol)	Productividad (g 1,3-PD/L.h)	Fuente
AKR102a	Puro	Lote alimentado	1	93,7	0,52	3,3	[116]
AKR102a	Crudo	Lote alimentado	1	76,2	0,51	2,3	[116]
AKR102a	Crudo	Lote alimentado	200	61,5	0,53	2,1	[116]
CNCM1211	Crudo	Lote	1	63,4	0,57	0,63	[113]
DL 07	Crudo	Lote alimentado	5	94,2	0,52	3,04	[14]
DL 07	Crudo	Lote alimentado	5	86	0,52	2,87	[14]
DL 07	Crudo	Lote alimentado	5	104	0,54	3,38	[14]
DL 07	Crudo	Lote alimentado secuencial	5	88	0,54	3,54	[14]
DSM 10702	Pretratado	Lote	2	39,9	0,57	0,99	[117]
DSM 5431	Puro	Lote	1	56	0,51	1,9	[118]
DSM 5431	Crudo	Lote alimentado	1	70,3	0,56	1,5	[19]
DSP1	Crudo	Lote	6,6	37,6	0,53	1,12	[119]
DSP1	Crudo	Lote alimentado	6,6	71	0,54	0,68	[119]
DSP1	Crudo	Lote	42	36,4	0,52	1,13	[119]
DSP1	Crudo	Lote	150	37,2	0,53	1,33	[119]
DSP1	Crudo	Lote repetido	6,6	62	0,53	0,76	[119]
E4	Puro	Lote alimentado	2	57,9	0,54	1,21	[120]
E5	Puro	Lote alimentado	2	65,6	0,54	1,37	[120]
F2b	Crudo	Lote	2	47,1	0,52	1,34	[121]
F2b	Crudo	Continuo	2	44	0,51	1,76	[121]
F2b	Crudo	Continuo	1	46	0,53	3,4	[64]
Gen 7	Crudo	Lote	5	47,33	0,54	2,62	[122]
Gen 7	Crudo	Lote alimentado	5	66,2	0,51	1,38	[122]
Gen 7	Crudo	Lote alimentado	50	61,7	0,52	1,62	[122]
IK 124	Crudo	Lote alimentado	0,4	87,7	0,54	1,9	[123]
JTK 237	Puro	Lote	3,6	56,5	0,47	1,52	[124]
NCIMB8082	Crudo	Lote	1	32,2	0,52	2,38	[125]
SCUT343-4	Puro	Lote	5	42,8	0,54	1,78	[126]
SCUT343-4	Puro	Lote alimentado	1	59,1	0,53	2,11	[126]
SCUT343-4	Puro	Lote alimentado inmovilizado	1	86	0,52	4,2	[126]
VPI1718	Crudo	Lote	1	41,9	0,52	0,81	[127]
VPI1718	Crudo	Lote repetido	1	65,5	0,52	1,15	[73]
VPI1718	Crudo	Lote repetido	2	67,9	0,55	0,78	[127]
VPI3266	Puro	Continuo	0,3	35	0,53	0,6	[90]
VPI3266	Puro	Continuo	2	29,7	0,51	2,98	[77]
VPI3266	Crudo	Continuo	2	31,5	0,50	3,15	[89]
VPI3266	Puro	Lote alimentado	2	65	0,54	1,21	[128]

Las fermentaciones por lote alimentado, junto con otras estrategias, como uso de cosustrato, control de pH, alimentación de amonio, diferentes estrategias de aireación y diferentes composiciones del medio han sido desarrolladas por varios grupos de investigadores [129–131]. En general, se pueden alcanzar más de 60 g/L de 1,3-PD se podrían alcanzar en cultivos por lote alimentado con glicerol crudo o puro por *C. butyricum* y *K. pneumoniae* [73,127,132,133].

Una técnica de cultivo que presentó buenos resultados fue una variante del cultivo por lote alimentado en la cual se mantuvo un exceso de glicerol, con corrección automática de pH [134], los valores obtenidos por esta técnica para *Clostridium butyricum* fueron una concentración de 70.4 g/L y una productividad de 1.9 g/L.h [87], con *Klebsiella pneumoniae* se obtuvo una concentración final de 78 g/L y una productividad promedio de 3.0 g/L.h [86]. Otra estrategia utilizada de lote alimentado combinó la adición de glicerol dependiente de la adición de base y la medición constante de glicerol, para una cepa tolerante a altas concentraciones de producto y sustrato. La concentración final obtenida de 1,3-PD fue de 87 g/L con una productividad global de 1,9 g/L.h utilizando glicerol refinado y con glicerina los valores fueron de 80.1 g/L y 1,8 g/L.h [123]. También se han realizado cultivos por lote alimentado con inmovilización de células en un reactor de lecho fijo para mejorar la producción de 1,3-PD. La productividad de 1,3-PD se incrementó de 1,06 g/L.h a 1,61 g/L.h, en una fermentación por lote alimentado repetido, debido a la inmovilización de células [135]. Los mejores resultados con glicerol crudo para en lote alimentado con *C. butyricum* varían de 84 g/L a 104 g/L y las productividades pueden estar desde 1,9 a 3,3 g/L.h [14,123]. Dos técnicas estudiadas de lote alimentado incluyen cultivo secuencial y cultivo inmovilizado. Estas técnicas han mostrado ser eficientes en el incremento de productividad a valores de 3,54 y 4,2 g/L.h manteniendo concentraciones altas de 1,3-propanodiol superiores a 85 g/L [14,126].

Igualmente, el cultivo continuo proporciona una ventaja significativa al obtener una elevada productividad, aunque no ha sido posible obtener una concentración de producto superior a la obtenida en lote alimentado. Adicionalmente, con tasas de dilución superiores a 0,35/h se presenta disminución en la productividad del cultivo continuo [89,121,136]. También se investigaron los efectos de la concentración inicial de glicerol y la tasa de dilución en la producción de 1,3-PD por *K. pneumoniae* DSM2026 en cultivo continuo. Los resultados indicaron que la producción de 1,3-PD era una función de la concentración inicial de glicerol y la tasa de dilución [137]. Por otra parte, se usaron la productividad volumétrica de 1,3-PD como un objetivo de optimización e investigaron las condiciones óptimas para la fermentación continua con *K. pneumoniae*. La concentración de glicerol en la alimentación y la tasa de dilución óptimas fueron 67 g/L y 0.29/h respectivamente [138].

Uno de los mayores valores de concentración obtenidos para cultivos continuos de *K. pneumoniae* ha sido de 48 g/L con una tasa de dilución de 0.1/h, alcanzando un

rendimiento molar de 63% y una productividad de 4.8 g/L.h, lo cual requirió un exceso de glicerol de más de 50 g/L [69,134,137]. Para *Clostridium butyricum* se tienen resultados similares a los de *Klebsiella* con un porcentaje molar de 66%, una tasa de dilución de 0.02/h y una productividad máxima de 5.5 g/L.h [64]. También se ha propuesto mantener una alta concentración celular en el biorreactor bajo cultivo continuo a través del reciclaje celular. En comparación con el cultivo continuo sin reciclaje celular, la densidad celular aumentó de 4 a 5 veces con un glicerol inicial de 32 g/L y de 3,4 a 4 veces con glicerol inicial de 56 g/L y una concentración máxima de 1,3-PD fue de 26,6 g/L [139]. Una fermentación de dos etapas en cultivo continuo se llevó a cabo con *C. freundii* [140]. La biomasa se produjo en el primer fermentador bajo condiciones de limitación de glicerol y una reducción de la tasa de dilución se realizó en el segundo, para aumentar la producción de 1,3-PD. La máxima concentración de 1,3-PD obtenida fue 41,42 g/L, mientras que la mayor productividad fue de 1,38 g/L.h.

También se observó alta productividad de 3,4 g/L.h usando *C. butyricum* aislado de glicerol crudo en un cultivo continuo en dos etapas. Esta estrategia de cultivo utilizó una alta tasa de dilución en el primer fermentador para aumentar la productividad de 1,3-PD y una baja tasa de dilución en la segunda etapa, para aumentar la concentración de producto. La concentración de biomasa fue siempre menor en el segundo fermentador que en el primero, y esto se atribuyó a la autólisis bacteriana en la segunda etapa, debido a la propagación microbiana en condiciones desfavorables de forma permanente (con aumento del tiempo de contacto entre las células y los productos metabólicos) [64].

Igualmente, se evaluó un cultivo con alimentación continua de múltiples etapas con *K. pneumoniae* bajo condiciones microaeróbicas y anaeróbicas [141]. En la primera etapa, una biomasa de alta concentración se obtuvo bajo condiciones microaeróbicas. En la segunda etapa, la concentración de glicerol en la alimentación fue seleccionada para ser baja (40 g/L) con una alta tasa de dilución (0.2/h) o alta concentración (70 a 110 g/L) con un menor valor de tasa de dilución (0.1/h) con el fin de evitar la limitación o efectos de inhibición por sustrato sobre el crecimiento celular. En la tercera etapa, el glicerol residual se consume a nivel bajo (1 a 13 g/L) y así el rendimiento y la concentración de 1,3-PD se incrementa en condiciones anaeróbicas. La concentración final de 1,3-PD varió de 36,7 a 46,2 g/L con la productividad de 4,0 a 8,1 g/L.h.

1.2.3 Producción Industrial de 1,3-propanodiol y su mercado

Para la producción industrial de 1,3-PD se ha indicado que los costos de sustrato son alrededor de un 50% del costo total de producción. Materias primas como glucosa y glicerol crudo, producido directamente de las unidades de producción de biodiesel, se han utilizado para obtener 1,3-PD debido a sus ventajas económicas [12,135,142]. Se espera que el valor de mercado de la 1,3-PD aumente de una estimación de \$310,5 millones en 2014 a \$621,2 millones para 2021 [12]. Siendo casi el 60% de los ingresos totales proveniente de 1,3-PD producido biológicamente, la tendencia proyectada del mercado para 2030 es de 799,3 millones de dólares [143].

Así, la producción biotecnológica de 1,3-PD llegó a nivel industrial y etapa comercial con la multinacional DuPont y Genencor por el desarrollo de una cepa de *Escherichia coli* recombinante productora del solvente a partir de glucosa. Lo anterior, por la combinación de la expresión de genes heterólogos, delección de genes y control apropiado de la distribución de flujos metabólicos, manteniendo el balance de energía y oxido-reducción. Este microorganismo alcanza una concentración de 135 g/L, una productividad de 3,5 g/L.h y un rendimiento en peso de 51% en peso desde glucosa en un fermentador por lote de 10 litros [68,144].

Otro resultado de escalamiento industrial ha sido el desarrollo de un microorganismo modificado de *C. acetobutylicum* DG1 (pSPD5) que expresa genes de la ruta de 1,3-PD de *C. butyricum*. Este microorganismo recombinante alcanza 84 g/L de 1,3-PD con un rendimiento de 0,65 mol/mol desde glicerol en cultivo por lote alimentado y 1,7 g/L.h de productividad. En cultivo continuo, esta bacteria alcanzó 54.8 g/L con productividad de 3 g/L.h [145]. Actualmente, las principales empresas productoras se consideran DuPont Tate & Lyle Bioproducts (EE. UU.), Metabolic Explorer SA (Francia), Zhangjiagang Glory Biomaterial Co. Ltd. (China) y Zouping Mingxing Chemical Co. Ltd. (China). [12,112,143].

1.2.4 Economía del proceso biotecnológico para 1,3-PD

El aprovechamiento de la plataforma de glicerol para la biosíntesis de 1,3-PD requiere el desarrollo de análisis técnico - económicos, ya que es uno de los factores rectores en que se consideran los aspectos comerciales. Así, en los últimos cinco años, han sido

desarrollados pocos estudios que traten de descifrar el costo de la producción de 1,3-PD derivado del glicerol [143,146]. En uno de ellos se planteó la posibilidad de integrar una línea de producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol crudo dentro de una biorrefinería de caña de azúcar. Se asumió que el escenario de biorrefinería que utiliza glicerol crudo opera todo el año, excepto por las paradas de planta, por lo tanto, se supuso que el tiempo de operación de 8000 horas por año (31.387 1,3-PD t/año). Se utilizó el precio en el mercado de 1,3-PD de US\$ 3,38/kg como referencia y glicerol crudo con pureza de 83% en peso como materia prima (U\$ 0,12/kg). Se planteo una fermentación continua con una cepa de *Clostridium* modificada con alto rendimiento (0,53 g/g), productividad (2,6 g/L.h) y concentración final de 1,3-PD (51,92 g/L), para un proceso continuo con tecnologías de destilación para purificación. Para este caso se obtuvo un costo de producción de US\$ 0,96/kg, una tasa interna de retorno de 46,93% y un precio mínimo de venta de producto de U\$ 1,66/kg para una tasa interna de retorno del 20%. Con los anteriores resultados el autor considera que una línea de la biorrefinería de 1,3-PD que utilice glicerol crudo es potencialmente factible [147].

Un estudio similar planteo la producción de 1,3-PD a partir de glicerol crudo como planta independiente. Con una tasa de producción de 1,3-PD de 0,5 t/h (4.000 t/año), un precio de venta de US \$4,5/kg de 1,3-PD y un precio de compra de glicerol crudo de US \$0,138/kg. El proceso productivo se basó en una cepa silvestre de *Clostridium* usando tecnología de destilación para la purificación. En este caso, la tasa interna de retorno solo alcanzo un valor de 25,23% con un costo unitario de US \$3,9/kg. Los autores resaltan que el proceso tiene un gasto intensivo de energía, por lo que se deben buscar alternativas para incrementar la rentabilidad del proceso a través de la utilización de técnica avanzadas de cultivo (inmovilización celular) o alternativas de cultivo no estéril, lo cual reduciría el gasto energético [148].

En síntesis, la producción microbiana de 1,3-PD es un proceso ecológico técnicamente viable, con tecnologías tradicionales de cultivo, que se proyecta como una tecnología de desarrollo sostenible y que reduce la dependencia de los recursos fósiles. La fermentación usando como fuente de carbono glicerol se ha explorado, ampliamente, a nivel piloto con cepas silvestres, pero aún se necesita solucionar cuellos de botella biotecnológicos como el incremento de concentraciones y la minimización de otros metabolitos. Por lo que es importante buscar nuevas alternativas de cultivo que incrementen el rendimiento y la

productividad de la fermentación de glicerol a 1,3-PD, a partir de sustratos como el glicerol crudo.

1.3 Sistemas bioelectroquímicos de fermentación

Frente a los problemas energéticos, existe una fuerte demanda de nuevas tecnologías que aborden la sustitución de combustibles fósiles. Los campos emergentes de la biotecnología, la fotobiotecnología y la electrobiotecnología ofrecen soluciones para la producción de combustibles, energía o productos químicos utilizando fuentes de energía renovables (luz o corriente eléctrica, por ejemplo, producida por energía eólica o solar) o sustratos orgánicos (residuos) [149].

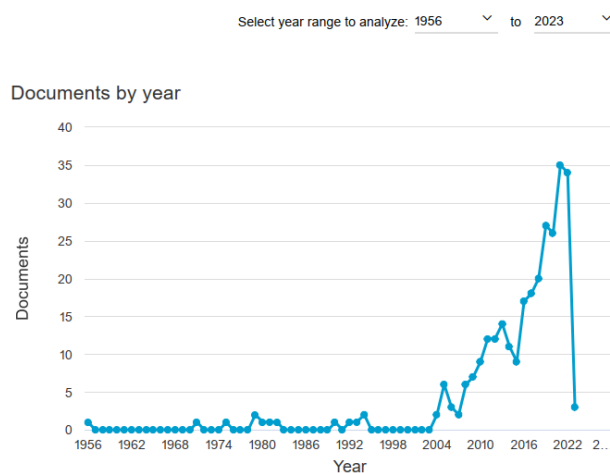


Figura 1-2: Artículos científicos publicados para EF (1956 – 2023/01).

Base de datos Scopus [150]. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY (electrofermentation) OR TITLE-ABS-KEY (fermentation AND cathode)*. Número de documentos: 286. Fuente: Elaboración propia

Así, los sistemas bioelectroquímicos (BES por sus siglas en inglés) de fermentación describen una variedad de tecnologías emergentes ([Figura 1-2](#)) que utilizan interacciones entre electrodo - bacteria para ser aplicadas en biotecnología, incluyendo la producción de electricidad, residuos y tratamiento de aguas residuales, la biorremediación y la obtención de productos de valor agregado [66,151]

Es clave en cada aplicación la capacidad del biocatalizador para interactuar con aceptores de electrones externos y / o los donantes (Figura 1-3) y sus propiedades metabólicas que permiten la combinación de transporte de electrones y el metabolismo de carbono [20,66,152]. Estas técnicas son una herramienta emergente para la intensificación de bioprocesos. Se esperan beneficios especialmente para los bioprocesos en los que las células pueden intercambiar electrones directamente con las superficies de los electrodos. También se ha demostrado que el uso de energía eléctrica en BES puede aumentar el rendimiento del bioproceso por efectos secundarios indirectos. En este caso, la electricidad se usa para alterar los parámetros del proceso y activar indirectamente las vías deseadas [153]

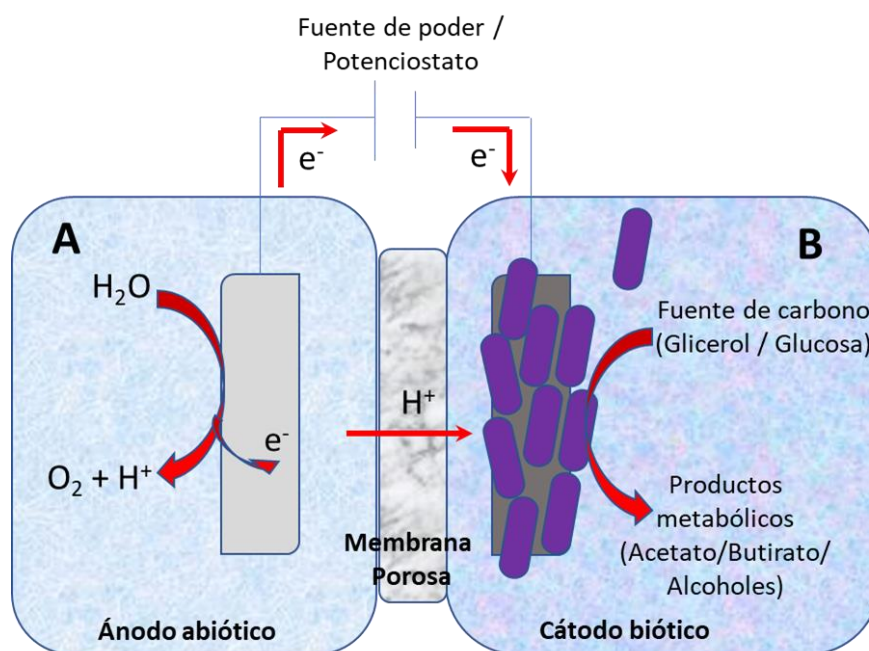


Figura 1-3: Representación para un proceso de electrofermentación catódica.

(A) Reacción anódica, (B) Reacción catódica. Basado en [154]

En años recientes, se ha investigado la producción microbiana de compuestos de múltiples carbonos, a través del consumo de energía eléctrica en una celda catódica con un sistema bioelectroquímico (BES, por sus siglas en inglés) [155]. Con esta técnica de cultivo, frecuentemente referida como electrofermentación (EF) [156], se busca el mejoramiento eléctrico de la producción bacteriana usando múltiples sustratos [21,29,157] como dióxido de carbono, formiato, acetato, fumarato, glucosa o glicerol, acelerando el metabolismo

reductivo [66] y obteniendo productos químicos de valor agregado o combustibles líquidos [158], como el ácido L-glutámico, etanol, 1,3-propanodiol, butirato y succinato, entre otros [22,24,29,159].

Los sistemas BES, han tenido un progreso significativo en los últimos años [23,160]. En primer lugar, se ha buscado optimizar el desempeño de los biocatalizadores (microorganismos) conocidos y también aislar otros nuevos con fuertes propiedades electro autotróficas [161,162]. También se está realizando investigación para mejorar el diseño de los cátodos a través de nuevos materiales o mejor disposición espacial. Igualmente se está buscando mejorar otros componentes del sistema como son la membrana de intercambio de iones [163], para permitir la extracción de productos a través de ellas [164]. Otro reto tecnológico es el entendimiento de cómo se transfieren electrones desde el cátodo al biocatalizador para desarrollar estrategias de cultivo [160].

Desde el punto de vista de la ingeniería, la electrobiotecnología tiene grandes retos en el proceso de escalamiento y lograr una escala de relevancia industrial, ya que su eficiencia depende del área de transferencia de electrones. Estos desafíos son similares a los enfrentados por la fotobiotecnología. Por lo anterior, se ha propuesto que la transferencia de conocimiento desde campo de la fotobiotecnología, siendo más avanzado que el de la electrobiotecnología, puede acelerar su desarrollo hacia aplicaciones industriales [149].

1.3.1 Mecanismos de transferencia de electrones

Se descubrió una amplia gama de bacterias capaces de intercambiar electrones con superficies sólidas, pero solo unos pocos se han estudiado en profundidad. De hecho, los mecanismos de transporte de electrones de diferentes especies pueden diferir significativamente entre sí. Especialmente los mecanismos de transferencia de electrones desde cátodos hacia el organismo microbiano son poco conocidos, pero son esenciales para muchas aplicaciones [152]. Hay una serie de microorganismos, tales como *Clostridia sp.*, *Shewanella oneidensis*, *Acetobacterium woodii*, *Clostridium ljungdahlii*, *Brevibacterium sp.* y *Sporomusa sp.*, entre otras, que pueden intercambiar directamente electrones con el electrodo o a través de transportadores de electrones [156,165].

Estos mecanismos de transferencia extracelular de electrones (EET, por sus siglas en inglés) desde la fuente (cátodo) a las células microbianas ([Figura 1-4](#)) se puede dividir en tres tipos [166]: transferencia directa de electrones, en la que las células aceptan electrones formando biopelículas delgadas que rodean el cátodo [22,167], transferencia indirecta de electrones usando oxidación de hidrógeno y formiato como portadores de electrones [35], transferencia indirecta de electrones por transportadores de electrones endógenos [152] como flavinas [168], quinonas [169] y fenazinas [170] o por transportadores artificiales como Metil-viológeno (MV) [29], antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) [171] o Rojo Neutral (NR) [172].

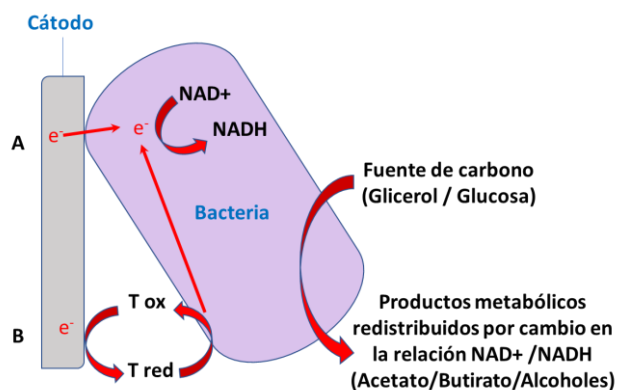


Figura 1-4: Representación de mecanismos de transferencia de electrones.

(A) Transferencia directa, (B) Transferencia indirecta. T ox: Transportador de electrones oxidado en la membrana. T red: Transportador de electrones reducido en el cátodo. Basado en [173]

Sin embargo, la relación entre los transportadores de electrones de base química y la cadena transportadora de electrones no está clara [174]. Algunos estudios demostraron que el Rojo Neutral puede integrarse en las membranas y ejecutar la función de los mediadores de transferencia de electrones nativos [172]. Recientemente, se encontró que el Rojo Neutral puede interactuar con la Menaquinona y luego transferir los electrones a la cadena de transporte de electrones intracelular en *E. coli* [175].

1.3.2 Producción de 1,3-PD con sistemas bioelectroquímicos

La electrofermentación de glicerol ha sido investigada, recientemente, buscando mejorar las velocidades y los rendimientos de la conversión de esta fuente de carbono. Sin

embargo, el número de estudios para la electrofermentación en el cátodo son limitados [176] y puede ser una nueva dirección para futuros desarrollos [68].

Al inicio, fueron empleados ánodos polarizados y cátodos en una sola cámara para fermentaciones por lotes con glicerol, con el fin de aumentar los rendimientos de hidrógeno producidos y obtuvieron concentraciones residuales de 1,3-propanodiol [177]. También se estudió la producción de metabolitos durante las fermentaciones continuas alteradas eléctricamente para observar cambios en la población microbiana. Se obtuvieron correlaciones microbianas interesantes, que muestran la relación entre los productos metabólicos y cambios de población [178]. Sin embargo, en estos estudios el 1,3-PD, no fue el principal producto y la aplicación de corrientes eléctricas no afectó positivamente estas fermentaciones para la obtención de este solvente. Paralelamente se demostró que el uso de electricidad en un cultivo de producción para propanodiol podía cambiar los flujos de carbono y de electrones, usando como fuente de carbono glicerol. Específicamente, una biopelícula de población mixta que crecía en el cátodo mejoró la producción de 1,3-PD del 24,8 % con cultivo tradicional al 50,1 %, usando un biocátodo polarizado a $-0,9$ V [179].

Posteriormente, se estudió el uso de potencial eléctrico para fermentar electrobioquímicamente glicerol y obtener 1,3-propanodiol (1,3-PD) en una electrofermentación mixta dominada por especies *Clostridiaceae*. Este grupo obtuvo una tasa de producción de 1,3-PD, 6 veces superior en electrofermentaciones con cultivo mixto, en comparación con las fermentaciones tradicionales con concentraciones de 1,3-PD de hasta 42 g/L versus 18 g/L con un rendimiento de 0,46 g/g. En todos los casos, el consumo de glicerol cesó y la electroactividad catalítica se perdió cuando se sustituyeron los electrodos con biopelícula por electrodos que carecen de la misma, lo que sugiere que la electrofermentación de glicerol fue principalmente soportada por las bacterias situadas en la biopelícula [176].

