



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE H₂ POR BACTERIAS DEL GÉNERO
CLOSTRIDIUM MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SUS RUTAS METABÓLICAS Y LA
MODELACIÓN DE FLUJOS METABÓLICOS.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO CIVIL
EN BIOTECNOLOGÍA

NICOLÁS ALEXANDER LÓPEZ OSORIO

PROFESORA GUÍA:

MARIA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

MELANIE COLET LAGRILLE

SANTIAGO DE CHILE

2022

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR A LOS
TÍTULOS DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO E INGENIERO
CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: NICOLÁS ALEXANDER LÓPEZ OSORIO
FECHA: 09/05/2022
PROFESORA GUÍA: MARIA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE H₂ POR BACTERIAS DEL GÉNERO
CLOSTRIDIUM MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SUS RUTAS METABÓLICAS Y LA
MODELACIÓN DE FLUJOS METABÓLICOS.

Esta memoria tiene como motivación, el poder contribuir en la superación del desafío energético actual, con la búsqueda de nuevos recursos renovables y de uso limpio para el medio ambiente. En este ámbito, el gas hidrógeno resulta ser un combustible de alto interés comercial debido a su elevado contenido energético y la posibilidad de ser utilizado sin generar contaminación, por lo que supone un candidato excelente para suplir las crecientes demandas energéticas urbanas de la actualidad y a futuro.

La producción microbiológica de hidrógeno, representa una alternativa a considerar puesto que permite establecer un proceso de obtención de carácter renovable. Microorganismos pertenecientes al género *Clostridium sp.* son capaces de producir este gas como un subproducto de su metabolismo, además de que los *Clostridias* pueden crecer en medios residuales como aguas servidas, pudiéndose establecer procesos de tratamiento de aguas servidas con bio producción de hidrógeno.

Con la aplicación de la ingeniería metabólica, es posible modelar el funcionamiento interno de un microorganismo de interés, simular cambios en su metabolismo y pronosticar cuales serían sus efectos, para poder generar escenarios de optimización de la producción de metabolitos de interés. Por ello, mediante el análisis de flujos metabólicos, se estudió el metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*, un bio productor de hidrógeno, con la intención de encontrar formas de incrementar su capacidad de producir hidrógeno.

La metodología consistió en emplear dos algoritmos de búsqueda analítica, estos son: *Flux Variability Scanning based on Enforced Objective Flux* (FVSEOF) y búsqueda de nodos principales (BNP), en la resolución del problema de balance de flujos, para el modelo metabólico ATCC 824 (*Clostridium acetobutylicum*), sin escala genómica. El criterio de optimización fue maximizar la producción de hidrógeno, sujeto a la restricción de máxima formación de biomasa. Posteriormente se realizó un análisis integrado entre los resultados de ambos algoritmos para definir las modificaciones que se simularían computacionalmente, en Matlab con ayuda de la *toolbox* COBRA.

De las simulaciones realizadas se obtuvo que, al silenciar las vías de síntesis de acetato, butirato y lactato, se podría incrementar el flujo de hidrógeno producido en un 42% en comparación con la producción sin modificaciones en las vías metabólicas. Por esto, se proponen estas modificaciones como candidatos de modificación genética. La mayor carencia del trabajo realizado es la ausencia de información sobre la escala genómica, que se podría incorporar posteriormente para robustecer los resultados obtenidos.

Tabla de Contenido

Introducción	1
Capítulo I	1
1. Motivación	1
Superar el desafío energético	1
2. Marco Teórico	2
2.1. El gas Hidrógeno	2
2.2. Métodos para producir H ₂	2
2.3. El Bio-H ₂	2
2.4. <i>Clostridium</i> sp. especie dominante en producción de bio-H ₂	3
2.5. Metabolismo en el género <i>Clostridium</i>	4
2.6. Reacciones asociadas a la producción de H ₂	10
2.7. Modelación del metabolismo celular	14
2.8. Análisis de flujos metabólicos	15
2.9. Bases matemáticas sobre el MFA.....	17
2.9. Justificación	22
3. Objetivos	23
3.1. Objetivo General	23
3.2. Objetivos Específicos.....	23
4. Metodología	23
4.1. Modelo metabólico de <i>Clostridium acetobutylicum</i> : ATCC 824	23
4.2. Algoritmo FVSEOF (<i>Flux Variability Scanning based on Enforced Objective Flux</i>) 24	
4.3. Algoritmo de Búsqueda de Nodos Principales (BNP).....	26
4.4. Análisis Integrado	27
Capítulo II	28
5. Resultados	28
5.1. Simulación del metabolismo de <i>Clostridium acetobutylicum</i> : Análisis de los flujos metabólicos (MFA) por medio de los algoritmos FVSEOF y BNP	28
5.2. Identificación de las vías metabólicas que son candidatos para modificaciones genéticas que incrementen la productividad de H ₂ : Vías de síntesis de lactato, acetato y butirato.....	31
Capítulo III	36
6. Discusión.....	36

7. Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	41
Anexos.....	44
Anexo A: Reacciones de bio-síntesis de macromoléculas:	44

Índice de Figuras

Figura 1: Curva de crecimiento (densidad óptica, OD), producción de ácidos orgánicos (ácido génesis) y producción de solventes (solvento génesis) durante un cultivo batch estándar.....	4
Figura 2: Curva de crecimiento (densidad óptica, OD), producción de ácidos orgánicos (ácido génesis) y producción de solventes (solvento génesis) durante un cultivo continuo con limitación de fosfato.....	4
Figura 3: Rutas bioquímicas de <i>C. acetobutylicum</i> en ácido génesis. Reacciones predominantes durante la fase acidogénica.	6
Figura 4: Rutas bioquímicas de <i>C. acetobutylicum</i> en solvento génesis. Reacciones predominantes durante la fase solventogénica.	7
Figura 5: Reutilización de Acetato en la formación de Butanol.....	8
Figura 6: Reutilización del Butirato en la formación de Butanol.....	9
Figura 7: Producción de Butanol, sin consumo de ácidos.	9
Figura 8: Esquema de una red metabólica simple.....	15
Figura 9: Clasificación del tipo de flujo de las reacciones en el algoritmo FVSEOF.	25
Figura 10: Clasificación del tipo de flujo según el análisis de variabilidad.	26
Figura 11: Ejemplo de partición de Flujos de un metabolito A entre el Step 1 y Step 2 del algoritmo FVSEOF.....	27
Figura 12: Gráfico de los flujos de H ₂ en la simulación del knockout de la reacción ID704.	32
Figura 13: Gráfico de los flujos de H ₂ en la simulación del knockout de las reacciones ID230 y ID315.	33
Figura 14: Gráfico de los flujos de H ₂ en la simulación del knockout de las reacciones ID1174 y ID1688.	34
Figura 15: Gráfico de los flujos de H ₂ en la simulación del knockout de las reacciones ID704, ID230, ID315, ID1174 y ID1688.	35

Índice de Tablas

Tabla 1: Reacciones metabólicas de <i>Clostridium acetobutylicum</i> asociadas a la generación de H ₂	11
---	----

Tabla 2: Número de reacciones con flujos decrecientes y poco variables obtenidas por el algoritmo FVSEOF, clasificadas de acuerdo a la ruta a la cual pertenecen (según KEGG).	29
Tabla 3: Nodos Principales y las reacciones donde actúan, clasificadas según la ruta metabólica a la cual pertenecen (según KEGG).....	30
Tabla 4: Reacciones que coinciden entre los resultados de los algoritmos de búsqueda FVSEOF y BNP.	31

Introducción

Capítulo I

1. Motivación

Superar el desafío energético

Tanto en Chile como a nivel mundial, las necesidades energéticas nos plantean un gran desafío en la búsqueda de fuentes de energía que sean eficientes y duraderas.

En la actualidad, las principales fuentes energéticas comprenden el uso de combustibles de origen fósil como el carbón, el petróleo y el gas natural, estos tienen un carácter limitado debido a que no son renovables y por otro lado tienen un uso muy sobrecargado a nivel global [1].

Se ha estimado que las reservas mundiales de estos combustibles se agotarían dentro de unas pocas décadas, 60 años para el gas natural, 80 años para el petróleo y en el mejor de los casos unos 200 años para el carbón, lo que pondría en crisis el marco energético [2].

Este escenario implica que, dentro de las próximas décadas, el valor de este tipo de combustibles irá en continuo incremento a medida que se vuelven más demandados y escasos, volviendo urgente la búsqueda de alternativas viables [3].

Los recursos renovables ofrecen una forma sostenible de desarrollo socioeconómico, pues permiten asegurar la mantención de un suministro energético estable, sin condicionar el agotamiento de recursos naturales escasos ni generar un impacto medioambiental negativo con su consumo, como lo es el calentamiento global, la emisión de gases de efecto invernadero, el deshielo de los polos, la contaminación del mar y el aire, entre otros tantos efectos negativos [4].

Recientemente, se han propuesto diversas fuentes energéticas alternativas como potenciales sustitutos de los combustibles fósiles, entre ellos se encuentra el gas H₂, reconocido como el candidato más prometedor dentro de los portadores energéticos [5].

2. Marco Teórico

2.1. El gas Hidrógeno

El gas hidrógeno es considerado como un combustible limpio, debido a que no posee carbono, azufre o nitrógeno y por tanto no genera ningún tipo de polución durante su combustión [6].

Actualmente, el hidrógeno es producido principalmente a partir de combustibles fósiles como el gas natural y la nafta [7], lo que incurre en una contradicción evidente respecto a la generación de combustibles que sean limpios y de carácter renovable, por lo que la búsqueda e implementación de otros medios de producción resultan ser mucho más consistentes y llamativos [8].

2.2. Métodos para producir H₂

Existen tres métodos principales para la producción de hidrógeno actualmente. El primero y principal a nivel mundial, es mediante la aplicación de metodologías basadas en la termoquímica, como lo son el reformado de gas natural y la gasificación [9]. El segundo modo, es mediante procesos eléctricos, como la electrólisis del agua, que mantiene una elevada eficiencia y seguridad [9]. La tercera forma de producir hidrógeno consiste en emplear agentes biológicos capaces de producir hidrógeno debido a su metabolismo [9].

De estas tres formas de producción de hidrógeno, las dos últimas poseen las mejores proyecciones; sin embargo, sólo la generación biológica requiere de una menor inversión energética en comparación con los otros dos métodos y resulta mucho más favorable en términos medioambientales [9].

2.3. El Bio-H₂

Cuando el hidrógeno es producido por la acción de agentes biológicos a partir de fuentes renovables como la energía lumínica o la biomasa, es denominado bio-hidrógeno. El bio-hidrógeno es calificado como un recurso muy prometedor debido a que sus fuentes de producción tienen una elevada disponibilidad y una distribución global [10].

Las formas de producir bio-H₂ se clasifican en tres categorías:

- I. Bio-fotólisis: corresponde a la disociación de uno más sustratos, bajo la acción de la energía radiante del sol en conjunto de microorganismos del tipo fotosintético, como las algas verdes o algunas cianobacterias [11].
- II. Foto fermentación: corresponde a la fermentación que llevan a cabo algunos microorganismos, los cuales reducen componentes orgánicos utilizando energía solar, produciendo bio-H₂ y CO₂ como parte de la actividad metabólica [12].

III. Fermentación oscura: corresponde a la forma de producción biológica más sustentable que ha sido reportada en los últimos años, mediante la cual diversas especies de bacterias mesófitas como *Escherichia coli* [13], *Enterobacters sp* [13], y *Clostridium sp* [14], son capaces de generar bio-H₂ sin la necesidad de utilizar energía solar y de forma prácticamente continua. Este tipo de bacterias es capaz de producir bio-H₂ por medio de la actividad de un grupo de enzimas denominadas hidrogenasas [15], las cuales mantienen una mayor tasa productiva en comparación con la bio-fotólisis y la foto-fermentación.

2.4. *Clostridium sp.* especie dominante en producción de bio-H₂

Cuando se produce bio-H₂, es común emplear comunidades microbiológicas que actúan en consorcio [15], pues se tienen algunas ventajas frente a emplear alguna especie en particular, como la posibilidad de usar residuos industriales como medio de cultivo, sin la necesidad de emplear métodos de esterilización, lo que se traduce en beneficios económicos a lo largo de un proceso de tratamiento de residuos y de generación del bio-H₂ [16].

Durante años, los estudios sobre cómo mejorar el rendimiento de este proceso, se han basado en la evaluación y la mantención de las condiciones de cultivo [16]- [27], aun cuando estas técnicas poseen limitantes como la gran demanda de tiempo, el trabajo intensivo y la susceptibilidad a la generación de sesgos hacia cultivos de microorganismos que no son predominantes, por ello resulta bastante aconsejable estudiar y dar una mirada dentro de las estructuras que se forman en los consorcios y la dinámica que desarrollan las comunidades microbiológicas al interactuar.

Estudios recientes sobre la producción de bio-H₂ han empleado técnicas de la biología molecular (*DGGE*, clonación de *DNA*, *Dot-Blot*, *TRFLP*) [28] y métodos indirectos (microscopía, enriquecimiento, distribución de metabolitos) [29] para determinar cuál es la composición microbiológica en un proceso de generación de bio-H₂ [30].

El análisis de la distribución de los metabolitos en un medio de cultivo, es una técnica que permite estudiar la composición biológica de un consorcio durante un proceso de fermentación [31], debido a que las diferentes componentes biológicas tienen distintos productos metabólicos. Comúnmente, acetato, butirato, propionato, butanol y etanol [32], son los principales metabolitos producidos por los organismos fermentadores que producen H₂. Se señala a *Clostridium sp.* como la especie dominante que está presente en un sistema de producción de bio-H₂ [31][33].

Es por lo anterior que resulta relevante estudiar el metabolismo de *Clostridium sp.* como un buen candidato productor de bio-H₂, particularmente interesante por su presencia dominante en los consorcios productores de bio-H₂, como también por su presencia en las aguas servidas [34][35], que lo centra en una aplicación actual de alto impacto en el desarrollo urbano.

2.5. Metabolismo en el género *Clostridium*

El metabolismo en el género *Clostridium* posee dos etapas características que pueden ser observadas en fermentaciones tipo batch como se muestra en la Figura 1 y también en fermentaciones del tipo continuo, como se muestra en la Figura 2. La primera etapa es la de formación de ácidos orgánicos (ácido génesis) y la segunda etapa es la de formación de solventes (solvento génesis).

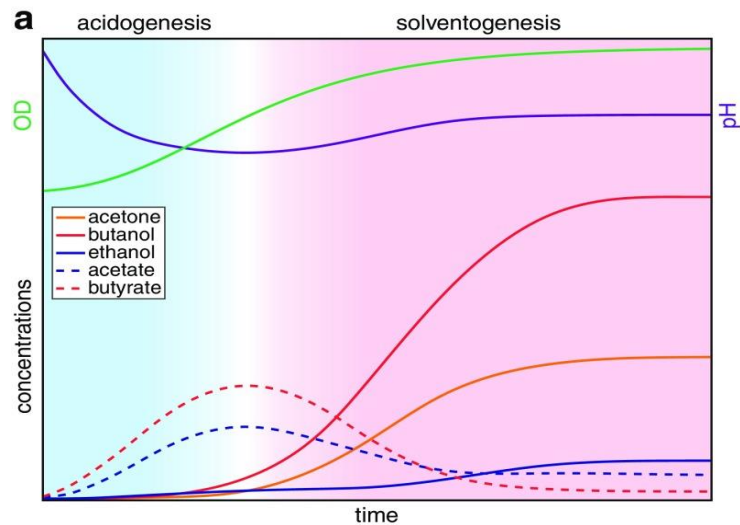


Figura 1: Curva de crecimiento (densidad óptica, OD), producción de ácidos orgánicos (ácido génesis) y producción de solventes (solvento génesis) durante un cultivo *batch* estándar. Se muestra el cambio de pH. No se muestran la inoculación ni la fase de crecimiento inicial. Fuente [31].

