

Determinación del modelo cinético de reacción para la producción de polihidroxicanoatos a partir de azúcar comercial

Sebastián Fernando Guillén Álvarez¹, Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano²

Resumen

La contaminación del medio ambiente por plástico ha llevado a buscar alternativas para reducir sus efectos dañinos. Una de las soluciones es el uso de bioplásticos producidos por bacterias, los cuales son materiales biodegradables como es el caso de los polihidroxicanoatos (PHAs). En este estudio se evaluó el rendimiento de producción de PHA variando distintas condiciones y se propuso un modelo cinético que explicara la síntesis de este biopolímero. Para la investigación se utilizó la bacteria *Bacillus subtilis* y se realizaron fermentaciones por lotes de 48 horas; obteniendo mayores rendimientos empleando sacarosa como sustrato y una relación 300:1 (g.carbono. g.nitrogeno-1). Se determinaron tres ecuaciones cinéticas utilizando la aplicación Berkeley Madonna. El modelo obtenido tiene el potencial para escalar el proceso de producción de los polihidroxicanoatos.

PALABRAS CLAVE: polihidroxicanoatos, bioplástico, modelo cinético, ecuación de monod, biotecnología, fermentación bacteriana

Abstract

The environmental plastic pollution has led to the search for alternatives to reduce its effects. One of these alternatives is the use of microorganisms that can produce polymers, which are biodegradable such as polyhydroxyalkanoates (PHAs). In this study, the PHA production yield was evaluated changing different fermentation conditions and a kinetic model was proposed explaining the synthesis of the biopolymer. The bacteria used was *Bacillus subtilis* and batch fermentations were carried out; obtaining a better performance using sucrose as substrate and a

proportion 300:1 (g.carbono. g.nitrogeno-1). Three equations for the kinetic model were determined using the Berkeley Madonna application. The model has the potential to scale the production process of polyhydroxyalkanoates.

KEYWORDS: polyhydroxyalkanoates, bioplastics, Monod reaction kinetics, biotechnology, bacterial fermentation

Introducción

Los plásticos convencionales son un producto indispensable debido a su peso liviano, termo estabilidad, cristalinidad y su capacidad de ser moldeado. El incremento de materiales plásticos de uso doméstico e industrial ha aumentado la producción a más de 400 toneladas métricas por año lo que plantea graves problemas para la eliminación de estos. Para mitigar estos problemas, los bioplásticos en la forma de polihidroxicanoatos (PHA) han ganado mucha atención para sustituir plásticos a base de petróleo (Li & Wilkins, 2020).

Este bioplástico ha llamado la atención a nivel comercial debido a sus propiedades biodegradables, termo estabilidad y biocompatibilidad. Es empleado en dispositivos médicos, electrónicos, construcción, empaque y en la agricultura. Algunas empresas que producen PHA a nivel mundial son Metaboli (Woburn, MA, USA), Procter & Gamble Co., Ltd. (Cincinnati, OH, USA), Tianjin Green Bioscience Co., Ltd (Tianjin, China), etc (Bugnicourt, y otros, 2013).

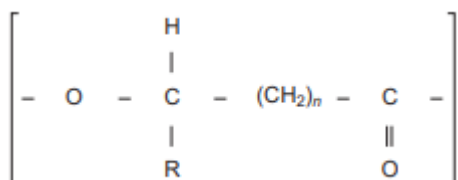
Los PHA son poliésteres lineales producidos por bacterias por fermentación del azúcar (Figura 1). La bacteria *Bacillus subtilis* es capaz de producir este biopolímero en condiciones de estrés cuando existe

¹ Ingeniero en Biotecnología Industrial por Universidad del Valle de Guatemala. Email: gui171011@uvg.edu.gt.

² Magister en Ciencia Farmacéuticas, Ingeniero Químico por Universidad del Valle de Guatemala. Docente desde hace 20 años. Ha impartido cursos de Termodinámica 1-2, Investigación de Operaciones, Transferencia de Masa 1-2, Manejo de sólidos, Operaciones Unitarias 1 y 2, Industria Farmacéutica y Cosmética en la Universidad Rafael Landívar. También, Balance de Masa y Energía, Flujo de Fluidos, Transferencia de Calor, Transferencia de Masa 1-2, Manejo de Sólidos, Bioingeniería, Operaciones Unitarias 1-2, Diseño de Plantas Químicas, Procesos Químicos Industriales 1-2, Ingeniería de los Biocombustibles, Necesidades de la Energía para el Futuro en la Universidad Del Valle de Guatemala. Email: zambrano@uvg.edu.gt.

escasez de nitrógeno y altas concentraciones de carbono en el medio. Dependiendo de la fuente de sustrato empleado y la relación carbono y nitrógeno, va a variar el rendimiento de producción de producto (Saratale, y otros, 2021).