Por su parte, la investigación experimental con cultivos puros, para la electrofermentación catódica, con especies del género *Clostridium* se ha centrado en algunas especies como *Clostridium pasteurianum* (butanol y 1,3-propanodiol a partir desde glucosa o glicerol) [24–26,180], *Clostridium acetobutylicum* (butanol a partir de glucosa) [27,28], *Clostridium tyrobutyricum* (butirato desde sacarosa) [29], *Clostridium beijerinckii* (butanol e hidrógeno

desde glucosa) [30,31,173,181], *Clostridium glutamicum* (lisina desde glucosa) [32], *Clostridium autoethanogenum* (butanol y hexanol a partir desde dióxido de carbono) [33,182] *Clostridium ljungdahlii* (caproato, heptanoato o acetato desde dióxido de carbono) [34,35], *Clostridium aceticum* (acetato y 2-oxobutirato desde dióxido de carbono) [36] y *Clostridium kluyveri* (ácidos grasos de cadena media, caproato, butirato a partir de acetato y etanol) [37,38].

Para 1,3-PD se investigó con cultivos de *Clostridium pasteurianum*. En esta investigación se logró un cambio exitoso en el metabolismo de la bacteria incrementando la producción de 1,3-PD (21 %) y butanol (20 %) cuando se estableció un potencial eléctrico en la fermentación a partir de glicerol y glucosa, respectivamente [24], obteniendo concentraciones alrededor de hasta 7,22 g/L para 1,3-PD. También se estableció que una pequeña cantidad de electrones indujo vías que consumen NADH sobre la contribución estequiométrica de los electrones como equivalentes reductores.

También se ha investigado el crecimiento de *C. pasteurianum* en la cámara de cátodo de un reactor de celda H. Se aplicó potencial negativo en un electrodo liberando en el medio acuoso iones de hidrógeno e hidroxilo en el cultivo anaeróbico para minimizar el potencial redox del medio o para estabilizar el pH a pesar de la producción de ácidos. El pH se estabilizó mediante la regulación de la electroquímica con un controlador de pH, y el flujo de corriente neutralizó indirectamente los ácidos producidos por las bacterias. Con este método se logró disminuir la concentración de 1,3-PD de 4.5 g/L a 3,3 g/L e incrementar la concentración de butanol de 7,7 g/L a 9,2 g/L [26].

Posteriormente se analizó el uso de mediadores con *C. pasteurianum*. Se encontró que varios mediadores tienen diferentes efectos sobre el espectro del producto de la fermentación del glicerol. Mientras que el azul brillante incrementó los rendimientos de producción de 1,3-PD (21%), la producción de n-butanol aumentó (33%) cuando se agregó Rojo Neutral [20]. Esta investigación se desarrolló con un nuevo tipo de reactor que incluye un BES de cámara única con un electrodo de electrólisis en forma varilla que se puede insertar fácilmente en biorreactores de tanque agitado. Este sistema se ha utilizado con éxito para la generación in situ de H₂ y O₂, el control del potencial redox y la recarga del mediador de electrones para la producción asistida de solventes [25]

También se ha explorado la manipulación del potencial de oxidación-reducción (ORP) de la fermentación a través de BES. En este estudio se investigaron los mecanismos subyacentes de la fermentación de glicerol con *C. pasteurianum* cuando está influenciada electroquímicamente. Aquí, se desarrolló un sistema para el control electroquímico de ORP en cultivo continuo para estudiar cuantitativamente los efectos de la alteración de ORP en *C. pasteurianum*. Los resultados indicaron que con una tasa de dilución fija de $0,1 \text{ h}^{-1}$ y 36 g/L de concentración de sustrato glicerol, se observó un aumento general del 57 % en el rendimiento molar de 1,3-propanodiol mediante un aumento del ORP de -462 mV a -250 mV , junto con una disminución de concentración de 1,3-PD (3,64 g/L a 1,17 g/L) y Butanol (6,16 g/L a 0,46 g/L), respectivamente.[153].

Hace poco, el mismo grupo utilizando una mutante de *Clostridium pasteurianum* con baja producción de butanol mostró una formación mejorada de butirato y una mayor generación de ATP para un mayor crecimiento, un mayor consumo de glicerol y una mayor producción de 1,3-PD. Este grupo de 1,3-PD alcanzó un máximo de 120,67 g/L con una corriente catódica de -400 mA , que es un 33 % más alta que sin electricidad, con un aumento simultáneo del ácido butírico en un 80 % [183].

Por su parte con *Klebsiella pneumoniae* se examinó el efecto del cátodo (potencial aplicado de -900 mV frente a Ag/AgCl) para la bioconversión de glicerol en 1,3-propanodiol con varios mediadores de electrones. El potencial aplicado externamente al cátodo incrementó la producción de 1,3-PD de 23,7 mM (Fermentación tradicional) a 35 mM (Electrofermentación) [184].

1.3.3 Economía de procesos con sistemas bioelectroquímicos

Los sistemas bioelectroquímicos han recibido gran atención en investigación a escala de laboratorio, aunque falta una hoja de ruta impulsada por la tecnología y la economía hacia la validación y la demostración a gran escala de esta tecnología [185]. Esta validación se realiza a través de análisis técnico - económicos que ayudan a identificar los principales contribuyentes de costos de un proceso que requieren atención inmediata, de modo que se pueda reducir el costo general del proceso [143].

Para los sistemas bioelectroquímicos, se han realizado análisis comparándolos contra el proceso fermentativo convencional. En general, los estudios mostraron fortalezas en el rendimiento y la productividad del sistema bioelectroquímico para la producción de solventes y alcoholes en comparación con la fermentación tradicional [186]. Por estas fortalezas, se obtiene costos de producción más bajos para los sistemas bioelectroquímicos [187].

Paralelamente, existen desafíos debido a que también se presenta incremento en el costo de capital, los requerimientos de un sistema de control y la optimización de parámetros operativos. Específicamente, el material del cátodo y la membrana son factores importantes para el cálculo técnico-económico de los sistemas bioelectroquímicos [186]. Por ejemplo, se estima que dentro de los principales costos de capital y operativos está el costo del material del electrodo (59%) [185]. También, se estima que usando materiales como cátodos a base de platino y la membrana de Nafion los costos de capital son 800 veces más altos que un proceso anaeróbico tradicional [188].

Así, los altos costos de capital de la tecnología bioelectroquímica son un obstáculo importante para su ampliación e industrialización [188]. En estas condiciones económicas y de rendimiento, los sistemas bioelectroquímicos de última generación, se consideran no viables [185,189]. Por lo tanto, es un tema obligado de investigación, la disminución del costo de los materiales (como la membrana y los electrodos) mediante el uso de alternativas (por ejemplo, electrodos de carbono) [186]. Otro tema de investigación es nuevos diseños de reactores de fabricación fácil y convenientes [190].

También se tiene en cuenta la baja tasa de producción de productos específicos y las bajas tasas de transferencia de electrones entre los microorganismos electroactivos y los electrodos. Sin embargo, estos desafíos pueden superarse investigando las interacciones sinérgicas entre electrodos y microorganismos y el metabolismo intracelular [191]. Un análisis técnico – económico mostró que la sola mejora del rendimiento producto - sustrato, independientemente de la mejora de los parámetros no tecnológicos, puede dar como resultado un valor presente neto positivo y una rentabilidad de estos sistemas [185].

En conclusión, en la actual fase de desarrollo tecnológico, es poco probable que las plantas convencionales implementen sistemas bioelectroquímicos al considerar la evaluación

técnico-económica reciente, ya que las inversiones asociadas a los sistemas electroquímicos microbianos son superiores a las de las tecnologías convencionales. Los investigadores están tratando de reducir las inversiones utilizando materiales rentables; sin embargo, existe el gran desafío de reducir el costo y aumentar el rendimiento. Además, la evaluación del impacto ambiental y la sostenibilidad también deben tenerse en cuenta, para que estos sistemas sean de uso práctico; la viabilidad económica junto con la viabilidad de la sostenibilidad juega un papel crucial [192]. Desde el punto de vista ambiental son críticos el material de la membrana de intercambio iónico y los componentes de los medios del reactor en la celda del cátodo y ánodo [189].

1.3.4 Simulación de sistemas bioelectroquímicos (BES)

La modelación matemática tiene un papel importante para la integración y consolidación de la investigación de los sistemas bioelectroquímicos (BES) y puede ser útil para acelerar la contribución de dichos sistemas a una sociedad más sostenible. La viabilidad de las tecnologías a escala industrial basadas en BES está actualmente restringida por una comprensión limitada de los elementos específicos en el proceso bioelectroquímico. También, hay una falta de descripciones matemáticas validadas adecuadas de estos sistemas, que representen adecuadamente las interacciones más importantes entre los elementos y procesos del sistema. Así, los modelos matemáticos, adecuados a diferentes objetivos específicos y aplicaciones de los sistemas bio – electroquímicos, son necesarios para lograr una comprensión integrada de los diversos fenómenos acoplados a fin de avanzar la investigación y el desarrollo de estos [193].

1.3.4.1 Modelos no estructurados

Los modelos no estructurados existentes se basan en balances de masa. Aquí las concentraciones de los componentes relevantes dependen del tiempo y se definen generalmente como las variables de estado del modelo. Las concentraciones se acoplan a los procesos electroquímicos a través de diferentes enfoques para calcular los resultados de los modelos en forma de potenciales y corrientes. Las diferencias predominantes entre los modelos existentes se consideran en: el nivel de complejidad, número de especies y componentes considerados, nivel de detalle de la descripción de algunos de los elementos

en las biopelículas y diferentes enfoques para la descripción de los mecanismos de transferencia de electrones desde las bacterias hasta los electrodos [194].

Se han desarrollado varios enfoques de modelado que comienzan con la descripción simple de procesos biológicos y electroquímicos en términos de ecuaciones diferenciales ordinarias hasta modelos 2D y 3D muy detallados que estudian la distribución espacial de sustratos y biomasa para estudiar el rendimiento de BES. Además, también se han descrito modelos matemáticos centrados en el estudio de un proceso particular, como la difusión de iones a través de la membrana, y nuevos enfoques de modelado, como métodos de inteligencia artificial y modelos de redes celulares [195]

La modelación matemática de los sistemas bioelectroquímicos (BES) abarca variados elementos que pueden ser modelados con diferentes aproximaciones. En primer lugar, se tiene el circuito eléctrico que normalmente se ha modelado con la ley de Ohm. También se contempla el sistema de reactor que incluye el balance de masas y la discretización en volúmenes perfectamente mezclados. Igualmente debe contemplarse la existencia de una biopelícula unidimensional o multidimensional en capas perfectamente mezcladas. Existen varias cinéticas de reacciones que pueden contemplarse como son las reacciones abióticas del electrodo y las reacciones biológicas que serían dependientes del mecanismo de transferencia de electrones entre el electrodo y la biopelícula. Los fenómenos de transporte deben ser también contemplados, para esto se utiliza la ley de Fick para el transporte de masa, para el transporte selectivo de iones a través de la membrana se tiene en cuenta las permeabilidades de la membrana a protones y también los mecanismos de transferencia de electrones usando transportadores químicos por difusión o mecanismos de conducción (Ley de Ohm). Finalmente es necesario tener en cuenta la actividad biológica y su metabolismo usando cinéticas tipo Monod, rendimientos de biomasa constantes y variables dependientes de la energía, junto con la consideración de la existencia de una sola especie o una población creciendo en el biorreactor [194,195].

Hasta la fecha, se han publicado pocos estudios de modelado no estructurados sobre electrosíntesis microbiana y la dinámica entre microorganismos y condiciones operativas. Inicialmente modelaron un cátodo para un proceso de electrosíntesis microbial (MES), basado en biopelícula con un cultivo puro que produce acetato utilizando un enfoque de biopelícula conductora. El modelo les permitió estudiar la densidad de corriente y el grosor

de la biopelícula en diferentes concentraciones de CO₂ y potenciales catódicos aplicados. Su modelo mostró que las altas concentraciones de CO₂ disminuyeron la eficiencia de transferencia de electrones, mientras que un potencial catódico más alto aumentó la eficiencia de transferencia de electrones [196]. Estudios posteriores se han centrado en estudiar los efectos de los parámetros operativos en el rendimiento general de procesos específicos [197–199].

1.3.4.2 Modelos estructurados

Por su parte, los modelos metabólicos permiten la simulación matemática del metabolismo de las arqueas, las bacterias y los organismos eucariotas. Estos definen cuantitativamente una relación entre el genotipo y el fenotipo al contextualizar diferentes tipos de datos (por ejemplo, genómica, metabolómica y transcriptómica) y permiten predecir fenotipos, dilucidar las vías metabólicas para la producción de productos químicos relevantes para la industria, identificar objetivos farmacológicos y generar conocimiento [200].

Los BES son sistemas complejos que combinan electroquímica y biotecnología. Cuando se trata de mejorar el rendimiento del reactor, todos los procesos físicos, químicos y biológicos que ocurren simultáneamente deben estar debidamente regulados. Al observar el biocatalizador en sí, el modelado metabólico permite un análisis en profundidad de los mecanismos moleculares y bioquímicos que ocurren dentro de un microorganismo en particular. Estas expresiones matemáticas complejas abarcan todas las vías metabólicas principales y las simulan en la perspectiva de toda la red metabólica [201].

Los modelos de redes metabólicas son de gran utilidad cuando se estudian las vías presentes dentro de un microorganismo en particular con un proceso BES. La simulación de electrofermentación catódica se ha realizado en un pequeño número de especies. Inicialmente con *E. coli* se desarrolló un modelo a escala del genoma para glucosa y glicerol como sustratos. Lo utilizaron para caracterizar el papel de la bioelectrosíntesis en la producción química y mostró que podrían existir compensaciones entre mejorar las tasas de crecimiento y los rendimientos. A partir de la glucosa se analizaron los productos 1,4-butanodiol, etanol, n-butanol y succinato. Aquí, solo se obtuvieron aumentos en el rendimiento para 1,4-butanodiol (39 %), etanol (9 %) y succinato (39 %) [202]. Posteriormente, también con *E. coli* se utilizó el análisis de modo elemental con múltiples

redes centrales de vías metabólicas de carbono y se descubrió que el rendimiento obtenido con la mejora eléctrica depende en gran medida del mecanismo de transporte de electrones. Aquí, se identificaron 18 productos objetivo con posibles aumentos en el rendimiento del producto entre el 7 % y el 84 %. Específicamente, 6 de los 20 productos estudiados se benefician del suministro adicional de electrones para las vías de producción que dependen únicamente de la entrada de NADH (p. ej., 1,2-PD, 1,3-PD, ácido 3-hidroxipropiónico) [203]. Luego se construyeron tres modelos metabólicos a escala de genoma (*Acetobacterium*, *Sulfurospirillum* y *Desulfovibrio*) que en combinación con el análisis de balance de flujo permitió predecir la actividad metabólica de una comunidad microbiana. Sus resultados identificaron las principales rutas metabólicas en estos sistemas, además de demostrar la posibilidad de que múltiples especies estén activas dentro de un espacio muy limitado cerca de un electrodo [204].

También, se simuló la producción de butanol con *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, usando el modelo iCAC490. Se analizó sus capacidades metabólicas y su respuesta al suministro externo de electrones. El modelo mostró que una absorción de butirato combinada con una absorción de electrones daría como resultado un aumento de la productividad volumétrica de butanol con un rango de flujo de absorción de butirato entre 20 y 30 mmol/gDW-h [205] y con un modelo de *Clostridium kluyveri* se evaluó la producción de ácidos orgánicos de cadena media a partir de etanol y acetato. Este estudio encontró que un cátodo puede "reemplazar" la alimentación conjunta de etanol sólo si la absorción de electrones está acoplada a la producción de ATP [37]. No se han desarrollado estudios que simulen el proceso de electrofermentación catódica con una red metabólica central de *Clostridium butyricum*.

1.4 Herramientas de álgebra lineal para analizar redes metabólicas

La comprensión cuantitativa del metabolismo de los clostridios es de gran interés debido a la importancia de los clostridios como anaerobios modelo, caballos de batalla de la biotecnología y contribuyentes a la historia evolutiva y al ecosistema. Los métodos computacionales actuales, como la construcción basada en el análisis del balance de flujo del metabolismo de los clostridios a escala del genoma, proporcionan un marco

fundamental para el análisis metabólico [206]. En este contexto, los estudios metabólicos pueden ayudar a evaluar los rendimientos máximos teóricos, las condiciones óptimas del bioproceso y los objetivos para la optimización de cepas o la manipulación de vías por medios biomoleculares [207]. El modelado de redes metabólicas estructurales se ha aplicado ampliamente para analizar el metabolismo celular en estado estacionario [208].

La teoría detrás del análisis de redes metabólicas se basa en el primer principio de conservación de masa de los metabolitos internos dentro de un sistema biológico [209]. Un sistema puede definirse por una sola célula o un compartimento celular que contiene metabolitos internos. Estos metabolitos se transforman en otros a través de una intrincada red de reacciones catalizadas por enzimas. Las reacciones que transforman los metabolitos dentro del sistema se definen como reacciones internas, mientras que las reacciones que implican el transporte de metabolitos dentro y fuera del sistema se consideran reacciones de intercambio [208].

La ecuación general para describir la conservación de masa de metabolitos dentro de un sistema de volumen definido es

$$\frac{dC}{dt} = S \cdot r - \mu \cdot C \quad (1.1)$$

donde C (mol/L) es el vector de columna ($m \times 1$) de las concentraciones de metabolitos internos; S es la matriz estequiométrica ($m \times n$) de la red metabólica cuyas filas y columnas representan metabolitos y reacciones, respectivamente; r (mol/L/h) es el vector de flujo (tasa de reacción) ($n \times 1$) y μ (1/h) es el efecto de dilución, por ejemplo, expansión de volumen durante el crecimiento celular. Dentro de las dimensiones de una sola célula, dado que la tasa de dilución es mucho más lenta que las tasas de reacción de las enzimas la contribución del cambio de volumen al cambio en las concentraciones de metabolitos puede considerarse insignificante, además, debido a la rápida tasa de renovación de los metabolitos internos, se puede suponer que no se acumulan en el sistema [209] y se puede simplificar la ecuación (1.1) a

$$S \cdot r = 0 \quad (1.2)$$

La reversibilidad de una reacción está definida por la restricción termodinámica. Si una reacción es irreversible, está obligada a tener un flujo positivo, es decir:

$$r_i \geq 0 \quad (1.3)$$

Típicamente, la ecuación (1.2) es un sistema indeterminado donde el número de metabolitos es mucho menor que el número de reacciones. Dependiendo de la estructura invariante de S y de si se requieren algunos flujos medidos experimentalmente para la iniciar el modelo, se han desarrollado técnicas para resolver el sistema de ecuaciones lineales descrito por la ecuación (1.2) junto con las restricciones de desigualdad descritas por la ecuación (1.3) para el vector de flujos metabólicos r. Estas técnicas para analizar las redes metabólicas son el análisis de flujo metabólico (MFA por sus siglas en inglés), el análisis de balance de flujo (FBA por sus siglas en inglés) y el análisis de vías metabólicas como el análisis de modos elementales (EMA por sus siglas en inglés), entre otros [208].

1.4.1 Análisis de flujo metabólico (MFA)

Una red metabólica típicamente contiene más flujos desconocidos que ecuaciones de balance de masa para metabolitos ($m < n$), por lo que hay $n-m$ grados de libertad suponiendo que m es del mismo valor que el rango de S. El MFA puede calcular el vector de flujo metabólico r conociendo por medición $n-m$ flujos [210]. Al dividir el vector r en los dos vectores: vector de medidos (r_m) y vector de no medidos (r_u) y también, la matriz estequiométrica S en las matrices correspondientes S_m y S_u , se puede calcular fácilmente el vector r_u de la siguiente manera:

$$r_u = -S_u^{-1} \cdot S_m \cdot r_m \quad (1.4)$$

El MFA está configurado para calcular el vector de flujo metabólico r correspondiente a un estado fisiológico de la célula bajo una condición dada. Requiere un gran conjunto de datos experimentales para resolver r_u , especialmente para una gran red metabólica, que puede volverse experimentalmente inviable. MFA generalmente maneja redes metabólicas pequeñas y simplificadas [211].

1.4.2 Análisis de balance de flujo (FBA)

El análisis de balance de flujo (FBA por sus siglas en inglés) determina un vector de flujo metabólico r correspondiente a un estado fisiológico de la célula bajo una condición dada, pero se puede aplicar a una red metabólica a escala del genoma ($m \ll n$). El método se basa en la teoría del análisis convexo y se requiere una o varias funciones-objetivo, tal como maximizar la tasa de crecimiento específica, minimizar la utilización de ATP o maximizar la formación de producto. Estas funciones-objetivo están restringidas por varios flujos de reacción en el vector r . Por ejemplo, restricciones como la tasa de absorción de sustrato, tasa de secreción de productos o por restricciones termodinámicas. Con estas restricciones y la función objetivo, se calcula el vector de flujo metabólico r [212]. Por lo tanto, se deben proporcionar algunos flujos medidos experimentalmente (generalmente menos de $n-m$) para realizar FBA. Cuantos más flujos medidos experimentalmente estén disponibles, mejor funcionará la predicción del modelo para determinar el vector de flujo metabólico r [210]. Algunas cuestiones desafiantes al aplicar FBA son justificar la suposición de objetivo funciones para predecir el estado fisiológico de la célula bajo una condición dada [213] y dar cuenta de todas las soluciones alternativas que pueden representar estados fisiológicos reales de la célula [214].

1.4.3 Análisis de modo elemental (EMA)

Las redes bioquímicas pueden ser tremendamente complejas y puede ser un desafío identificar todas las rutas viables y biológicamente significativas desde un sustrato hasta el producto deseado. En redes pequeñas, cuando las restricciones en forma de datos medidos están disponibles, los métodos de MFA o FBA pueden ayudar en este contexto. Si bien, la aplicación de MFA clásica puede fallar debido a la estructura de la red, el FBA por su parte limita el espacio de solución por las funciones-objetivo aplicadas y, a veces, además, por las restricciones de las reacciones específicas para que se encuentren dentro de un rango predefinido [212]. Por otra parte, el análisis de modo elemental (EMA) es una poderosa herramienta que simplifica el complejo metabolismo microbiano en un conjunto de modos elementales únicos e indivisibles [215].

Un "modo de flujo" es una distribución de estado estacionario de las tasas de reacción intracelular en proporciones fijas. "Elemental" denota que la solución no es descomponible.

A diferencia de los enfoques anteriores, EMA considera las restricciones termodinámicas de cada reacción metabólica, que están contenidas en la matriz estequiométrica N mediante la definición de reactivos y productos de cada reacción. Durante EMA, se calculan todas las soluciones que se encuentran dentro del espacio de solución (flujo) de la ecuación (1.2) junto con estas restricciones termodinámicas, incluidos los ciclos de metabolitos. Además, los vectores obtenidos deben cumplir una restricción de no descomposición. Por lo tanto, todas las soluciones se encuentran en el espacio nulo de la matriz estequiométrica N y cumplen la restricción de reversibilidad termodinámica establecida. Cada red bioquímica tiene un subconjunto único de modos de flujo elementales (EM). Además, un modo de flujo elemental consiste en el número mínimo de reacciones requeridas para lograr un estado estacionario fenotípico. Si se elimina una reacción, el modo no puede operar como una unidad funcional y no se logrará el estado estacionario [216,217]

El espacio operativo para la red metabólica se define por una combinación lineal positiva de estos modos elementales que contribuyen al metabolismo general [215]. Los rendimientos máximos para productos específicos se determinan dentro del espacio de la solución. Además, se reconstruyen los flujos de carbono dentro de la red, por ejemplo, para estudiar cambios en la formación de subproductos [218]. La metodología EMA es el cálculo de todas las soluciones en lugar de solo una mejor solución. La distribución de todos los flujos metabólicos posibles representa una visión holística del impacto del cambio ambiental sobre el metabolismo analizado. Este análisis no considera factores como la termodinámica, la cinética enzimática, la regulación génica y la toxicidad del producto [203].

Una limitación de EMA es que requiere una inmensa potencia computacional. Matemáticamente, todos los modos obtenidos para EMA forman un cono poliédrico convexo y pueden calcularse mediante diferentes algoritmos computacionales. Aunque los enfoques y algoritmos han experimentado mejoras significativas, que podrían acelerar el tiempo de cálculo en varios órdenes de magnitud [219], los cálculos aún pueden tardar horas o días. EMA aún no se puede aplicar a las grandes redes a escala del genoma cada vez más disponibles, por lo tanto, se utiliza principalmente para redes metabólicas de escala media de alta calidad [220]. Se pueden encontrar explicaciones y derivaciones más detalladas en los libros de texto actuales de ingeniería metabólica y bioquímica [221].

1.5 Avances del grupo de Bioprocesos y Bioprospección

En este contexto, el grupo de Bioprocesos y Bioprospección de la Universidad Nacional de Colombia desde hace 20 años viene trabajando en el desarrollo de bioprocesos agroindustriales para la producción de solventes amigables con el ambiente [222]. Para lograr este propósito, hacia mediados de la década de los ochenta se aislaron 178 cepas de *Clostridium sp.* a partir de 155 muestras provenientes de diferentes cultivos agrícolas, de las cuales 13 cepas presentaron una mayor producción de solventes como acetona, butanol y etanol. Este grupo de trece cepas de *Clostridium sp.*, están estrechamente relacionadas con *Clostridium butyricum* [223,224], han sido identificadas como buenos productores de solventes y ácidos, incluido el ácido acético, ácido butírico, etanol, butanol, acetona e hidrógeno a partir de glucosa o 1,3-propanodiol a partir de glicerol [223,225,226]. Estas cepas se han caracterizado bioquímicamente, secuenciado y simulado la fisiología, bioquímica, genética y metabolismo [227–231].

El grupo de investigación ha trabajado con un tipo de fermentación tradicional en cultivo por lote y lote alimentado, realizada con glicerina cruda del 60% y 80% de pureza, encontrándose rendimientos producto / sustrato de 0,67 y 0,8 mol 1,3-PD / mol de glicerol, con productividades volumétricas entre 1,5 g/L.h y 1,1 g/L.h, respectivamente [232]. Al comparar estos resultados con el estado de la técnica, se puede observar que los microorganismos aislados sin modificación, como la cepa IBUN 158B, tienen una alta viabilidad técnica, ya que se comportan en cultivo como las mejores cepas silvestres y algunas transformadas encontradas en la literatura técnica consideradas buenas productoras de 1,3-propanodiol.