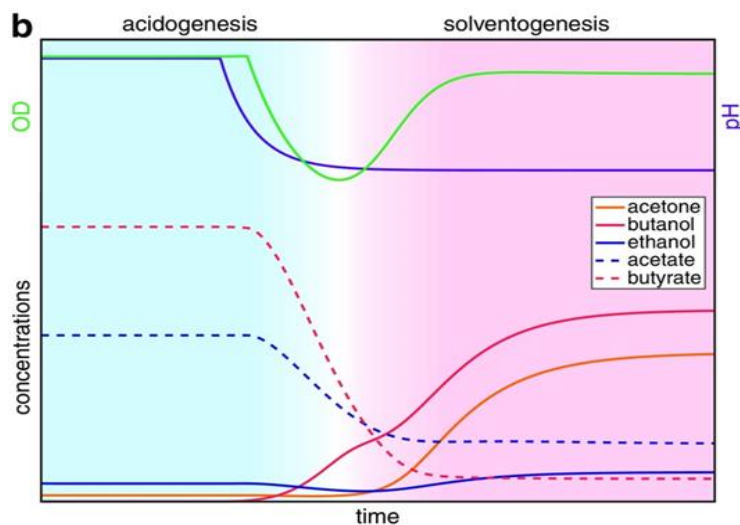


Figura 2: Curva de crecimiento (densidad óptica, OD), producción de ácidos orgánicos (ácido génesis) y producción de solventes (solvento génesis) durante un cultivo continuo con limitación de fosfato. Se muestra el cambio de pH. No se muestran la inoculación ni la fase de crecimiento inicial. Fuente [31].

Los microorganismos pertenecientes al género *Clostridium sp.* utilizan las vías bioquímicas que se describen a continuación para la conversión de carbohidratos hacia ácidos orgánicos, solventes, H₂ y CO₂.

En primera instancia, ocurre la vía metabólica de Embden-Meyerhof (glicólisis), donde 1 mol de hexosas es metabolizado para formar 2 moles de piruvato, 2 moles de NADH y 2 moles de ATP.

Además de ser capaces de metabolizar hexosas, los clostridias pueden utilizar azúcares de 5 carbonos, en la vía de pentosas-fosfato [37], donde logran convertir 3 moles de pentosas, en 5 moles de NADH y 5 moles de ATP.

Esto ocurre a partir de la transformación de la pentosa en una pentosa 5 –fosfato, que luego podrá ingresar a la vía de glicólisis, gracias a la acción en secuencia de las enzimas transcetolasa y transaldolasa que le convierten en una fructosa 6 –fosfato y gliceraldehído 3 –fosfato.

Posteriormente, los moles de piruvato que se forman de la fermentación de los azúcares de 5 y 6 carbonos, son escindidos por la enzima piruvato sintasa junto a la coenzima A (CoA) para formar acetil-CoA, ferredoxina reducida y CO₂. La fosforilación del acetil-CoA por parte de las enzimas quinasas fosfotransacetilasa o la fosfotransbutilasa, generan acetato o bien, butirato y ATP.

La generación de ácidos orgánicos no conlleva la reducción de otros agentes, pero la ferredoxina reducida en la degradación del piruvato, es capaz de transferir electrones a la enzima hidrogenasa, permitiéndole utilizar protones como un aceptor final de electrones [36]. De esta forma, la ferredoxina puede ser re-oxidada y se puede liberar H₂ desde la célula. Esta reducción de protones, es esencial en la fermentación de piruvato para el depósito del exceso de electrones.

En condiciones de alta presión parcial de H₂, la ley de acción de masas limita la formación del gas, por lo que las células se ven forzadas a transportar electrones, a través de la NADH:ferredoxina oxidoreductasa para reducir acetil-CoA y butiril-CoA en etanol y butanol, respectivamente [27]. Esta producción de solventes conlleva un cambio en el flujo de carbonos y por tanto un cambio en las rutas metabólicas, desde la vía de producción de ácidos hacia la vía de formación de solventes.

El cambio en las vías metabólicas requiere de al menos dos grupos de enzimas hidrogenasas para conseguir las reacciones de reducción necesarias y poder llevar a cabo la producción de etanol y butanol [36], ya que la ferredoxina se encuentra en un estado incapaz de ceder electrones a las enzimas hidrogenasas que formarían el H₂, resulta necesario prevenir las condiciones que fuerzan el cambio metabólico en la fermentación, de ácido génesis hacia solvento génesis.

Estas rutas son similares entre varias especies de clostridias como *C. acetobutylicum*, *C. thermocellum*, *C. beijerinckii*, aunque en ciertas especies, las vías de formación de acetona y ácido butírico están ausentes, como es el caso de *C. thermocellum* [36].

Las rutas bioquímicas que *Clostridium acetobutylicum* posee para la producción de ácidos orgánicos se muestran en la Figura 3, destacando en líneas gruesas las reacciones predominantes en esta etapa.

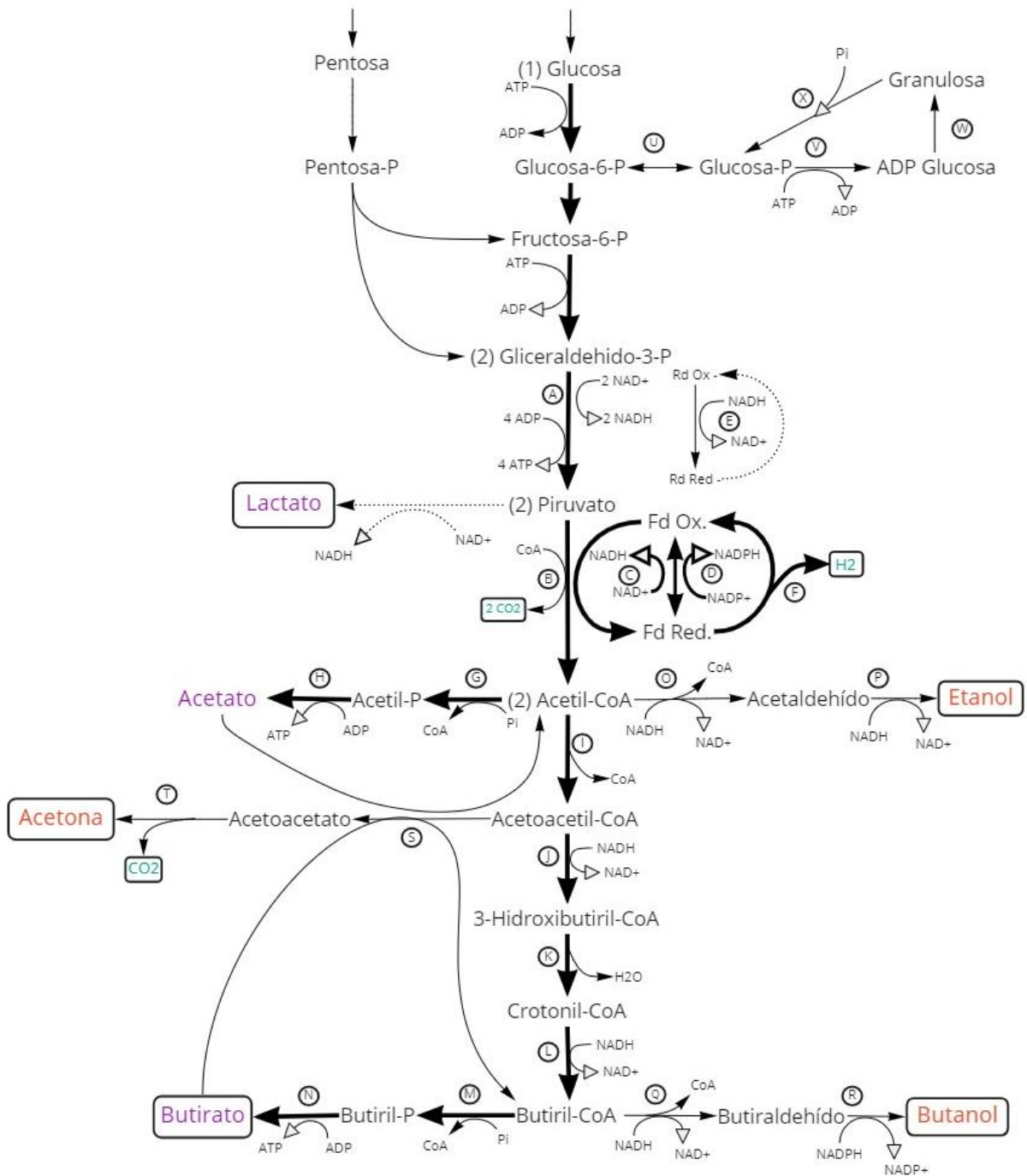


Figura 3: Rutas bioquímicas de *C. acetobutylicum* en ácido génesis. Reacciones predominantes durante la fase acidogénica. Fuente [32].

El cambio metabólico hacia la solvento génesis involucra una variación en las reacciones predominantes del metabolismo, como se muestran en la Figura 4. Las nuevas reacciones que predominan durante esta etapa se indican en líneas gruesas.

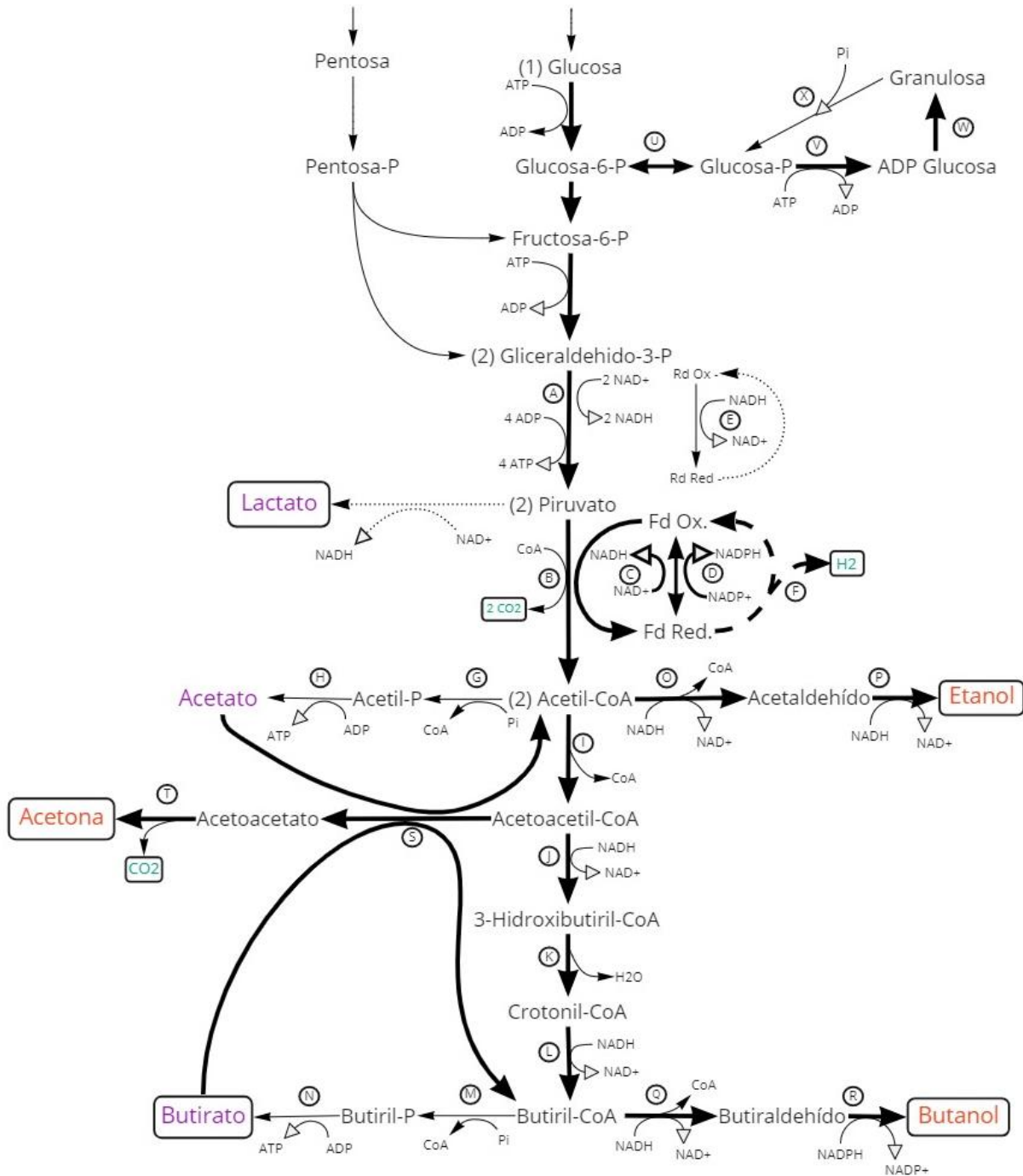


Figura 4: Rutas bioquímicas de *C. acetobutylicum* en solvento génesis. Reacciones predominantes durante la fase solventogénica. Fuente [32].

En las Figuras 3 y 4, se indican las enzimas que participan en cada reacción con letras mayúsculas, de acuerdo a la siguiente notación:

(A) gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); (B) piruvato-ferredoxina oxido reductasa; (C) NADH-ferredoxina oxido reductasa; (D) NADPH-ferredoxina oxido reductasa; (E) NADH rubredoxina oxido reductasa; (F) hidrogenasa; (G) fosfato acetil transferasa (fosfotransacetilasa); (H) acetato quinasa; (I) tiolasa (acetil-CoA acetil transferasa); (J) 3 –hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa, (K) crotonasa; (L) butiril-CoA deshidrogenasa, (M) fosfato butiril transferasa (fosfotransbutirilasa); (N) butirato quinasa; (O) acetaldehído deshidrogenasa; (P) etanol deshidrogenasa; (Q) butiraldehido deshidrogenasa; (R) butanol deshidrogenasa; (S) acetoacetil-CoA:acetato/butirato:CoA transferasa; (T) acetoacetato descarboxilasa; (U) fosfoglucomutasa; (V) ADP-glucosa pirofosforilasa; (W) glicógeno sintasa; (X) glicógeno fosforilasa.

Durante la fase solvento génica, existe una correlación estequiométrica entre la producción de solventes y el consumo de los ácidos orgánicos generados previamente. Esta correlación incluye un par de vías para la reutilización de acetato, como se muestra en la Figura 5 y para la reutilización de butirato, como se muestra en la Figura 6, para la producción de butanol.

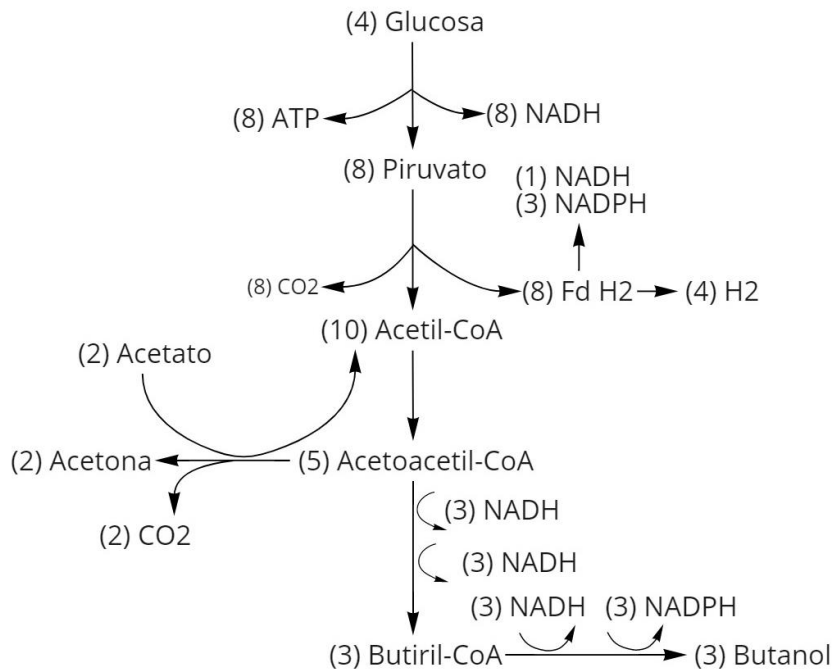


Figura 5: Reutilización de Acetato en la formación de Butanol. Se indican entre paréntesis las relaciones estequiométricas. Fuente [32].