Figura 1. Estructura general de los PHA.



(Lemos & Cordoba, 2015)

El modelo de Monod describe una relación entre el crecimiento microbiano y el sustrato que limita el crecimiento. Los modelos matemáticos son importantes, ya que nos permiten correlacionar datos experimentales, hacer una predicción cuantitativa del proceso y reducir costos en diseño experimental y de proceso. Por lo que el objetivo del trabajo fue realizar un modelo cinético de reacción para la producción de polihidroxialcanoatos a partir de azúcar comercial utilizando *Bacillus subtilis*.

Materiales y Métodos

Preparación de medio de cultivo

La cepa *Bacillus subtilis* fue comprada en presentación de hisopo marca Kwin Stik, número de lote 120-25-5. En una zona estéril, la bolsa de KWIK-STIK con la cepa fue abierta y se saturó el hisopo con el material hidratado. Se transfirió al medio con agar nutritivo, se inoculó la placa por medio de un asa esterilizada y se incubó a 37°C por 24 horas. En triplicado, se inoculó en 200 mL de caldo nutritivo y se colocó la suspensión bacteriana en una incubadora con agitación. Cada hora se tomó una alícuota de 25 µL y se realizaron conteos bacterianos en cámara de Neubauer. Se determinó que luego de 12 horas de fermentación, se alcanzaba una concentración bacteriana de $10^7 \frac{UFC}{mL}$. El inoculo usado para las experimentaciones fue de 5% v/v (fermentación realizada en medio nutritivo durante 12 horas).

Producción de PHA en Erlenmeyers de 250 mL.

En triplicado, se pesaron dos distintas concentraciones de azúcar (20 g/L y 15 g/L) y se añadió extracto de levadura como fuente de nitrógeno para obtener relaciones en gramos de carbono y nitrógeno (C:N) de 20:2 y 15:2. Se suplementó con 5 g/L de cloruro de sodio y 190 mL de agua desmineralizada a cada Erlenmeyer.

De igual forma, se pesaron estas cantidades en otros Erlenmeyers, y se invirtió la solución de azúcar comercial calentando a 80°C por una hora y agitando a 250 rpm. Se utilizó ácido sulfúrico para disminuir el pH a 1. Luego se neutralizó con hidróxido de sodio 1.0 M. Se verificó que la conversión de azúcares fuera mayor al 85% por medio de HPLC.

El medio se inóculo con la solución de *Bacillus subtilis* para obtener un volumen total de 200 mL. Se colocaron los Erlenmeyers en el agitador marca New Brunswick Scientific Serie 25 con agitación a 150 rpm y temperatura a 37°C por 48 horas. Se tomó una muestra al inicio y al final de 10 mL de la fermentación.

Producción de PHA en Reactor Sartorius BIOSTAT A plus

Para determinar el efecto en la relación de la fuente de carbono y nitrógeno, se pesaron tres distintas concentraciones de azúcar (20 g/L, 15 g/L y 10 g/L). Y se agregó 2 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno para obtener relaciones en gramos de fuente de carbono y nitrógeno (C:N) de 20:2, 15:2 y 10:2. Se suplementó con 5 g/L de cloruro de sodio y 950 mL de agua desmineralizada. Las mismas cantidades fueron pesadas e invertidas con ácido sulfúrico.

El medio se inóculo con la solución de *Bacillus subtilis* para obtener un volumen total de 1 L. Se configuró el reactor para que operara a 150 rpm y temperatura a 37°C por 48 horas. Se tomó una muestra al inicio y al final de 10 mL de la fermentación.

Producción de PHA en Reactor Bioflo 415

A partir de los resultados obtenidos en las previas fermentaciones, se realizó en duplicado una fermentación con 20 g/L de azúcar, 2 g/L de extracto

de levadura, 5 g/L de cloruro de sodio y 9.5 L de agua esterilizada.

El medio se inóculo con la solución de *Bacillus subtilis* para obtener un volumen total de 10 L. Se fermentó por 48 horas y se operó el reactor a 150 rpm y temperatura de 37°C. Se tomó una muestra cada 3 horas de 50 mL en tubos Falcon.

Cuantificación de nutrientes y análisis de PHA

Las muestras obtenidas, se centrifugaron a 4500 rpm por 20 minutos en la centrifuga Eppendorf AG. Con el sobrenadante obtenido se prepararon tres tubos de ensayo con diferentes diluciones. El tubo 1 y 2, se realizó una dilución 1:10 mientras que el tubo 3, una dilución 1:1000. Se determinó los mg/mL de carbono utilizando el tubo 3 y el total de nitrógeno empleando el tubo 2, con el colorímetro Hatch.