El grupo avanzó en el proceso optimizando el cultivo por lote alimentado y determinando un proceso de separación factible, para escalar a nivel laboratorio usando extracto de levadura como fuente principal de nitrógeno y glicerol crudo. Paralelamente, se realizó la simulación del proceso industrial como parte del análisis económico mostrando que una línea de producción de 1,3-propanodiol dentro de una planta de producción de biodiesel en Colombia sería económicamente factible y mejoraría la economía de la planta de biodiesel [233,234].

También se estudió la factibilidad de una planta única para la producción de 1,3-propanodiol, independiente de una planta de biodiesel y consumiendo glicerol crudo producido de diferentes fuentes industriales. Aquí, se encontró un retorno positivo de la inversión con un tamaño de planta de 50.000 toneladas/año de producción de 1,3-PD. Pero siendo un proceso altamente dependiente de los precios de la materia prima y el 1,3-propanodiol es muy importante para la planta valorizar sus corrientes secundarias para mejorar su economía al igual que mejorar el rendimiento y productividad obtenido en el proceso fermentativo [235].

Recientemente, el grupo de investigación exploró la capacidad de las cepas nativas para generar energía eléctrica en una celda de combustible microbiana (MFC, por sus siglas en inglés). Encontrando que la cepa nativa IBUN 62F podía generar energía eléctrica y formar una biopelícula sobre el ánodo de fieltro de grafito [236].

2. Capítulo 2 Objetivos

El Acuerdo de París adoptado en 2016 refleja un esfuerzo internacional para reducir las emisiones de carbono y promueve nuevos procesos sostenibles de producción de combustibles y productos químicos que utilizan carbono "superficial" como materia prima [1]. Los productos de base biológica son el reemplazo futurista de los productos químicos de origen fósil y, considerablemente, la mejor manera de avanzar hacia una economía baja en carbono (LCE, por sus siglas en inglés) [2,3]. El material orgánico renovable de plantas y animales se puede convertir, a través de la fermentación, en varios productos químicos de valor agregado, como azúcares, alcoholes, glicerol, ácidos orgánicos, poliésteres, resinas y solventes [4]. Entre ellos, la glucosa y el glicerol son materias primas atractivas porque son renovables, están disponibles en grandes cantidades y tienen precios bajos [5,6].

La electrofermentación (EF) es una nueva técnica de sistema bioelectroquímico (BES) que recientemente ha recibido mucha atención [20,21]. Esta nueva tecnología combina microbiología y electroquímica, abriendo la posibilidad de manipular las tasas de regeneración de los cofactores intracelulares para lograr la fisiología celular deseada. En esta tecnología, los electrones externos de una fuente de energía artificial son aceptados por bacterias electroactivas directa o indirectamente, cambiando el equilibrio redox intracelular y promoviendo la formación de productos reductores [22].

Algunas cepas bacterianas del género *Clostridium* han sido utilizadas en procesos de electrofermentación catódica, debido a su gran capacidad para producir metabolitos o solventes altamente reducidos como etanol, butanol y 1,3-propanodiol [24–31].

Por su parte, *Clostridium butyricum* es una importante especie productora de solventes e hidrógeno [237–239] que ha sido ampliamente estudiada por su capacidad para consumir

glicerol crudo, pero no ha sido utilizada en el proceso de electrofermentación catódica [9,12,39,40].

Recientemente, varias cepas relacionadas a *Clostridium butyricum* fueron identificadas como microorganismos capaces de interactuar con un electrodo para la generación de la energía eléctrica en una celda de combustible microbiana (MFC, por sus siglas en inglés). [236,240].

Una de estas cepas pertenece al grupo de trece cepas de *Clostridium sp*, que están estrechamente relacionadas con *Clostridium butyricum* identificadas como buenas productoras de solventes, aisladas de suelos colombianos [223,224,230,232]

La anterior exposición y revisión de literatura demuestran el potencial prometedor del enfoque novedoso de la electrofermentación catódica para la obtención de solventes e hidrógeno con cepas del género *Clostridium*, pero también señala una falta en el conocimiento del efecto del uso de cepas de *Clostridium butyricum* como biocatalizador en una electrofermentación de glicerol y su potencial para el incremento del rendimiento producto / sustrato. Esta ha sido la razón de ser de esta tesis doctoral, que pretende reunir información sobre el efecto en el metabolismo de *Clostridium butyricum* del suministro de electrones en una fermentación de glicerol, de forma que se analice el uso de esta tecnología. Para lograrlo se optó por realizar inicialmente una simulación metabólica para ver el potencial del incremento de los productos reducidos y posteriormente la selección de una cepa nativa con la cual realizar cultivos catódicos evaluando la producción de solventes.

2.1 Objetivo general

El objetivo general para este proyecto es:

- Evaluar la viabilidad técnica de la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerina cruda con un sistema bio-electroquímico de fermentación usando una cepa nativa de *Clostridium sp*.

2.1.1 Objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo principal se establecieron los siguientes objetivos específicos

- Establecer un modelo metabólico para la producción de 1,3-PD en un sistema bio-electroquímico.
- Seleccionar una cepa nativa que se adapte al crecimiento en presencia de un transportador de electrones.
- Estandarizar las condiciones de rendimiento de la fermentación bio electroquímica con glicerol usando una cepa patrón.

3. Capítulo 3 Metodología

La metodología que se presenta a continuación se describe en el orden de los objetivos específicos presentados en el capítulo anterior:

3.1 Establecimiento de un modelo metabólico

Aquí se presentan los pasos que se tomaron para desarrollar un modelo metabólico central que permitiera visualizar, por simulación, los potenciales cambios en rendimiento al someter la red metabólica al suministro de electrones proveniente de un cátodo en un proceso EF.

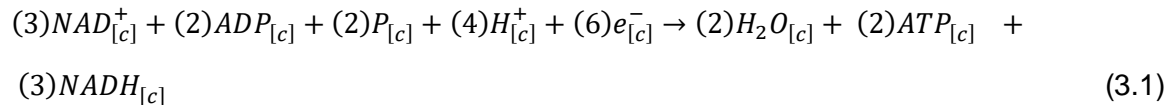
3.1.1 Construcción de un modelo metabólico central

El modelo se desarrolló en la página Base de Conocimiento para la Biología de Sistemas (KBASE por sus siglas en inglés) del Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE por sus siglas en inglés) siguiendo el procedimiento recomendado [241–243]. Inicialmente, la versión publicada en la base de datos del NCBI del genoma de *Clostridium* sp. IBUN 13A se importó a KBASE. Esta es una cepa de *Clostridium* sp, estrechamente relacionada con *Clostridium butyricum*, aislada de suelos e identificada como productora de solventes y ácidos como ácido acético, ácido butírico, etanol, butanol, acetona e hidrógeno a partir de glucosa junto con 1,3-propanodiol a partir de glicerol [223,225,226,244]. Su número de acceso en GenBank es No. NZ_JZWG00000000.1, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000968315.1). Posteriormente, el genoma fue anotado con una aplicación de KBASE usando el sistema RAST (*Rapid Annotations using Subsystem Technology*). El primer borrador del modelo se construyó utilizando la aplicación *Build Metabolic Model* basada en el algoritmo de ModelSEED [245]. A continuación, el borrador del modelo fue curado teniendo en cuenta datos de la literatura

[246–248], la base de datos KEGG [249] y el modelo metabólico de escala genómica para *C. butyricum* iCbu641 [230,231]. La curación del modelo incluyó el ajuste de la direccionalidad de la reacción para evitar rutas metabólicas en direcciones no fisiológicas. La reconstrucción del modelo se encuentra en la interfaz narrativa de KBASE (<https://narrative.kbase.us/narrative/91426/>).

Adicionalmente, el desarrollo del modelo de electrofermentación catódica incluyó vías de utilización de electrones y mecanismos de transferencia de electrones. Sin embargo, los detalles moleculares de los mecanismos de transferencia de electrones en los microorganismos del género *Clostridium* no están completamente entendidos [250]. Por lo tanto, los mecanismos utilizados en este estudio se basan en los mecanismos de transferencia genéricos propuestos por Kracke y colaboradores [203].

El primer mecanismo (ET1) incrementa la cantidad de NADH y la cantidad de ATP (ecuación (3.1)).



donde la letra (e⁻) representa electrones transferidos. Esta ruta de consumo de electrones se basa en el modelo de citocromos con un mediador de electrones y una cascada de complejos enzimáticos unidos a la membrana haciendo una generación simultánea de ATP [203]. La segunda vía de utilización de electrones (ET2), solo incrementa la cantidad de NADH mediante la reducción directa de NAD⁺ consumiendo electrones y protones. Este mecanismo se basa en la función de enzimas unidas a la membrana como las hidrogenasas o por la difusión de moléculas mediadoras ((ecuación (3.2)).



La tercera reacción (ecuación (3.3)) introducida en el modelo representa el suministro de electrones exógenos al citoplasma celular. Aquí, los subíndices [e] y [c] indican si el metabolito es extracelular o citoplasmático, respectivamente. Los mecanismos utilizados

en este trabajo son similares a otros mecanismos de transferencia de electrones evaluados en microorganismos como *E. coli* y *C. acetobutylicum* [182,202,205,218].



La red metabólica del modelo comprende la vía de Embden - Meyerhof, la vía de las pentosas fosfato, el metabolismo del piruvato, la formación de hidrógeno, las reacciones anfibólicas, la vía de consumo de glicerol y la producción de 1,3-propanodiol. Esta red metabólica tiene 114 reacciones, 20 metabolitos externos y 71 metabolitos internos (Anexo [A](#)). En este estudio se usó una función objetivo de producción de biomasa desarrollada para *Clostridium sp.* Esta función para la producción de biomasa asume que la composición macromolecular de *C. acetobutylicum* es similar a la *B. subtilis*. Todos los metabolitos esenciales forman parte de la red central. Se han utilizado funciones de biomasa similares con modelos para *C. autoethanogenum* [182] y *C. kluyveri* [37].

3.1.2 Validación del modelo metabólico central

El modelo metabólico central fue validado [251] con la técnica de análisis de balance de flujo (FBA por sus siglas en inglés) [212] resolviendo ecuaciones de equilibrio estequiométrico del estado pseudoestacionario (ecuación (1.2)). Se realizó el FBA en MATLAB R2019a [252] con la herramienta de software CellNetAnalyzer, Versión 2019.3 [253]. Se obtuvo una solución para los flujos de metabolitos intracelulares y extracelulares, maximizando la tasa de crecimiento como función objetivo. Se analizó la bondad de ajuste del modelo, comparando las tasas de crecimiento específicas de la biomasa celular simulada con los valores de la contraparte experimental a través del coeficiente de determinación (ecuación (3.4)).

El coeficiente de determinación se define como:

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{res}}{SS_{tot}} \quad (3.4)$$

R^2 es el coeficiente de determinación o la proporción de la varianza en la variable dependiente que es predecible a partir de la variable independiente. SS_{res} es la suma de los cuadrados residuales, y SS_{tot} es la suma de los cuadrados totales proporcionales a los datos de la varianza [254]. La información experimental utilizada para validación del modelo son datos del crecimiento heterótrofo en glucosa y glicerol con un balance de carbono cercano al 100% a diferentes diluciones en quimiostato para *Clostridium butyricum* [255,256].

3.1.3 Evaluación del suministro de electrones al metabolismo

La metodología EMA es el cálculo de todas las soluciones en lugar de solo una mejor solución. La distribución de todos los flujos metabólicos posibles representa una visión holística del impacto del cambio ambiental sobre el metabolismo analizado [203]. El análisis de modos elementales se realizó en MATLAB R2019a [252] con la herramienta de software CellNetAnalyzer, Versión 2019.3 [253]. Se evaluó el efecto de la electrofermentación sobre los rendimientos teóricos de biomasa y los rendimientos de producto (ecuación (3.5)). Se compararon de forma independiente dos mecanismos de transferencia de electrones genéricos diferentes (ET1 y ET2), evaluando el porcentaje de aumento (PI) o disminución del rendimiento promedio de los productos (ecuación (3.6)).

El rendimiento del producto se define como:

$$Yield_{product} = \frac{Flux_{product} * Carbon_{product}}{Flux_{substrate} * Carbon_{substrate}} \quad (3.5)$$

donde $Flux_{product}$ es la velocidad de reacción para la salida del producto, $Flux_{substrate}$ es la velocidad de reacción para la absorción del sustrato, $Carbon_{product}$ es el número de átomos de carbono en el producto y $Carbon_{substrate}$ es el número de átomos de carbono en el sustrato.

El porcentaje de aumento (PI) o disminución en el valor promedio del rendimiento del producto se define como:

$$PI_{product} = \frac{Yield_{product:ET1orET2} - Yield_{product:NoET}}{Yield_{product:NoET}} * 100 \quad (3.6)$$

donde $Yield_{product ET1 or ET2}$ es el valor promedio del rendimiento del producto obtenido cuando se activa ET1 o ET2 en la red metabólica. También, $Yield_{product NoET}$ es el valor promedio del rendimiento del producto obtenido cuando ningún mecanismo de transferencia de electrones está activo en la red metabólica.

3.2 Selección de una cepa nativa

Se realizó un tamizado de las 13 cepas nativas buscando cepas que pueden metabolizar glicerol crudo al 83 % de pureza a través de cultivos por lote sin pH controlado y que pudieran crecer en presencia de un transportador de electrones como el Rojo Neutral sin inhibición.

3.2.1 Microorganismos nativos

Las cepas nativas (Tabla 3-1). utilizadas en este estudio pertenecen a la familia *Bacillaceae* del género *Clostridia* y su especie está cercanamente relacionada a *C. butyricum* [223]. Estos son bacilos Gram positivos, rectos o curvos, formadores de espora subterminal o central, anaerobios estrictos, mótils por flagelos peritricos y no reducen el sulfato a sulfito. Se clasifican por sus requerimientos nutricionales como proteolíticos y sacarolíticos. Su crecimiento puede ser a 37°C en medio vegetativo, en un rango de pH de 6,5 a 7,0 y requiere glucosa como fuente de carbono y factores de crecimiento como biotina y ácido paraaminobenzoico (PABA, por sus siglas en inglés). Las cepas nativas han sido caracterizadas bioquímica y molecularmente y no presentan patogenicidad. [223,226,230,257]

Tabla 3-1: Cepas nativas utilizadas en el estudio

Cepa	Característica
13A	Nativa
22A	Nativa
158B	Nativa
137K	Nativa
140B	Nativa
64A	Nativa

Cepa	Característica
125C	Nativa
95B	Nativa
18S	Nativa
62F	Nativa
62B	Nativa
18Q	Nativa
18A	Nativa

3.2.2 Microorganismos patrón

Clostridium diolis es un mesófilo anaeróbico Gram positivo que puede utilizar glicerol para producir de manera eficiente 1,3-propanodiol (1,3-PD) y una valiosa plataforma química, utilizada principalmente en la síntesis de polímeros [97]. La morfología celular se asemeja a *C. butyricum* y *C. beijerinckii*, solos o en parejas, ocasionalmente en filamentos. Las esporas son ovaladas, terminales o subterminales e hinchan la célula, convirtiéndose en Gram negativo en cultivos antiguos. Es móvil con flagelos peritricos. El rango de crecimiento de pH es 5,5 – 8,5 con pH óptimo en 7,0. El rango de temperatura de crecimiento es de 25-42 °C, con óptimo 37 °C. También usa una gran variedad de carbohidratos y derivados que incluyen glucosa, fructosa, celobiosa, lactosa, galactosa, trehalosa, xilosa, salicina, amigdalina y melibiosa. También fermenta glucógeno, manitol y glicerol. Fermenta débilmente melecitosa, arabinosa, ribosa, esculina y sorbitol [258]. Por su parte, *Clostridium pasteurianum* es una bacteria Gram positiva, formadora de endosporas, anaeróbica obligada y en forma de bastón que fija nitrógeno atmosférico. Puede utilizar eficientemente el glicerol como materia prima para producir los combustibles n-butanol y 1,3-propanodiol. La especie fue descubierta (1893-95) en el suelo por el microbiólogo ruso Winogradsky [20,183]. Las cepas descritas se obtuvieron de ATCC (<https://www.atcc.org/>).

Tabla 3-2: Cepas patrón utilizadas en el estudio

Cepa	Característica
DSM 5431	<i>Clostridium diolis</i>
ATCC 6013	<i>Clostridium pasteurianum</i>

3.2.3 Medios de cultivo de inóculo

El medio de cultivo RCM (Reinforced Clostridial Medium) se utilizó para cultivar el preinóculo y el inóculo de las cepas nativas y patrón. Sus componentes se observan en la Tabla 3-2. El medio se preparó en una botella de laboratorio resistente al vacío y presión (SCHOTT-DURAN ®) disolviendo 38 g de medio RCM (Oxoid ®) en un litro de agua destilada. El pH del medio se ajustó con NaOH (40% p/p) hasta un valor de 7,0. Se adicionó un 10% v/v de agua adicional al litro y 40 µL de solución de resazurina al 5% p/p como indicador de anaerobiosis. La mezcla se calentó hasta ebullición para tener el volumen original de 1 litro y eliminar el oxígeno disuelto. La botella se tapó herméticamente y se trasladó a una cámara de anaerobiosis con atmósfera de nitrógeno. Allí, se sirvió 40 mL del medio en viales de vidrio de 50 mL [226].

Tabla 3-3: Medio de cultivo RCM

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de carne – Lab –Lemco	10
Peptona	10
Extracto de levadura	3
D (+) glucosa	5
Almidón soluble	1
Cloruro de sodio	5
Acetato de sodio	3
Cloruro de L- Cisteína	0,5
Agar – agar	0,5

3.2.4 Medios de cultivo de tamizaje con glicerol USP y crudo

El medio con glicerol (medio 1) aporta los componentes que se presentan en la Tabla 3-3. Este medio fue optimizado para la fermentación acetobutílica [226]. Para su preparación, los componentes del medio y la solución de minerales (Tabla 3-4) fueron medidos y mezclados (excepto la PABA y la biotina) en una botella de laboratorio (SCHOTT-DURAN ®).

Posteriormente, se adiciono un 10% v/v de agua adicional al litro de medio. En este estudio se usó glicerol USP y glicerol crudo proveniente de la producción de biodiésel. La pureza de este último medida por HPLC fue de 87% en peso.

Tabla 3-4: Componentes del medio 1

Componente (Unidad)	Valor
Biotina (g/L)	0.004
PABA (g/L)	0,003
Fosfato diácido de sodio (g/L)	1.8
Extracto de Levadura (g/L)	3,0
Glicerol (g/L)	50
Cloruro de L – cisteína (g/L)	0,5
Resazurina (µL)	40
Solución de minerales (mL)	4

La mezcla se calentó hasta ebullición para tener el volumen original de 1 litro y eliminar el oxígeno disuelto. La botella se tapó herméticamente y se trasladó a una cámara de anaerobiosis con atmósfera de nitrógeno. Allí, se sirvió 39 mL del medio en viales de vidrio de 50 mL, los cuales fueron tapados con tapones de caucho y agrafados. Los viales fueron retirados de la cámara y esterilizados por 15 minutos a 121 °C. Paralelamente se preparó una solución de biotina y PABA de concentraciones 160 y 120 mg/L, respectivamente y se adiciono 1 mL filtrado con membrana estéril (0,2 µm) a cada vial para tener un volumen final de 40 mL por vial.

Tabla 3-5: Componentes de la solución de minerales

Componente	Concentración (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,640
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,380
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,253
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,060
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,060
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,065

3.2.5 Proceso de activación y desarrollo de inóculo

Los microorganismos fueron mantenidos en forma esporulada en un vial stock con medio RCM. Para cada fermentación se tomó del stock un volumen de 3 mL (O.D. de 0,5). Este volumen fue inyectado en un vial con medio RCM estéril. Se activaron las cepas sometiendo los viales inyectados a un choque térmico calentando a 70 °C por 10 minutos y posteriormente se introdujeron en un baño de agua - hielo por otros 10 minutos. Al final de este periodo se localizaron los viales en un agitador orbital a 200 rpm y 37 °C por 12

horas para tener el preinóculo. A las doce horas se tomaron 3 mL de los viales del preinóculo (O.D. de 1,8) y se inyectaron en nuevos viales de medio RCM para el inóculo, en el caso del medio 1. Posteriormente, estos se colocaron en el agitador orbital a 200 rpm y 37 °C por 7 horas hasta alcanzar una densidad óptica de 1,0. Con este cultivo se inocularon en el medio 1. Los porcentajes de inóculo fueron 7% v/v para los viales de 43 mL.

3.2.6 Condiciones de cultivo en vial sin control de pH

Para el caso del medio 1, las fermentaciones en volumen de 43 mL en viales de vidrio sin control de pH se realizaron bajo las condiciones establecidas por Cárdenas y colaboradores [226]. Los viales fueron inicialmente inoculados con 3 mL (O.D. 1,0) provenientes de un cultivo en fase exponencial (7% v/v). Posteriormente, se colocaron en un agitador orbital a una temperatura de 37 °C y una velocidad de agitación de 200 rpm por 72 horas de fermentación. Se tomaron muestras cada 12 horas. Todas las fermentaciones fueron realizadas por duplicado, por método de descabezado.

3.2.7 Inhibición a diferentes concentraciones de Rojo Neutral.

A las cepas nativas que presentaron mejor creciendo en glicerol USP y crudo se les sometió a diferentes concentraciones del transportador de electrones Rojo Neutral (0,0; 0,1; 0,2 y 0,5 mM), que ha sido probado con cepas de género *Clostridium* [29], y otros microorganismos [172,259], para determinar el nivel de inhibición en el crecimiento de los microorganismos en un cultivo por lote sin pH controlado. Se utilizó el método de cultivo en vial definido en el numeral anterior [226]. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo con la ecuación [3.7](#)

$$I_{NR} = \frac{\mu_{0NR} - \mu_{iNR}}{\mu_{0NR}} * 100 \quad (3.7)$$

donde I_{NR} es el valor porcentual de inhibición de la tasa de crecimiento por el incremento de concentración de Rojo Neutral. También, μ_{0NR} es el valor de la tasa de crecimiento del

cultivo sin adición de Rojo Neutral y μ_{iNR} es el valor de la tasa de crecimiento del cultivo con una concentración i adicionada de Rojo Neutral.

3.2.8 Determinación de parámetros cinéticos

El crecimiento del microorganismo fue monitoreado por medio de la densidad óptica (O.D.) a una longitud de onda de 680 nm, en un espectrofotómetro BioRad ® y se correlacionó con peso seco de biomasa determinado directamente. La relación obtenida se observa en la Tabla 3-5. Para determinar el peso seco se tomaron muestras de un volumen de 10 mL de una fermentación, cada 6 horas, se filtraron a vacío con membranas (0,2 μm) y se dejaron secar a 60 °C por 36 horas hasta obtener peso constante.

Para medir la densidad óptica se tomaron muestras de 1 mL y se leyeron en el espectrofotómetro tomando como valor 0 un mililitro de medio limpio sin inóculo. Cuando la muestra fue tomada de una fermentación con glicerol crudo, se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el pellet fue suspendido en 1 mL de agua destilada y se leyó la densidad óptica en el espectrofotómetro, tomando como valor cero, 1 mililitros de agua destilada.

Los metabolitos 1,3-PD, glicerol, ácido butírico, ácido acético, ácido láctico, butanol y etanol, fueron cuantificados a través de una metodología desarrollada dentro del grupo de investigación empleando cromatografía líquida ultra rápida (UFLC) con un detector de índice de refracción (Shimadzu ® RID 10A) a una temperatura de 60 °C y una columna AMINEX HPX – 87H (Biorad ®) a 63 °C con fase móvil de ácido sulfúrico 3 mM y un flujo de 0.5 mL/min.

El tiempo de corrida fue de 50 minutos. El software integrador fue Lab Solutions Versión 1,25 (Shimadzu ®). Las muestras de 2 mL, tomadas de la fermentación fueron centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. Posteriormente el sobrenadante fue filtrado con membranas de 0,2 μm y almacenado a -20 °C. Finalmente las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente, introduciendo un volumen 1000 μL , en viales de muestreo y posteriormente colocadas en el automuestreador del equipo UFLC Shimadzu

® Prominence LC- 20AD para ser inyectadas con un volumen de 20 μ L. Las relaciones lineales y tiempos de retención obtenidos en este estudio se presentan en la Tabla 3-5.

Tabla 3-6: Relaciones de detección HPLC y Biomasa

Sustancia	Coefficiente de correlación (R ²)	Tiempo retención (min)	Relación lineal
Láctico	0,9998	14,644	Concentración (g/L) = $4,621 \cdot 10^{-06} \cdot \text{Área} + 1,224 \cdot 10^{-01}$
Glicerol	0,9998	15,588	Concentración (g/L) = $7,034 \cdot 10^{-06} \cdot \text{Área} + 9,977 \cdot 10^{-02}$
Acético	0,9999	17,286	Concentración (g/L) = $1,282 \cdot 10^{-05} \cdot \text{Área} + 9,391 \cdot 10^{-03}$
1,3-Propanodiol	0,9999	20,353	Concentración (g/L) = $8,046 \cdot 10^{-06} \cdot \text{Área} + 1,797 \cdot 10^{-01}$
Butírico	0,9998	23,641	Concentración (g/L) = $1,016 \cdot 10^{-05} \cdot \text{Área} + 2,261 \cdot 10^{-02}$
Etanol	0,9999	24,981	Concentración (g/L) = $1,378 \cdot 10^{-05} \cdot \text{Área} - 6,219 \cdot 10^{-02}$
Butanol	0,9996	41,045	Concentración (g/L) = $9,212 \cdot 10^{-06} \cdot \text{Área} - 2,150 \cdot 10^{-01}$
Biomasa	0,97	-	Biomasa (g/L) = $0.3206 \cdot \text{densidad óptica}$

3.3 Estandarización de la electrofermentación con cepa patrón

Se realizó una exploración de las características del cultivo por electrofermentación con una cepa patrón.