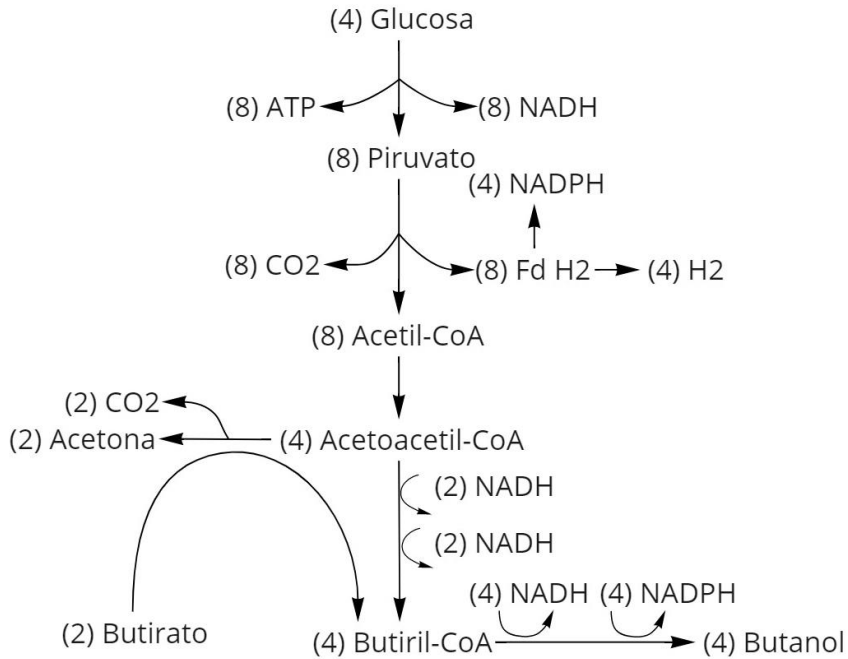


Figura 6: Reutilización del Butirato en la formación de Butanol. Se indican entre paréntesis las relaciones estequiométricas. Fuente [32].

Por otro lado, también se muestra una vía capaz de producir butanol, sin recurrir al consumo de los ácidos, acetato y butirato, formados durante la acido génesis, como se muestra en la Figura 7.

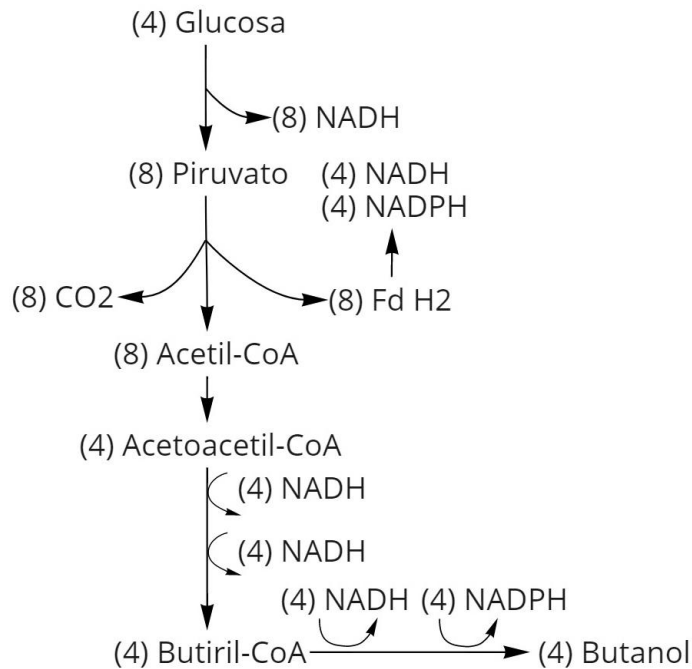


Figura 7: Producción de Butanol, sin consumo de ácidos. Se indican entre paréntesis las relaciones estequiométricas. Fuente [32].

2.6. Reacciones asociadas a la producción de H₂

Para la construcción de un modelo matemático capaz de describir el metabolismo de *Clostridium acetobutylicum* es necesario conocer todas las reacciones que se llevan a cabo en dicho microorganismo. Estas reacciones se pueden agrupar en dos categorías principales, las reacciones metabólicas (no asociadas al crecimiento) y las reacciones de síntesis de biomasa (asociadas al crecimiento).

2.6.1. Reacciones metabólicas

Este grupo de reacciones, se compone de todas las reacciones que se desarrollan en el interior de un microorganismo. Se diferencian de las reacciones de síntesis de biomasa debido a que éstas se emplean para mantención de los microorganismos y no para su crecimiento.

A continuación, en la Tabla 1, se muestran las principales reacciones del metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*, descrito anteriormente y detallado en la Figura 3 y Figura 4. Además, se señalan las enzimas responsables de la catálisis de cada reacción.

Desde el consumo de glucosa (Reacción 1) hasta la oxidación de ferredoxina reducida (Reacción 17), se encuentran las reacciones asociadas a la producción de H₂, mientras que, las siguientes reacciones se encuentran asociadas a la producción de solventes (acetona, butanol y etanol) y la reutilización de ácidos (acetato y butirato) en la producción de butanol.

Tabla 1: Reacciones metabólicas de *Clostridium acetobutylicum* asociadas a la generación de H₂ y a la producción de solventes.

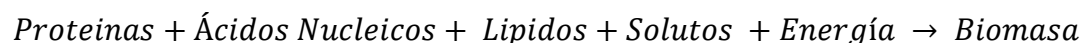
N°	Reacción	Enzima
Reacción 1	$Glucosa + ATP \rightarrow Glucosa - 6P + ADP$	Gluconasa (hexoquinasa)
Reacción 2	$Glucosa - 6P \leftrightarrow Glucosa - 1P$	Fosfoglucomutasa
Reacción 3	$Glucosa - 1P + ATP \rightarrow ADP - Glucosa + ADP$	ADP-Glucosa pirofosforilasa
Reacción 4	$ADP - Glucosa \rightarrow Granulosa$	Glicógeno sintasa
Reacción 5	$Granulosa + P_i \rightarrow Glucosa - 1P$	Glicógeno fosforilasa
Reacción 6	$Pentosa \rightarrow Pentosa - P$	Ribosa 5-fosfato isomerasa, Ribulosa 5,3-fosfato epimerasa
Reacción 7	$Pentosa - P \rightarrow Fructosa - 6P$	Transcetolasa / Transaldolasa
Reacción 8	$Pentosa - P \rightarrow Gliceraldehído - 3P$	Transcetolasa
Reacción 9	$Glucosa - 6P \rightarrow Fructosa - 6P$	Fosfo-glucosa isomerasa
Reacción 10	$Fructosa - 6P + ATP \rightarrow Gliceraldehído - 3P + ADP$	Transaldolasa
Reacción 11	$Gliceraldehído - 3P + NAD^+ + 2 ADP \rightarrow Piruvato + NADH + 2 ATP$	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
Reacción 12	$Rd_{Ox} + NADH \rightarrow Rd_{Red} + NAD^+$	NADH-rubredoxina oxido reductasa
Reacción 13	$Piruvato + NADH \rightarrow Lactato + NAD^+$	Lactato deshidrogenasa
Reacción 14	$Piruvato + CoA + Fd_{Ox} \rightarrow Acetil - CoA + Fd_{Red} + CO_2$	Piruvato-ferredoxina oxido reductasa
Reacción 15	$Fd_{Red} \rightarrow Fd_{Ox} + H_2$	Hidrogenasa

Reacción 16	$Fd_{Ox} + NADH \rightarrow Fd_{Red} + NAD^+$	NADH-ferredoxina oxido reductasa
Reacción 17	$Fd_{Red} + NADP^+ \rightarrow Fd_{Ox} + NADPH$	NADPH-ferredoxina oxido reductasa
Reacción 18	$Acetil - CoA + P_i \rightarrow Acetil - P + CoA$	Fosfato acetil transferasa (fosfotransacetilasa)
Reacción 19	$Acetil - P + ADP \rightarrow Acetato + ATP$	Acetato quinasa
Reacción 20	$Acetil - CoA + NADH \rightarrow Acetaldehído + CoA + NAD^+$	Acetaldehído deshidrogenasa
Reacción 21	$Acetaldehído + NADH \rightarrow Etanol + NAD^+$	Etanol deshidrogenasa
Reacción 22	$2 Acetil - CoA \rightarrow Acetoacetil - CoA + CoA$	Tiolasa (acetil-CoA acetil transferasa)
Reacción 23	$Acetoacetil - CoA + Acetato \rightarrow Acetoacetato + Acetil - CoA$	AcetoacetilCoA : acetato CoA transferasa
Reacción 24	$Acetoacetato \rightarrow Acetona + CO_2$	Acetoacetato descarboxilasa
Reacción 25	$Acetoacetil - CoA + NADH \rightarrow 3 - Hidroxibutiril - CoA + NAD^+$	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa
Reacción 26	$3 - Hidroxibutiril - CoA \rightarrow Crotonil - CoA + H_2O$	Crotonasa
Reacción 27	$Crotonil - CoA + NADH \rightarrow Butiril - CoA + NAD^+$	Butiril-CoA deshidrogenasa
Reacción 28	$Butiril - CoA + P_i \rightarrow Butiril - P + CoA$	Fosfato butiril transferasa (fosfotransbutirilasa)
Reacción 29	$Butiril - P + ADP \rightarrow Butirato + ATP$	Butirato quinasa
Reacción 30	$Acetoacetil - CoA + Butirato \rightarrow Acetoacetato + Butiril - CoA$	AcetoacetilCoA : butirato CoA transferasa
Reacción 31	$Butiril - CoA + NADH \rightarrow Butiraldehído + CoA + NAD^+$	Butiraldehído deshidrogenasa
Reacción 32	$Butiraldehído + NADPH \rightarrow Butanol + NADP^+$	Butanol deshidrogenasa

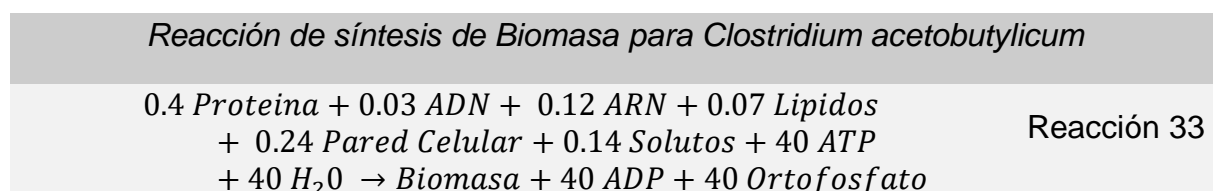
2.6.2. Reacción de síntesis de biomasa

La reacción de síntesis de biomasa es relevante para poder describir el crecimiento de un microorganismo a modelar, permitiendo definir correctamente los objetivos de optimización y las restricciones, pues se debe maximizar la producción del metabolito de interés (H_2) sujeto a la restricción de maximizar el crecimiento de los microorganismos durante el proceso, es decir la formación de biomasa.

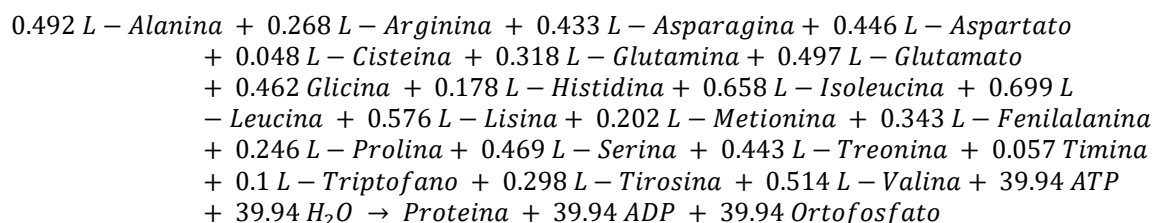
La reacción de síntesis de biomasa describe la conformación del contenido celular a partir de sus macromoléculas. Se puede expresar matemáticamente como la suma de las macromoléculas que componen la célula, es decir, ácidos nucleicos (ADN/ARN), proteínas, lípidos, carbohidratos, pared celular y solutos del citoplasma, además de los requerimientos de consumo energético durante el crecimiento (expresado como ATP). De este modo es posible expresar la reacción de síntesis de biomasa como:



Para el trabajo, se empleó la reacción de síntesis de biomasa que se muestra a continuación (Fuente [38]):



Donde, cada una de las macromoléculas de la Reacción 33, puede ser descrita por la suma de los polímeros que los componen, por ejemplo, para las proteínas, como la suma de la composición de aminoácidos:



Y así, para cada una de las componentes, como se muestra en el Anexo A.

2.7. Modelación del metabolismo celular

El metabolismo celular se puede describir por medio de todas las reacciones bioquímicas que ocurren en el interior de una célula. Las redes metabólicas de un microorganismo tienen que ser robustas y a la vez plásticas pues, deben mantener el equilibrio celular (homeostasis) en respuesta a cambios o perturbaciones del medio ambiente.

La ingeniería metabólica tiene entonces por objetivo el diseño de microorganismos para la producción rentable de algún producto de interés a nivel mundial. En este marco se encarga tanto del diseño, construcción y optimización de las redes o vías metabólicas de un microorganismo específico.

Las metodologías matemáticas para la modelación de las rutas metabólicas de un microorganismo, suelen adoptar un enfoque basado en la reconstrucción del metabolismo por medio de ecuaciones y el uso de restricciones, por lo que emplear herramientas computacionales como la *toolbox* COBRA (*Constraint-Based Reconstruction and Analysis*) resultan de gran utilidad.

Existen varios tipos de modelos metabólicos, de acuerdo con el nivel de información que estos disponen sobre el microorganismo, su genoma, las reacciones del metabolismo, entre otros parámetros y la posibilidad de correlacionar estos parámetros entre sí.

Los modelos metabólicos que establecen una relación entre el metabolismo, el genoma, el transcriptoma y el proteoma de un microorganismo, se denominan estequiométricos. A este marco, se le suele denominar escala de genoma.

Los modelos metabólicos que poseen tanto información del genoma como de las rutas metabólicas de un microorganismo, se denominan de modelos de escala genómica. Estos relacionan la información sobre los genes de un microorganismo, las enzimas que estos genes expresan y las reacciones que estas enzimas median en el metabolismo. Se basan en poder caracterizar el fenotipo de un microorganismo al establecer la correlación [Gen – Enzima – Reacción].

Hay dos formas principales de establecer esta correlación:

Top-Down (de arriba hacia abajo): se conocen las rutas metabólicas y se asocian con los genes del microorganismo, es decir:

Ruta metabólica → Reacción → Enzima/proteína → Gen

Bottom-Up (de abajo hacia arriba): se conoce el genoma del microorganismo y se asocia con las rutas de su metabolismo, es decir:

Gen → Enzima/proteína → Reacción → Rutas metabólicas

2.8. Análisis de flujos metabólicos

El análisis de flujos metabólicos (MFA) permite describir una ruta metabólica mediante la cuantificación de las velocidades de reacción de una red, esto es, mediante la distribución de flujos, para ciertas condiciones de operación. Se puede analizar cuáles son los fenotipos de los microorganismos, es decir, caracterizar sus capacidades metabólicas. Además, se pueden predecir cuales serían los efectos al realizar modificaciones genéticas *in-silico*.

Los flujos metabólicos se pueden cuantificar mediante un modelo estequiométrico, al considerar todas (o la gran mayoría) de las reacciones intracelulares, realizando un balance de masas sobre los metabolitos intracelulares. Esto quiere decir que el punto de partida es un grupo de ecuaciones que relacionan las velocidades de reacción (flujos) de los sustratos de entrada y los metabolitos extracelulares ya sean productos o sub-productos.

En el esquema de la Figura 8 se muestra como ejemplo, una red metabólica simple, donde hay 5 metabolitos (A, B, C, D y E) que participan en las 11 reacciones del microorganismo (4 reacciones de intercambio con el medio, 7 de metabolismo interno).