El tubo 1 fue destinado a un análisis de HPLC para determinar azúcares totales y ácidos orgánicos. El detector de índice de refracción empleado fue el P-1200 marca Agilent y la columna utilizada fue la Hi-Plex H y, específica para azúcares y ácidos orgánicos, cuya fase móvil fue agua filtrada con filtros de 0.45 µm. De primero se filtraron las muestras con filtros de 0.22 µm hacia los viales de cromatografía y se colocó en el auto mostrador. Se inyectó 20 µL de las muestras, las cuales se bombean a 0.6 mL/min durante 21 min a 40°C. Finalmente se reconocen los compuestos por el índice de refracción a 40°C.

El sólido obtenido de la centrifugación fue secado a 60°C y pesado, para determinar la cantidad de células totales. Luego, se empleó el protocolo de purificación y recuperación de PHA de acuerdo con Salmiati y colaboradores (2011). Luego de purificar la muestra se pesó y se recolectó aproximadamente 0.5 g de PHA para realizar un análisis de FT-IR con un espectrofotómetro marca Perkin Elmer modelo Frontier IR/NIR systems para determinar su pureza.

Realización del modelo cinético

Los datos experimentales obtenidos en el tiempo fueron introducidos en diferentes hojas de Excel bajo los nombres: células, nitrógeno y PHA. Los archivos fueron guardados como tipo CSV (Macintosh). Luego se cargaron estos formatos a la aplicación Berkeley

Madonna, para determinar las constantes del modelo cinético por medio de simulaciones. Se partió utilizando las ecuaciones de Monod y de Luedeking-Piret, para la formación de producto mixta asociada al crecimiento. Además, el programa utilizó el método numérico de Euler como herramienta para aproximar los valores para las soluciones de las ecuaciones diferenciales. Se realizaron simulaciones y se ajustaron las variables manualmente. Luego de cada simulación, se modificaron las ecuaciones base para ajustar compartimientos de transferencia de masa y consumo de sustrato.

Análisis estadístico ANOVA

Para el análisis estadístico se utilizó EXCEL versión 2021. Se empleó la herramienta análisis de datos y se seleccionó el análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. El nivel de confianza seleccionado fue de 95%. Las dos variables analizadas fueron el tipo de sustrato agregado (sacarosa o sacarosa invertida) y la cantidad de este.

Resultados y discusión

Para evaluar el rendimiento global de producción de polihidroxicanoatos con dos distintas fuentes de carbono se empleó azúcar comercial y azúcar invertida. Al observar el cuadro 1, se demuestra que se obtuvo un rendimiento más alto al utilizar sacarosa comercial. El valor F obtenido (Cuadro 2) para el tipo de sustrato es mayor que el valor crítico. Por lo que se rechaza la hipótesis nula, de que el tipo de sustrato no iba a afectar la producción de polihidroxicanoatos.

La azúcar comercial es más difícil de metabolizar debido a que requiere de un paso más para ser incorporado a glucólisis. Este paso requiere de un ATP extra, por lo que se gasta más energía. Al necesitar producir más energía es necesario consumir más sacarosa, lo que resulta en la acumulación de Acetil-CoenzimaA (Verhaeghte, Aerts, Diricks, Soetaert, & Desmet, 2014). Esto produce que esta molécula sea destinada no solo a ciclo de Krebs si no que a otras rutas como la de producción de polihidroxicanoatos.

Por el contrario, la azúcar invertida empleada está compuesta en su mayoría por glucosa y fructosa. La

glucosa es una molécula, la cual es más fácil de metabolizar por la bacteria. Esta es utilizada frecuentemente para la producción de energía. El

exceso de esta en el medio contribuye a que la bacteria la utilice para formar ácidos orgánicos y otras moléculas como PHA.

Cuadro 1. Rendimientos de la fermentación de dos fuentes de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis*.

| Sistema | Sustrato principal | Concentración inicial sustrato (g/L) | $Y_{x/s}$ % (m/m) | $Y_{p/x}$ % (m/m) |
|---------|--------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Sacarosa* | 19.5 ±0.1732 | 9.16 ±0.184 | 6.55 ±0.095 |
| 2 | Sacarosa* | 14.5 ±0.1732 | 12.8 ±0.389 | 3.36 ±0.043 |
| 3 | Sacarosa | 22.5 ±0.1732 | 8.56 ±0.148 | 9.58 ±0.298 |
| 4 | Sacarosa | 14.6 ±0.1732 | 8.31 ±0.137 | 4.80 ±0.161 |

Notación: $Y_{x/s}$ rendimiento global de formación de biomasa con respecto al consumo de sustrato; $Y_{p/x}$ rendimiento global de formación de polihidroxialcanoatos con respecto al crecimiento bacteriano; Sacarosa*, representa que fue hidrolizada; m/m, relación másica. Se determinó la desviación estándar de las muestras.