3.3.1 Voltamperometría cíclica para cultivo suspendido

Las cepas nativas que presentaron baja inhibición al Rojo Neutral fueron analizadas a través de la realización de su perfil de voltamperometría cíclica (CV) según condiciones establecidas en la literatura para cepas de género *Clostridium* [24,176], para caracterizar su actividad electroquímica en cultivo suspendido. Se usó un potenciostato DY2311, marca Digilvy con un electrodo de grafito vítreo, un contra electrodo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl (1 M KCl) en celda de borosilicato y tapón de teflón (Figura 3-1). Se cultivaron los microorganismos de acuerdo con las condiciones de cultivo en vial sin control de pH.

Posteriormente se tomó una muestra de 3 mL y se hizo pasar por centrifugación a 13000 rpm por 15 minutos, obteniendo sobrenadante y pellet de biomasa. Después, el líquido sobrenadante se trasladó a la celda de borosilicato, donde se gaseó con nitrógeno 5 minutos y se realizó la voltamperometría. El sobrenadante obtenido se revisó con el

electrodo de grafito. Por su parte, la CV de la biomasa suspendida se realizó después de suspender el pellet de biomasa obtenido en solución tampón de fosfato PBS (0,1X) con pH 7,0. Los CV se ejecutaron en un rango potencial de -1,0 V a 1,0 V frente al electrodo de referencia a una velocidad de exploración de 1 mV/s. Los escaneos registrados se tomaron después de 2 ciclos iniciales y muestran un promedio de tres mediciones con una desviación estándar máxima general de un máximo de $\pm 2,5\%$.



Figura 3-1: Arreglo experimental para realización de Voltamperometría Cíclica.

3.3.2 Voltamperometría cíclica con electrodo fieltro de grafito

También se realizaron cultivos de las cepas nativas seleccionadas usando fieltro de grafito como electrodo en el cátodo en la celda de vidrio para detectar actividad electroquímica de la biomasa creciendo en la superficie del cátodo. Inicialmente se realizó un cultivo del microorganismo expuesto a un potencial de -0,25 V vs Ag/AgCl, durante al menos 12 horas con el fin de desarrollar crecimiento sobre la superficie de fieltro del electrodo de grafito (1 cm²), en la celda de borosilicato, manteniendo gaseado de nitrógeno. Se hizo seguimiento al crecimiento a través de la técnica de amperometría.

Al final del tiempo de incubación se realizó un perfil de voltamperometría cíclica (CV) al cultivo. Para este momento se considera que el cultivo ha consumido gran parte del sustrato. A continuación, se realizó el retiro del medio líquido, se reemplazó por buffer fosfato PBS 0,1X (pH 7,0) y se realizó la voltamperometría cíclica (CV), según condiciones descritas anteriormente. Finalmente, se analizó el sobrenadante de los cultivos celulares obtenido por centrifugación a 13000 rpm por 15 minutos. Este fue revisado usando el electrodo de grafito vítreo luego de ser suspendido en PBS 0,1X.

3.3.3 Condiciones de cultivo por lote en reactor H con pH controlado

Se empleó un reactor tipo H con doble cámara como sistema bio-electroquímico (Figura 3-2). La descripción esquemática del sistema de celdas usando en la electrofermentación en este estudio se presenta en el Anexo [D](#). El volumen de cada cámara fue de 300 mL; las cámaras estaban físicamente separadas por una membrana de intercambio catiónico Nafion 117. El cátodo y el ánodo eran un electrodo de fieltro de grafito (6 cm²). La solución anódica era tampón PBS 1x y el compartimento del cátodo se llenó con medio esterilizado por separado (300 ml).

El electrodo de referencia fue Ag/AgCl, NaCl 1 M; estaba sumergido en el compartimento del cátodo. Para eliminar el oxígeno residual, cada compartimento se purgó por completo con gas nitrógeno filtrado utilizando un filtro de ventilación (tamaño de poro de 0,3 mm). La temperatura del reactor se mantuvo a 37 °C utilizando banda calefactora. Se fijó un voltaje constante de -0,34 V frente a Ag/AgCl al cátodo (electrodo de trabajo) utilizando un potenciostato (DY2311, marca Digilvy).



Figura 3-2: Arreglo experimental para cultivo en reactor H por lote.

Se inoculó la bacteria en el compartimento del cátodo. Para la fermentación de glicerol, se llenó el compartimento del cátodo con medio 1. La corriente se midió utilizando el potenciostato y se controló continuamente a 4 Hz mediante una computadora interconectada. Las fermentaciones en volumen de 300 mL en reactor H con control de pH

se realizaron, inicialmente inoculando con 3 mL (O.D. 1,0) provenientes de un cultivo en fase exponencial (10% v/v).

Posteriormente, se iniciaron las condiciones de fermentación a una temperatura de 37 °C y una velocidad de agitación de 50 rpm por 20 horas de fermentación. Se tomaron muestras cada 4 horas de 1 ml. Todas las fermentaciones fueron realizadas por duplicado. El sistema de control de pH, gas y temperatura pertenecen al sistema BIOSTAT® A. Cuando se realizaron cultivos con mediador o transportador de electrones se añadió una concentración de 0,1 mM al medio microbiano correspondiente.

4. Resultados y discusión

En el presente capítulo se presentan los resultados de investigación obtenidos, ordenados por objetivos específicos y se realiza la discusión de acuerdo con el estado del arte actual.

4.1 Establecimiento de un modelo metabólico

A continuación, se describe el proceso de validación del modelo metabólico y el análisis de los resultados de la aplicación del EMA sobre la red metabólica estimulada por electrones contra el estado del arte.

4.1.1 Validación de modelo metabólico

Se usó información experimental describiendo el crecimiento heterótrofo de *Clostridium butyricum*, con sustratos como glucosa y glicerol con un balance de carbono cercano al 100% usando diferentes tasas de dilución en quimiostato, para validar el comportamiento de la red metabólica [255,256]. Aquí se calculó el valor del coeficiente de determinación estadístico (R^2) para evaluar la bondad de ajuste del modelo. En la Figura [4-1](#) se presenta la comparación de las tasas de crecimiento obtenidas con el modelo contra los valores experimentales usados. Para glucosa el valor es de 0,69, para glicerol residual bajo es de 0,54 y para glicerol en exceso de 0,91. En este caso se considera que el modelo representa exitosamente la tendencia de los fenotipos de crecimiento en heterotrofia para *Clostridium butyricum*.

4.1.2 Cambios en flujos metabólicos y rendimiento de productos

Los cambios en los flujos de la red metabólica estimulada por electrones usando glicerol como sustrato se presentan en la Figura [4-2](#). El valor del flujo de electrones de ET1 es solo un 38 % más alto que el valor transferido con ET2. Aquí, la ruta de la glucólisis presenta

variaciones en los flujos debido a la bifurcación del flujo de glicerol entre la ruta oxidativa y la ruta reductora en la que se consume NADH y se produce 1,3-propanodiol. El mecanismo ET1 crea un aumento del 23 % en el flujo a través de la vía reductora en comparación con el valor de la red no estimulada con electrones. Además, presentó una ligera disminución del 3% con el mecanismo ET2.

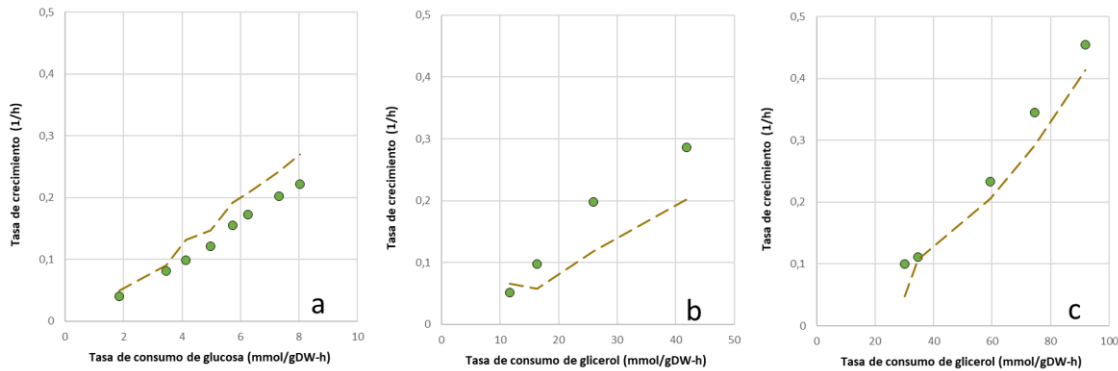


Figura 4-1: Validación del modelo metabólico central para *Clostridium butyricum*.

Tasas específicas de crecimiento simuladas mediante FBA comparadas con datos experimentales reportados en literatura [255,256]. Fuente de carbono: (a) glucosa, (b) glicerol residual bajo, (c) glicerol en exceso). Datos experimentales (puntos verdes), Tasas simuladas para *Clostridium butyricum* (línea punteada)

Este cambio en los flujos de la vía reductora provoca alteraciones en su contraparte oxidativa. Específicamente, hace que los flujos de glucólisis sean más bajos cuando ET1 se activa a sus valores en la red metabólica estándar y más altos cuando se introducen electrones a través de ET2. Este comportamiento se extiende a través de la red metabólica desde el glicerol hasta el fosfoenolpiruvato. Los valores de flujo obtenidos con la introducción de ET1 y ET2 tienen un valor superior al valor base (133% y 33%, respectivamente) en el paso de dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído a glucosa-6-fosfato. Este comportamiento es compartido por la red de pentosas fosfato y la producción de biomasa con porcentajes de incremento similares para ET1 y ET2.

Los resultados de flujo después de fosfoenolpiruvato muestran un valor de detrimento con ambos mecanismos de transferencia ET1 y ET2. Específicamente para la vía del lactato, formiato, acetato, butirato y etanol. En cuanto a la relación de ácidos producidos (ácido butírico/ácido acético), el valor base con la red inalterada es 0,88/1; con la activación de

ET1, el valor desciende a 0,34/1, y con la activación de ET2, disminuye sólo ligeramente a 0,78/1. En este caso, el flujo de ácido acético excede consistentemente el flujo de ácido butírico

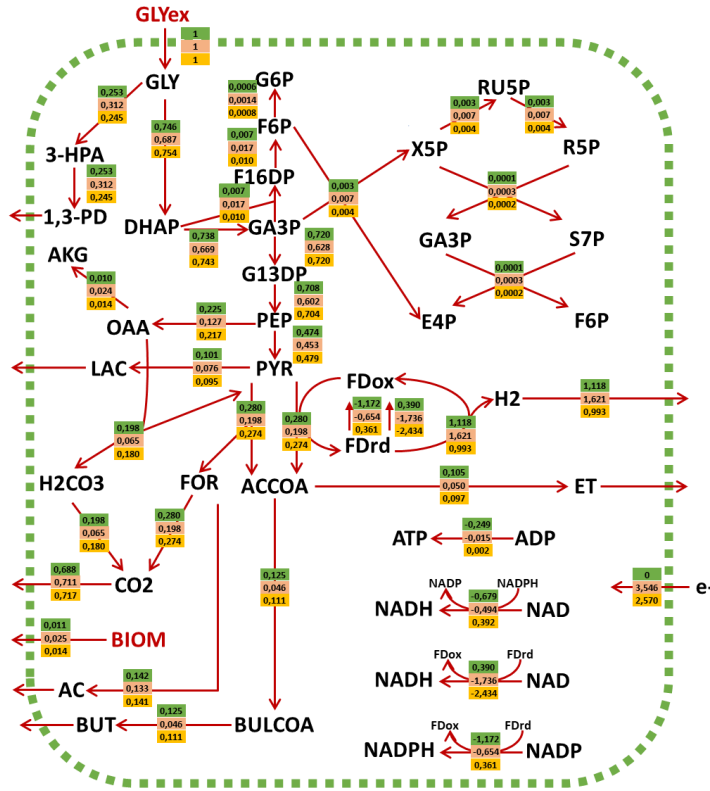


Figura 4-2: Cambio de flujos metabólicos por CEF.

Los valores de los flujos se determinaron en mmol/gramo de peso seco de células - hora. Los flujos con signos negativos indican que la reacción avanza en una dirección opuesta a la flecha que se muestra. El código de color es: Verde- No E; Rojo - ET1; Amarillo - ET2. No ET: Sin transferencia de electrones, ET1: Suministro de electrones catódicos acoplado a la producción de ATP, ET2: Solo el suministro de electrones catódicos incrementando solo producción de NADH.

Las rutas de 1,3-propanodiol y el hidrógeno son las que tienen un mayor potencial para aumentar su rendimiento debido a los incrementos de flujo obtenidos en la simulación de la red metabólica. Estas dos rutas muestran un aumento en el flujo metabólico del 23% para el 1,3-propanodiol y del 45% para el hidrógeno utilizando el mecanismo ET1. Con la activación del mecanismo ET2, el valor de ambos flujos metabólicos obtenido es ligeramente inferior al valor obtenido con la red metabólica base. Estas dos rutas metabólicas están conectadas con las reacciones de equilibrio de oxidación-reducción de

la red celular. En este balance, el impacto más significativo es donde los electrones ingresan al sistema celular. Para este escenario, la ferredoxina-NADH oxidoreductasa tiene un flujo positivo en la dirección de aumento de NADH para el caso base. El valor del flujo cambia de dirección con la activación de ET1, obteniendo un valor negativo y 4,4 veces mayor que el obtenido con la red metabólica base. La participación de ET2 mantiene el comportamiento de ferredoxina-NADH oxidoreductasa obtenido con ET1, provocando una inversión de la dirección del flujo, pero esta vez es 6,24 veces mayor que el valor base.

Por su parte, la ferredoxina-NADPH oxidoreductasa tiene un comportamiento diferente. El valor del flujo es negativo sin electrones exógenos en la red, lo que indica que el flujo se dirige hacia una producción de ferredoxina reducida y NADP+. La activación de ET1 en la red base mantiene la dirección del flujo, pero disminuye su valor al 56% del original. El mecanismo ET2 invierte este flujo y hace que se dirija hacia la producción de ferredoxina oxidada y NADPH. En este escenario, el valor de flujo es solo el 31% del original. Estos cambios en el equilibrio de oxidación-reducción provocados por la activación de ET1 producen un aumento neto en la ferredoxina y el NADH reducidos que se evacúan a través de las vías del hidrógeno y del 1,3-propanodiol. Sin embargo, la activación de ET2 provoca el efecto contrario. Los flujos de estos dos productos disminuyeron un 11 % para el hidrógeno y un 3 % para el 1,3-propanodiol. El flujo de ATP sintasa se dirige hacia la producción de ADP con un valor negativo en el caso base con sustrato glicerol. La dirección del flujo se mantiene, pero su valor disminuye al 6% del valor base al activar el mecanismo ET1 en la red. Con ET2 involucrado en la dinámica de la red metabólica, la ATP sintasa invierte su dirección hacia la producción de ATP y su valor permanece bajo, siendo menos del 1% del flujo de la red metabólica inalterada. Los resultados de la simulación muestran una alteración de los flujos de 1,3-propanodiol e hidrógeno para equilibrar el exceso de NADH generado por los electrones introducidos en la red metabólica.

En cuanto a los cambios en los rendimientos de productos metabólicos a partir de glicerol en el caso base el mayor rendimiento de producto fue para 1,3-propanodiol (Figura 4-3), seguido de CO₂, butirato, ácido láctico, acetato y etanol. Hay cambios en el valor de los rendimientos de los productos obtenidos, aplicando los diferentes mecanismos de transferencia de electrones. El mecanismo ET1 con el sustrato de glicerol (Fig. 4) en la red aumentó los rendimientos de 1,3-propanodiol (23%) y CO₂ (3%). Los rendimientos de

producto que disminuyeron fueron acetato (-6%), butirato (-63%), etanol (-52%) y láctico (-24%).

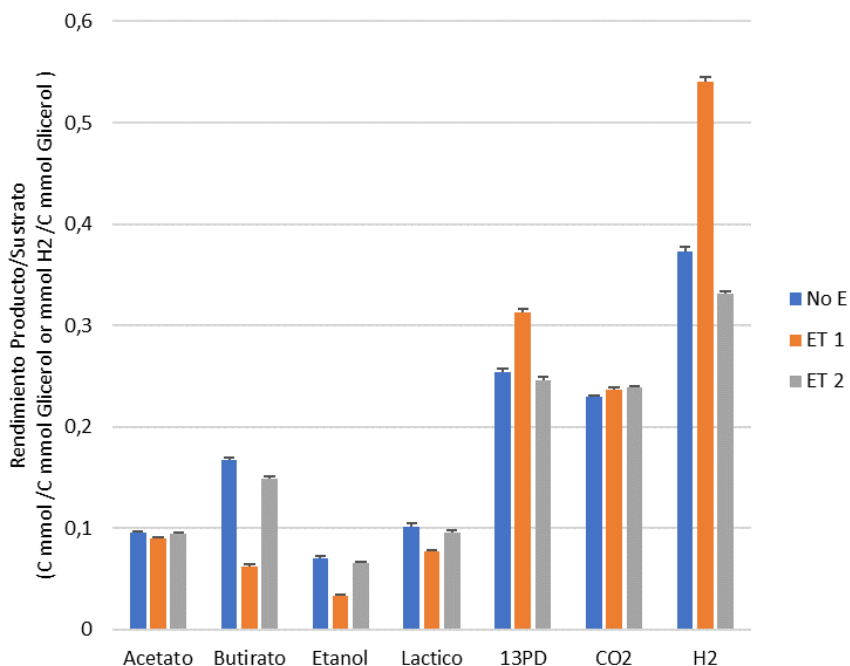


Figura 4-3: Yp/s con diferentes mecanismos de transferencia de electrones.

No E: Sin transferencia de electrones, ET 1: Suministro de electrones catódicos acoplado a la producción de ATP, ET 2: Solo el suministro de electrones catódicos con incremento de NADH.

El mecanismo ET2 también afectó la red metabólica, pero de una manera diferente al mecanismo ET1 (Figura 4-3). ET2 provocó un aumento del rendimiento medio de CO₂ del (4 %) y una disminución de los valores de acetato (-1 %), butirato (-11 %), etanol (-8 %), lactato (-6%) y 1,3-propanodiol (-3%). Los resultados obtenidos para hidrógeno (Fig. 4) mostraron un aumento en el rendimiento con ET1 (45%) y ET2 muestra una disminución del 11%. Del resultado anterior se confirma que solo dos metabolitos presentan un potencial incremento en el rendimiento del producto cuando la red metabólica es alterada por la adición de electrones de una fuente externa como un cátodo. El 1,3-propanodiol aumenta cuando el mecanismo ET1 está activo con glicerol como sustrato (Figura 4-3) y también con hidrógeno.

En la Tabla 4-1 se muestran la cantidad de modos de flujo elementales (EM) y los rendimientos de producto obtenidos para 1,3-propanodiol e hidrógeno en la fermentación de glicerol aplicando diferentes mecanismos de transferencia de electrones con y sin producción de biomasa. En esta tabla se muestran los valores máximos y medios de los rendimientos globales del producto / sustrato.

Tabla 4-1: Número de EM con rendimientos para 1,3-PD e hidrógeno

Producto			1,3-PD			H2	
Mecanismo de Transferencia de Electrones		No E	ET1 ^a	ET2 ^b	No E	ET1	ET2
Parámetro	Unidades						
Número total de Modos	Adimensional	6571	8206	9797	6571	8206	9797
Número total de Modos con producción de biomasa	Adimensional	2211	3702	3690	3639	5037	5559
Media Yp/s ^c	cmol/cmol ^d ; mmol/cmol ^e	0,254	0,312	0,246	0,373	0,541	0,331
Media Yp/s con producción de biomasa	cmol/cmol; mmol/cmol	0,573	0,608	0,565	0,555	0,764	0,511
Máximo Yp/s	cmol/cmol; mmol/cmol	1,000	1,000	1,000	1,333	1,750	1,222
Máximo Yp/s con producción de biomasa	cmol/cmol; mmol/cmol	0,912	0,845	0,880	1,167	1,257	1,062

^a. ET1: Suministro de electrones catódicos acoplado a la producción de ATP y NADH.

^b. ET2: Suministro de electrones catódicos acoplado a la producción de NADH.

^c. Yp/s: Rendimiento producto / sustrato.

^d. cmol/cmol: cmol 1,3-propanodiol / cmol Glicerol.

^e. mmol/cmol: mmol Hidrógeno / cmol Glicerol.

Al suministrar los electrones desde la red metabólica se observa un aumento en el número de modos elementales (Tabla 4-1). Al alimentar con glicerol, el número de modos elementales sin suministro de electrones fue de 6.571. Incluyendo el suministro de electrones acoplado a la generación de ATP (ET1), el número de modos aumentó un 24,9% (8.206 modos), y con ET2, el número de modos aumentó un 49,1% (9.797 modos).

Para el 1,3-propanodiol, cuando la red no es alterada por electrones, el porcentaje de modos elementales con producción de biomasa es del 33% del total de modos obtenidos. Este valor aumenta al 45% si se activa la entrada de electrones a la red metabólica con la producción acoplada de ATP (ET1), y con ET2 el valor solo aumenta levemente al 38%.

Se observa que el valor máximo de rendimiento del producto obtenido de todos los modos elementales no cambia cuando se activan las perturbaciones electrónicas. Mientras tanto, con el máximo rendimiento de producto emparejado con la producción de biomasa hay una reducción del 7% con ET1 y del 3,5% con ET2. Para los valores medios del valor de rendimiento del producto obtenidos de todos los modos elementales, ET1 produce un incremento del 22 % y ET2, en cambio, produce una disminución del 3 %. Por otro lado, los valores medios de rendimiento de producto con producción de biomasa muestran un incremento del 7% con la activación de ET1 y una disminución del 1% con ET2.

Para el hidrógeno, el porcentaje de modos elementales con el rendimiento de producto y biomasa aumenta desde el valor del caso base (55 %) al 61 % con ET1 y al 56 % con ET2. También hay un aumento con la activación de ET1 sobre el valor máximo de rendimiento (31 %), pero la activación de ET2 produce una disminución del 8 %. Este comportamiento es similar al rendimiento máximo con producción de biomasa. ET1 tiene un aumento del 7% y con ET2 una reducción del 9%. El valor medio de producción de hidrógeno también muestra un aumento con ET1 del 45 % y con ET2 una disminución del 11 %. El valor de rendimiento medio con la producción de biomasa también aumenta con ET1 un 37% y con ET2 muestra una disminución del 7%.

Los anteriores resultados sugieren que, con glicerol como sustrato, se podrían aumentar los rendimientos de 1,3-propanodiol e hidrógeno. Estos aumentos están relacionados con el mecanismo de entrega de electrones ET1 con el que también aumenta el contenido de ATP en la célula. Por el contrario, al probar el mecanismo ET2, hay un detrimento en los rendimientos de producto de ambos metabolitos (hidrógeno y 1,3-propanodiol). Estos efectos se observan en el rendimiento promedio global, y también se observa en proporciones similares en el rendimiento promedio cuando hay producción de biomasa. No se aprecian efectos de aumento del rendimiento del producto -sustrato cuando se evalúan únicamente los valores máximos en cada uno de los casos analizados. Por lo tanto, se puede proponer que, con un suministro externo de electrones, la expresión de la red metabólica se ve afectada globalmente.

Estos resultados son similares a los obtenidos con *C pasteurianum* en electrofermentación catódica experimental de glicerol. Aquí, un porcentaje de los intermedios reducidos generados durante el proceso se direcciona hacia una mayor producción de 1,3-

propanodiol, reduciendo la cantidad de butanol producido [24]. Un estudio metabólico de *C. pasteurianum* en electrofermentación de glicerol determinó que esta cepa tiene un aumento de 3 a 5 veces en la relación intracelular NADH / NAD⁺. El exceso de equivalentes reducidos genera la activación de vías como la del butanol y la del 1,3-propanodiol. En esta investigación se presenta una disminución en la producción de hidrógeno cuando la cepa se somete a electrofermentación debido a los equivalentes reducidos que se dirigen a la ruta del 1,3-propanodiol [260]. Otra investigación realizada con la electrofermentación de *K. pneumoniae* en glicerol mostró que los electrones recibidos afectaron algunos flujos de vías que consumen NADH intracelularmente. En este caso, los equivalentes reducidos (NADH) impulsaron la producción de etanol, lactato y 1,3-PD [259].

La simulación realizada muestra que el suministro de electrones catódicos en la red metabólica de *Clostridium butyricum* puede modificar los valores de los flujos internos y el equilibrio redox [202], modificando los rendimientos de producto / sustrato de todos los metabolitos y promoviendo la producción de sustancias reducidas, como hidrógeno y 1,3-propanodiol. También se observa que los incrementos en los rendimientos promedio obtenidos con la simulación de *Clostridium butyricum* son del mismo orden que otras simulaciones desarrolladas previamente para otros microorganismos de interés en condiciones similares de electrofermentación catódica [37,202,203,205]. Esta comparación permite destacar que la electrofermentación catódica de *Clostridium butyricum* tiene potencial para incrementar la producción de 1,3-propanodiol e hidrógeno a partir de glicerol, como proceso de producción alternativo a la fermentación tradicional.

4.1.3 Modulación de la fermentación por suministro de electrones

Se ha propuesto que la aplicación de la electrofermentación catódica en la red metabólica, puede establecer la base para controlar los flujos a través de algunas reacciones, particularmente aquellas que oxidan el NADH y alivian las limitaciones redox [202]. En este contexto, el análisis de modos elementales (EMA) es una herramienta poderosa que simplifica el complejo metabolismo microbiano en un conjunto de modos elementales únicos e indivisibles [215]. Esta distribución de todos los flujos metabólicos posibles representa una visión holística del impacto del cambio ambiental sobre el metabolismo analizado [203].

Se aplicó esta característica de visión holística de EMA para analizar el efecto de la electrofermentación catódica en la dispersión de los rendimientos del producto de sustrato obtenido al activar diferentes mecanismos de transferencia de electrones en el metabolismo celular. En la Tabla [4-1](#) se presentan los valores totales de modos elementales obtenidos para hidrógeno y 1,3-propanodiol. En cada uno de estos modos se obtiene un valor de rendimiento para H₂ y 1,3-PD con o sin producción de biomasa y pueden ser organizados en función de su valor numérico. Así se obtienen las dispersiones mostradas en las Figuras [4-4](#) (1,3-PD) y [4-5](#) (H₂).