En este caso el metabolito A es el único que se incorpora desde el medio extracelular hacia el medio intracelular, B es un metabolito intermediario, mientras que C, D y E son los productos liberados al medio externo.

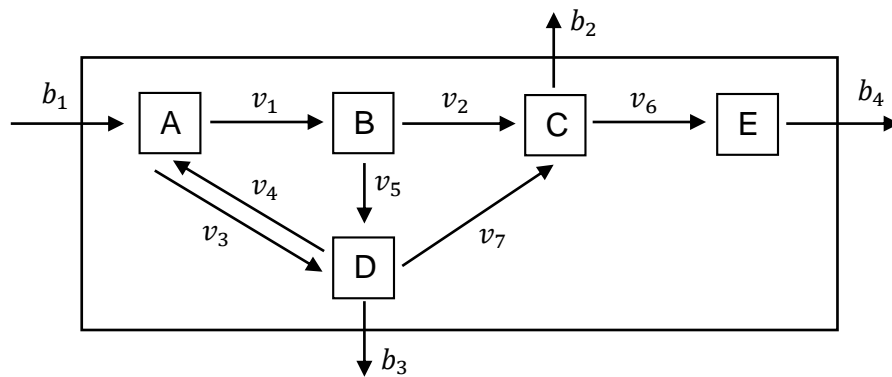


Figura 8: Esquema de una red metabólica simple. Metabolitos A, B, C, D y E. Las flechas indican los respectivos flujos. Los flujos b_i corresponden a los flujos externos (de intercambio). Los flujos v_i corresponden a flujos internos.

Si en este esquema se realiza un balance de masa para cada metabolito intermediario, se obtiene el sistema de ecuaciones diferenciales que se muestra a continuación:

$$\frac{d[A]}{dt} = b_1 + v_3 - v_1 - v_4$$

$$\frac{d[B]}{dt} = v_1 - v_2 - v_5$$

$$\frac{d[C]}{dt} = v_2 + v_7 - v_6 - b_2$$

$$\frac{d[D]}{dt} = v_4 + v_5 - v_3 - v_7 - b_3$$

$$\frac{d[E]}{dt} = v_6 - b_4$$

Este sistema de ecuaciones se puede reescribir de forma matricial de la siguiente forma:

$$\begin{bmatrix} \frac{d[A]}{dt} \\ \frac{d[B]}{dt} \\ \frac{d[C]}{dt} \\ \frac{d[D]}{dt} \\ \frac{d[E]}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & | & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & | & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & | & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 1 & 0 & -1 & | & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & | & 0 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ - \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \end{bmatrix}$$

De forma simplificada se puede expresar como:

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot v$$

Donde podemos identificar tres componentes principales: el vector de concentraciones de metabolitos (X), la matriz de coeficientes estequiométricos (S) y el vector de flujos (v).

De esta ecuación es posible obtener, en condiciones de estado estacionario para las concentraciones de metabolitos, la siguiente expresión:

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot v = 0$$

Es posible asumir esto, pues los cambios a nivel de flujos metabólicos ocurren rápidamente frente a perturbaciones en el medio extracelular, en comparación con los procesos transcriptómicos.

A partir de esta expresión es posible despejar los flujos internos desconocidos en el vector v , pues en la mayoría de los casos es posible medir algunos flujos de intercambio de manera empírica o bien pueden ser estimados de alguna forma analítica.

Se puede definir el tipo de sistema a resolver de acuerdo con los grados de libertad que este posee. Los grados de libertad permiten saber cuántas variables se deben definir o conocer para poder resolver el sistema y corresponden al rango de la matriz S , es decir:

$$GL = \text{Rango}(S)$$

El rango de la matriz S es el número de filas (o indistintamente columnas) linealmente independientes entre sí. Cabe destacar que el rango de una matriz siempre se encuentra acotado por el menor número entre las filas (m) y las columnas (n) de la matriz.

$$0 \leq GL = \text{Rango}(S) \leq \min(m, n)$$

Si los grados de libertad del sistema resultan ser cero, el sistema se denomina determinado y posee una única solución. Esto quiere decir que existen suficientes mediciones experimentales que permiten calcular los flujos desconocidos de v . Este caso corresponde a un análisis de flujos metabólicos (MFA).

Por otro lado, si los grados de libertad del sistema resultan ser mayores que cero, significa que el sistema se encuentra sub-determinado y se pueden obtener infinitas soluciones. Para resolver este caso, se deben agotar la mayor cantidad de grados de libertad posibles por medio de la obtención analítica de flujos a partir de datos experimentales. Consiste en un problema optimización donde se suelen usar métodos de programación lineal. Este caso corresponde a un balance de flujos metabólicos (FBA).

2.9. Bases matemáticas sobre el MFA

Para estudiar la dinámica interna de los microorganismos y las interacciones que mantienen con el entorno en el que se desarrollan, se emplean herramientas de la biología de sistemas y modelamiento matemático, que permiten realizar un análisis de las diferentes reacciones que ocurren en el interior de los microorganismos logrando describir los flujos de metabolitos entre ellos y el medio donde crecen, a este tipo de simulación, se le denomina análisis de flujos metabólicos o MFA, de las siglas en inglés *metabolic flux analysis*.

Para realizar el estudio y modelamiento de las rutas metabólicas de *Clostridium*, que intervienen en la generación/consumo de H_2 , es necesario establecer mediante expresiones matemáticas, cuáles son las reacciones que se hallan en esta red metabólica de interacciones.

El sistema de reacciones metabólicas completo quedaría descrito por la siguiente ecuación matricial (Ecuación 1):

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot v - b \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde, x es un vector de dimensión m , con la concentración de cada uno de los metabolitos en el interior de una célula:

$$x = \begin{bmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_m \end{bmatrix}$$

S es la matriz de estequiometria, de dimensiones $m \times n$, cuyos coeficientes corresponden a los coeficientes estequiométricos (a_{ij}) de las m especies, para cada una de las n reacciones ya balanceadas:

$$S = \begin{bmatrix} a_{11} & \dots & a_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & \dots & a_{mn} \end{bmatrix}$$

Donde a_{ij} corresponde al coeficiente estequiométrico de la especie i en la reacción j .

v es un vector de flujos, en pseudo estado estacionario, de dimensión n , con los flujos metabólicos de cada una de las reacciones que ocurren en el interior de una célula:

$$v = \begin{bmatrix} v_1 \\ \vdots \\ v_n \end{bmatrix}$$

b es el vector de intercambio neto, de dimensión m , el cual posee las tasas de transportes netos medibles experimentalmente, entre el interior y exterior de una célula:

$$b = \begin{bmatrix} b_1 \\ \vdots \\ b_m \end{bmatrix}$$

De este modo, al reescribir la Ecuación 1 de forma extendida se obtiene la Ecuación 2:

$$\begin{bmatrix} \frac{dx_1}{dt} \\ \vdots \\ \frac{dx_m}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{11} & \dots & a_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & \dots & a_{mn} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} v_1 \\ \vdots \\ v_n \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} b_1 \\ \vdots \\ b_m \end{bmatrix} \quad \text{Ecuación 2}$$

En un sistema celular, las reacciones que se generan en el interior de una célula mantienen tasas de intercambio suficientemente altas, de forma tal que, permiten mantener respuestas oportunas, bajo el efecto de perturbaciones externas o cambios en el entorno y así reajustar los niveles de intercambio rápidamente. Es por lo anterior que es posible suponer la existencia de un pseudo-estado estacionario para las tasas de intercambio a nivel celular. Al considerar esta suposición se obtiene un sistema matricial lineal y homogéneo, expresado en la Ecuación 3:

$$S \cdot v - b = \frac{dx}{dt} = 0 \quad \text{Ecuación 3}$$

Reescribiendo el siguiente sistema simplificado, se obtiene la Ecuación 4, donde se observa que se requiere conocer la estequiometría de las reacciones y las tasas de intercambio neto, de cada una de ellas para conocer el flujo de cada reacción:

$$S \cdot v = b \quad \text{Ecuación 4}$$

Una vez obtenidas cada una de las reacciones y especies metabólicas (sustratos, metabolitos intermediarios y productos), el sistema obtenido se expresa de forma matricial, donde la información de cada una de las m especies participantes, se ubica a lo largo de las filas de la matriz S y la información de las n reacciones se ubica en la extensión de las columnas, como se muestra en el Esquema 1:

$$\begin{array}{l}
 S_1 \\
 \vdots \\
 S_i \\
 P_1 \\
 \vdots \\
 P_j \\
 I_1 \\
 \vdots \\
 I_k
 \end{array}
 \rightarrow
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{ccc}
 R_1 & \cdots & R_n \\
 \downarrow & & \downarrow \\
 \begin{bmatrix}
 a_{11} & \cdots & a_{1n} \\
 \vdots & \ddots & \vdots \\
 a_{i1} & \cdots & a_{in} \\
 b_{11} & \cdots & b_{1n} \\
 \vdots & \ddots & \vdots \\
 b_{j1} & \cdots & b_{jn} \\
 c_{11} & \cdots & c_{1n} \\
 \vdots & \ddots & \vdots \\
 c_{k1} & \cdots & c_{kn}
 \end{bmatrix}
 \end{array}
 = S
 \end{array}$$

Esquema 1: Matriz S de estequiometría. Orden vertical de asignación de metabolitos indicado al lado izquierdo. Orden horizontal de asignación de reacciones indicado arriba.

Cabe destacar la siguiente notación, donde los subíndices i, j, k son genéricos:

S_i : corresponde al sustrato i

P_j : corresponde al producto j

I_k : corresponde al metabolito intermediario k

a_{in} : corresponde al coeficiente del sustrato i en la reacción n .

b_{jn} : corresponde al coeficiente del producto j en la reacción n .

c_{kn} : corresponde al coeficiente del metabolito intermediario k en la reacción n .

Puesto que se realiza una distinción entre las diferentes especies que conforman la red metabólica, entre “sustratos”, “intermediarios” y “productos”.

Los sustratos, corresponderán a aquellas especies que generalmente son incorporadas por las células hacia su interior para ser consumidas, por lo que típicamente son un punto de partida en una vía o ruta particular del metabolismo y, por ende, no poseen una especie predecesora.

Los intermediarios corresponderán a aquellas especies que se encuentran siendo participes de múltiples reacciones en el metabolismo celular, cumpliendo tanto el rol de reactivo como el de producto, en las diferentes reacciones, por lo que tienen la particularidad de generarse y consumirse a lo través de las diversas rutas metabólicas.

Los productos corresponderán a aquellas especies que se encuentran siendo el punto final de una vía o ruta particular del metabolismo, y por ende no poseen especies sucesoras. Generalmente corresponden a los productos finales del metabolismo, como lo son sustancias de excreción y desechos.

Esta distinción permite realizar una simplificación a nivel matemático, como se verá más adelante.

En el Esquema 1, se muestra cómo se organizan los coeficientes de las diferentes especies que participan en las reacciones que componen las vías metabólicas que son objeto del estudio, donde se ordena de forma descendente en filas de la matriz S , los sustratos metabólicos (desde S_1 hasta S_i), luego los productos metabólicos finales (desde P_1 hasta P_j) y en tercera instancia, los metabolitos intermediarios (desde I_1 hasta I_k).

De este mismo esquema, se desprende que cada reacción puede ser descrita a lo largo de una columna (como señalan R_1 y R_n), por los coeficientes estequiométricos de las especies que participan en dicha reacción, donde los coeficientes que poseen un valor negativo corresponden a los de aquellas especies que se consumen durante dicha reacción, mientras que los coeficientes con un valor positivo corresponden a los de aquellas especies que se forman. Cuando una especie no es participe de una reacción, su coeficiente estequiométrico en dicha columna es cero.

A continuación, se describe a modo de ejemplo, un sistema metabólico simplificado, con la intención de esclarecer el modo de confección de la matriz S .

La Ecuación 5, representa una reacción genérica entre las especies, S_1 , I_1 y P_1 , mientras que la Ecuación 6, representa una reacción genérica entre las especies S_2 , I_1 y P_2 , cada una de ellas, con sus respectivos coeficientes estequiométricos:



Si se consideran sólo estas dos ecuaciones para confeccionar la matriz S , se tendrían dos sustratos (S_1 y S_2), un intermediario (I_1) y dos productos (P_1 y P_2), formando un total de cinco especies distintas ($m = 5$), para dos reacciones ($n = 2$), por lo que esta matriz S estaría conformada por cinco filas y por dos columnas. La información sería incorporada en la matriz S como se indica a continuación, en el Esquema 2:

$$\begin{bmatrix} -\alpha_1 & 0 \\ 0 & -\alpha_2 \\ \beta_1 & -\beta_2 \\ \delta_1 & 0 \\ 0 & \delta_2 \end{bmatrix} = S$$

Esquema 2: Matriz S y modo de inclusión de coeficientes estequiométricos.

En general, la matriz S de un sistema biológico es una matriz del tipo dispersa, es decir, una gran cantidad de sus coeficientes tiene valor cero, debido a que solo una pequeña fracción del total de metabolitos, intervienen en las diferentes reacciones de manera simultánea.

Para hallar el método de resolución de un MFA es necesario reconocer que tipo de determinación posee, para luego definir una estrategia y hallar la solución del sistema de ecuaciones. Esto se logra mediante la comparación entre el número de grados de libertad (GL) de la matriz S y el número de metabolitos o especies que pueden ser medidas experimentalmente (ME). El número de grados de libertad (GL) de la matriz S está definido como la diferencia entre el número de metabolitos (m) y el número de reacciones (n), es decir:

$$GL = m - n \quad \text{Ecuación 7}$$

De este modo, un sistema estará completamente determinado si los grados de libertad coinciden con el número de metabolitos que pueden ser medidos experimentalmente, es decir $GL = ME$. Sin embargo, si el número de metabolitos que pueden ser medidos de forma experimental, es menor que los grados de libertad del sistema, el sistema se encuentra sub determinado ($GL > ME$) y es necesario incorporar información adicional o restricciones. Por el contrario, si el número de metabolitos que pueden ser medidos experimentalmente es mayor que los grados de libertad, el sistema se encuentra sobre determinado ($GL < ME$).

Cuando el sistema se encuentra determinado, la solución corresponde al vector v que se obtiene a partir de la Ecuación 4, luego de pre-multiplicar por la inversa de la matriz S , como se muestra en la Ecuación 8:

$$\begin{aligned} S^{-1} \cdot S \cdot v &= S^{-1} \cdot b \\ v &= S^{-1} \cdot b \end{aligned} \quad \text{Ecuación 8}$$

Sin embargo, la matriz S no siempre es del tipo cuadrado ($m = n$), por lo que la solución resulta ser como se muestra en la Ecuación 9:

$$v = \{[S^T \cdot S]^{-1} \cdot S^T\} \cdot b$$

Ecuación 9

Además, al modelar un sistema biológico, se suele incluir un número de reacciones mayor al de metabolitos ($n > m$), por lo que hay un mayor número de variables sin conocer, lo que hace que el sistema tenga más de una posible solución.

2.9. Justificación

Este trabajo pretende esclarecer si existe la posibilidad de modificar las vías metabólicas de *Clostridium acetobutylicum* con el fin de incrementar su capacidad para producir H₂.

Al realizar este trabajo se puede demostrar por medio de la simulación computacional del metabolismo de *Clostridium acetobutylicum* que, al realizar modificaciones en sus vías metabólicas, el incremento en la productividad de H₂ es posible.

El aporte de este trabajo consistiría entonces, en encontrar aquellas vías metabólicas que sean los mejores candidatos para realizar modificaciones que incrementen la producción de H₂. Los candidatos encontrados constituirían el punto de partida para futuros trabajos de biotecnología e ingeniería genética que busquen optimizar la bio-producción de H₂ en *Clostridium acetobutylicum* o incluso, en otros microorganismos similares.