Cuadro 2. Análisis ANOVA de los rendimientos globales de formación de polihidroxialcanoatos con respecto al crecimiento bacteriano.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------|--------------|----------------------|
| Peso sustrato inicial | 38.33 | 1 | 38.33 | 13.82 | 0.005 | 5.31 |
| Tipo de sustrato | 16.01 | 1 | 16.01 | 5.77 | 0.04 | 5.31 |
| Interacción | 4.18 | 1 | 4.18 | 1.51 | 0.25 | 5.31 |
| Dentro del grupo | 22.17 | 8 | 2.77 | | | |
| Total | 80.71 | 11 | | | | |

Los PHA se acumulan en condiciones de desequilibrio nutricional, generalmente dónde existe un exceso de la fuente de carbono con respecto a un nutriente limitante como el nitrógeno (Hye-Young, Hyeoncheol, So Young, & Sang Yup, 2018). Para evaluar la relación que existe entre el carbono y el nitrógeno en la producción de PHA se variaron las concentraciones de carbono manteniendo fijo la cantidad de nitrógeno.

Comparando las mejores condiciones variando la relación carbono-nitrógeno utilizando sacarosa invertida y sacarosa como sustrato, se obtuvo una mayor producción de PHA utilizando sacarosa. Con una relación de 263:1 (m/m) carbono-nitrógeno, se obtuvo una producción de 0.0761 g/L PHA utilizando glucosa. Mientras que con una

relación de 300:1 (m/m) carbono-nitrógeno, se produjo 0.0905 g/L de PHA utilizando sacarosa (Cuadro 3). El valor F (cuadro 2), obtenido para el tipo de sustrato es mayor que el valor crítico. Por lo que se rechaza la hipótesis nula de que el cambio de la relación carbono-nitrógeno no va a influenciar en el rendimiento de producción de polihidroxialcanoatos.

Cuadro 3. Rendimientos de la fermentación para la producción de polihidroxialcanoatos empleando *Bacillus subtilis* variando la relación de carbono y nitrógeno.

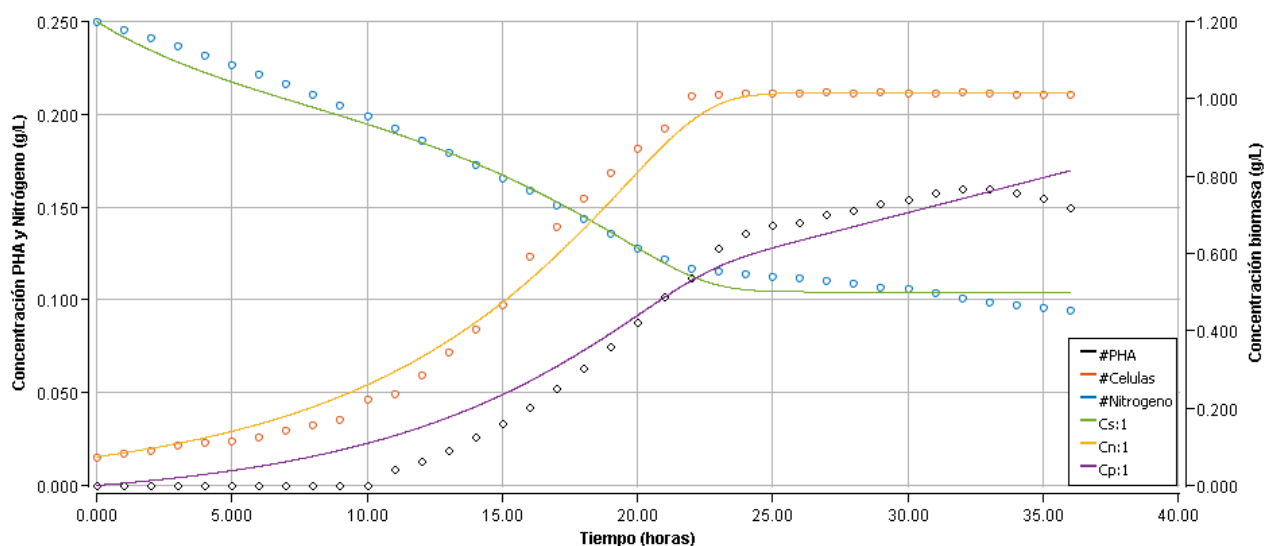
| Sistema | Sustrato | Relación Carbono-Nitrógeno (m/m) | $Y_{x/sc}$ % (m/m) | $Y_{x/sn}$ % (m/m) | $Y_{p/x}$ (m/m) |
|---------|-----------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 1 | Sacarosa* | 263 : 1 ± 0.1102 | 2.09 $\pm 8.7 * 10^{-5}$ | 542.54 $\pm 4.3 * 10^{-1}$ | 7.92 $\pm 4.2 * 10^{-3}$ |
| 2 | Sacarosa* | 184 : 1 ± 0.0736 | 3.01 $\pm 1.3 * 10^{-4}$ | 459.53 $\pm 3.3 * 10^{-1}$ | 5.25 $\pm 4.3 * 10^{-3}$ |
| 3 | Sacarosa* | 113 : 1 ± 0.0446 | 2.33 $\pm 1.6 * 10^{-4}$ | 311.93 $\pm 2.3 * 10^{-1}$ | 16.49 $\pm 6.9 * 10^{-3}$ |
| 4 | Sacarosa | 300 : 1 ± 0.1304 | 2.05 $\pm 6.6 * 10^{-5}$ | 829.11 $\pm 6.9 * 10^{-1}$ | 6.50 $\pm 3.2 * 10^{-3}$ |
| 5 | Sacarosa | 179 : 1 ± 0.0733 | 1.74 $\pm 1.1 * 10^{-4}$ | 308.03 $\pm 2.1 * 10^{-1}$ | 10.11 $\pm 6.4 * 10^{-3}$ |
| 6 | Sacarosa | 83 : 1 ± 0.0304 | 4.82 $\pm 2.5 * 10^{-4}$ | 367.43 $\pm 2.5 * 10^{-1}$ | 3.08 $\pm 5.2 * 10^{-3}$ |