Estas figuras representan la distribución del número de modos de flujo elemental para el rendimiento producto / sustrato con producción de biomasa en la fermentación anaeróbica de glicerol utilizando diferentes mecanismos de transferencia de electrones. Las figuras tienen una gráfica para el caso base sin estimulación eléctrica (No E), una para cuando se activa el mecanismo (ET1) y una tercera para el mecanismo (ET2).

En la Figura [4-4](#) se muestra que la respuesta de distribución de la red metabólica en el caso base, tiene una distribución unimodal sesgada a la izquierda con un máximo en el rango de rendimiento de 0,75 a 0,8. La distribución en el caso b se vuelve bimodal, utilizando ET1, con dos máximos acentuados en los rangos 0.3 a 0.35 y 0.75 a 0.8. La distribución cambia radicalmente, activando ET2, siendo ahora multimodal con tres máximos en los rangos 0,2 a 0,25, 0,35 a 0,4 y 0,75 a 0,8. Se destaca de la Figura [4-4](#) que el par de mecanismos de suministro de electrones (ET1 y ET2) promueven un mayor aumento en el número de modos elementales en el rango superior de rendimiento del producto (0.75 a 0.85). Adicionalmente, hay un aumento de tres veces en el número de modos elementales en rangos cercanos (0,85 a 0,9 para ET1 y 0,9 a 0,95 para ET2). Sin embargo, los modos elementales en el rango de 0,95 - 1 en la red metabólica original, se pierden cuando se activan los mecanismos de transferencia de electrones ET1 y ET2.

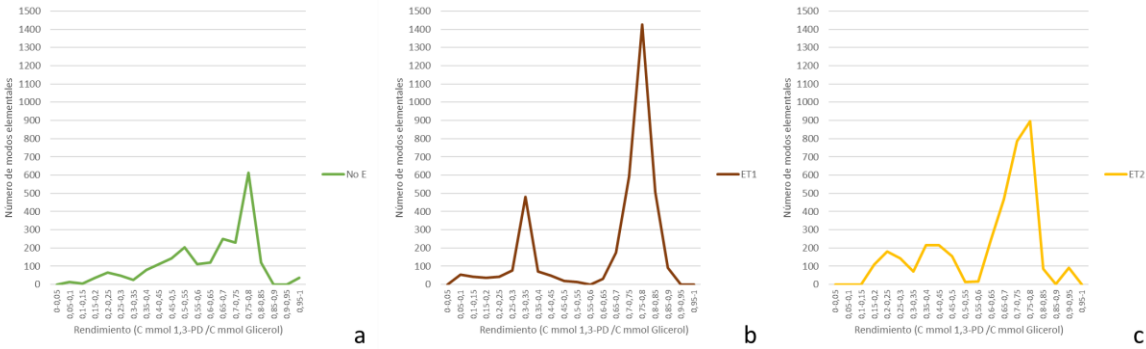


Figura 4-4: Distribución del número de EM para el rendimiento de 1,3-PD.

a: No E: Sin transferencia de electrones, b: ET 1: Suministro de electrones catódicos acoplado a la producción de ATP, c: ET 2: Solo el suministro de electrones catódicos aumenta la producción de NADH

Por su parte en la Figura 4-5 se presenta la distribución de rendimiento para la producción de hidrógeno a partir de glicerol. La dispersión de la red en estado base es multimodal simétrica con cuatro picos ligeramente pronunciados (0,21 a 0,28; 0,35 a 0,42; 0,63 a 0,7; 0,91 a 0,98). Cuando se activa ET1 ocurre un aumento localizado en el número de modos elementales. ET1 provoca una dispersión bimodal, sesgada a la derecha con el máximo principal en el rango de 0,91 a 0,98 y el otro en 1,26 a 1,33. La participación de ET2 en la red microbiana también desarrolla una dispersión bimodal más simétrica con un máximo de 0,56 a 0,63 y un valor superior de 0,77 a 0,84.

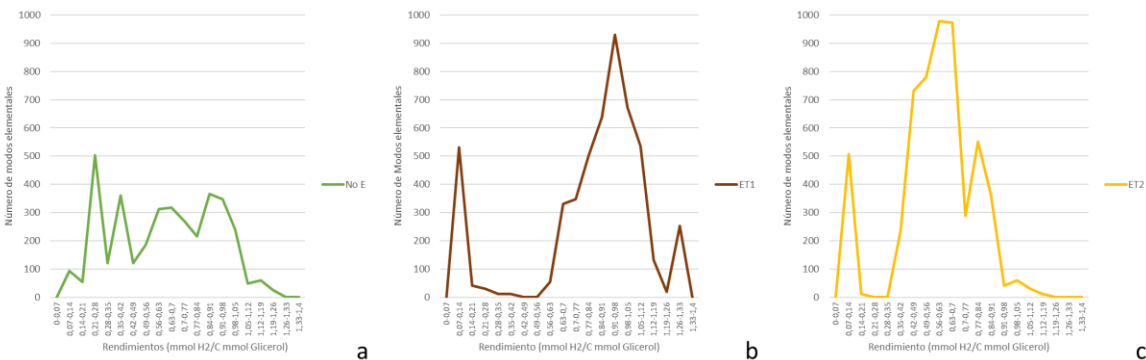


Figura 4-5: Distribución del número de EM para el rendimiento de H₂.

a: No E: Sin transferencia de electrones, b: ET 1: Suministro de electrones catódicos acoplado a la producción de ATP, c: ET 2: Solo el suministro de electrones catódicos aumenta la producción de NADH

Este resultado muestra cómo, a través de la activación de los diferentes mecanismos de transferencia de electrones (ET1 y ET2), cambia la distribución del número de modos. La red metabólica no alterada por electrones, en el caso del 1,3-PD y del H₂, presenta una distribución uniforme del número de modos elementales en el rango de rendimiento del producto (0 – 1 cmol/cmol). La red estimulada por electrones tiende a eliminar la distribución uniforme y fomenta valores de rendimiento específicos aumentando el número de modos elementales en rangos específicos y disminuyendo el número en otros rangos. En el caso de la 1,3-PD, se presenta un mayor aumento de valores con el mecanismo ET1 que con el mecanismo ET2 (Figura 4-4). El hidrógeno con glicerol como sustrato presenta una situación similar entre la estimulación con ET1 y ET2 (Figura 4-5).

En otras palabras, cuando se modifica el tipo de mecanismo de transferencia de electrones, se están obteniendo diferentes perfiles en la expresión de la red metabólica, promoviendo rangos de valores de rendimiento específicos. Este resultado indica que, a través del suministro de electrones, la expresión de la red puede ser modulada. Estos resultados coinciden con el resultado experimental de modulación de la red metabólica presentado por Choi, quien demostró que al variar la cantidad de corriente consumida era posible variar las concentraciones de butanol y 1,3-propanodiol, produciendo un aumento en la producción de 1,3 - PD y al mismo tiempo una disminución en la producción de butanol [24].

4.2 Selección de una cepa nativa

Aquí se describen y discuten los resultados del proceso de selección de una cepa nativa con capacidad de crecer en presencia de un transportador de electrones usando como fuente de carbono glicerol crudo.

4.2.1 Cultivos en vial con glicerol crudo

El parámetro de evaluación escogido para la selección de la cepa nativa más promisoría en la producción de 1,3-propanodiol (1,3 - PD) fue la concentración de producto (g 1,3-PD / L). En la Tabla 4-2 se pueden observar los resultados de todas las cepas nativas y la cepa patrón, a las 72 horas de crecimiento en vial sin control de pH con glicerol USP.

Tabla 4-2: Fermentaciones en vial con glicerol USP

Origen	Cepa	Concentración 1,3-PD (g/L)
Patrón	DSM 5431	3,7944
Nativa	IBUN 158B	2,1168
Nativa	IBUN 140B	1,9512
Nativa	IBUN 62B	1,7568
Nativa	IBUN 62F	1,512
Nativa	IBUN 137K	1,5048
Nativa	IBUN 125C	1,368
Nativa	IBUN 13A	1,2528
Nativa	IBUN 22A	1,2024
Nativa	IBUN 64A	1,0872
Nativa	IBUN 18Q	1,0224
Nativa	IBUN 18A	0,9576
Nativa	IBUN 18S	0,8064
Nativa	IBUN 95B	0,792

Al analizar la concentración de 1,3-PD a las 72 horas con glicerol USP se observa que las mejores dos cepas nativas son IBUN 158B e IBUN 140B con concentraciones de 2.11 y 1.95 g/L, respectivamente siendo superadas sólo por la cepa patrón DSM 5431 [261] con un valor de 3.79 g/L. Al usar glicerol crudo, Tabla 4-3, proveniente de una industria productora de biodiesel, en general todas las cepas nativas y la cepa patrón tuvieron un reordenamiento de las concentraciones obtenidas. Las cepas que presentaron mayor rendimiento fueron IBUN 125C e IBUN 18Q con concentraciones de 2.37 y 2,09 g/L, respectivamente. La cepa patrón quedó en doceavo lugar con un valor de 1 g/L.

Tabla 4-3: Fermentaciones en vial con glicerol crudo

Origen	Cepa	Concentración 1,3-PD (g/L)
Nativa	IBUN 125C	2,376
Nativa	IBUN 18Q	2,0952
Nativa	IBUN 22A	1,9512
Nativa	IBUN 62B	1,8072
Nativa	IBUN 95B	1,7856
Nativa	IBUN 140B	1,692
Nativa	IBUN 62F	1,5552
Nativa	IBUN 13A	1,4976
Nativa	IBUN 18S	1,4328
Nativa	IBUN 158B	1,3176
Nativa	IBUN 137K	1,3104
Patrón	DSM 5431	1,0008
Nativa	IBUN 18A	0,936
Nativa	IBUN 64A	0,8856

Es claro que los componentes del glicerol crudo afectan la producción de 1,3-propanodiol en las cepas nativas y la cepa patrón. Este efecto ha sido observado por otros investigadores como inhibición debido a metanol residual o ácidos grasos [120,128]. Teniendo en cuenta los resultados anteriormente presentados se decidió trabajar con dos cepas (IBUN 158B y IBUN 125C) para analizar los factores de fermentación en presencia de un transportador de electrones.

4.2.2 Cultivos en vial con transportador Rojo Neutral

Las cepas nativas IBUN 158B y IBUN 125C fueron sometidas diferentes concentraciones del transportador de electrones Rojo Neutral (0,0; 0,1; 0,2 y 0,5 mM) para determinar el porcentaje de inhibición en el crecimiento de los microorganismos en un cultivo por lote sin pH controlado.

Tabla 4-4: Porcentaje de inhibición por adición de Rojo Neutral.

	IBUN 125 C	IBUN 158B
Concentración de Rojo Neutral (mM)	Porcentaje de Inhibición (%)	Porcentaje de Inhibición (%)
0,0	0,00	0,00
0,1	14,41	24,99
0,2	14,48	28,49
0,5	24,83	88,16

Los resultados indicaron que la concentración máxima para no presentar inhibición de las cepas nativas es inferior a 0,1 mM. Por otro lado, el nivel de 0,5 mM presentó un nivel importante de inhibición en las cepas nativas especialmente en la cepa IBUN 158 nivel en el cual la inhibición llegó al 88%.

4.2.3 Efecto de Rojo Neutral en rendimiento de 1,3-propanodiol

Después se analizaron los efectos de la presencia del Rojo Neutral sobre las cepas nativas consumiendo glicerol en fermentación sin pH controlado. Los resultados de estos experimentos se muestran la Figura [4-6](#)

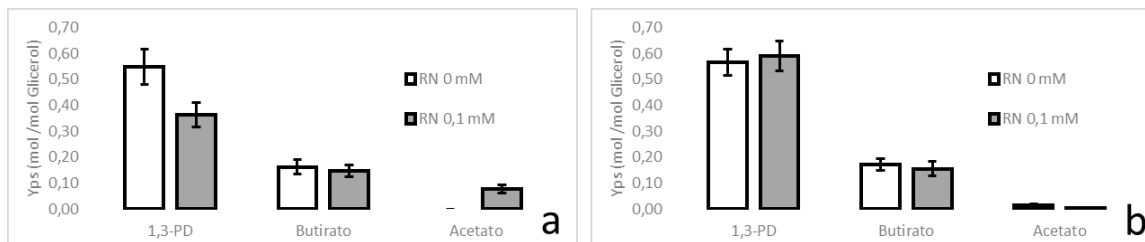


Figura 4-6: Efecto del Rojo Neutral sobre el rendimiento producto / sustrato

a. Cepa IBUN 125C; b. Cepa IBUN 158B. Yp/s: Rendimiento producto / sustrato (mol 1,3-PD/mol Glicerol)

Los datos obtenidos mostraron que la adición de Rojo Neutral tiene efecto sobre el rendimiento producto / sustrato de las cepas nativas. Para la cepa 125C, el principal producto, 1,3-propanodiol, disminuyó su rendimiento en un 33%. El rendimiento de butirato también disminuyó en un 10% y el ácido acético que no se había detectado en el medio sin presencia de Rojo Neutral se incrementó hasta alcanzar un valor de 0.08 mol de acetato / mol de glicerol. Los cambios en la cepa 158B son diferentes a los presentados por la cepa 125C. En primer lugar, el 1,3-PD tuvo un incremento en el rendimiento del 4%. Por su parte el butirato tuvo una disminución similar a la cepa 125C (9%). Para el acetato, en ambos casos si hubo producción, pero fue el metabolito menos producido y en vez de aumentar, como en 125C, disminuyó hasta un valor de 0.004 mol de acetato / mol de glicerol.

Los anteriores resultados muestran en primer lugar que el grupo de 13 cepas nativas tiene un gran potencial para la producción de metabolitos de interés comercial como es el 1,3-propanodiol ya que todas lo producen en mayor o menor cantidad y dependiendo la pureza del glicerol pueden producirlo en concentraciones diferentes, lo cual corresponde con la mayor producción de otros metabolitos como H₂ junto con CO₂ y ácidos acético y butírico. Así se reafirma que las especies de *Clostridium*, especialmente *C. butyricum*, son buenas candidatas para la producción fermentativa de hidrógeno y solventes con un alto rendimiento y uso de amplia gama de sustratos. Lo anterior es apoyado por amplios estudios que lo demuestran [262].

Por otra parte, al analizar el efecto de inhibición del Rojo Neutral sobre el crecimiento de las cepas nativas se observa que el uso de mediadores de electrones para mejorar la fermentación de glicerol tiene limitantes. Así, para las cepas analizadas la concentración de 0,1 mM es una concentración máxima con el fin de evitar un efecto deletéreo en la tasa

de crecimiento de los microorganismos. Este valor o inferiores están de acuerdo con otros estudios en los que se han usado mediadores de electrones para analizar el flujo de electrones en cepas del género *Clostridium* [29,30,263].

También se evaluó el efecto del Rojo Neutral sobre el rendimiento producto / sustrato de los tres principales productos solubles: 1,3-PD, acetato y butirato. En la cepa 158B el comportamiento de la cepa al adicionar el Rojo Neutral concuerda con el comportamiento de otras cepas del género *Clostridium* en los cuales al adicionar el Rojo Neutral produce principalmente alcoholes y butirato y bajos niveles de hidrógeno [264–266]. Ha sido propuesto que este fenómeno ocurre debido a que la abundante ferredoxina/NAD(P)⁺ reductasa se une al abundante Rojo Neutral (NR), lo que conduce a una mayor generación de NADPH interfiriendo con la actividad de la ferredoxina y la hidrogenasa haciendo que la biosíntesis de hidrógeno disminuya [263,267].

Por otra parte, el comportamiento observado en la cepa 125C, no concuerda por el efecto observado en la cepa 158B. En este caso hubo una disminución del rendimiento de todos los productos solubles: 1,3-PD, acetato y butirato. El efecto deletéreo general parece estar relacionado con un efecto inhibitorio general. Esto concuerda con algunas observaciones realizadas en condiciones extremas de fermentación, en donde una fermentación controlada a pH 5,5 y 5,8 con adición de colorante redox (Rojo Neutral), no tuvo efecto positivo sobre la producción de disolvente (butanol) [268]. Por su parte en otra investigación para aumentar aún el rendimiento de butanol, se añadió una pequeña cantidad de transportador de electrones, Rojo Neutral, cuando la tasa de producción de butanol alcanzó el nivel máximo. Sin embargo, la adición de Rojo Neutral mejoró la producción de NADH, pero el rendimiento de butanol no tuvo cambios [269]. Esto sugiere que no en todas las situaciones experimentales la adición de Rojo Neutral mejora la producción de los metabolitos más reducidos a expensas de la producción de H₂ como se observa en los resultados de la cepa 125C.

4.3 Estandarización electrofermentación con cepa patrón

Aquí se presentan todos los resultados de los experimentos realizados para estandarizar el proceso de electrofermentación con una cepa patrón y su comparación de desempeño con una cepa nativa.

4.3.1 Detección de actividad bioelectroquímica

De acuerdo a los resultados del tamizaje de cepas nativas se eligió continuar trabajando con la cepa nativa IBUN 158B y con la cepa patrón *Clostridium pasteurianum*, ya que es ampliamente demostrada su capacidad para trabajar en sistemas de electrofermentación catódica de glicerol [20,24,183,216].

De acuerdo al procedimiento establecido por Choi y asociados [24] se evaluaron los cultivos electroquímicos de la cepa patrón *C. pasteurianum* y la cepa nativa. Se inició con la prueba de electroactividad con el cultivo suspendido de ambas cepas utilizando un electrodo de carbón vítreo por voltametría cíclica (CV). Los cultivos suspendidos de ambas cepas no mostraron picos redox bien definidos frente al electrodo Ag/AgCl (Anexo B). Un comportamiento similar fue observado para para *C. tyrobutyricum* y *C. acetobutylicum* que, en cultivo suspendido, generaron picos redox débiles y amplios [24].

A continuación, se realizó el cultivo de las dos cepas de *Clostridium* (patrón y nativa) con potencial impuesto en celda de vidrio de borosilicato. Potencial con un valor de -0,25 V vs Ag/AgCl aplicado sobre el cátodo de fieltro de grafito. Ambos cultivos mostraron consumo de corriente y al realizar la CV, los cultivos presentaron un pico de reducción y oxidación. Para *C. pasteurianum* el pico de reducción se observó en -0,34 V vs. Ag/AgCl y pico de oxidación en -0,38 V vs. Ag/AgCl (Figura 4-7)

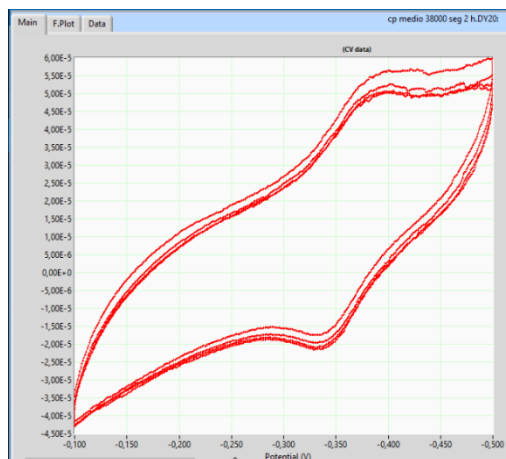


Figura 4-7: CV de *C. pasteurianum* en electrodo de fieltro de grafito.

Electrolito usado PBS 1X. Velocidad de escaneo 0.005 V/s. Eje horizontal: Potencial (Voltios). Eje vertical Corriente (Amperios).

La cepa IBUN 158B mostró picos similares a los presentados por la cepa patrón. El pico de reducción se observó en -0,34 V vs. Ag/AgCl y pico de oxidación en -0,37 V vs. Ag/AgCl (Figura [4-8](#))



Figura 4-8: CV de IBUN 158B en electrodo de fieltro de grafito.

Electrolito usado PBS 1X. Velocidad de escaneo 0.005 V/s. Eje horizontal: Potencial (Voltios). Eje vertical Corriente (Amperios).

Un pico de reducción similar ha sido reportado para *Clostridium butyricum* EG3. La cepa se reconoce como electroquímicamente activa. La voltamperometría cíclica de EG3 mostró un pico de reducción a -300 mV vs. Ag/AgCl y se propone que la actividad electroquímica detectada en el aislado EG3 se debe a los citocromos de la superficie celular. Finalmente,

se afirma que la suspensión celular del aislado EG3 mostró una reacción de oxidación-reducción cuasi-reversible en la voltamperometría cíclica (CV) con un pico más pronunciado para la reducción que para la oxidación [270]. Por su parte con *Clostridium phytofermentans*, se observó un pico de reducción irreversible usando CV que comenzaba en la fase de crecimiento logarítmica media. Este pico se asoció con *C. phytofermentans* y no con el medio gastado y fue indicativo de una disminución en las fuentes de carbono y energía para las células. En particular, la naturaleza de un pico de reducción sin su pico de oxidación concomitante indica la captación de electrones y, en este caso, la utilización por parte de las células de *Clostridium* y especialmente asociada con rutas NADH/NAD⁺ [271].

También afirman que una de las principales enzimas responsables de la transferencia de protones y electrones es la deshidrogenasa. La separación de protones y electrones del sustrato de crecimiento suele producir hidrógeno en condiciones anaeróbicas. Para que ocurra esta reacción, se deben reducir dos protones. Típicamente, esto ocurre con los electrones donados por la ferredoxina, un cofactor, y la enzima hidrogenasa. De este modo, es probable que el pico de reducción observado esté asociado con este proceso. Así, una posibilidad para el pico es el del par NAD⁺/NADH que tiene un potencial de $-0,32 \pm 0,03$ V vs. Ag/AgCl [272]. En resumen, según el comportamiento de los CV para la cepa patrón y la cepa nativa se tiene un par de oxidorreducción cuasi-reversible que está asociado con las rutas de reducción de NAD⁺. Este resultado coincide con lo expresado para *Clostridium pasteurianum* en CEF de glicerol, donde la forma del pico de reducción ($-0,16$ vs. Ag/AgCl) fue diferente de la del pico de oxidación ($0,125$ vs. Ag/AgCl), lo que indica que la reacción redox de *C. pasteurianum* DSM 525 es casi reversible y que esta asimetría similar entre el pico de reducción y el pico de oxidación corresponde a microorganismos electroactivos productores de corriente [24].

4.3.2 Electrofermentación catódica en reactor H

Habiendo definido el potencial a aplicar a la electrofermentación en el punto anterior, gracias a la definición del pico reductor ($-0,34$ V vs. Ag/AgCl) se procedió a realizar las electrofermentaciones catódicas con pH controlado para observar su efecto sobre el rendimiento producto - sustrato para el 1,3-propanodiol a partir de glicerol y los ácidos

acético y butírico. Las concentraciones finales de cada uno de los metabolitos analizados (Glicerol consumido, ácido acético, ácido butírico y 1,3-propanodiol) se encuentran en el Anexo C.

Primero se realizó la EF con la cepa patrón *C. pasteurianum* utilizando glicerol USP y glicerol crudo como se observa en la Figura 4-9

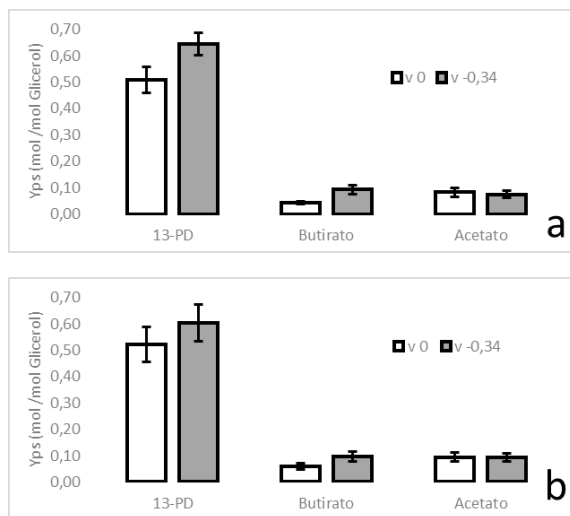


Figura 4-9: Rendimientos en EF de *C. pasteurianum* con Glicerol USP y crudo.

a. Glicerol USP; b. Glicerol crudo; Yp/s: Rendimiento producto / sustrato (mol producto/mol Glicerol); V0: Fermentación sin aplicación de voltaje; V-0,34: EF con voltaje de -0,34 V vs Ag/AgCl

De forma general, la cepa patrón presentó mayores rendimientos con glicerol USP que con glicerol industrial para el 1,3-propanodiol, posiblemente por los componentes del glicerol crudo [89,121,226,273]. Respecto a la imposición de voltaje en la fermentación en ambos casos existe un aumento del rendimiento de 1,3-propanodiol cuando se compara con el proceso de fermentación tradicional (26% para glicerol USP y 15% para glicerol industrial). Los ácidos presentan un comportamiento similar en ambos casos. El ácido butírico incrementó el rendimiento a aproximadamente el doble tanto con glicerol USP como industrial cuando se impuso voltaje a la fermentación. Por su lado el ácido acético disminuyó su rendimiento tanto con glicerol crudo (10%) como con USP (1.5%) cuando se impone el voltaje de -0,34 V vs Ag/AgCl.

En la Figura 4-10 se observa el comportamiento de la cepa nativa IBUN 158B. Los ácidos en este caso tuvieron comportamientos diferentes a la cepa patrón. El ácido butírico disminuyó en el momento de realizar la EF catódica, un 37% para glicerol USP y 23% para glicerol crudo. El acético en ambos casos aumentó su rendimiento por el mismo orden alrededor de 57% cuando se cultivó el microorganismo con voltaje impuesto. El rendimiento del 1,3-propanodiol se incrementó en ambos casos con glicerol USP y crudo al imponer el voltaje, pero el valor de incremento es mucho menor que el obtenido con la cepa patrón. Aquí, solo obtenemos incremento entre 7 y 8% para el 1,3-PD.