Este trabajo tiene por alcance, la predicción del efecto en la producción de H₂ por *Clostridium acetobutylicum* al realizar modificaciones genéticas *in-silico*. Es por esto, que estas modificaciones deben ser realizadas de manera *in-situ*, es decir, en los propios microorganismos, para corroborar la obtención de los efectos predichos por este trabajo.

Anteriormente se han confeccionado modelos metabólicos que predicen el comportamiento de *Clostridium acetobutylicum*, pero con otros fines como, por ejemplo, la búsqueda de mejoras en la producción industrial de solventes, siendo este el principal uso que estos microorganismos han tenido durante los últimos años.

Por otro lado, el interés actual se ha desplazado hacia la búsqueda de fuentes energéticas que reemplacen a los combustibles fósiles, tanto por la disponibilidad de estos recursos como por los impactos ambientales que su consumo conlleva, planteándose entonces, la obtención libre de emisiones de efecto invernadero, resultado la bio-producción (por medio de microorganismos) de H₂ una gran alternativa.

El bio-H₂ proyecta múltiples usos como el almacenamiento energético, la generación de calor a nivel industrial (en fundiciones de metal, elaboración de cemento y calefacción doméstica) y en transporte (vehículos ligeros, camiones, aviones y barcos).

Se puede usar el H₂ como combustible para alimentar celdas electroquímicas. Las celdas de combustible que utilizan H₂ para la combustión, poseen la peculiaridad de producir electricidad, vapor de agua y calor, como sus productos, constituyendo un mecanismo limpio de generación de energía eléctrica.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

El objetivo principal de esta memoria es modelar los flujos de las rutas metabólicas de *Clostridium acetobutylicum*, que se encuentran relacionadas con la producción de bio-H₂, para identificar alguna vía como un potencial candidato para una modificación genética, por medio de la simulación de cambios en los flujos de la red metabólica, con el propósito de generar un incremento en la productividad de H₂.

3.2. Objetivos Específicos

1. Simular computacionalmente un modelo metabólico de *Clostridium sp.* considerando como restricciones los rangos biológicamente factibles para los flujos metabólicos y como objetivo de optimización, el incremento en la producción de bio-H₂.
2. Identificar vías metabólicas que sean candidatos para realizar modificaciones genéticas para incrementar la producción de bio-H₂, por medio del uso de algoritmos de optimización.

4. Metodología

4.1. Modelo metabólico de *Clostridium acetobutylicum*: ATCC 824

Se empleó un modelo metabólico simplificado de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, sin considerar la escala genómica, que consta de 210 vías metabólicas, 1.056 reacciones enzimáticas y 88 reacciones de transporte (detallado en la planilla Excel “*Metabolic Network*” adjunta como el Anexo B).

Se implementó por medio del software Matlab, con ayuda de la *toolbox* COBRA (*Constraints Based Reconstruction and Analysis*) que permite desarrollar algoritmos para el análisis de las rutas metabólicas.

Se consideró la formación de Piruvato a partir de glucosa como precursor en la síntesis de H₂, pues como se observa en la Reacción 14 y Reacción 15, se requiere de *Piruvato-Ferredoxina-Reducida* para la formación del gas de interés y se estableció arbitrariamente un consumo (*up-take*) de glucosa de 10 [mmol/gDW · h] como fuente de carbono.

Se emplearon los algoritmos FVSEOF y búsqueda de Nodos principales para encontrar las reacciones y metabolitos más relevantes en la distribución de flujos, para luego realizar un análisis integrado entre ambos algoritmos que permita robustecer la selección por medio de la conjunción de los dos diferentes enfoques.

4.2. Algoritmo FVSEOF (*Flux Variability Scanning based on Enforced Objective Flux*)

El algoritmo FVSEOF consiste en realizar un proceso iterativo de optimización sobre las distribuciones de flujo en un problema de balance de flujos tradicional, en el cual se establecen dos flujos como funciones objetivo de maximización (en este caso, biomasa e hidrógeno), para estudiar el comportamiento de los demás flujos dentro de la red metabólica.

Para poder emplear el algoritmo de FVSEOF, descrito por Choi et. al. (2010) [39], se desarrolló un script que genera 10 etapas (*Steps*), donde cada una corresponde a una distribución de flujos. La primera etapa (*Step1*) o distribución de flujos se obtiene al maximizar la producción de biomasa, la décima etapa (*Step10*) se obtiene al maximizar la producción de H₂, mientras que las etapas intermedias (*Steps K*) corresponden a maximizar la producción de biomasa con flujos crecientes en la generación de H₂.

$$\begin{aligned} \text{Step 1} \quad & \text{Max } v_{\text{biomasa}} \text{ s. a. } \sum_{j=1}^n S_{ij} \cdot v_j^{\text{Step1}} = 0 \quad / \quad \forall i \in M \text{ y } \forall j \in N \\ & \text{con: } lb_j \leq v_j \leq ub_j \text{ y } 0 \leq v_{H_2} \leq 1000 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Step 10} \quad & \text{Max } v_{H_2} \text{ s. a. } \sum_{j=1}^n S_{ij} \cdot v_j^{\text{Step10}} = 0 \quad / \quad \forall i \in M \text{ y } \forall j \in N \\ & \text{con: } lb_j \leq v_j \leq ub_j \text{ y } 0 \leq v_{H_2} \leq 1000 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Step } k \quad & \text{Max } v_{\text{biomasa}} \text{ s. a. } \sum_{j=1}^n S_{ij} \cdot v_j^{\text{Step } k} = 0 \quad / \quad \forall i \in M \text{ y } \forall j \in N \\ & \text{con: } lb_j \leq v_j \leq ub_j \text{ y } 0 \leq v_{H_2} \leq 1000 \\ & k \cdot R \leq v_{H_2} \leq 1000 \quad / \quad \forall k \in \{1, 2, \dots, 9\} \\ & R = \frac{v_{H_2}^{\text{Step 10}}}{10} \end{aligned}$$

S_{ij} es el coeficiente estequiométrico del metabolito i en la reacción j . M es el conjunto de metabolitos y N el conjunto de reacciones. lb_j y ub_j son los límites inferiores (*lower bound*) y superiores (*upper bound*) para los valores de flujo en la reacción j .

Para reacciones reversibles los límites inferiores y superiores son $-1000 \leq v_j \leq 1000$, mientras que para reacciones irreversibles son $0 \leq v_j \leq ub_j$.

Con este algoritmo es posible identificar cuatro tipos de comportamiento en los flujos de las reacciones, a medida que se avanza por las etapas: flujos crecientes, decrecientes, constantes u oscilantes, como se muestran en la Figura 9, sin embargo, la existencia de múltiples soluciones genera un grado de incertidumbre sobre si el comportamiento de los flujos dentro de alguno de los cuatro grupos, se mantiene siempre del mismo tipo.

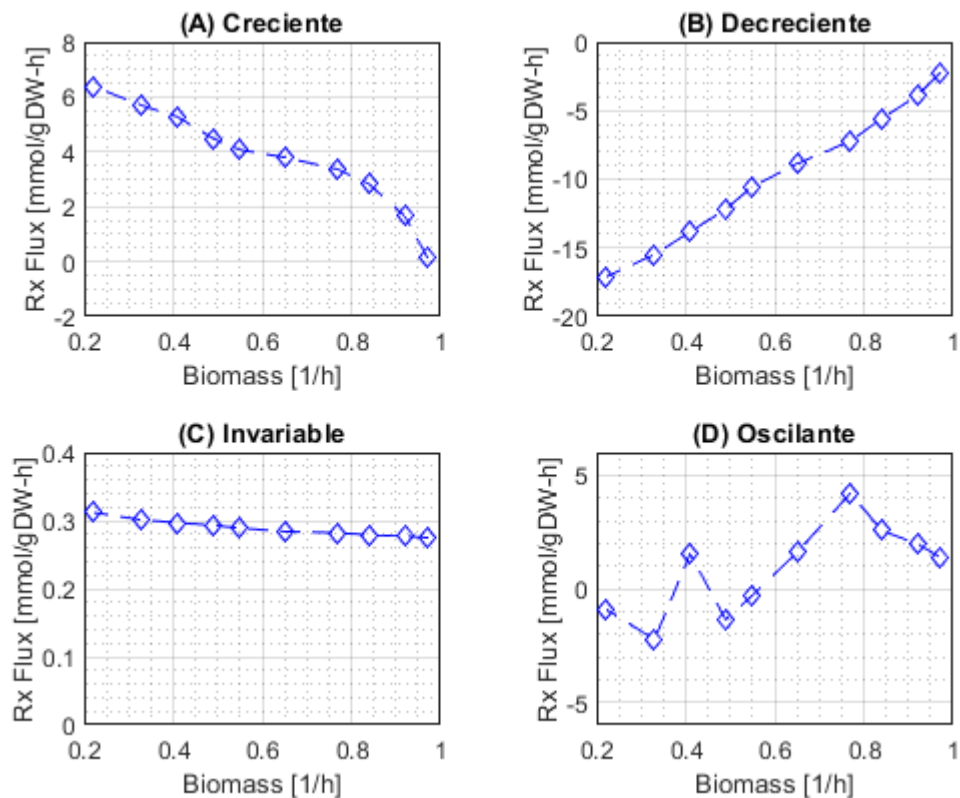


Figura 9: Clasificación del tipo de flujo de las reacciones en el algoritmo FVSEOF. (A) Creciente (B) Decreciente (C) Invariable (D) Oscilante. Cada gráfico muestra el valor del flujo de una reacción según el valor de biomasa durante los *steps* del algoritmo, que suceden correlativamente de derecha a izquierda, desde el primero al décimo.

Lo anterior implica que se debe realizar un análisis de variabilidad de flujos, como se describe en trabajo de Mahadevan & Schilling [40], el que consiste en fijar la función objetivo en su valor óptimo, para luego minimizar y maximizar los flujos de cada reacción.

Este análisis se realiza mediante el comando *fluxVariability* en la *toolbox* COBRA en cada una de las etapas o *Steps*, para los flujos con carácter decreciente, pues se descartan del análisis de búsqueda todos aquellos flujos que no son de interés por su carácter de tipo creciente, invariable u oscilante ante el aumento del flujo hacia la formación de H₂.

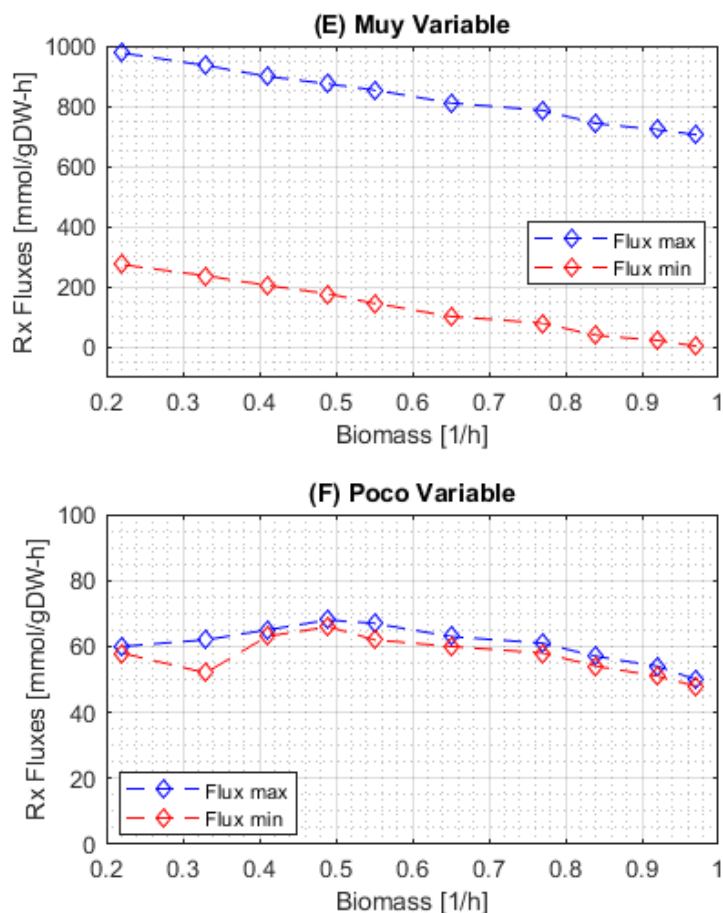


Figura 10: Clasificación del tipo de flujo según el análisis de variabilidad. (E) Muy Variable (F) Poco Variable. Cada gráfico muestra el valor de los flujos máximo y mínimo para una reacción, según el valor de biomasa durante los *steps* del algoritmo, que suceden correlativamente de derecha a izquierda, desde el primero al décimo.

Este método no entrega el número de cuantas distribuciones de flujos pueden existir, dado que el espacio de soluciones tiende a ser infinito, sino que, entrega el rango de variación para cada uno de los flujos decrecientes.

Así, los flujos de carácter decreciente que resultan ser poco variables se clasifican como $FVSEOF_{down}$ y constituyen la base de búsqueda como candidatos plausibles de delección con el objetivo de aumentar el flujo de formación de H_2 .

4.3. Algoritmo de Búsqueda de Nodos Principales (BNP)

Los nodos principales son todos aquellos metabolitos cuya partición de flujos varía en mayor proporción al transitar de una condición a otra [41].

Se identificaron los nodos principales realizando un procedimiento que consta de tres partes. La primera consiste en guardar los rangos de flujo obtenidos del algoritmo

FVSEOF. En la segunda parte, se estimó el valor de la diferencia porcentual de la partición de flujos de cada nodo, a este valor se le denomina *Score*.

El *Score* para un Nodo o metabolito, se calcula como la norma de la diferencia porcentual de su partición de flujos entre cada etapa (*Step*) del algoritmo FVSEOF.

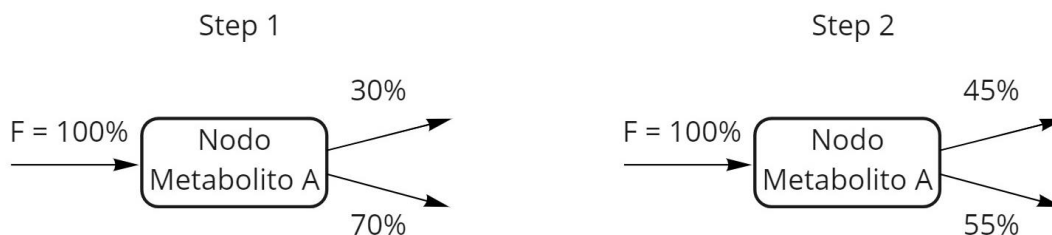


Figura 11: Ejemplo de partición de Flujos de un metabolito A entre el *Step 1* y *Step 2* del algoritmo FVSEOF.

De este modo, para el ejemplo de la Figura 11, el *Score* del metabolito A entre los *Steps* 1 y 2 se calcula como:

$$Score_A^{1-2} = \sqrt{(30 - 45)^2 + (70 - 55)^2}$$

Posteriormente, la tercera parte consiste en ordenar todos los Nodos según el valor promedio de *Score* obtenido entre cada etapa o *Step* para cada Nodo, generando así, un *Ranking* de selección. Luego se eligen un numero arbitrario de entre los mejores puestos, como los Nodos principales.

Se suelen descartar algunos metabolitos para representar Nodos principales como por ejemplo ATP, NADH y NADPH debido a que su participación en múltiples reacciones dificulta realizar el análisis.

4.4. Análisis Integrado

Como se señaló anteriormente, el enfoque del algoritmo FVSEOF tiene por objetivo encontrar un conjunto de reacciones ($FVSEOF_{down}$) que tienen como comportamiento, un flujo decreciente y poco variable, cuando se maximiza la formación de H₂, sujeto a la máxima formación de biomasa.

Por otro lado, el enfoque del algoritmo de Búsqueda de Nodos Principales tiene por función encontrar aquellos metabolitos que tienen una mayor partición de flujos, es decir, el destino metabólico de sus flujos cambia en mayor proporción, cuando se busca maximizar la producción de H₂.