Notación: $Y_{x/sc}$ rendimiento global de formación de biomasa contra consumo de carbono; $Y_{x/sn}$ rendimiento global de formación de biomasa contra consumo de nitrógeno total; $Y_{p/x}$ rendimiento global de formación de polihidroxialcanoatos contra crecimiento bacteriano; Sacarosa*, representa que fue hidrolizada; m/m, relación másica molecular. Se determinó la propagación de error.

Se puede observar, en general, que se obtiene una mayor producción de PHA al tener una mayor concentración de carbono en el medio según la figura 2. Al empezar a escasear el nitrógeno en el medio, la bacteria empieza la producción de los polihidroxialcanoatos. El excedente de carbono lo

utiliza para la producción de PHA, para tener una reserva de energía cuando la bacteria se quede sin sustrato limitante. Por lo que, al haber más carbono en el medio, mayor cantidad de polihidroxialcanoatos puede producir

Figura 2: Ajuste de modelo cinético con Berkeley Madonna a los resultados experimentales de crecimiento bacteriano, consumo de nitrógeno y producción de PHA.



Notación: #PHA, producción de polihidroxicanoatos en el tiempo experimental; #Celulas, producción de *Bacillus subtilis* en el tiempo experimental; #Nitrogeno, consumo de nitrógeno en el tiempo experimental; Cs:1, ajuste de consumo de nitrógeno; Cn:1, ajuste de producción de *Bacillus subtilis*; Cp:1, ajuste de producción de polihidroxicanoatos.

Para la propuesta del modelo de la cinética se utilizó sacarosa como sustrato en lugar de glucosa, debido a los mejores rendimientos obtenidos en la producción de PHA realizados en Erlenmeyers y en el reactor SARTORIUS BIostat Aplus. Se utilizaron las ecuaciones cinéticas 1, 2 y 3 en función del tiempo para expresar diferentes fenómenos de la reacción de producción de los polihidroxicanoatos. Las constantes cinéticas fueron obtenidas por medio de simulaciones utilizando el software Berkeley Madonna.

Se puede observar en la ecuación 1, que la generación de biomasa en el tiempo equivale a su concentración por la tasa de crecimiento específico en el tiempo. La tasa de crecimiento específico depende de los coeficientes μ_{max} y K_s , la concentración de nitrógeno en instantes concretos y el tiempo de fermentación. Se obtuvo un valor de μ_{max} de 0.13967 h^{-1} y un K_s de 0.01256 g/L por lo que *Bacillus subtilis*. Entre más cercano es el valor de K_s a 0, mayor es la afinidad por el sustrato (Levenspiel, 1999).