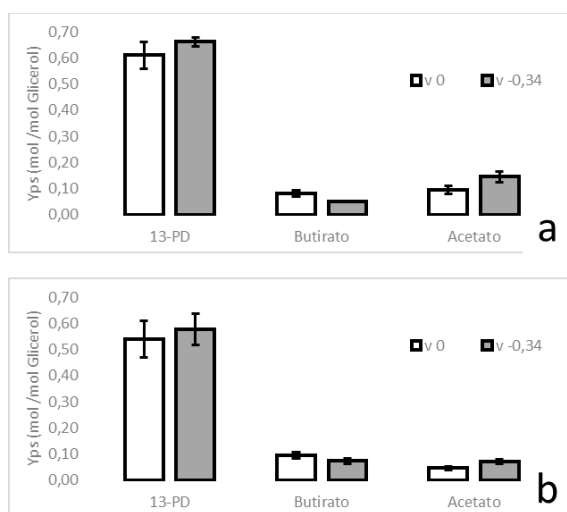


Figura 4-10: Rendimientos en EF de IBUN 158B con Glicerol USP y crudo.

a. Glicerol USP; b. Glicerol crudo; Yp/s: Rendimiento producto / sustrato (mol producto/mol Glicerol); V0: Fermentación sin aplicación de voltaje; V-0,34: EF con voltaje de -0,34 V vs Ag/AgCl

Por último, se evaluó el efecto de adicionar al medio de cultivo con glicerol industrial, 0,1 mM de Rojo Neutral (NR) y realizar la EF con un voltaje de -0,4V vs Ag/AgCl (Figura 4-11), ya que el valor de potencial del cátodo coincide con el potencial redox del NR [29]. El 1,3-propanodiol presenta un incremento del 8% al imponerse el voltaje en presencia de NR. Para el butirato se duplicó el rendimiento, mientras que el acetato se mantuvo prácticamente constante con un ligero incremento del 1.5% al activar el voltaje impuesto. Es de resaltar, que respecto al glicerol industrial sin NR (Figura 4-10), los rendimientos de 1,3-PD son más altos cuando se adiciona el mediador Rojo Neutral.

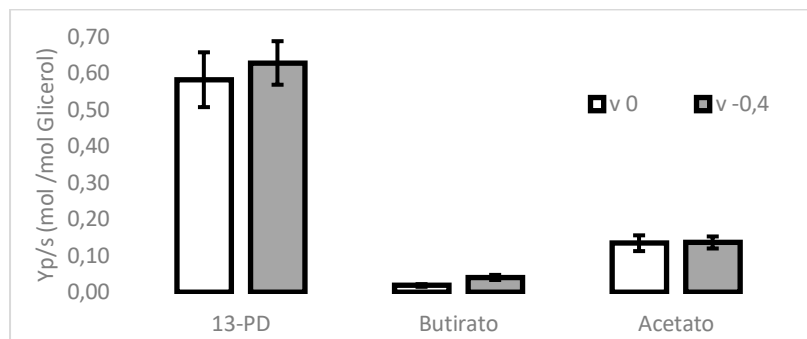


Figura 4-11: Rendimientos en EF de IBUN 158B con Glicerol crudo y Rojo Neutral
 Yp/s: Rendimiento producto / sustrato (mol producto/mol Glicerol); V0: Fermentación sin aplicación de voltaje; V-0,4: EF con voltaje de -0,4 V vs Ag/AgCl

Los resultados obtenidos para el 1,3-PD indican que la electrofermentación puede incrementar el rendimiento de este solvente entre 15% y 26% para la cepa patrón con glicerol crudo y USP. Al comparar estos resultados con los valores de incremento de rendimiento reportados por otras cepas en el estado de la técnica, se observa que la cepa patrón está dentro de los rangos publicados en la literatura. Por ejemplo, se utilizó una biopelícula de población mixta que crecía en el cátodo para mejorar la producción de 1,3-PD del 24,8 % (sin corriente) al 50,1 % (con un biocátodo polarizado a -0,9 V) [159]. Por otra parte, en comparación con la fermentación tradicional, la electrofermentación dominada por *Clostridiaceae* aumentó la tasa de producción de 1,3-PD hasta 6 veces, y la alta concentración hasta 42 g/L en modo discontinuo alimentado [176]. Por su parte *C. pasteurianum* DSM 525 usó simultáneamente tanto el cátodo como el sustrato (glucosa y glicerol) como donantes de electrones para mejorar los metabolitos reductores (butanol y 1, 3-PD) a través de transferencia directa de electrones. Aquí, *C. pasteurianum* presenta un incremento de butanol a partir de glucosa (20 % de cambio) y 1,3-PD a partir de glicerol (21 % de cambio).[24]. También con la misma cepa patrón se probó el uso de dos transportadores Rojo Neutral (Neutral Red - NR) y mediador redox Azul Brillante (Brilliant Blue -BB). En un sistema BES estos transportadores incrementaron los rendimientos producto / sustrato, hasta un 33% para butanol en fermentaciones con NR y un 21% para 1,3-PD en fermentaciones con BB en comparación con los controles respectivos producto [20]. Estos ejemplos incluyendo, el presente trabajo demuestra que una pequeña captación de corriente puede provocar cambios significativos en el flujo metabólico con un aumento

concomitante en la producción de 1,3-PD con la cepa *Clostridium pasteurianum*. Esto sugiere que tanto un aumento en la producción de 1,3-PD como la regulación de la vía metabólica celular son viables mediante el control impulsado por electrodos en la electrofermentación catódica. [184]

Por otro lado, la cepa nativa IBUN 158B presentó un menor incremento con la aplicación de la electrofermentación entre el 7% y 8%, usando glicerol crudo y el mediador de electrones como el Rojo Neutral. Siendo así, se considera que la cepa nativa, tiene todavía un rango de mejora del proceso ya que el cálculo teórico del modelo metabólico central, realizado en este trabajo indica que el incremento del rendimiento puede llegar hasta el 23%. Entre las alternativas que es necesario explorar para incrementar el valor del rendimiento producto / sustrato para 1,3-PD con la cepa nativa: el uso de otros transportadores de electrones como por ejemplo el Brilliant Blue (BB) [20] que no sean tóxicos para el crecimiento celular, de color fácil de eliminar, de bajo costo y con estabilidad a largo plazo [274,275], el desarrollo de un nuevo sistema de reacción que disminuya el espacio entre los electrodos [25], la modificación genética de la cepa nativa eliminando rutas competidoras en consumo de NADH como la vía del lactato [183], estudiar las interacciones de los componentes de glicerol crudo con el mediador de electrones o el uso de cultivos mixtos para maximizar la producción de metabolitos de interés comercial como el H₂ además del 1,3-PD [30,176]. En conclusión, la producción de 1,3-PD por electrofermentación a partir de glicerol crudo con una cepa nativa es viable, pero necesita mayor desarrollo tecnológico para que sea una realidad escalable.

4.4 Viabilidad de electrofermentación para 1,3-PD

Desde un punto de vista técnico, los resultados obtenidos muestran que el proceso de electrofermentación permite un incremento en el rendimiento producto – sustrato respecto a la fermentación tradicional. No obstante, la implantación de esta nascente tecnología en su estado actual requiere de una inversión importante en infraestructura técnica, sistemas de control, electrodos, transportadores de electrones y membranas de intercambio, lo cual impacta los costos de capital y operación del proceso. Así, diferentes análisis técnico-económicos han indicado que actualmente la tecnología de electrofermentación, bajo las condiciones técnicas en las que se estudia a escala laboratorio, no es viable [185,195] y

requiere mayor investigación en diferentes aspectos para hacer la tecnología competitiva en el mercado.

Por su parte, la comercialización de 1,3-PD por Metabolic Explorer, Francia, ha demostrado la viabilidad comercial de explotar la plataforma de glicerol crudo para la producción por vía biotecnológica [143]. Sin embargo, la reciente utilización de residuos con alto contenido de grasas y aceites como materias primas para la producción de biodiesel ha provocado una disminución en la calidad del glicerol industrial obtenido, debido al incremento de cenizas y materia orgánica que no es glicerol [43]. Esta variación de la pureza del glicerol crudo afecta la rentabilidad de los procesos biotecnológicos existentes, haciendo necesario el desarrollo de soluciones de purificación avanzadas (membranas de intercambio) que mejoren los pretratamientos fisicoquímicos establecidos [43] y seguramente incrementaran los costos de capital y proceso.

También es necesario realizar los análisis del ciclo de vida de los equipos, materiales y sustancias adicionales para descifrar los vacíos en el proceso electrofermentativo de 1,3-PD que desfavorecen su sostenibilidad ambiental y así evaluar holísticamente sus beneficios [143]. Recientemente, el desempeño ambiental de la producción de 1,3-PD con la tecnología tradicional de fermentación, indicó generación de bajas emisiones de gases de efecto invernadero. Por lo tanto, el autor recomienda este escenario como posiblemente factible para una biorrefinería, pues presenta beneficios económicos y ambientales [147]. Por otra parte, se analizó el ciclo de vida de un sistema bioelectroquímico de fermentación. Aquí se encontró que la purificación del producto (ácido acético), la membrana de intercambio y los componentes del medio del reactor son puntos críticos ambientales significativos en términos de emisiones de gases de efecto invernadero y uso de energía no renovable. También se resaltó que el uso de electrodos con grafeno funcionalizado mejoran la productividad. Sin embargo, esta modificación eleva los costos de energía y materiales, haciendo el proceso ambientalmente desfavorable. Por lo tanto, recomienda que nuevos cátodos más eficientes que se están desarrollando para sistemas bioelectroquímicos se evalúen por su desempeño ambiental, antes de que puedan clasificarse como adecuados para estudios a escala piloto [189].

De acuerdo con lo anterior, el proceso estudiado de electrofermentación para la producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerina cruda, necesita mayor investigación básica y

afinamiento antes de ser escalado. Es el momento adecuado para implementar la economía circular con biorrefinerías para aprovechar la plataforma de glicerol, fomentando los conceptos de multi-producto, sostenibilidad, minimización de residuos y creación de cadenas de valor. Igualmente, para este proceso bioelectroquímico es necesario profundizar investigación sobre varios puntos clave para que sea competitivamente viable para comercialización. Entre ellos se encuentran, desarrollo de pretratamientos de materia prima de bajo costo y ambientalmente amigables, creación de electrodos de bajo costo altamente conductores de electrones y fomentadores de formación de biopelícula, diseño de nuevos biorreactores que integren procesos de intercambio para minimizar costos de operación, mejoramiento del biocatalizador para incrementar la concentración final y la transferencia de electrones y finalmente procesos de purificación con menor gasto energético e impacto ambiental.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Los azúcares y el glicerol pueden servir como sustratos de bajo costo en aplicaciones biotecnológicas para obtener varios intermediarios químicos con un alto valor agregado. La electrofermentación es una reciente tecnología con la que es posible mejorar y controlar la fermentación microbiana, especialmente con cepas del género *Clostridium*, aumentando la especificidad de las vías metabólicas. En este contexto, cepas bacterianas aisladas de suelos colombianos, y estrechamente relacionadas con *Clostridium butyricum*, se han identificado como eficientes productoras de solventes y ácidos, incluidos ácido acético, ácido butírico, etanol, butanol, acetona e hidrógeno a partir de glucosa o 1,3-propanodiol a partir de glicerol. En este trabajo se propuso hacer una primera exploración para el grupo de investigación y evaluar el efecto del suministro externo de electrones en la producción de metabolitos de interés comercial en la red metabólica de una cepa nativa de *Clostridium sp.*

En primer lugar, podemos concluir que herramientas de simulación como el Elemental Flux Analysis (EMA) permite capturar la plasticidad de la red metabólica y su capacidad de adaptación a cambios ambientales, modulando su respuesta. Esta herramienta permitió simular los incrementos teóricos que podrían alcanzar el rendimiento de productos reducidos de alto valor agregado como el 1,3-propanodiol (23%) e hidrógeno (45%) al alimentar la red metabólica con electrones provenientes de un cátodo.

Por su parte, la parte experimental confirmó que las 13 cepas nativas aisladas de suelos colombianos tienen la capacidad de asimilar glicerol crudo para la producción de 1,3-propanodiol, ácido acético, ácido butírico e hidrógeno, con diferentes perfiles de asimilación, permitiendo abrir la puerta al desarrollo de procesos de fermentación de

cocultivo que maximicen el uso de diferentes cepas con perfiles de producción diferentes pero complementarios.

También se exploró el uso del transportador de electrones Rojo Neutral, detectando el nivel máximo para no inhibir el crecimiento de las cepas nativas y permitiendo el cambio de flujos metabólicos por su interacción con la cadena transportadora de electrones interna.

Igualmente se estableció que la cepa patrón de *Clostridium pasteurianum*, es un modelo biológico eficiente para la implementación de procesos de electrofermentación y permite obtener cambios interesantes los rendimientos (15 a 25%) de productos reducidos como el 1,3-propanodiol minimizando otros metabolitos solubles como ácidos de cadena corta.

Por último, se estableció que la cepa nativa IBUN 158B es electroactiva y tiene la capacidad de incrementar los valores de rendimiento producto / sustrato de 1,3-PD (7 – 8%) cuando es sometida a la alimentación de pequeñas cantidades de electrones desde un cátodo en un proceso de CEF y que el uso de transportadores de electrones como el Rojo Neutral incrementa los efectos de la electrofermentación alcanzando mayores valores de rendimiento cuando está presente en el medio de cultivo.

5.2 Recomendaciones

Las anteriores conclusiones se pueden reunir en la afirmación de que la producción de 1,3-PD por electrofermentación a partir de glicerol crudo con una cepa nativa es viable, pero necesita mayor desarrollo tecnológico para que sea una realidad escalable y comercializable. Así, existen áreas que es necesario explorar y profundizar si el grupo de investigación desea seguir explorando esta nueva área del conocimiento. En primer lugar es necesario profundizar en el conocimiento de la red metabólica de las cepas nativas y desarrollando modelos de todas las cepas en escala metabólica y simulando de forma dinámica procesos de electrofermentación, llevando esa información al laboratorio contrastando los resultados y retroalimentando los modelos con técnicas ómicas, sometiéndolos a procesos de optimización buscando formas racionales de modificación o para el desarrollo de cultivos mixtos resistentes a los cambios de la dinámica de cultivo. Otra línea recomendada, es el diseño de nuevos tipos de reactores que maximicen la

integración de las propiedades electroquímicas y biológicas para maximizar transferencia de electrones sin inhibir la tasa de crecimiento de los microorganismos. Finalmente, es importante también explorar el uso de herramientas electroquímicas para la identificación y aislamiento de nuevos microorganismos o consorcios con una elevada actividad bioelectroquímica que permitan una más rápida adaptación a las condiciones estresantes de un ambiente catódico en un reactor para EF.

La electrofermentación es un área de estudio muy interesante y prometedora pero requiere un trabajo interdisciplinario entre las ciencias básicas y aplicadas de la biología, genética, materiales y electroquímica para ofrecer resultados a corto plazo y que permitan cerrar las brechas de investigación para mejorar aún más la tecnología para la síntesis química verde, la gestión sostenible de desechos y la bioeconomía circular [276] y tengan un real impacto para mitigar el apremiante fenómeno de cambio climático.

Bibliografía

1. Veas CA, Neuendorf CS, Pflügl S (2020) Towards continuous industrial bioprocessing with solventogenic and acetogenic clostridia: challenges, progress and perspectives, Springer International Publishing.
2. Dahiya S, Katakojwala R, Ramakrishna S, et al. (2020) Biobased Products and Life Cycle Assessment in the Context of Circular Economy and Sustainability. *Mater Circ Econ* 2: 1–28.
3. Baritugo KA, Kim HT, David Y, et al. (2018) Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fermentative production of chemicals in biorefinery. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 3915–3937.
4. Kumar B, Verma P (2020) Biomass-based biorefineries: An important archetype towards a circular economy. *Fuel* 119622.
5. Santos SCSC, Liebensteiner MGMT, van Gelder AHAH, et al. (2018) Bacterial glycerol oxidation coupled to sulfate reduction at neutral and acidic pH. *J Gen Appl Microbiol* 64: 1–8.
6. Cheng H-H, Whang L-M, Lin C-A, et al. (2013) Metabolic flux network analysis of fermentative hydrogen production: using *Clostridium tyrobutyricum* as an example. *Bioresour Technol* 141: 233–239.
7. Drozdzyńska A, Leja K, Czaczyk K, et al. (2011) Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *Biotechnologia* 92: 92–100.
8. Soares JF, Confortin TC, Toderio I, et al. (2020) Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: technological challenges and future prospects. *Renew Sustain Energy Rev* 117: 109484.
9. Liberato V, Benevenuti C, Coelho F, et al. (2019) *Clostridium* sp. As bio-catalyst for fuels and chemicals production in a biorefinery context. *Catalysts* 9.
10. Park J-H, Kim D-H, Baik J-H, et al. (2021) Improvement in H₂ production from *Clostridium butyricum* by co-culture with *Sporolactobacillus vineae*. *Fuel* 285:

- 119051.
11. Cai G, Jin B, Monis P, et al. (2013) A genetic and metabolic approach to redirection of biochemical pathways of *Clostridium butyricum* for enhancing hydrogen production. *Biotechnol Bioeng* 110: 338–342.
 12. Vivek N, Pandey A, Binod P (2017) Production and applications of 1, 3-propanediol, *Current developments in biotechnology and bioengineering*, Elsevier, 719–738.
 13. Xu BB, Ma C (2019) Advances in the production of 1, 3-propanediol by microbial fermentation. *AIP Conf Proc* 2110: 10–15.
 14. Wang X-L, Zhou J-J, Shen J-T, et al. (2020) Sequential fed-batch fermentation of 1, 3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* DL07. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 1–13.
 15. Zhou JJJ-J, Shen J-TT, Wang X-LXL, et al. (2020) Metabolism, morphology and transcriptome analysis of oscillatory behavior of *Clostridium butyricum* during long-term continuous fermentation for 1, 3-propanediol production. *Biotechnol Biofuels* 13: 1–18.
 16. Su M-YMY, Li Y, Ge XZX-Z, et al. (2014) Insights into 3-hydroxypropionic acid biosynthesis revealed by overexpressing native glycerol dehydrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Biotechnol Equip* 28: 762–768.
 17. Zhang Y, Huang Z, Du C, et al. (2009) Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metab Eng* 11: 101–106.
 18. Lakshmanan M, Chung BKS, Liu C, et al. (2013) Cofactor modification analysis: A computational framework to identify cofactor specificity engineering targets for strain improvement. *J Bioinform Comput Biol* 11: 1343006.
 19. Abbad-Andaloussi S, Amine J, Gerard P, et al. (1998) Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *J Appl Microbiol* 84: 515–522.
 20. Utesch T, Sabra W, Prescher C, et al. (2019) Enhanced electron transfer of different mediators for strictly opposite shifting of metabolism in *Clostridium pasteurianum* grown on glycerol in a new electrochemical bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 116: 1627–1643.
 21. Toledo-Alarcón J, Fuentes L, Etchebehere C, et al. (2020) Glucose electro-fermentation with mixed cultures: A key role of the Clostridiaceae family. *Int J Hydrogen Energy*.

22. Zhou J, Wang X, Sun Y, et al. (2016) Progress on microbial electrosynthesis of bio-based chemicals. *Huagong Jinzhan/Chemical Ind Eng Prog* 35: 3005–3015.
23. Moscoviz R, Desmond-Le Quéméner E, Trably E, et al. (2019) Bioelectrochemical Systems for the Valorization of Organic Residues, *Biorefinery*, Springer, 511–534.
24. Choi O, Kim T, Woo HM, et al. (2014) Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*. *Sci Rep* 4: 6961.
25. Utesch T, Zeng A (2018) A novel All-in-One electrolysis electrode and bioreactor enable better study of electrochemical effects and electricity-aided bioprocesses. *Eng Life Sci* 18: 600–610.
26. Utesch T, Sabra W, Zeng AP (2016) Growth of *Clostridium pasteurianum* in bio-electrochemical H-cell reactor.
27. Kim TS, Kim BH (1988) Electron flow shift in *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically introduced reducing equivalent. *Biotechnol Lett* 10: 123–128.
28. Engel M, Holtmann D, Ulber R, et al. (2019) Increased Biobutanol Production by Mediator-Less Electro-Fermentation. *Biotechnol J* 14.
29. Choi O, Um Y, Sang BIB-IBI (2012) Butyrate production enhancement by *Clostridium tyrobutyricum* using electron mediators and a cathodic electron donor. *Biotechnol Bioeng* 109: 2494–2502.
30. Zhang Y, Li J, Meng J, et al. (2021) A neutral red mediated electro-fermentation system of *Clostridium beijerinckii* for effective co-production of butanol and hydrogen. *Bioresour Technol* 332: 125097.
31. He AY, Yin CY, Xu H, et al. (2016) Enhanced butanol production in a microbial electrolysis cell by *Clostridium beijerinckii* IB4. 39: 245–254.
32. Xafenias N, Kmezik C, Mapelli V (2017) Enhancement of anaerobic lysine production in *Corynebacterium glutamicum* electrofermentations. *Bioelectrochemistry* 117: 40–47.
33. Haas T, Krause R, Weber R, et al. (2018) Technical photosynthesis involving CO₂ electrolysis and fermentation. *Nat Catal* 2017 11 1: 32–39.
34. Jabeen G, Farooq R (2016) Bio-electrochemical synthesis of commodity chemicals by autotrophic acetogens utilizing CO₂ for environmental remediation. *J Biosci* 41: 367–380.
35. Bajracharya S, Ter Heijne A, Dominguez Benetton X, et al. (2015) Carbon dioxide

- reduction by mixed and pure cultures in microbial electrosynthesis using an assembly of graphite felt and stainless steel as a cathode. *Bioresour Technol* 195: 14–24.
36. Nevin KP, Hensley SA, Franks AE, et al. (2011) Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 77: 2882–2886.
 37. Koch C, Kuchenbuch A, Kracke F, et al. (2017) Predicting and experimental evaluating bio-electrochemical synthesis — A case study with *Clostridium kluyveri*. *Bioelectrochemistry* 118: 114–122.
 38. Van Eerten-Jansen MCAAAA, Ter Heijne A, Grootscholten TIMM, et al. (2013) Bioelectrochemical Production of Caproate and Caprylate from Acetate by Mixed Cultures. *ACS Sustain Chem Eng* 1: 1069–1069.
 39. Kluge M, Pérocheau Arnaud S, Robert T (2019) 1,3-Propanediol and its Application in Bio-Based Polyesters for Resin Applications. *Chem Africa* 2: 215–221.
 40. Cheng C, Bao T, Yang S-TS-T (2019) Engineering *Clostridium* for improved solvent production: recent progress and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 103: 5549–5566.
 41. Asopa RP, Ikram MM, Saharan VK (2022) Valorization of glycerol into 1,3-propanediol and organic acids using biocatalyst *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol Reports* 18.
 42. Kumar P, Mehariya S, Ray S, et al. (2014) Biodiesel Industry Waste: A Potential Source of Bioenergy and Biopolymers. *Indian J Microbiol* 2014 55: 1–7.
 43. Attarbachhi T, Kingsley MD, Spallina V (2023) New trends on crude glycerol purification: A review. *Fuel* 340: 127485.
 44. Bautista S, Espinoza A, Narvaez P, et al. (2019) A system dynamics approach for sustainability assessment of biodiesel production in Colombia. Baseline simulation. *J Clean Prod* 213: 1–20.
 45. de Souza TAZ, Pinto GM, Julio AAV, et al. (2022) Biodiesel in South American countries: A review on policies, stages of development and imminent competition with hydrotreated vegetable oil. *Renew Sustain Energy Rev* 153: 111755.
 46. Liu Y, Zhong B, Lawal A (2022) Recovery and utilization of crude glycerol, a biodiesel byproduct. *RSC Adv* 12: 27997–28008.
 47. Dikshit PK, Moholkar VS (2019) Batch and repeated-batch fermentation for 1, 3-dihydroxyacetone production from waste glycerol using free, immobilized and

- resting *Gluconobacter oxydans* cells. *Waste and Biomass Valorization* 10: 2455–2465.
48. Pott RWM, Howe CJ, Dennis JS (2014) The purification of crude glycerol derived from biodiesel manufacture and its use as a substrate by *Rhodospseudomonas palustris* to produce hydrogen. *Bioresour Technol* 152: 464–470.
 49. Lopes AP, Souza PR, Bonafé EG, et al. (2019) Purified glycerol is produced from the frying oil transesterification by combining a pre-purification strategy performed with condensed tannin polymer derivative followed by ionic exchange. *Fuel Process Technol* 187: 73–83.
 50. Thompson JC, He BB (2006) Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Appl Eng Agric* 22: 261–265.
 51. Elgharbawy AS, Sadik W, Sadek OM, et al. (2021) A review on biodiesel feedstocks and production technologies. *J Chil Chem Soc* 66: 5098–5109.
 52. Yildiz G, Ronsse F, Venderbosch R, et al. (2015) Effect of biomass ash in catalytic fast pyrolysis of pine wood. *Appl Catal B Environ* 168: 203–211.
 53. Di Fraia A, Miliotti E, Rizzo AM, et al. (2023) Coupling hydrothermal liquefaction and aqueous phase reforming for integrated production of biocrude and renewable H₂. *AIChE J* 69: e17652.
 54. Samul D, Leja K, Grajek W (2014) Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. *Ann Microbiol* 64: 891–898.
 55. Boga DA, Liu F, Bruijninx PCA, et al. (2016) Aqueous-phase reforming of crude glycerol: effect of impurities on hydrogen production. *Catal Sci & Technol* 6: 134–143.
 56. Viana MB, Freitas A V, Leitão RC, et al. (2012) Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environ Technol Rev* 1: 81–92.
 57. Pagliaro M (2017) C3-Monomers. *Glycerol Renew Platf Chem* 23–57.
 58. Asopa RP, Bhoi R, Saharan VK (2022) Valorization of glycerol into value-added products: A comprehensive review on biochemical route. *Bioresour Technol Reports* 20.
 59. Crosse AJ, Brady D, Zhou N, et al. (2019) Biodiesel's trash is a biorefineries' treasure: the use of "dirty" glycerol as an industrial fermentation substrate. *World J Microbiol Biotechnol* 2019 361 36: 1–5.
 60. Juturu V, Wu JC (2016) Microbial production of lactic acid: the latest development. *Crit Rev Biotechnol* 36: 967–977.