Para robustecer los resultados obtenidos por medio de ambos algoritmos FVSEOF y BNP, se deben buscar coincidencias entre sus resultados, analizando desde un punto de vista topológico para una red metabólica, es decir, como reacciones bioquímicas que ocurren dentro de un conjunto de microorganismos. Para este caso, se analizaron los metabolitos encontrados como Nodos Principales que son participes en las reacciones $FVSEOF_{down}$,

Capítulo II

5. Resultados

5.1. Simulación del metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*: Análisis de los flujos metabólicos (MFA) por medio de los algoritmos FVSEOF y BNP

Para lograr el primer objetivo específico, se planteó el problema de balance de flujos metabólicos (FBA) tradicional para simular el metabolismo de *Clostridium acetobutylicum* por medio del software Matlab, con el modelo simplificado ATCC 824.

Este problema de FBA consistió en resolver el sistema matricial compuesto por las reacciones enzimáticas conocidas (1.056 en total) y los metabolitos que participan en dichas reacciones.

Se plantearon las restricciones para los flujos de cada una de las reacciones, en sus límites inferiores y superiores, de acuerdo con el tipo de reacción al que corresponden (para reacciones reversibles $-1000 \leq v_j \leq 1000$ y $0 \leq v_j \leq ub_j$ para reacciones irreversibles) según se detalla en el Anexo B, obteniendo como espacio-solución los posibles vectores de flujos internos.

Se realizó el análisis de los flujos metabólicos (MFA) obtenidos utilizando los dos algoritmos de búsqueda analítica y optimización planteados anteriormente (FVSEOF y BNP) por medio de la *toolbox* Cobra.

El objetivo de optimización se estableció como una doble restricción al maximizar la síntesis de H₂ sujeto a la máxima producción de biomasa.

5.1.1. Reacciones que poseen flujo decreciente y poco variable cuando se maximiza la producción de H₂ y la generación de biomasa.

A partir de la ejecución del algoritmo de búsqueda de reacciones (FVSEOF), se obtuvieron 81 reacciones cuyos flujos poseen un carácter decreciente y poco variable, es decir, se clasifican como $FVSEOF_{Down}$, al maximizar la producción de H₂, sujeto a la máxima síntesis de biomasa.

El número de reacciones obtenidas se indican en la Tabla 2. Se encuentran ordenadas según la ruta metabólica a la cual pertenecen de acuerdo a la clasificación KEGG.

Tabla 2: Número de reacciones con flujos decrecientes y poco variables obtenidas por el algoritmo FVSEOF, clasificadas de acuerdo a la ruta a la cual pertenecen (según KEGG).

Rutas (KEGG)	N° de Reacciones
Metabolismo de Alanina y Aspartato	1
Metabolismo de Amino azúcares	3
Metabolismo de Arginina y Prolina	2
Metabolismo de Butanoato	4
Metabolismo de Cisteína	3
Metabolismo de D-glutamina y D-glutamato	1
Biosíntesis de Ácidos grasos	6
Metabolismo de Fructosa y Manosa	3
Glicolisis / Glucogénesis	5
Síntesis de H ₂	1
Metabolismo de Histidina	9
Vía de Pentosas Fosfato	8
Biosíntesis de Fenilalanina, Tirosina y Triptófano	5
Metabolismo de Propanoato	1
Metabolismo de Purinas	5
Metabolismo de Pirimidinas	9
Metabolismo de Piruvato	1
Reacciones de Transporte	9
Biosíntesis de Valina, Leucina e Isoleucina	4
Total	81

5.1.2. Metabolitos que actúan como nodos principales al maximizar la producción de H₂ y la formación de biomasa.

A ejecutar el algoritmo de búsqueda metabolitos (BNP), se obtuvo que los metabolitos: acetil-CoA, acetoacetyl-CoA, CoA, ferredoxina y piruvato, tienen la mayor participación de flujos, por lo que corresponden a los Nodos Principales de la red metabólica, cuando se maximiza la producción de H₂ sujeto a la máxima formación de biomasa.

Se debe destacar que se descartaron aquellos Nodos que no son participes en las rutas de formación de H₂ y aquellos que son participes en múltiples vías metabólicas, como por ejemplo ATP, dado que dificultan el análisis o que no es posible realizar interpretaciones correctamente.

En la Tabla 3 se muestran las reacciones donde los metabolitos actúan como Nodos principales cuando se maximiza la producción de H₂ y se indican las participaciones de flujo de cada una en valor absoluto.

Tabla 3: Nodos Principales y las reacciones donde actúan, clasificadas según la ruta metabólica a la cual pertenecen (según KEGG). Se indica el valor absoluto de la partición de flujos para cada reacción.

Nodo Principal	Reacción ID	Clasificación de las rutas (KEGG)	Partición de Flujo [$mmol/gDW \cdot h$]
Acetil-CoA	55332	Metabolismo de Amino azúcares	1.6
Acetil-CoA	00238	Metabolismo de Butanoato	0.2
Acetil-CoA	01196	Síntesis de H ₂	1
Acetil-CoA	00742	Metabolismo de Propanoato	0.6
Acetil-CoA	01359	Metabolismo de Propanoato	0.65
Acetil-CoA	00228	Metabolismo de Piruvato	0.1
Acetil-CoA	00230	Metabolismo de Piruvato	0.1
Acetoacetil-CoA	00238	Metabolismo de Butanoato	1
Acetoacetil-CoA	01365	Metabolismo de Butanoato	1
Acetoacetil-CoA	01975	Metabolismo de Ácidos grasos	0.5
Acetoacetil-CoA	01359	Metabolismo de Propanoato	0.65
Coenzima_A	00238	Metabolismo de Butanoato	0.06
Coenzima_A	01172	Metabolismo de Butanoato	0.08
Coenzima_A	01174	Metabolismo de Butanoato	0.08
Coenzima_A	01197	Ciclo del Citrato (TCA)	1.4
Coenzima_A	01196	Síntesis de H ₂	1
Coenzima_A	00228	Metabolismo de Piruvato	0.06
Coenzima_A	00230	Metabolismo de Piruvato	0.06
Coenzima_A	00259	Ciclo de Urea y Metabolismo de grupos Amino	0.05
Ferredoxina	01197	Ciclo del Citrato (TCA)	0.15
Ferredoxina	01195	Síntesis de H ₂	0.03
Ferredoxina	01196	Síntesis de H ₂	0.03
Ferredoxina	05875	Síntesis de H ₂	0.05
Ferredoxina	00790	Reducción y fijación de Nitrógeno	0.01
Ferredoxina	00791	Reducción y fijación de Nitrógeno	0.01
Piruvato	00200	Glicolisis / Glucogénesis	0.35
Piruvato	00703	Glicolisis / Glucogénesis	0.35
Piruvato	01196	Síntesis de H ₂	0.16
Piruvato	00704	Metabolismo de Piruvato	0.6

Con los resultados anteriores, es decir, el grupo de reacciones tipo $FVSEOF_{Down}$ y el grupo de metabolitos que actúan como nodos principales de la red metabólica, se logró cumplir el primer objetivo específico planteado en este trabajo, puesto que se consiguió por medio de la simulación computacional del metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*, considerando las restricciones de flujos planteadas y los criterios de optimización propuestos.

5.2. Identificación de las vías metabólicas que son candidatos para modificaciones genéticas que incrementen la productividad de H₂: Vías de síntesis de lactato, acetato y butirato

Con el fin de lograr identificar las vías metabólicas que sean candidatos para realizar modificaciones genéticas que incrementen la producción de H₂, es decir, el segundo objetivo específico, se realizó un análisis integrado de los resultados obtenidos por los algoritmos FVSEOF y BNP.

Al relacionar los resultados obtenidos de los algoritmos FVSEOF y BNP se tiene que hay 10 reacciones que coinciden entre los resultados de ambos algoritmos. Estas reacciones se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Reacciones que coinciden entre los resultados de los algoritmos de búsqueda FVSEOF y BNP.

ID	Reacción
00230	$Acetil - CoA + P_i \leftrightarrow Acetil - P + CoA$
00238	$2 Acetil - CoA \leftrightarrow Acetoacetyl - CoA + CoA$
00704	$Piruvato + NADH \leftrightarrow Lactato + NAD^+$
01172	$Butiril - CoA + NADH \leftrightarrow Butiraldehído + CoA + NAD^+$
01174	$Butiril - CoA + P_i \leftrightarrow Butiril - P + CoA$
01195	$Fd_{Red} + NADP^+ \leftrightarrow Fd_{Ox} + NADPH$
01196	$Piruvato + CoA + Fd_{Ox} \leftrightarrow Acetil - CoA + Fd_{Red} + CO_2$
01359	$Acetoacetyl - CoA + Acetato \leftrightarrow Acetoacetato + Acetil - CoA$
01365	$Acetoacetyl - CoA + Butirato \leftrightarrow Acetoacetato + Butiril - CoA$
05875	$Fd_{Ox} + NADH \leftrightarrow Fd_{Red} + NAD^+$

Estas reacciones corresponden a la base de búsqueda de las vías de interés a nivel topológico de la red metabólica de *Clostridium acetobutylicum*, para realizar modificaciones que logren incrementar la producción de H₂.

Es posible observar que las reacciones ID01196 (Reacción 14) y ID00230 (Reacción 18) se encuentran relacionadas con la formación de acetato, la reacciones ID00238 (Reacción 22) y ID001174 (Reacción 28) se relacionan con la formación de butirato mientras que la reacción ID00704 (Reacción 13) se encarga de la formación de lactato.

Por otra parte, las reacciones ID01359 (Reacción 23), ID01365 (Reacción 30) y ID01172 (Reacción 31) están presentes en el consumo de acetato y butirato para la formación de los solventes, acetona, butanol y etanol.

Lo anterior sugiere que la disminución en los flujos de formación de los ácidos acetato, butirato y lactato permite incrementar la producción de H₂, sujeto a la máxima formación de biomasa.

Se planteó realizar la optimización empleando restricciones en los flujos de aquellas reacciones encargadas de la formación de estos ácidos, es decir, restricciones del tipo: $0 \leq v_j \leq ub_j = 0$, lo que correspondería a una delección de los genes que codifican para las enzimas asociadas a la catálisis de dichas reacciones.

A continuación, se comparan los escenarios entre la formación de H₂ sin optimizar y la formación de H₂ con las restricciones impuestas sobre los flujos en las vías de síntesis de los ácidos.

5.2.1. Restricción sobre la vía de síntesis de lactato: Incremento del 3% en el flujo de H₂

Cuando se establece la restricción de flujo nulo para la reacción ID00703, es decir sobre la reacción que permite la síntesis de lactato, se obtiene que hay un incremento en el flujo de síntesis de H₂, de aproximadamente un 3%, en comparación al flujo de H₂ cuando no hay restricciones sobre los flujos.

ID	Reacción	Nº
00704	<i>Piruvato + NADH ↔ Lactato + NAD⁺</i>	Reacción 13

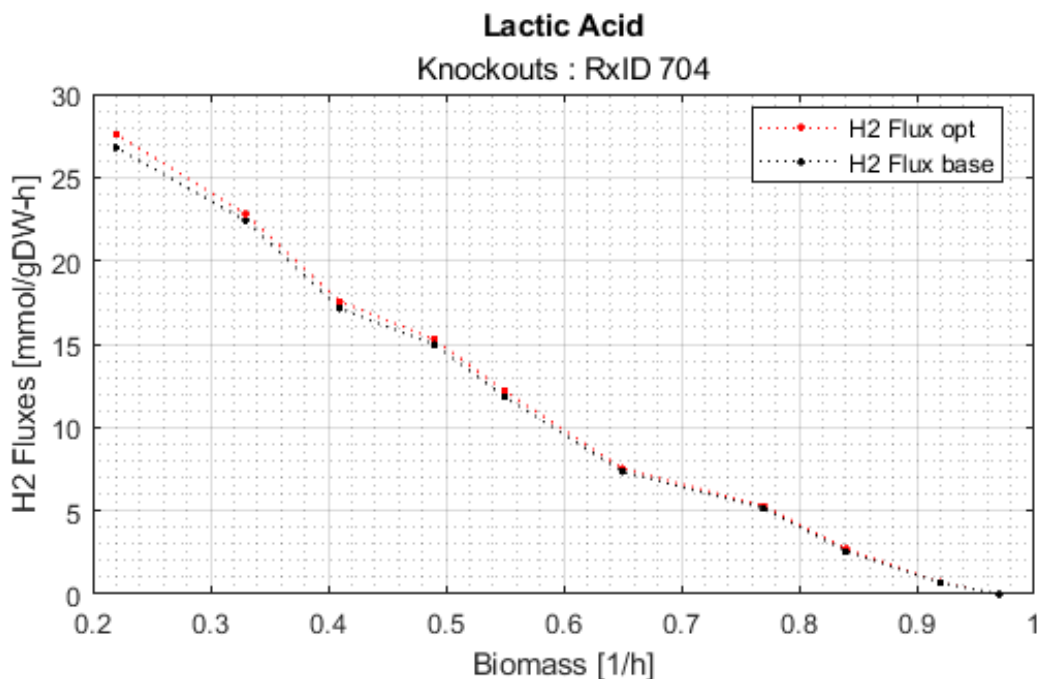


Figura 12: Gráfico de los flujos de H₂ en la simulación del *knockout* de la reacción ID704. En color rojo, el flujo de H₂ cuando no hay formación de lactato. En color negro, el flujo de H₂ cuando no hay restricción. Los *steps* suceden correlativamente de derecha a izquierda, del primero al décimo.

En la Figura 12 se muestran los flujos de H₂ en las 10 etapas de la simulación, cuando se realiza el *knockout* de la reacción encargada de la formación de lactato y cuando no hay restricciones.

El flujo de H₂ incrementa de 26,7834 [mmol/gDW – h] cuando no hay restricción de flujo, a un valor de 27,5867 [mmol/gDW – h] cuando se restringe la síntesis de lactato, en la etapa 10 de la simulación, este aumento de 0,8033 [mmol/gDW – h] corresponde a un incremento del 2,99% del flujo de H₂ en el escenario sin optimizar.

5.2.2. Restricción sobre la vía de síntesis de acetato: Incremento del 11% en el flujo de H₂

Cuando se establece la restricción de flujo nulo para la reacción ID00230 y la reacción ID00315, es decir sobre las reacciones que permiten la síntesis de acetato, se obtiene que hay un incremento en el flujo de síntesis de H₂, de aproximadamente un 11%, en comparación al flujo de H₂ cuando no hay restricciones sobre los flujos.

ID	Reacción	N°
00230	$Acetil - CoA + P_i \leftrightarrow Acetil - P + CoA$	Reacción 18
00315	$ADP + Acetil - P \leftrightarrow ATP + Acetato$	Reacción 19

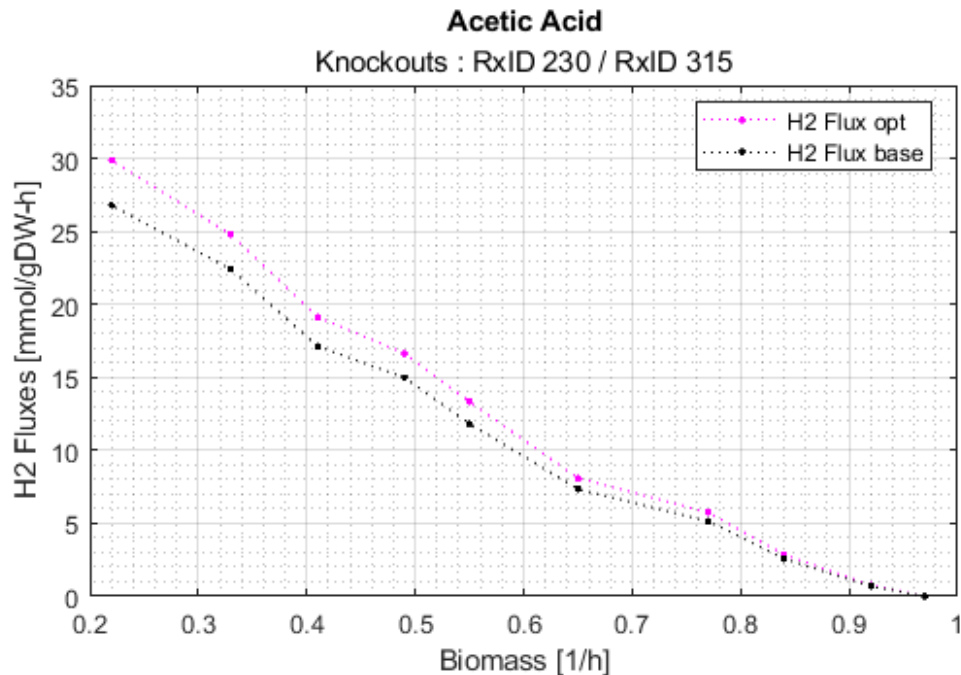


Figura 13: Gráfico de los flujos de H₂ en la simulación del *knockout* de las reacciones ID230 y ID315. En color rojo, el flujo de H₂ cuando no hay formación de acetato. En color negro, el flujo de H₂ cuando no hay restricciones. Los *steps* suceden correlativamente de derecha a izquierda, del primero al décimo.