La ecuación para el consumo de nitrógeno se observa en la ecuación 2, donde el consumo de este

equivale al negativo de la velocidad específica por la concentración de células en un tiempo determinado dividido dentro el factor de rendimiento de biomasa más un ajuste de aceleración de consumo de nitrógeno. Se obtuvo un factor de rendimiento de $8.84591 \frac{\text{g de Células}}{\text{g de nitrógeno}}$; el organismo solo necesita trazas de esta molécula para poder reproducirse si se compara con el consumo de sacarosa.

Para el ajuste de aceleración de consumo de nitrógeno, se obtuvo para la constante "a" un valor de $-0.008 \frac{\text{g}}{\text{L}\cdot\text{h}}$ y para la constante "k" un dato de -0.20273 h^{-1} . Al ser "a" un valor cercano a cero, esta constante va a acelerar el consumo de nitrógeno al principio del modelo. Esta corrección es necesaria debido a que al principio de la fermentación hay una mayor cantidad de sustrato, por lo que va a haber un mayor consumo del mismo.

Finalmente, para la producción de polihidroxicanoatos se planteó la ecuación 3. Para la constante cinética asociada a la producción de PHA se obtuvo un valor de $0.00372 \frac{\text{g}}{\text{L}\cdot\text{h}}$. Esta constante representa la producción de PHA durante la fase estacionaria. El microorganismo comienza a

producir el producto intracelular durante la fase exponencial, pero cuando llega a la fase estacionaria se produce un incremento en la producción. Esto se debe a que empiezan a escasear los nutrientes por lo que la bacteria se ve en la necesidad de producir cadenas largas de carbonos, para poder degradarlas en un futuro para usarlas como fuente de energía. Se obtuvo un rendimiento de $0.09198 \frac{g\ PHA}{g\ Biomasa}$. Este se puede considerar como bajo debido a que en la literatura se observan rendimientos mayores a $0.4 \frac{g\ PHA}{g\ Biomasa}$.

En un estudio realizado por Ipsita Panda y colaboradores, se obtuvo un rendimiento de $0.3047 \frac{g\ PHA}{g\ Biomasa}$ utilizando *Bacillus subtilis* y glucosa como sustrato. En esta experimentación se mantuvo un pH de 7.4, una velocidad de agitación en el reactor de 120 rpm, y una aireación de 0.25 vvm (Panda, Balabantaray, Sahoo, & Patra, 2017). Mantener el pH

les permitió, que no hubiera una acidificación del medio por lo que no hubo inhibición de crecimiento por este motivo. Este factor y la aireación, fomentó el crecimiento bacteriano por lo que hubo una mayor biomasa al momento que empezó a escasear el nitrógeno en el medio.

Para mejorar la experimentación realizada en la Universidad del Valle, se recomienda mantener el pH constante durante la fermentación para evitar la inhibición por acidificación del medio para obtener una mayor cantidad de biomasa. Otra opción sería realizar fermentaciones previas donde el medio sea rico en nutrientes para que exista la mayor división celular posible. Alcanzar una biomasa mayor a 5 g/L y luego fermentar en un medio con limitante de nitrógeno. Este paso extra supondría una mayor cantidad de células, por lo que al entrar en condiciones de estrés habría una mayor acumulación de PHA por ende, un mayor rendimiento.

Cuadro 4. Ecuaciones cinéticas empleadas para el desarrollo del modelo cinético de reacción.