61. Garlapati VKVK, Shankar U, Budhiraja A (2016) Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnol Reports* 9: 9–14.
62. Kaur J, Sarma AK, Jha MK, et al. (2020) Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnol Reports* 27: e00487.
63. Liu H, Xu Y, Zheng Z, et al. (2010) 1,3-Propanediol and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnol J* 5: 1137–1148.
64. Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B, et al. (2000) High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J Biotechnol* 77: 191–208.
65. Fokum E, Zabed HM, Yun J, et al. (2021) Recent technological and strategical developments in the biomanufacturing of 1,3-propanediol from glycerol. *Int J Environ Sci Technol* 18: 2467–2490.
66. Sun YQ, Shen JT, Yan L, et al. (2018) Advances in bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: Prospects and challenges. *Process Biochem* 71: 134–146.
67. da Silva Ruy AD, de Brito Alves RM, Reis Hwer TL, et al. (2020) Catalysts for glycerol hydrogenolysis to 1,3-propanediol: A review of chemical routes and market. *Catal Today* 381: 243–253.
68. Cen X, Dong Y, Liu D, et al. (2023) Microbial Production of C2-C5 Diols1. *Handb Biorefinery Res Technol* 1–32.
69. Biebl H, Menzel K, Zeng A-PP, et al. (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 289–297.
70. Forsberg CW (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl Environ Microbiol* 53: 639–643.
71. Baeza-Jiménez R, Lopez-Martinez LX, de la Cruz-Medina J, et al. (2011) Effect of glucose on 1,3-propanediol production by *Lactobacillus reuteri* | Efecto de la glucosa sobre la producción de 1,3-propanodiol por *Lactobacillus reuteri*. *Rev Mex Ing Quim* 10: 39–46.
72. Celinska E, Celińska E, Celinska E, et al. (2012) *Klebsiella* spp as a 1, 3-propanediol producer: the metabolic engineering approach. *Crit Rev Biotechnol* 32: 274–288.
73. Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Kopsahelis N, et al. (2014) Biorefinery development through utilization of biodiesel industry by-products as sole fermentation feedstock for 1,3-propanediol production. *Bioresour Technol* 159:

- 167–175.
74. Dietz D, Zeng A-PAP (2014) Efficient production of 1,3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium. *Bioprocess Biosyst Eng* 37: 225–233.
 75. Ferreira TFTF, Saab VDSVDS, De Matos PMPMPM, et al. (2014) Evaluation of 1,3-propanediol production from glycerine by *Clostridium butyricum* ncimb 8082. *Chem Eng Trans* 38: 475–480.
 76. Hao J, Wang W, Tian J, et al. (2008) Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing *dhaT* gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 735–741.
 77. Jensen TOTØO, Kvist T, Mikkelsen MJMJ, et al. (2012) Production of 1,3-PDO and butanol by a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol. *AMB Express* 2: 1–7.
 78. Kivisto A, Santala V, Karp M (2012) 1,3-Propanediol production and tolerance of a halophilic fermentative bacterium, *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*. *J Biotechnol* 158: 242–247.
 79. Kubiak P, Leja K, Myszka K, et al. (2012) Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. *Process Biochem* 47: 1308–1319.
 80. Lee CS, Aroua MK, Daud WMAW, et al. (2015) A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. *Renew Sustain Energy Rev* 42: 235–244.
 81. Anand P, Saxena RK (2012) A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. *N Biotechnol* 29: 199–205.
 82. Szymanowska-Powałowska D, Orczyk D, Leja K, et al. (2014) Biotechnological potential of *Clostridium butyricum* bacteria. *Braz J Microbiol* 45: 892–901.
 83. Zhou S, Li L, Perseke M, et al. (2015) Isolation and characterization of a *Klebsiella pneumoniae* strain from mangrove sediment for efficient biosynthesis of 1,3-propanediol. *Sci Bull* 60: 511–521.
 84. Chen X, Zhang D-JJ, Qi W-TT, et al. (2003) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 143–146.
 85. Cheng K-KKK, Liu H-JHJ, Liu DHD-H (2005) Multiple growth inhibition of *Klebsiella*

- pneumoniae in 1,3-propanediol fermentation. *Biotechnol Lett* 27: 19–22.
86. Hartlep M, Hussmann W, Prayitno N, et al. (2002) Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glucose. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 60–66.
 87. Abbad-Andaloussi S, Manginot-Durr C, Amine J, et al. (1995) Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl Environ Microbiol* 61: 4413–4417.
 88. Biebl H (1991) Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 701–705.
 89. González-Pajuelo M, Andrade JCC, Vasconcelos I (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 442–446.
 90. Saint-Amans S, Girbal L, Andrade J, et al. (2001) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. *J Bacteriol* 183: 1748–1754.
 91. Gungormusler-Yilmaz M, Shamshurin D, Grigoryan M, et al. (2014) Reduced catabolic protein expression in *Clostridium butyricum* DSM 10702 correlate with reduced 1,3-propanediol synthesis at high glycerol loading. *AMB Express* 4: 1–14.
 92. Rampy MA, Chou TS, Pinchuk AN, et al. (1995) Synthesis and biological evaluation of radioiodinated phospholipid ether analogs. *Nucl Med Biol* 22: 505–512.
 93. Zhou M, Tu H, He Y, et al. (2020) Synthesis of an oligomeric thickener for supercritical carbon dioxide and its properties. *J Mol Liq* 312.
 94. Biebl H (2001) Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - Batch and continuous culture studies. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27: 18–26.
 95. O'Brien JR, Raynaud C, Croux C, et al. (2004) Insight into the Mechanism of the B12-Independent Glycerol Dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary Biochemical and Structural Characterization. *Biochemistry* 43: 4635–4645.
 96. Sun J, Van Den Heuvel J, Soucaille P, et al. (2003) Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnol Prog* 19: 263–272.
 97. Saxena RK, Anand P, Saran S, et al. (2009) Microbial production of 1,3-

- propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv* 27: 895–913.
98. Bizukoje M, Dietz D, Sun J, et al. (2010) Metabolic modelling of syntrophic-like growth of a 1,3-propanediol producer, *Clostridium butyricum*, and a methanogenic archaeon, *Methanosarcina mazei*, under anaerobic conditions. *Bioprocess Biosyst Eng* 33: 507–523.
 99. Cho S, Kim T, Woo HM, et al. (2015) High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnol Biofuels* 8: 146.
 100. Malaoui H, Marczak R (2001) Influence of glucose on glycerol metabolism by wild-type and mutant strains of *Clostridium butyricum* E5 grown in chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 226–233.
 101. Zeng A-PP, Biebl H, Schlieker H, et al. (1993) Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microb Technol* 15: 770–779.
 102. Zeng A-PP (1996) Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioprocess Eng* 14: 169–175.
 103. Yun J, Zayed HM, Zhang Y, et al. (2022) Improving tolerance and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* using physical mutagenesis, adaptive evolution and genome shuffling. *Bioresour Technol* 363.
 104. Schmitz R, Sabra W, Arbter P, et al. (2019) Improved electrocompetence and metabolic engineering of *Clostridium pasteurianum* reveals a new regulation pattern of glycerol fermentation. *Eng Life Sci* 19: 412–422.
 105. Barbirato F, Grivet JPJP, Soucaille P, et al. (1996) 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. *Appl Environ Microbiol* 62: 1448–1451.
 106. Vollenweider S, Lacroix C (2004) 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and perspectives of biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 16–27.
 107. Zheng Z-M, Wang T-P, Xu Y-Z, et al. (2011) Inhibitory mechanism of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol synthesis with *Klebsiella pneumoniae*. *African J Biotechnol* 10: 6794–6798.
 108. Colin T, Bories A, Moulin G (2000) Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 201–205.

109. Venkataramanan KPKP, Boatman JJJJ, Kurniawan Y, et al. (2012) Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 1325–1335.
110. Damasceno APK, Rossi DM, Ayub MAZ (2022) Biosynthesis of 1,3-propanodiol and 2,3-butanodiol from residual glycerol in continuous cell-immobilized *Klebsiella pneumoniae* bioreactors. *Biotechnol Prog* 38.
111. Luo H, Yang R, Zhao Y, et al. (2018) Recent advances and strategies in process and strain engineering for the production of butyric acid by microbial fermentation. *Bioresour Technol* 253: 343–354.
112. Isar J, Joshi H, Rangaswamy V (2019) 1,3-Propanediol: From Waste to Wardrobe, *High Value Fermentation Products*, Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc., 281–318.
113. Barbirato F, Himmi EHEH, Conte T, et al. (1998) 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind Crops Prod* 7: 281–289.
114. Himmi EHEH, Bories A, Barbirato F (1999) Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresour Technol* 67: 123–128.
115. Da Silva GPGP, De Lima CJB, Contiero J (2015) Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. *Catal Today* 257: 259–266.
116. Wilkens E, Ringel AKAKAK, Hortig D, et al. (2012) High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 1057–1063.
117. Loureiro-Pinto M, González-Benito G, Coca M, et al. (2016) Valorization of crude glycerol from the biodiesel industry to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 10702: Influence of pretreatment with ion exchange resins. *Can J Chem Eng* 94: 1242–1248.
118. Biebl H, Marten S, Hippe H, et al. (1992) Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 592–597.
119. Szymanowska-Powalowska D, Białas W, Szymanowska-Powalowska D, et al. (2014) Scale-up of anaerobic 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSP1 from crude glycerol. *BMC Microbiol* 14: 45.
120. Petitdemange E, Dürr C, Andaloussi SAA, et al. (1995) Fermentation of raw

- glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J Ind Microbiol* 15: 498–502.
121. Papanikolaou S, Fick M, Aggelis G (2004) The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol* 79: 1189–1196.
 122. Zhang AH, Zhuang XY, Chen KN, et al. (2019) Adaptive evolution of *Clostridium butyricum* and scale-Up for high-Concentration 1,3-propanediol production. *AIChE J* 65: 32–39.
 123. Hirschmann S, Baganz K, Koschik I, et al. (2005) Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters. *Landbauforsch Völkenrode* 55: 261–267.
 124. Tee ZKZK, Jahim JM, Tan JPJP, et al. (2017) Preeminent productivity of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* JKT37 and the role of using calcium carbonate as pH neutraliser in glycerol fermentation. *Bioresour Technol* 233: 296–304.
 125. Martins FFFF, Saab VSVSVS, Ribeiro CMSCMS, et al. (2016) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel derived glycerol. *Chem Eng Trans* 50: 289–294.
 126. Lan Y, Feng J, Guo X, et al. (2021) Isolation and characterization of a newly identified *Clostridium butyricum* strain SCUT343-4 for 1,3-propanediol production. *Bioprocess Biosyst Eng* 44: 2375–2385.
 127. Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, et al. (2011) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 101–112.
 128. Saint-Amans S, Perlot P, Goma G, et al. (1994) High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. *Biotechnol Lett* 16: 831–836.
 129. Cheng K-K, Ling H-Z, Zhang L-L, et al. (2004) Effect of glucose as cosubstrate on 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Guocheng Gongcheng Xuebao/The Chinese J Process Eng* 4: 561–566.
 130. Ji X-JXJ, Huang HH, Zhu J-GJG, et al. (2009) Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of *klebsiella pneumoniae*: The role of pH fluctuation. *Appl Biochem Biotechnol* 159: 605–613.

131. Reimann A, Biebl H (1996) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fedbatch culture: Feeding strategy for glycerol and ammonium. *Biotechnol Lett* 18: 827–832.
132. Kaur G, Srivastava AK, Chand S (2012) Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochem Eng J* 64: 106–118.
133. Metsoviti M, Paramithiotis S, Drosinos EHEHEH, et al. (2012) Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Eng Life Sci* 12: 57–68.
134. Zeng AP, Biebl H (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74: 239–259.
135. Jun S-ASA, Moon C, Kang C-HCH, et al. (2010) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol* 161: 491–501.
136. Chatzifragkou A, Aggelis G, Komaitis M, et al. (2011) Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation. *Bioresour Technol* 102: 10625–10632.
137. Menzel K, Zeng A-PP, Deckwer W-DD (1997) High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol* 20: 82–86.
138. Xiu Z-LZL, Song B-HBH, Wang Z-TZT, et al. (2004) Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in one- and two-stage anaerobic cultures. *Biochem Eng J* 19: 189–197.
139. Reimann A, Biebl H, Deckwer W-DD (1998) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 359–363.
140. Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G (1993) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 453–457.
141. Wang Y, Teng HH, Xiu Z (2011) Effect of aeration strategy on the metabolic flux of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol in continuous cultures at different glycerol concentrations. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 705–715.
142. Mu Y, Xiu Z-LZL, Zhang DJD-J (2008) A combined bioprocess of biodiesel

- production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem Eng J* 40: 537–541.
143. Agrawal D, Budakoti M, Kumar V (2023) Strategies and tools for the biotechnological valorization of glycerol to 1, 3-propanediol: Challenges, recent advancements and future outlook. *Biotechnol Adv* 108177.
 144. Nakamura CECE, Whited GMGM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14: 454–459.
 145. González-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, et al. (2005) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metab Eng* 7: 329–336.
 146. Martins FF, Liberato VDSS, Ribeiro CMS, et al. (2020) Low-cost medium for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum*. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 14: 1125–1134.
 147. van Heerden C (2023) Techno-economic analysis of 1, 3-propanediol, sorbitol, itaconic acid, and xylooligosaccharides production from sugarcane-based feedstocks.
 148. Espinel-Ríos S, Ruiz-Espinoza JEE (2019) Production of 1,3-propanediol from crude glycerol: Bioprocess design and profitability analysis | Producción de 1,3-propanodiol a partir de glicerol crudo: Diseño del bioproceso y análisis de rentabilidad. *Rev Mex Ing química* 18: 831–840.
 149. Enzmann F, Stöckl M, Zeng AP, et al. (2019) Same but different—Scale up and numbering up in electrobiotechnology and photobiotechnology. *Eng Life Sci* 19: 121–132.
 150. Scopus (2023) Elsevier, Scopus [Database]. Available at: <https://www.scopus.com>, 2023.
 151. Kim BH, Lim SS, Daud WRW, et al. (2015) The biocathode of microbial electrochemical systems and microbially-influenced corrosion. *Bioresour Technol* 190: 395–401.
 152. Kracke F, Vassilev I, Krömer JOJO, et al. (2015) Microbial electron transport and energy conservation - The foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Front Microbiol* 6: 1–18.
 153. Arbter P, Widderich N, Utesch T, et al. (2022) Control of redox potential in a novel continuous bioelectrochemical system led to remarkable metabolic and energetic responses of *Clostridium pasteurianum* grown on glycerol. *Microb Cell Fact* 21.

154. Bhagchandani DD, Babu RP, Sonawane JM, et al. (2020) A Comprehensive Understanding of Electro-Fermentation. *Fermentation* 6: 92.
155. Nevin KP, Woodard TL, Franks AE, et al. (2010) Microbial electrosynthesis: Feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *MBio* 1.
156. Chandrasekhar K, Naresh Kumar A, Kumar G, et al. (2021) Electro-fermentation for biofuels and biochemicals production: Current status and future directions. *Bioresour Technol* 323: 124598.
157. Rabaey K, Rozendal RA (2010) Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nat Rev Microbiol* 2010 8: 706–716.
158. Wang H, Ren ZJ (2013) A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol Adv* 31: 1796–1807.
159. Zhou M, Chen J, Freguia S, et al. (2013) Carbon and electron fluxes during the electricity driven 1,3-propanediol biosynthesis from glycerol. *Environ Sci Technol* 47: 1–16.
160. Tremblay P-L, Zhang T (2015) Electrifying microbes for the production of chemicals. *Front Microbiol* 6.
161. deCamposRodrigues T, Rosenbaum MA (2014) Microbial Electroreduction: Screening for New Cathodic Biocatalysts. *ChemElectroChem* 1: 1916–1922.
162. El-Naggar MY, Wanger G, Leung KM, et al. (2010) Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18127–18131.
163. Varcoe JR, Atanassov P, Dekel DR, et al. (2014) Anion-exchange membranes in electrochemical energy systems. *Energy Environ Sci* 7: 3135–3191.
164. Andersen SJ, Hennebel T, Gildemyn S, et al. (2014) Electrolytic membrane extraction enables production of fine chemicals from biorefinery sidestreams. *Environ Sci Technol* 48: 7135–7142.
165. Lovley DR (2017) Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer. *Annu Rev Microbiol* 71: 643–664.
166. Rosenbaum M, Aulenta F, Villano M, et al. (2011) Cathodes as electron donors for microbial metabolism: which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour Technol* 102: 324–333.
167. Strycharz SM, Woodard TL, Johnson JP, et al. (2008) Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter*

- lovleyi. *Appl Environ Microbiol* 74: 5943–5947.
168. Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, et al. (2008) Shewanella secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3968–3973.
169. Xia X, Cao XX, Liang P, et al. (2010) Electricity generation from glucose by a Klebsiella sp. in microbial fuel cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 383–390.
170. Pham TH, Boon N, Aelterman P, et al. (2008) Metabolites produced by Pseudomonas sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 1119–1129.
171. Thrash JC, Van Trump JI, Weber KA, et al. (2007) Electrochemical Stimulation of Microbial Perchlorate Reduction. *Environ Sci Technol* 41: 1740–1746.
172. Park DH, Laivenieks M, Guettler M V., et al. (1999) Microbial Utilization of Electrically Reduced Neutral Red as the Sole Electron Donor for Growth and Metabolite Production. *Appl Environ Microbiol* 65: 2912.
173. Li J, Zhang Y, Sun K, et al. (2022) Optimization of a cathodic electro-fermentation process for enhancing co-production of butanol and hydrogen via acetone-butanol-ethanol fermentation of Clostridium beijerinckii. *Energy Convers Manag* 251: 114987.
174. Zheng T, Li J, Ji Y, et al. (2020) Progress and Prospects of Bioelectrochemical Systems: Electron Transfer and Its Applications in the Microbial Metabolism. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 10.
175. Harrington TD, Tran VN, Mohamed A, et al. (2015) The mechanism of neutral red-mediated microbial electrosynthesis in Escherichia coli: menaquinone reduction. *Bioresour Technol* 192: 689–695.
176. Xafenias N, Anunobi MOSO, Mapelli V (2015) Electrochemical startup increases 1,3-propanediol titers in mixed-culture glycerol fermentations. *Process Biochem* 50: 1499–1508.
177. Selembo PA, Perez JM, Lloyd WA, et al. (2009) Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnol Bioeng* 104: 1098–1106.
178. Dennis PGP, Harnisch F, Yeoh YKYKYK, et al. (2013) Dynamics of cathode-associated microbial communities and metabolite profiles in a glycerol-fed bioelectrochemical system. *Appl Environ Microbiol* 79: 4008–4014.
179. Zhou M, Yang J, Wang H, et al. (2013) Microbial fuel cells and microbial electrolysis cells for the production of bioelectricity and biomaterials. *Environ*

- Technol (United Kingdom)* 34: 1915–1928.
180. Moscoviz R, Flayac C, Desmond-Le Quéméner E, et al. (2017) Revealing extracellular electron transfer mediated parasitism: energetic considerations. *Sci Rep* 7: 7766.
 181. Sadhukhan J, Lloyd JR, Scott K, et al. (2016) A critical review of integration analysis of microbial electrosynthesis (MES) systems with waste biorefineries for the production of biofuel and chemical from reuse of CO₂. *Renew Sustain Energy Rev* 56: 116–132.
 182. Kracke F, Virdis B, Bernhardt P V., et al. (2016) Redox dependent metabolic shift in *Clostridium autoethanogenum* by extracellular electron supply. *Biotechnol Biofuels* 9: 249.
 183. Zhang C, Traitongsat P, Zeng A-P (2023) Electrochemically mediated bioconversion and integrated purification greatly enhanced co-production of 1,3-propanediol and organic acids from glycerol in an industrial bioprocess. *Bioprocess Biosyst Eng* 2023 1–11.
 184. Kim C, Lee JHJJH, Baek J, et al. (2020) Small Current but Highly Productive Synthesis of 1,3-Propanediol from Glycerol by an Electrode-Driven Metabolic Shift in *Klebsiella pneumoniae* L17. *ChemSusChem* 13: 564–573.
 185. Jourdin L, Sousa J, van Stralen N, et al. (2020) Techno-economic assessment of microbial electrosynthesis from CO₂ and/or organics: An interdisciplinary roadmap towards future research and application. *Appl Energy* 279: 115775.
 186. Khosravanipour Mostafazadeh A, Drogui P, Brar SK, et al. (2017) Microbial electrosynthesis of solvents and alcoholic biofuels from nutrient waste: A review. *J Environ Chem Eng* 5: 940–954.
 187. Nagendranatha Reddy C, Mehariya S, Kavitha S, et al. (2020) Electro-Fermentation of biomass for high-value organic acids. *Biorefineries A Step Toward Renew Clean Energy* 417–436.
 188. Escapa A, Mateos R, Martinez EJ, et al. (2016) Microbial electrolysis cells: An emerging technology for wastewater treatment and energy recovery. From laboratory to pilot plant and beyond. *Renew Sustain Energy Rev* 55: 942–956.
 189. Gadkari S, Beigi BHM, Aryal N, et al. (2021) Microbial electrosynthesis: is it sustainable for bioproduction of acetic acid? *RSC Adv* 11: 9921–9932.
 190. Liu Z, Xue X, Cai W, et al. (2023) Recent progress on microbial electrosynthesis reactor designs and strategies to enhance the reactor performance. *Biochem Eng J*

- 190: 108745.
191. Al-Mamun A, Ahmed W, Jafary T, et al. (2023) Recent advances in microbial electrosynthesis system: Metabolic investigation and process optimization. *Biochem Eng J* 196: 108928.
192. Savla N, Pandit S, Verma JP, et al. (2021) Techno-economical evaluation and life cycle assessment of microbial electrochemical systems: A review. *Curr Res Green Sustain Chem* 4: 100111.
193. Hoeger CD (2013) Foundational Work in Bioelectrochemical Anaerobic Reactor Design with Electron Mediators.
194. Rodriguez J, Premier GC (2010) Towards a mathematical description of bioelectrochemical systems, *Bioelectrochemical systems*, London., 423–448.
195. Gadkari S, Gu S, Sadhukhan J (2018) Towards automated design of bioelectrochemical systems: A comprehensive review of mathematical models. *Chem Eng J* 343: 303–316.
196. Kazemi M, Biria D, Rismani-Yazdi H (2015) Modelling bio-electrosynthesis in a reverse microbial fuel cell to produce acetate from CO₂ and H₂O. *Phys Chem Chem Phys* 17: 12561–12574.
197. Gadkari S, Shemfe M, Modestra JA, et al. (2019) Understanding the interdependence of operating parameters in microbial electrosynthesis: A numerical investigation. *Phys Chem Chem Phys* 21: 10761–10772.
198. Abel AJ, Clark DS (2021) A Comprehensive Modeling Analysis of Formate-Mediated Microbial Electrosynthesis**. *ChemSusChem* 14: 344–355.
199. Salimijazi F, Kim J, Schmitz AM, et al. (2020) Constraints on the Efficiency of Engineered Electromicrobial Production. *Joule* 4: 2101–2130.
200. Passi A, Tibochoa-Bonilla JD, Kumar M, et al. (2021) Genome-Scale Metabolic Modeling Enables In-Depth Understanding of Big Data. *Metabolites* 12.
201. Cabau-Peinado O, Straathof AJJ, Jourdin L (2021) A General Model for Biofilm-Driven Microbial Electrosynthesis of Carboxylates From CO₂. *Front Microbiol* 12: 1405.
202. Pandit A V., Mahadevan R (2011) In silico characterization of microbial electrosynthesis for metabolic engineering of biochemicals. *Microb Cell Fact* 10: 76.
203. Kracke F, Krömer JO (2014) Identifying target processes for microbial electrosynthesis by elementary mode analysis. *BMC Bioinformatics* 15.