En la Figura 13 se muestran los flujos de H₂ en las 10 etapas de la simulación, cuando se realiza el *knockout* de las reacciones encargadas de la formación de acetato y cuando no hay restricciones.

El flujo de H₂ incrementa de 26,7834 [mmol/gDW – h] cuando no hay restricciones de flujo, a un valor de 29,8667 [mmol/gDW – h] cuando se restringe la síntesis de acetato, en la etapa 10 de la simulación, este aumento de 3,0833 [mmol/gDW – h] corresponde a un incremento del 11,51% del flujo de H₂ respecto al escenario sin optimizar.

5.2.3. Restricción sobre la vía de síntesis de butirato: Incremento del 17% en el flujo de H₂

Cuando se establece la restricción de flujo nulo para la reacción ID01174 y la reacción ID01688, es decir sobre las reacciones que permiten la síntesis de butirato, se obtiene que hay un incremento en el flujo de síntesis de H₂, de aproximadamente un 17%, en comparación al flujo de H₂ cuando no hay restricciones sobre los flujos.

ID	Reacción	N°
01174	$Butiril - CoA + P_i \leftrightarrow Butiril - P + CoA$	Reacción 28
01688	$ADP + Butiril - P \leftrightarrow ATP + Butirato$	Reacción 29

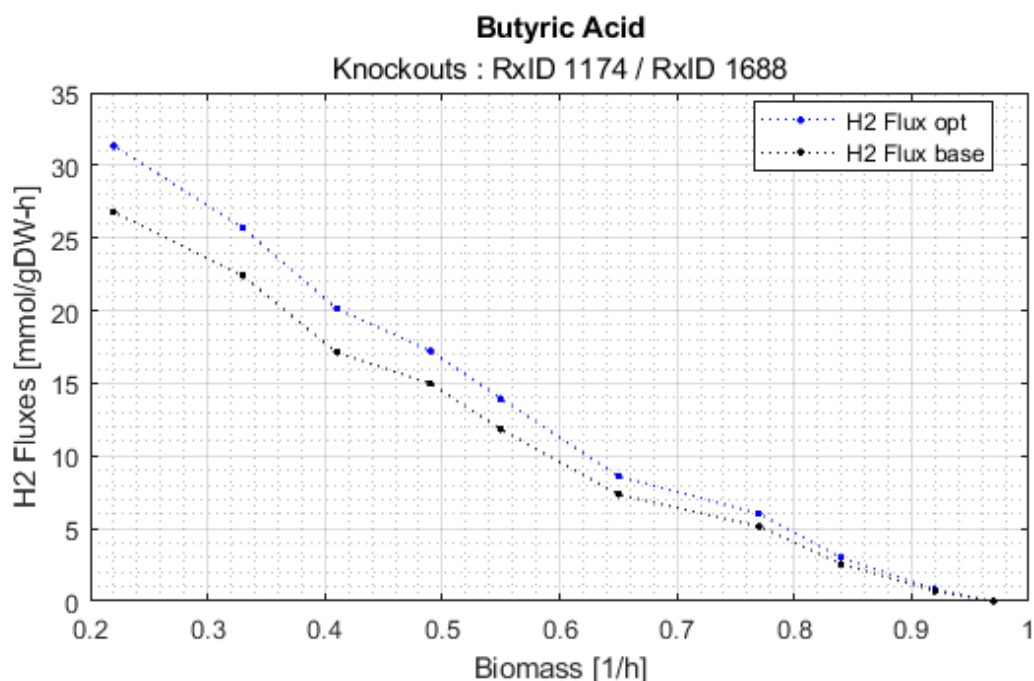


Figura 14: Gráfico de los flujos de H₂ en la simulación del *knockout* de las reacciones ID1174 y ID1688. En color rojo, el flujo de H₂ cuando no hay formación de butirato. En color negro, el flujo de H₂ cuando no hay restricciones. Los *steps* suceden correlativamente de derecha a izquierda, del primero al décimo.

En la Figura 14 se muestran los flujos de H₂ en las 10 etapas de la simulación, cuando se realiza el *knockout* de las reacciones encargadas de la formación de butirato y cuando no hay restricciones.

El flujo de H₂ incrementa de 26,7834 [mmol/gDW – h] cuando no hay restricciones de flujo, a un valor de 31,3466 [mmol/gDW – h] cuando se restringe la síntesis de butirato, en la etapa 10 de la simulación, este aumento de 4,5632 [mmol/gDW – h] corresponde a un incremento del 17,04% del flujo de H₂ respecto al escenario sin optimizar.

5.2.4. Restricción sobre las vías de síntesis de acetato, butirato y lactato: Incremento del 42% en el flujo de H₂

Cuando se establece la restricción de flujo nulo para las reacciones ID00703, ID00230, ID00315, ID01174 y la reacción ID01688, es decir sobre las reacciones que permiten la síntesis de acetato, butirato y lactato, se obtiene que hay un incremento en el flujo de síntesis de H₂, de aproximadamente un 42%, en comparación al flujo de H₂ cuando no hay restricciones sobre los flujos.

ID	Reacción	N°
00704	<i>Piruvato + NADH ↔ Lactato + NAD⁺</i>	Reacción 13
00230	<i>Acetil – CoA + P_i ↔ Acetil – P + CoA</i>	Reacción 18
00315	<i>ADP + Acetil – P ↔ ATP + Acetato</i>	Reacción 19
01174	<i>Butiril – CoA + P_i ↔ Butiril – P + CoA</i>	Reacción 28
01688	<i>ADP + Butiril – P ↔ ATP + Butirato</i>	Reacción 29

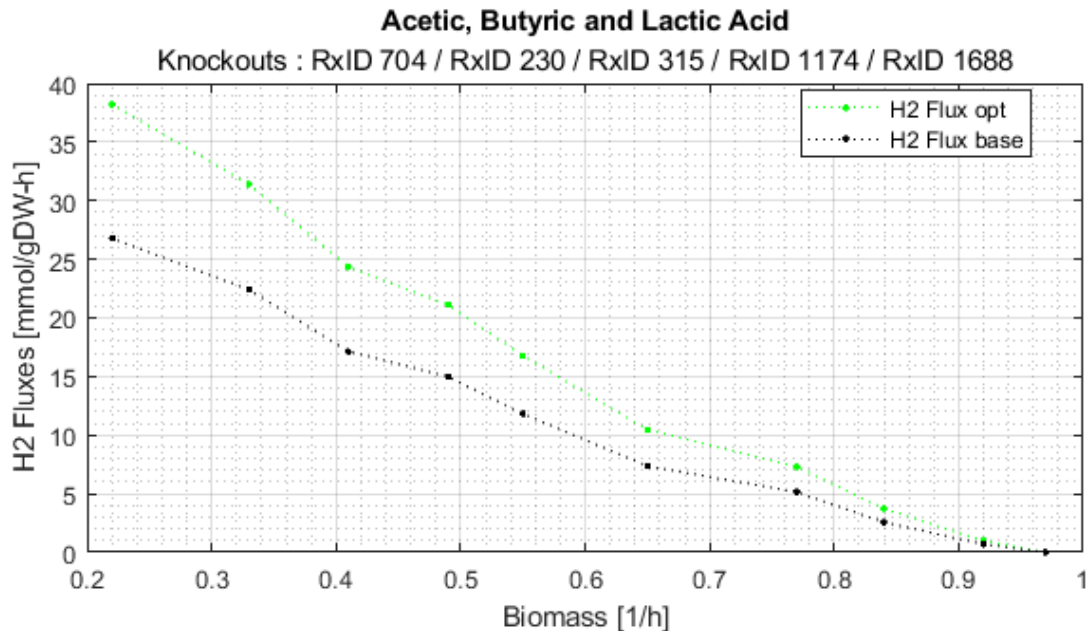


Figura 15: Gráfico de los flujos de H₂ en la simulación del *knockout* de las reacciones ID704, ID230, ID315, ID1174 y ID1688. En color rojo, el flujo de H₂ cuando no hay formación de acetato, butirato ni lactato. En color negro, el flujo de H₂ cuando no hay restricciones. Los *steps* suceden correlativamente de derecha a izquierda, del primero al décimo.

En la Figura 15 se muestran los flujos de H₂ en las 10 etapas de la simulación, cuando se realiza el *knockout* de las reacciones encargadas de la formación de los ácidos (acetato, butirato y lactato) y cuando no hay restricciones sobre los flujos.

El flujo de H₂ incrementa de 26,7834 [mmol/gDW – h] cuando no hay restricciones de flujo, a un valor de 38,2037 [mmol/gDW – h] cuando se restringe la síntesis de ácidos, en la etapa 10 de la simulación, este aumento de 11,4203 [mmol/gDW – h] corresponde a un incremento del 42,64% del flujo de H₂ respecto al escenario sin optimizar.

Para las reacciones asociadas a la reutilización de acetato y butirato en la formación de solventes, es suficiente con constatar si hay una disminución en los flujos de butanol y etanol, además de ver si hay un flujo nulo en la síntesis de acetona (cuando ambos ácidos son de flujo nulo).

No es necesario realizar una restricción del tipo: $0 \leq v_j \leq ub_j = 0$, en los flujos de los solventes, como en el caso anterior, debido a que ya se ha impuesto en formación de los ácidos.

Con el resultado anterior, es decir, al identificar las vías de síntesis de acetato, butirato y lactato como posibles candidatos para realizar modificaciones genéticas que permitirían incrementar la producción de H₂ por parte de *Clostridium acetobutylicum*, se logró cumplir el segundo objetivo específico planteado en este trabajo, puesto que se obtuvieron por medio del uso de algoritmos de búsqueda analítica y optimización de las rutas metabólicas.

Capítulo III

6. Discusión

6.1. Sobre las reacciones con flujo decreciente y poco variable

La mayor parte de las reacciones obtenidas con el algoritmo de búsqueda FVSEOF está compuesta por aquellas reacciones responsables de la formación de aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y otros componentes, precursores en la síntesis de macromoléculas. Concretamente son 49 de las 81 reacciones totales obtenidas, es decir, el 60%.

Lo anterior se justifica al considerar que la optimización del flujo de H₂ se realiza sujeto a la restricción de maximizar la formación de biomasa en primera instancia. Cabe recordar que las reacciones para la síntesis de macromoléculas son las componentes de la reacción de síntesis de biomasa (Reacción 33), como se detalla en el Anexo A.

El porcentaje restante de las reacciones obtenidas tienen como función la obtención de energía. Esto es mediante el procesamiento de azúcares, por las vías de glicólisis, el ciclo del citrato (TCA) y la vía de pentosas-fosfato. Teniendo en consideración la elevada

proporción de ATP que se requiere en la ecuación de síntesis de biomasa, esto se justifica debido a la misma razón previa, es decir, por la restricción de maximizar la formación de biomasa en primera instancia al optimizar el flujo de H₂.

Las reacciones $FVSEOF_{Down}$ obtenidas se pueden subdividir en tres categorías principales, según la cantidad de reacciones obtenidas en cada ruta (clasificación KEGG):

En la primera categoría, se pueden agrupar todas las rutas que poseen entre una y tres reacciones del tipo $FVSEOF_{Down}$. Este grupo tiene un total de 17 reacciones, conformando un 22% del total. Dentro de este grupo, se clasifica solo una reacción en la ruta de síntesis de hidrógeno, según KEGG.

La segunda categoría agrupa las rutas que poseen entre cuatro y seis reacciones del tipo $FVSEOF_{Down}$, conformando el 35% del total obtenido.

La tercera categoría corresponde al grupo de rutas que poseen siete o más reacciones del tipo $FVSEOF_{Down}$, estas rutas componen un 43% del total de reacciones obtenidas.

6.2. Sobre los metabolitos que actúan como nodos principales en la síntesis de H₂

Primero cabe notar que las reacciones que permiten la oxido-reducción de ferredoxina (Reacción 14, Reacción 16 y Reacción 17) son co-limitantes con la reacción de síntesis de H₂ (Reacción 15), donde la disponibilidad de los metabolitos $NAD^+/NADH$, $NADP^+/NADPH$ y ferredoxina, juega un rol de alta importancia. Por otro lado, las vías de consumo de glucosa y pentosa permiten la formación de piruvato, que actúa como precursor del H₂.

Respecto a los nodos principales encontrados por el algoritmo de búsqueda de metabolitos con mayor partición de flujos, cabe señalar que, el nodo con mayor partición de flujo corresponde al acetil-CoA, con 1,6 [$mmol/gDW - h$] para la reacción que actúa en la ruta de los amino azúcares. El coenzim-A corresponde al segundo metabolito con mayor partición de flujo, con 1,4 [$mmol/gDW - h$] ubicado en medio del ciclo del citrato.

Lo anterior indica que estos metabolitos actúan como intermediarios en múltiples vías de obtención de ATP, debido a que permiten flexibilizar los destinos metabólicos de su flujo, por lo que no se puede esclarecer su efecto directo sobre la síntesis de H₂, debido a que la optimización de biomasa presupone una alta demanda de ATP en primer lugar, por sobre la optimización de H₂, sin embargo, si se pueden relacionar de forma más directa, los nodos acetoacetil-CoA y piruvato, que ocupan el tercer puesto de los nodos con mayor partición de flujo, pues poseen una partición de 1 [$mmol/gDW - h$] y 0,6 [$mmol/gDW - h$] en reacciones asociadas a la síntesis de H₂, como la reacción ID01365 (Reacción 30) y la reacción ID00704 (Reacción 13).

Los metabolitos acetil-CoA, acetoacetil-CoA y CoA participan directamente en la síntesis de acetato y butirato, por lo que es razonable observarlos actuar como nodos principales

al optimizar la producción de H₂, debido a que la partición de sus flujos a nuevos destinos metabólicos en las vías, permite estabilizar el cambio impuesto en el metabolismo.

6.3. Sobre las restricciones en las vías de síntesis de los ácidos: Lactato, Acetato y Butirato

Considerando la importancia que juega la disponibilidad de los intermediarios *NAD⁺/NADH* en la vía de síntesis de H₂, la formación de lactato tiene como relevancia, la posibilidad de reestablecer la capacidad oxidativa (*NAD⁺*) dentro de esta vía, permitiendo el reajuste entre los estados oxidado y reducido de ferredoxina, lo que justifica el bajo incremento (3%) del flujo de H₂ en la modelación (ver Figura 12), cuando se restringe el flujo de síntesis de lactato, dado el efecto que tiene sobre las reacciones 14, 15, 16 y 17.

El incremento en mayor proporción (11% y 17%) del flujo de H₂ cuando se restringe la síntesis de acetato y butirato, en comparación con la restricción sobre el flujo de lactato (3%), se puede explicar en mayor parte porque estos dos ácidos no poseen el mismo rol que lactato sobre la reposición del poder oxidativo de la vía, de modo que el funcionamiento de las reacciones 14, 15, 16 y 17 no se ve afectado.