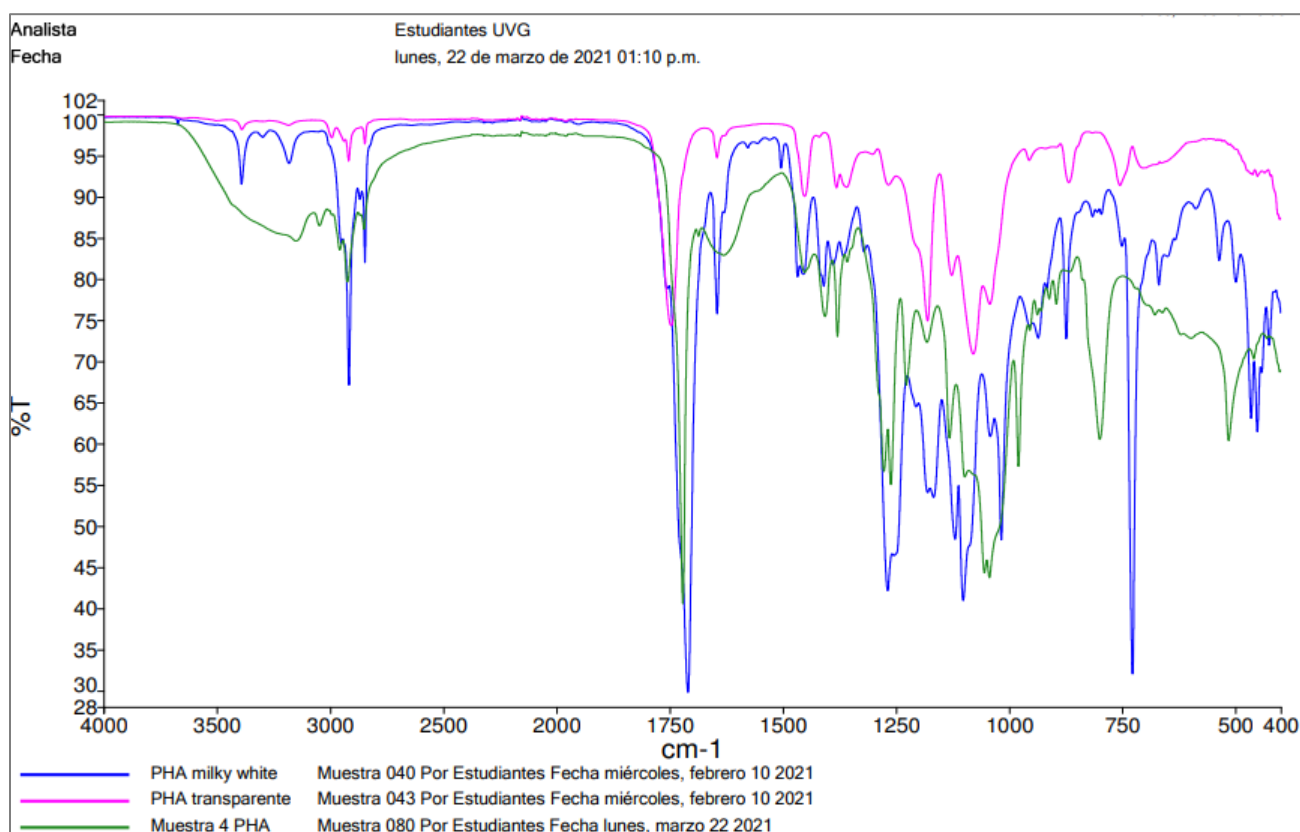
| Número | Ecuación empleada | Variables | Descripción |
|--------|--|---|--|
| 1 | $\frac{dC_n}{dt} = \mu * C_n$ | $\mu =$ velocidad de crecimiento $C_n =$ Concentración de células | Ecuación cinética de crecimiento microbiano en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> |
| 2 | $\frac{dC_s}{dt} = -\mu * \frac{C_n}{Y_{xs}} + a * (e^{k*TIME})$ | $\mu =$ velocidad de crecimiento $C_n =$ Concentración de células $Y_{xs} =$ Factor de rendimiento biomasa contra consumo de nitrógeno $a =$ Constante asociada a consumo de nitrógeno $k =$ Constante asociada a consumo de nitrógeno $TIME =$ Tiempo | Ecuación cinética de consumo de nitrógeno en función del tiempo para la producción de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> |
| 3 | $\frac{dC_p}{dt} = \mu * C_n * Y_{px} + i * C_n$ | $\mu =$ velocidad de crecimiento $C_n =$ Concentración de células $Y_{px} =$ Factor de rendimiento polihidroxicanoatos $i =$ Constante asociada a formación de PHAs | Ecuación cinética de la formación de polihidroxicanoatos empleando <i>Bacillus subtilis</i> |

Todas las muestras de PHA fueron analizadas con espectroscopia infrarroja (cuadro 4). Se obtuvo picos en alrededor 2900 y 2800 cm^{-1} que corresponden al enlace simple carbono-carbono y al enlace simple carbono-hidrógeno. Entre más grande los picos de este rango, más grande es la cadena de carbonos formada por la bacteria de PHA.

Además, se puede observar el pico característico del doble enlace oxígeno en 1724 cm^{-1} . Este ocurre

debido a que los polihidroxicanoatos son un tipo de hidroxiácidos. También se tienen lecturas en alrededor de 3330 cm^{-1} que representan el enlace oxígeno-hidrógeno. Por las lecturas obtenidas, se puede afirmar que se obtuvo una molécula con los picos característicos de PHA a partir de *Bacillus subtilis* utilizando sacarosa, extracto de levadura y cloruro de sodio como medio.

Figura 3. Análisis por FT-IR de muestra de PHA.