204. Marshall CW, Ross DE, Handley KM, et al. (2017) Metabolic reconstruction and modeling microbial electrosynthesis. *Sci Rep* 7: 1–12.
205. Gallardo R, Acevedo A, Quintero J, et al. (2016) In silico analysis of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic response to an external electron supply. *Bioprocess Biosyst Eng* 39: 295–305.
206. Wu C, Cano M, Gao X, et al. (2020) A quantitative lens on anaerobic life: leveraging the state-of-the-art fluxomics approach to explore clostridial metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 64: 47–54.
207. Maertens J, Vanrolleghem PA (2010) Modeling with a view to target identification in metabolic engineering: A critical evaluation of the available tools. *Biotechnol Prog* 26: 313–331.
208. Trinh CT, Thompson RA (2012) Elementary mode analysis: A useful metabolic pathway analysis tool for reprogramming microbial metabolic pathways. *Subcell Biochem* 64: 21–42.
209. Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen J (1998) Flux Analysis of Metabolic Networks. *Metab Eng* 581–627.
210. Orman MA, Berthiaume F, Androulakis IP, et al. (2011) Advanced Stoichiometric Analysis of Metabolic Networks of Mammalian Systems. *Crit Rev Biomed Eng* 39: 511.
211. Martínez I, Bennett GN, San KY (2010) Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain. *Metab Eng* 12: 499–509.
212. Orth JD, Thiele I, Palsson BOØ (2010) What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol* 28: 245–248.
213. Schuster S, Pfeiffer T, Fell DA (2008) Is maximization of molar yield in metabolic networks favoured by evolution? *J Theor Biol* 252: 497–504.
214. Reed JL, Palsson B (2004) Genome-Scale In Silico Models of *E. coli* Have Multiple Equivalent Phenotypic States: Assessment of Correlated Reaction Subsets That Comprise Network States. *Genome Res* 14: 1797.
215. Wlaschin AP, Trinh CT, Sreenc F (2005) Determination of the fractional contribution of individual elementary modes to the overall metabolism of *Escherichia coli*, *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings*, 8336.
216. Arbter P (2022) Fluxomic and metabolomic studies on the electro-fermentation of *Rhodospiridium toruloides* and *Clostridium pasteurianum* for improved

- bioprocesses.
217. Zanghellini J, Ruckerbauer DE, Hanscho M, et al. (2013) Elementary flux modes in a nutshell: Properties, calculation and applications. *Biotechnol J* 8: 1009–1016.
 218. Arbter P, Sinha A, Troesch J, et al. (2019) Redox governed electro-fermentation improves lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour Technol* 294: 122122.
 219. Van Klinken JB, Willems Van Dijk K (2016) FluxModeCalculator: an efficient tool for large-scale flux mode computation. *Bioinformatics* 32: 1265–1266.
 220. Ullah E, Yosafshahi M, Hassoun S (2020) Towards scaling elementary flux mode computation. *Brief Bioinform* 21: 1875–1885.
 221. Kremling A (2013) Systems biology: Mathematical modeling and model analysis. *Syst Biol Math Model Model Anal* 1–362.
 222. Montoya Castaño D (2013) Biotechnology Institute: Leader in Research, Development and Innovation. *Rev Colomb Biotechnol* 15: 5–7.
 223. Montoya D, Arévalo C, Gonzales S, et al. (2001) New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27: 329–335.
 224. Quilaguy Ayure DM, Suárez Moreno ZR, Aristizábal Gutierrez FA, et al. (2006) Genome analysis of thirteen Colombian clostridial strains by pulsed field gel electrophoresis. *Electron J Biotechnol* 9: 0.
 225. Bernal M, Tinoco LK, Torres L, et al. (2013) Evaluating Colombian *Clostridium* spp. strains' hydrogen production using glycerol as substrate. *Electron J Biotechnol* 16: 6.
 226. Cárdenas DP, Pulido C, Aragón ÓL, et al. (2006) Evaluating *Clostridium* sp. native strains' 1,3-propanediol production by fermentation from glycerol USP and raw glycerol from biodiesel production. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas* 35: 120–137.
 227. Barragan CE, Gutiérrez-Escobar AJAJ, Montoya Castaño D, et al. (2014) Computational analysis of 1,3-propanediol operon transcriptional regulators: Insights into *Clostridium* sp. Glycerol metabolism regulation. *Univ Sci* 20: 129–140.
 228. Comba Gonzalez N, Vallejo AFAF, Sanchez-Gomez M, et al. (2013) Protein identification in two phases of 1,3-propanediol production by proteomic analysis. *J Proteomics* 89: 255–264.
 229. Rosas-Morales JPJP, Perez-Mancilla X, López-Kleine L, et al. (2015) Draft

- genome sequences of Clostridium strains native to Colombia with the potential to produce solvents. *Genome Announc* 3.
230. Serrano-Bermúdez LLM, González Barrios AAF, Maranas CDC, et al. (2017) Clostridium butyricum maximizes growth while minimizing enzyme usage and ATP production: Metabolic flux distribution of a strain cultured in glycerol. *BMC Syst Biol* 11: 58.
 231. Serrano-Bermúdez LLM, González Barrios A, Montoya D, et al. (2018) Clostridium butyricum population balance model: Predicting dynamic metabolic flux distributions using an objective function related to extracellular glycerol content. *PLoS One* 13: e0209447.
 232. Aragón ÓL (2007) Estudio de la viabilidad técnica de la producción de 1,3-Propanodiol (1,3-PD) a partir de glicerol con nuevas cepas colombianas de Clostridium sp. a nivel de laboratorio.
 233. Montoya D, Buitrago G, Pineda L (2016) Programa estratégico para la biotransformación sostenible de glicerina cruda en 1,3-propanodiol y prospectiva para desarrollar una biorefinería en ECODIESEL COLOMBIA SA - Informe final - Convocatoria 562-2012, Bogotá.
 234. Gómez J (2016) Conceptual design of a downstream process of bio-based 1,3-propanediol.
 235. Gómez Rodríguez J, Aragón Caycedo O, Paez Coy N, et al. (2015) Study of added value to crude glycerin from colombian biodiesel industry, through a biotechnological production process of 1,3-propanediol with native strains of clostridium sp., *10th European Congress of Chemical Engineering +3rd European Congress of Applied Biotechnology + 5th European Process Intensification Conference (ECCE10+ECAB3+EPIC5)*, Niza, Francia.
 236. Hernández Prada CF (2015) Modelamiento del circuito eléctrico equivalente de una celda de combustible microbiana para condiciones de estado estacionario.
 237. Banu J R, Usman T M M, S K, et al. (2021) A critical review on limitations and enhancement strategies associated with biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 46: 16565–16590.
 238. Sim YB, Yang J, Kim SM, et al. (2022) Effect of bioaugmentation using Clostridium butyricum on the start-up and the performance of continuous biohydrogen production. *Bioresour Technol* 366: 128181.
 239. Atasoy M, Cetecioglu Z (2020) Butyric acid dominant volatile fatty acids

- production : Bio-Augmentation of mixed culture fermentation by *Clostridium butyricum*. *J Environ Chem Eng* 8.
240. Marassi RJRJ, Igreja M, Uchigasaki M, et al. (2019) High strength bioethanol wastewater inoculated with single-strain or binary consortium feeding air-cathode microbial fuel cells. *Environ Prog Sustain Energy* 38: 380–386.
241. Arkin AP, Cottingham RW, Henry CS, et al. (2018) KBase: the United States department of energy systems biology knowledgebase. *Nat Biotechnol* 36: 566.
242. Allen B, Drake M, Harris N, et al. (2017) Using KBase to assemble and annotate prokaryotic genomes. *Curr Protoc Microbiol* 46: 1E – 13.
243. Edirisinghe JN, Faria JP, Harris NL, et al. (2018) Reconstruction and Analysis of Central Metabolism in Microbes, *Metabolic Network Reconstruction and Modeling*, Springer, 111–129.
244. Serrano Bermúdez LM (2016) Análisis de balance de flujo dinámico de la producción de 1, 3-Propanodiol a partir de *Clostridium* sp.
245. Henry CS, DeJongh M, Best AA, et al. (2010) High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nat Biotechnol* 28: 977.
246. Papoutsakis ET (2000) Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol Bioeng* 67: 813–826.
247. Senger RS, Papoutsakis ET (2008) Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. *Biotechnol Bioeng* 101: 1036–1052.
248. Tracy BPBP, Jones SWSW, Fast AGAG, et al. (2012) Clostridia: The importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Curr Opin Biotechnol* 23: 364–381.
249. Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28: 27–30.
250. Shi L, Dong H, Reguera G, et al. (2016) Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nat Rev Microbiol* 14: 651–662.
251. Unrean P, Nguyen NHA (2013) Metabolic pathway analysis and kinetic studies for production of nattokinase in *Bacillus subtilis*. *Bioprocess Biosyst Eng* 36: 45–56.
252. Matlab S (2012) Matlab. *MathWorks, Natick, MA*.
253. von Kamp A, Thiele S, Hädicke O, et al. (2017) Use of CellNetAnalyzer in biotechnology and metabolic engineering. *J Biotechnol* 261: 221–228.

254. Devore J (2011) *Probability and Statistics for Engineering and the Sciences*, Nelson Education.
255. Solomon BOO, Zeng A-PP, Biebl H, et al. (1995) Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. *J Biotechnol* 39: 107–117.
256. Heyndrickx M, De Vos P, Vancanneyt M, et al. (1991) The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biotechnol* 34: 637–642.
257. Quilaguy Ayure DM, Montoya Solano JD, Suárez Moreno ZR, et al. (2010) Analysing the *dhaT* gene in Colombian *Clostridium* sp.(Clostridia) 1, 3-propanediol-producing strains. *Univ Sci* 15: 17–26.
258. Biebl H, Spröer C (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 25: 491–497.
259. Harrington TD, Mohamed A, Tran VN, et al. (2015) Neutral red-mediated electro-fermentation by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*. *BIOELECTROCHEMICAL Syst ENERGY BIOCOMMODITY Prod* 66.
260. Arbter P, Sabra W, Utesch T, et al. (2021) Metabolomic and kinetic investigations on the electricity-aided production of butanol by *Clostridium pasteurianum* strains. *Eng Life Sci* 21: 181–195.
261. Kaur G, Srivastava AKAKAK, Chand S (2012) Simple strategy of repeated batch cultivation for enhanced production of 1,3-propanediol using *clostridium diolis*. *Appl Biochem Biotechnol* 167: 1061–1068.
262. Wang J, Yin Y (2021) *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: An overview. *Int J Hydrogen Energy* 46: 34599–34625.
263. Girbal L, Croux C, Vasconcelos I, et al. (1995) Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol Rev* 17: 287–297.
264. Girbal L, Vasconcelos I, Saint-Amans S, et al. (1995) How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol Rev* 16: 151–162.
265. Byung-Hong K, Zeikus JG, Zeikus; JG (1992) Hydrogen Metabolism in *Clostridium acetobutylicum* Fermentation. *J Microbiol Biotechnol* 2: 248–254.
266. Nasser Al-Shorgani NK, Kalil MS, Wan Yusoff WM, et al. (2015) Improvement of the butanol production selectivity and butanol to acetone ratio (B:A) by addition of

- electron carriers in the batch culture of a new local isolate of *Clostridium acetobutylicum* YM1. *Anaerobe* 36: 65–72.
267. Ujor V, Okonkwo C, Ezeji TC (2016) Unorthodox methods for enhancing solvent production in solventogenic *Clostridium* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 1089–1099.
268. Hipolito CN, Crabbe E, Badillo CM, et al. (2008) Bioconversion of industrial wastewater from palm oil processing to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *J Clean Prod* 16: 632–638.
269. Li X, Li ZG, Shi ZP (2014) Metabolic flux and transcriptional analysis elucidate higher butanol/acetone ratio feature in ABE extractive fermentation by *Clostridium acetobutylicum* using cassava substrate. *Bioresour Bioprocess* 1: 1–13.
270. Park HS, Kim BH, Kim HS, et al. (2001) A Novel Electrochemically Active and Fe(III)-reducing Bacterium Phylogenetically Related to *Clostridium butyricum* Isolated from a Microbial Fuel Cell. *Anaerobe* 7: 297–306.
271. Martin AL, Satjaritanun P, Shimpalee S, et al. (2018) In-situ electrochemical analysis of microbial activity. *AMB Express* 8: 1–10.
272. Martin A (2015) Use of Electrochemistry to Monitor the Growth and Activity of *Clostridium phytofermentans*. *All Theses*.
273. Chatzifragkou A, Dietz D, Komaitis M, et al. (2010) Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. *Biotechnol Bioeng* 107: 76–84.
274. Batlle-Vilanova P, Puig S, Gonzalez-Olmos R, et al. (2016) Continuous acetate production through microbial electrosynthesis from CO₂ with microbial mixed culture. *J Chem Technol Biotechnol* 91: 921–927.
275. Guerrero K, Gallardo R, Gonzalez E, et al. (2021) Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by electro-fermentation in culture medium supplemented with butyrate and neutral red. *Artic J Chem Technol Biotechnol*.
276. Sriram S, Wong JWC, Pradhan N (2022) Recent advances in electro-fermentation technology: A novel approach towards balanced fermentation. *Bioresour Technol* 360: 127637.

A. Anexo: Modelo metabólico central

Tabla 5-1: Lista de Metabolitos.

Abbreviation	Description	Compartment
cpd00001[c]	H2O_c	c
cpd00001[e]	H2O_e	e
cpd00002[c]	ATP_c	c
cpd00003[c]	NAD_c	c
cpd00004[c]	NADH_c	c
cpd00005[c]	NADPH_c	c
cpd00006[c]	NADP_c	c
cpd00008[c]	ADP_c	c
cpd00009[c]	Phosphate_c	c
cpd00009[e]	Phosphate_e	e
cpd00010[c]	CoA_c	c
cpd00011[c]	CO2_c	c
cpd00011[e]	CO2_e	e
cpd00012[c]	PPi_c	c
cpd00013[c]	NH3_c	c
cpd00013[e]	NH3_e	e
cpd00018[c]	AMP_c	c
cpd00020[c]	Pyruvate_c	c
cpd00022[c]	Acetyl-CoA_c	c
cpd00024[c]	2-Oxoglutarate_c	c
cpd00027[c]	D-Glucose_c	c
cpd00027[e]	D-Glucose_e	e
cpd00029[c]	Acetate_c	c
cpd00029[e]	Acetate_e	e
cpd00032[c]	Oxaloacetate_c	c
cpd00047[c]	Formate_c	c
cpd00061[c]	Phosphoenolpyruvate_c	c
cpd00067[c]	H+_c	c
cpd00067[e]	H+_e	e
cpd00071[c]	Acetaldehyde_c	c
cpd00072[c]	D-fructose-6-phosphate_c	c
cpd00076[e]	Sucrose_e	e
cpd00079[c]	D-glucose-6-phosphate_c	c

Abbreviation	Description	Compartment
cpd00082[c]	D-Fructose_c	c
cpd00082[e]	D-Fructose_e	e
cpd00095[c]	Glycerone-phosphate_c	c
cpd00100[c]	Glycerol_c	c
cpd00100[e]	Glycerol_e	e
cpd00101[c]	ribose-5-phosphate_c	c
cpd00102[c]	Glyceraldehyde3-phosphate_c	c
cpd00105[c]	D-Ribose_c	c
cpd00105[e]	D-Ribose_e	e
cpd00106[c]	Fumarate_c	c
cpd00120[c]	Butyryl-CoA_c	c
cpd00130[c]	L-Malate_c	c
cpd00137[c]	Citrate_c	c
cpd00138[c]	D-Mannose_c	c
cpd00138[e]	D-Mannose_e	e
cpd00157[c]	Glycerone_c	c
cpd00159[c]	L-Lactate_c	c
cpd00159[e]	L-Lactate_e	e
cpd00169[c]	3-Phosphoglycerate_c	c
cpd00171[c]	D-Ribulose5-phosphate_c	c
cpd00190[c]	beta-D-Glucose_c	c
cpd00196[c]	Acetylphosphate_c	c
cpd00198[c]	D-Xylulose5-phosphate_c	c
cpd00203[c]	1,3-Bisphospho-D-glycerate_c	c
cpd00211[c]	Butyrate_c	c
cpd00211[e]	Butyrate_e	e
cpd00221[c]	D-Lactate_c	c
cpd00235[c]	D-mannose-6-phosphate_c	c
cpd00236[c]	D-Erythrose4-phosphate_c	c
cpd00238[c]	Sedoheptulose7-phosphate_c	c
cpd00242[c]	H2CO3_c	c
cpd00260[c]	Isocitrate_c	c
cpd00279[c]	Acetoacetyl-CoA_c	c
cpd00290[c]	D-fructose-1,6-bisphosphate_c	c
cpd00331[c]	cis-Aconitate_c	c
cpd00363[c]	Ethanol_c	c
cpd00363[e]	Ethanol_e	e
cpd00482[c]	2-Phospho-D-glycerate_c	c
cpd00650[c]	Crotonyl-CoA_c	c
cpd00714[c]	3-Hydroxypropanal_c	c
cpd00802[c]	D-fructose-1-phosphate_c	c
cpd00842[c]	(S)-3-Hydroxybutyryl-CoA_c	c
cpd00863[c]	beta-D-Glucose_6-phosphate_c	c
cpd00971[c]	Na+_c	c
cpd00971[e]	Na+_e	e
cpd01618[c]	1,3-Propanediol_c	c
cpd01618[e]	1,3-Propanediol_e	e

Abbreviation	Description	Compartment
cpd01662[c]	Butanoylphosphate_c	c
cpd01693[c]	6-Phosphosucrose_c	c
cpd03187[c]	Oxalosuccinate_c	c
cpd11416[c]	Biomass_c	c
cpd11416[e]	Biomass_e	e
cpd11620[c]	Reducedferredoxin_c	c
cpd11621[c]	Oxidizedferredoxin_c	c
cpd11640[c]	H2_c	c
cpd11640[e]	H2_e	e
cpd12713[c]	cpd12713_c	c
cpd12713[e]	cpd12713_e	e

Tabla 5-2: Lista de Reacciones.

Reaction	Reacción	Enzyme	Enzima	Compartment	Compartment	Reaction	Reacción	Enzyme	Enzima	Compartment	Compartment
CPD01662	CPD01662	CPD01662	CPD01662	c	c						
CPD01693	CPD01693	CPD01693	CPD01693	c	c						
CPD03187	CPD03187	CPD03187	CPD03187	c	c						
CPD11416	CPD11416	CPD11416	CPD11416	c	c						
CPD11416	CPD11416	CPD11416	CPD11416	e	e						
CPD11620	CPD11620	CPD11620	CPD11620	c	c						
CPD11621	CPD11621	CPD11621	CPD11621	c	c						
CPD11640	CPD11640	CPD11640	CPD11640	c	c						
CPD11640	CPD11640	CPD11640	CPD11640	e	e						
CPD12713	CPD12713	CPD12713	CPD12713	c	c						
CPD12713	CPD12713	CPD12713	CPD12713	e	e						

B. Anexo: Voltamperometría cíclica de cepa nativa y cepa patrón

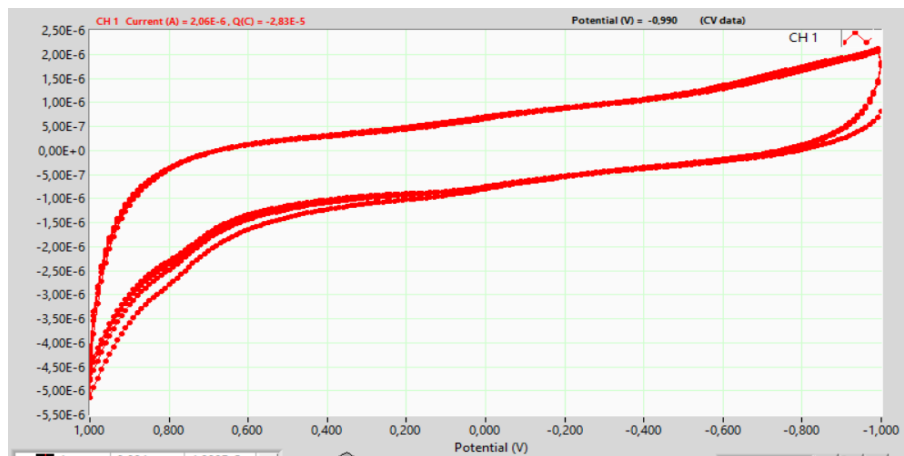


Figura 5-1: CV de IBUN 158B en cultivo suspendido.

Electrolito usado PBS 1X. Velocidad de escaneo 0.005 V/s. Eje horizontal: Potencial (Voltios). Eje vertical Corriente (Amperios).

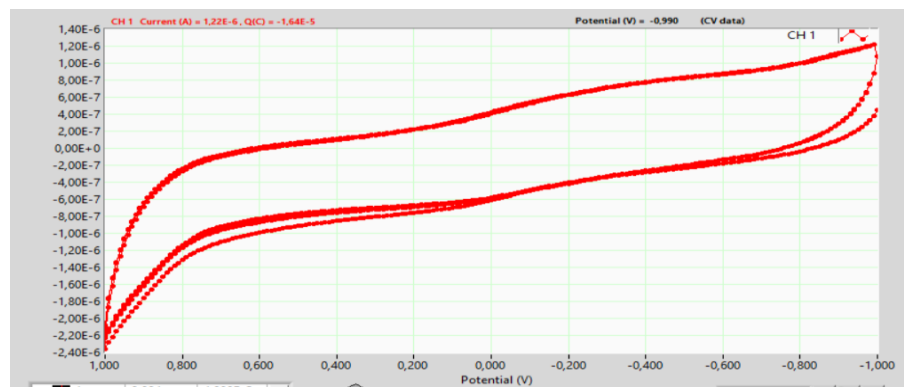


Figura 5-2: CV de *C. pasteurianum* en cultivo suspendido.

Electrolito usado PBS 1X. Velocidad de escaneo 0.005 V/s. Eje horizontal: Potencial (Voltios). Eje vertical Corriente (Amperios).

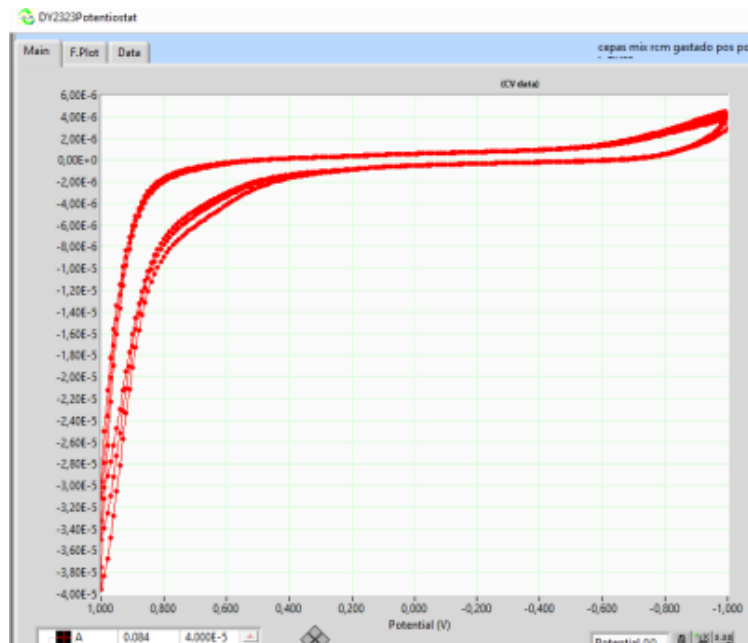


Figura 5-3: CV de sobrenadante sin biomasa en cultivo con fieltro de carbono. Electrolito usado PBS 1X. Velocidad de escaneo 0.005 V/s. Eje horizontal: Potencial (Voltios). Eje vertical Corriente (Amperios).

C. Anexo: Datos de electrofermentaciones en reactor H

Tabla 5-3: Concentraciones de electrofermentaciones en reactor H.

	Glicerol Consumido	Acetato	13-PD	Butirato
	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)
Cpas -Gli USP - V0	434,3	35,5	221,0	18,5
Cpas -Gli USP - V-0,34	434,3	32,2	280,3	40,5
	Glicerol Consumido	Acetato	13-PD	Butirato
	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)
Cpas -Gli Ind - V0	434,3	41,0	226,4	26,1
Cpas -Gli Ind - V-0,34	434,3	40,4	261,7	41,9
	Glicerol Consumido	Acetato	13-PD	Butirato
	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)
158 B -Gli USP - V0	434,3	40,6	265,4	35,3
158 B -Gli USP - V-0,34	434,3	63,3	287,4	22,2
	Glicerol Consumido	Acetato	13-PD	Butirato
	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)
158 B -Gli Ind - V0	434,3	19,5	234,2	41,2
158 B -Gli Ind - V-0,34	434,3	30,9	251,0	31,5
	Glicerol Consumido	Acetato	13-PD	Butirato
	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)
158 B -Gli Ind - V0 NR	434,3	58,2	252,6	8,0
158 B -Gli Ind - V-0,4 NR	434,3	59,1	272,5	17,5

D. Anexo: Diagrama del proceso en reactor H

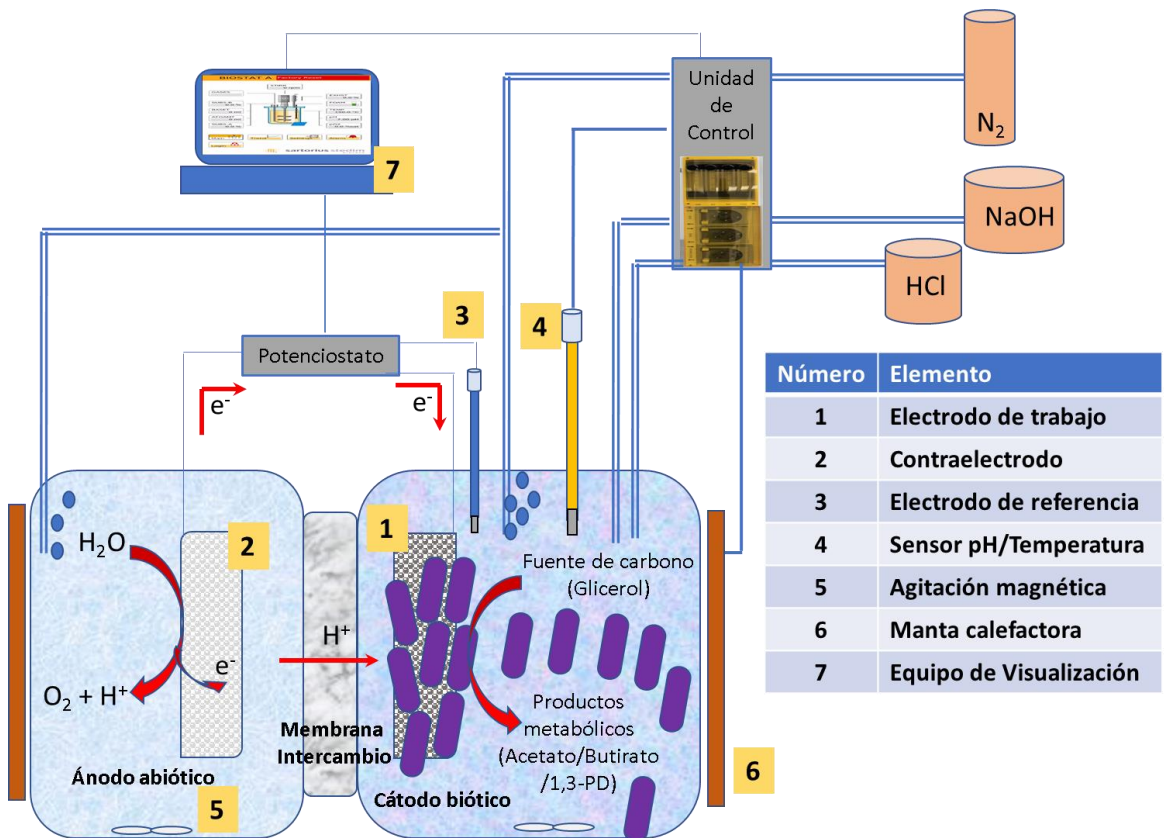


Figura 5-4: Descripción esquemática de electrofermentación en este estudio.