Si bien, el incremento en el flujo de H₂ cuando se restringe la síntesis de lactato resulta ser más bajo que cuando se restringe la síntesis de acetato o de butirato, se plantea que puede resultar conveniente mantener esta restricción sobre la síntesis de lactato debido a que su acumulación conlleva un descenso del pH que no puede ser compensada con algún consumo en la formación de otros compuestos, por no poseer una vía metabólica que lo permita, como es en el caso de acetato o de butirato que si poseen vías para su reutilización en la formación de solventes.

Cuando se restringe la síntesis de los tres ácidos en simultáneo, se obtiene un incremento en el flujo de H₂ de un 42%, que resulta ser mucho mayor que la adición de los incrementos en el flujo de H₂ de cada restricción por separado. Esto es razonable al considerar la conformación y la topología de la red metabólica, es decir, las correlaciones entre los metabolitos intermediarios de la red y sus niveles de dependencia, ya que estos, no se comportan como una dependencia lineal.

A nivel de enzimático, la restricción en la síntesis de los ácidos, correspondería a un silenciamiento de los genes que codifican para las proteínas que catalizan dichas reacciones de síntesis. Para el caso de lactato corresponde a silenciar los genes de la enzima *Lactato Deshidrogenasa*, para el acetato, las enzimas *Fosfato Acetil Transferasa* y *Acetato Quinasa*, mientras que, para la síntesis de butirato, las enzimas *Fosfato Butiril Transferasa* y *Butirato Quinasa*.

La disminución de los flujos de formación de los ácidos acetato, butirato y lactato, supone para el metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*, que la etapa de ácido génesis se mantiene de forma prolongada, debido a que la formación de ácidos es mínima, por ende,

no ocurre la reducción del pH necesaria para disparar el cambio metabólico hacia la etapa de solvente génesis, además, se ha reportado en otros trabajos (H. A. George y J. S. Chen, [42]), con *Clostridium beijerinckii* (microorganismo similar a *Clostridium acetobutylicum*), que la formación de butanol no resulta ser completamente dependiente de la acidez del medio, por lo tanto, la síntesis de solventes podría no verse mayormente afectada por el *knockout* de la síntesis de ácidos, aun cuando *Clostridium acetobutylicum* posee rutas particulares para reutilizar estos ácidos en la síntesis de acetona, butanol y etanol.

Por otro lado, la formación de los solventes butanol y etanol, conlleva de manera intrínseca la restauración de la capacidad oxidativa de la vía metabólica, debido a la generación de los intermediarios NAD^+ y $NADP^+$, que resultan necesarios para poder mantener el equilibrio de las reacciones de óxido-reducción de ferredoxina, que afectan directamente en la generación de H_2 .

Dentro de las limitaciones de la modelación, se encuentra principalmente la falta de información sobre la escala genómica de *Clostridium acetobutylicum*, para el modelo ATCC 824, ya que esta información permitiría complementar la búsqueda de reacciones para posible delección mediante un enfoque a nivel genético, empleando el algoritmo de búsqueda *OptGene* del *tooblox* COBRA, para robustecer aún más el trabajo.

Este algoritmo corresponde a una rutina de optimización evolutiva descrita por Patil et. Al. (2005) [43], que permite encontrar al mejor individuo, dentro de una población de 500 individuos con el mayor rendimiento o valor de *Fitness* metabólico, además de un conjunto de genes a ser delecionados para incrementar la producción de un compuesto de interés (H_2).

De este modo, el análisis integrado con la información a escala genómica del modelo ATCC 824, correspondería a buscar coincidencias entre los resultados de los tres algoritmos FVSEOF, BNP y *OptGene*, pues cada uno tiene por objetivo, maximizar la producción de H_2 , pero con enfoque de búsqueda diferente, pues obtienen como resultado, conjuntos diferentes, es decir, conjunto de reacciones con flujos decrecientes, metabolitos (nodos) con mayor partición de flujos y el mejor individuo con el conjunto de los genes para delección, respectivamente.

7. Conclusiones

La urgente necesidad actual de encontrar fuentes de energía renovable y duraderas nos llevan a emplear técnicas de ingeniería metabólica e ingeniería genética, en la búsqueda de productos biotecnológicos que permitan solventar estas necesidades.

El hidrógeno producido por microorganismos, representa un combustible de elevado valor energético y comercial, se puede catalogar como un combustible limpio, debido a que su uso en la obtención de energía eléctrica no conlleva la generación de contaminantes, a diferencia del uso de los combustibles fósiles convencionales.

Los microorganismos pertenecientes al género *Clostridium acetobutylicum* poseen un elevado valor comercial por su capacidad de producir de forma simultánea tres tipos de solventes, acetona, butanol y etanol, en un proceso denominado como fermentación ABE, pero más importante aún, poseen un elevado potencial en la producción de hidrógeno, debido a que su metabolismo es capaz de generar este gas como un subproducto o producto de desecho.

En este trabajo, se logró modelar los flujos de la red metabólica de *Clostridium acetobutylicum* (con el modelo ATCC 824), identificando las principales rutas asociadas a la producción de hidrógeno, simulando cambios en los flujos de síntesis de algunos metabolitos que conllevan un incremento de la producción del gas. Permitiendo descubrir algunos candidatos para realizar modificaciones genéticas con el fin de aumentar la productividad de hidrógeno de *Clostridium acetobutylicum*.

Para ello, se empleó una metodología compuesta por dos sistemas de búsqueda analítica y optimización. El primer sistema se encarga de hallar reacciones cuyos flujos metabólicos disminuyen continuamente cuando se maximiza un flujo metabólico objetivo (H_2). El otro método de búsqueda, consiste en hallar los metabolitos que actúan como nodos principales en la red, al optimizar con la misma función objetivo. Además, se realizó un análisis integrado entre ambos métodos, para entregar un resultado más robusto y acabado.

A partir de las simulaciones realizadas se obtuvo que, al restringir los flujos de síntesis de los ácidos acetato, butirato y lactato, en el metabolismo de *Clostridium acetobutylicum*, se incrementa la productividad de hidrógeno en un 42%. Esto corresponde a desactivar las reacciones 13, 18, 19, 28 y 29 (ver la Tabla 1) o dicho de otro modo, realizar el silenciamiento génico para las enzimas *Lactato Deshidrogenasa*, *Fosfato Acetil Transferasa*, *Acetato Quinasa*, *Fosfato Butiril Transferasa* y *Butirato Quinasa*, que son responsables de catalizar dichas reacciones, respectivamente. Es por esto, que se propone realizar esta serie de cambios para incrementar la productividad de hidrógeno de *Clostridium acetobutylicum*.

El trabajo realizado posee una limitante respecto de la falta de información a nivel de escala genómica, es por ello que se plantea la posibilidad de complementar el resultado obtenido por este trabajo, con la adición de dicha información en cuanto se halle disponible.

La proyección del trabajo realizado comprende realizar de manera exitosa las modificaciones genéticas propuestas, para posteriormente, corroborar de manera empírica si se logra el efecto predicho por la modelación sobre la producción de H_2 a escala de laboratorio. De obtener resultados exitosos, se validaría la propuesta experimental y se podría avanzar a un estudio de pre-factibilidad económica, para una escala industrial como, por ejemplo, dentro del proceso de tratamiento de aguas servidas.

Bibliografía

- [1] Enerdata, "Enerdata: Global Energy Statistical Yearbook 2018", 2018, 2018.
- [2] T. N. Veziroglu y F. Barbir, "Hydrogen: its comparison with fossil fuels and its potential as a universal fuel", *US Geol. Surv. Prof. Pap.*, 1993.
- [3] T. N. Veziroglu, H. J. Plass, y F. Barbir, "Comparison of Hydrogen with Coal and Synthetic Fossil Fuels", en *Electrochemistry in Transition*, 2012.
- [4] T. N. Veziroğlu y F. Barbir, "Economic Comparison of Hydrogen and Fossil Fuel Systems", en *Clean Utilization of Coal*, 2013.
- [5] S. A. Sherif, F. Barbir, y T. N. Veziroglu, "Hydrogen economy", en *Handbook of Hydrogen Energy*, 2014.
- [6] D. B. Levin, L. Pitt, y M. Love, "Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application", *Int. J. Hydrogen Energy*, 2004.
- [7] T. M. Liang, S. S. Cheng, y K. L. Wu, "Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane", *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002.
- [8] D. Das, "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature", *Int. J. Hydrogen Energy*, 2002.
- [9] J. D. Holladay, J. Hu, D. L. King, y Y. Wang, "An overview of hydrogen production technologies", *Catalysis Today*. 2009.
- [10] A. Demirbas, "Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections", *Energy Convers. Manag.*, 2008.
- [11] M. Y. Azwar, M. A. Hussain, y A. K. Abdul-Wahab, "Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014.
- [12] C. Y. Chen, M. H. Yang, K. L. Yeh, C. H. Liu, y J. S. Chang, "Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes", *Int. J. Hydrogen Energy*, 2008.
- [13] A. Ghimire *et al.*, "A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products", *Applied Energy*. 2015.
- [14] C. Zhang, F. X. Lv, y X. H. Xing, "Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production", *Bioresour. Technol.*, 2011.
- [15] I. K. Kapdan y F. Kargi, "Bio-hydrogen production from waste materials", *Enzyme and Microbial Technology*. 2006.
- [16] W. Park, S. H. Hyun, S. E. Oh, B. E. Logan, y I. S. Kim, "Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production", *Environ. Sci. Technol.*, 2005.
- [17] H. Alshiyab, M. S. Kalil, A. A. Hamid, y W. M. W. Yusoff, "Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production by *C. acetobutylicum*", *Pakistan J. Biol. Sci.*, 2008.
- [18] J. O. Kim, Y. H. Kim, S. H. Yeom, B. K. Song, y I. H. Kim, "Enhancing continuous hydrogen gas production by the addition of nitrate into an anaerobic reactor", *Process Biochem.*, 2006.

- [19] C. C. Chen, C. Y. Lin, y M. C. Lin, "Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002.
- [20] Y. J. Lee, T. Miyahara, y T. Noike, "Effect of iron concentration on hydrogen fermentation", *Bioresour. Technol.*, 2001.
- [21] S. Zhang, T. H. Kim, Y. Lee, y S. J. Hwang, "Effects of VFAs concentration on bio-hydrogen production with clostridium bifermentans 3AT-ma", en *Energy Procedia*, 2012.
- [22] S. Van Ginkel, S. Sung, y J. J. Lay, "Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration", *Environ. Sci. Technol.*, 2001.
- [23] S. Van Ginkel, S. W. Sung, L. Li, y J. J. Lay, "Role of initial sucrose and pH levels on natural, hydrogen-producing, anaerobe germination", 2001.
- [24] T. J. Phelps y J. G. Zeikus, "Influence of pH on Terminal Carbon Metabolism in Anoxic Sediments from a Mildly Acidic Lake.", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984.
- [25] S. K. Khanal, W. H. Chen, L. Li, y S. Sung, "Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products", *Int. J. Hydrogen Energy*, 2004.
- [26] H. H. P. Fang y H. Liu, "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture", *Bioresour. Technol.*, 2002.
- [27] M. G. Doremus, J. C. Linden, y A. R. Moreira, "Agitation and pressure effects on acetone-butanol fermentation", *Biotechnol. Bioeng.*, 1985.
- [28] G. Muyzer, E. C. de Waal, y A. G. Uitterlinden, "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993.
- [29] J. L. Garcia, B. K. C. Patel, y B. Ollivier, "Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea", *Anaerobe*. 2000.
- [30] R. I. Amann, W. Ludwig, y K. H. Schleifer, "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.", *Microbiol. Rev.*, 1995.
- [31] T. Millat y K. Winzer, "Mathematical modelling of clostridial acetone-butanol-ethanol fermentation", *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017.
- [32] D. T. Jones y D. R. Woods, "Acetone-butanol fermentation revisited.", *Microbiol. Rev.*, 1986.
- [33] W. Andersch, H. Bahl, y G. Gottschalk, "Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*", *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1983.
- [34] Y. Ueno, S. Otsuka, y M. Morimoto, "Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture", *J. Ferment. Bioeng.*, 1996.
- [35] H. Liu y H. H. P. Fang, "Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge", en *Water Science and Technology*, 2003.
- [36] I. Valdez-Vazquez y H. M. Poggi-Varaldo, "Hydrogen production by fermentative consortia", *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 13, n° 5, pp. 1000–1013, 2009.
- [37] P. Rogers, "Genetics and Biochemistry of *Clostridium* Relevant to Development of Fermentation Processes", *Adv. Appl. Microbiol.*, 1986.

- [38] R. Sengel & E. Papoutsakis, "Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis", *Biotechnology and Bioengineering*, 101 (5), 2008.
- [39] H. Choi, S. Lee, T. Kim & H. Woo, "In silico identification of gene amplification targets for improvement of lycopene production", *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (10), 2010.
- [40] R. Mahadevan, & C. H. Schilling, "The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models", *Metabolic Engineering*, 5 (4), 2003.
- [41] G. Stephanopoulos, & J. Vallino, "Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction", *Science*, 252 (5013), 1991.
- [42] H. A. George y J. S. Chen, "Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii* (Synonym, *C. butylicum*)", *Appl Env. Microbiol*, 1983.
- [43] K. Patil, I. Rocha, J. Förster, & J. Nielsen, "Evolutionary programming as a platform for in silico metabolic engineering", *BMC Bioinformatics*, 6, 2005.

Anexos

Anexo A: Reacciones de bio-síntesis de macromoléculas:

Componente	Ecuación de síntesis
Proteínas	$0.492 L - Alanina + 0.268 L - Arginina + 0.433 L - Asparagina + 0.446 L - Aspartato + 0.048 L - Cisteina + 0.318 L - Glutamina + 0.497 L - Glutamato + 0.462 L - Glicina + 0.178 L - Histidina + 0.658 L - Isoleucina + 0.699 L - Leucina + 0.576 L - Lisina + 0.202 L - Metionina + 0.343 L - Fenilalanina + 0.246 L - Prolina + 0.469 L - Serina + 0.443 L - Treonina + 0.057 L - Timina + 0.1 L - Triptofano + 0.298 L - Tirosina + 0.514 L - Valina + 39.94 ATP + 39.94 H_2O \rightarrow Proteinas + 39.94 ADP + 39.94 Ortofosfato$
ADN	$0.676 dATP + 0.33 dCTP + 0.33 dGTP + 0.676 dTTP + 4.39 ATP + 4.39 H_2O \rightarrow ADN + 4.39 ADP + 4.39 Ortofosfato$
ARN	$1.756 ATP + 0.496 CTP + 0.496 GTP + 0.496 UTP + 1.25 H_2O \rightarrow ARN + 1.25 ADP + 1.25 Ortofosfato$
Lípidos	$0.4588 Fosfatidilglicerol + 0.0574 Cardiolipina + 0.0574 3 - Fosfatidil - 1'(3' - O - L - lisil) glicerol + 0.0115 3 - D - Glucosil - 1,2 - diacilglicerol + 0.0688 Diglucosil - diacilglicerol + 0.0344 Ácido Lipoteico + 0.0765 Menaquinona + 0.1912 1,2 - Diacil - sn - glicerol \rightarrow Lipidos$
Pared Celular	$0.363 Peptidoglicano C. L. + 0.019 Ácido Teicoico \rightarrow Pared Celular$
Solutos	$0.0008 ATP + 0.1161 L - Alanina + 0.0288 L - Arginina + 0.5959 L - Aspartato + 0.5256 L - Glutamato + 0.0086 L - Glutamina + 0.0398 L - Glicina + 0.0169 L - Histidina + 0.0481 L - Isoleucina + 0.0222 L - Leucina + 0.0405 L - Lisine + 0.0222 L - Metionina + 0.0043 L - Fenilalanina + 0.1293 L - Prolina + 0.756 L - Serina + 0.0156 L - Treonina + 0.0017 L - Timina + 0.0162 L - Valina + 0.9947 Ortofosfato + 0.4775 D - Glucosa + 0.00033 Acetil - CoA + 0.0004 CoA + 0.0001 Citrulina + 0.00067 FAD + 0.01433 NAD^+ + 0.00033 NADH + 0.00087 NADP^+ + 0.00267 NADPH \rightarrow Solutos$