Notación: PHA milky White, muestra comercial; PHA transparente, muestra comercial; Muestra 4 PHA, muestra obtenida de experimentación realizada en Reactor Bioflo 415.

Conclusiones

Se obtuvo un mayor rendimiento de formación de polihidroxicanoatos contra consumo de sustrato de 0.0958 (m/m) al utilizar 22.5 g/L de sacarosa y se alcanzó un mayor rendimiento de formación de biomasa con respecto al consumo de sustrato de

0.0916 (m/m) al emplear 19.5 g/L de sacarosa invertida. Además, se alcanzó un mayor rendimiento de 0.0792 (m/m) para la producción de polihidroxicanoatos empleando una relación 263:1 ($\frac{\text{g carbono}}{\text{g nitrógeno}}$) utilizando sacarosa invertida como sustrato y un mayor rendimiento de 0.0649 (m/m) con

una relación de 300:1 ($\frac{g \text{ carbono}}{g \text{ nitrógeno}}$) usando sacarosa como sustrato en las condiciones evaluadas. Finalmente se determinó un modelo cinético de fermentación, en donde se definió el crecimiento bacteriano dependiente del tiempo de fermentación, el consumo de sustrato limitante en tiempo específico y la producción de polihidroxicanoatos en el tiempo (ecuaciones 1, 2 y 3 de la sección de resultados y discusión); modificando el modelo de Monod con factores de aceleración de consumo de sustrato y factores de fase de crecimiento celular.

Anexos

Figura 4. Código utilizado en programa Berkeley Madonna para la obtención de parámetros cinéticos.

```

Berkeley 3.mmd (modified)
METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 36
DT = 0.02

{Type Equations Here.}

u = umax*((Cs-b)/((Cs-b)+Ks))
Rn = u * Cn
Rs = -Rn/Yxs
Rp = Rn*Ypx

umax = 0.13967
Ks = 0.01256
Yxs = 8.84591
Ypx = 0.09198
b = 0.10424
i = 0.00372
e = 2.7182818284
a = -0.008
k = -0.20273

INIT Cs = 0.25
INIT Cn = 0.07
INIT Cp = 0

d/dt(Cn) = Rn
d/dt(Cs) = Rs + a*(e^(k*TIME))
d/dt(Cp) = Rp+i*Cn

```

Aporte de autores

Autor 1 (Ing. Sebastián Guillén): Realizó la experimentación y compiló los resultados. Desarrolló

el modelo cinético y la redacción del artículo científico.

Autor 2 (M.Sc. Ing. Gamaliel Zambrano): Asesoría a Ing. Sebastián Guillén durante el desarrollo de la experimentación. Revisor del artículo.

Bibliografía

Bugnicourt, E., Schmid, M., Nerney, O., Wildner, J., Smykala, A., & Cinelli, P. (2013). Processing and Validation of Whey-Protein-Coated Films and Laminates at Semi-Industrial Scale as Novel Recyclable Food Packaging Materials with Excellent Barrier Properties. Hindawi Publishing Corporation, 2013, 1-10. doi:<https://doi.org/10.1155/2013/496207>

Hye-Young, S., Hyeoncheol, F., So Young, C., & Sang Yup, L. (2018). Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. Trends in Biochemical Sciences, 43(10), 790-805. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.005>

Lemos, A., & Cordoba, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. Informador Técnico, 79(1), 93-101.

Levenspiel, O. (1999). Chemical Reaction Engineering. Nueva York: John Wiley & Sons.

Li, M., & Wilkins, M. (2020). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production: Feedstocks, strains and process developments. International Journal of Biological Macromolecules, 156, 691-703. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082>.

Panda, I., Balabantaray, S., Sahoo, S., & Patra, N. (2017). Mathematical model of growth and polyhydroxybutyrate production using microbial fermentation of Bacillus subtilis. Chemical Engineering Communications, 1-23. doi:<http://dx.doi.org/10.1080/00986445.2017.1384923>

Salmiati, M., Ujang, Z., Salim, M., & Olsson, G. (2011). Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion

and Saponification. American Society for Microbiology, 61(1), 34-39.

Saratale, R., Cho, S., Saratale, G., Kadam, A., Ghodake, G., Kumar, M., . . . Shin, H. (2021). A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates. *Bioresource Technology*, 325, 1-15.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124685>.

Verhaeghte, T., Aerts, D., Diricks, M., Soetaert, W., & Desmet, T. (2014). The quest for a thermostable sucrose phosphorylase reveals sucrose 6'-phosphate phosphorylase as a novel specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 7027-7037.
doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-014-5621-y>