

# Propuesta de un Modelo Cinético para la producción de Polihidroxicanoatos a partir de melaza utilizando *Bacillus cereus*

Angie Nohemí Vitola Sanchinelli, Luis Ernesto Núñez González, Luis Ernesto Núñez González/ lenunez@uvg.edu.gt  
Centro de Procesos Industriales y Departamento de Ingeniería Química, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 2021

**RESUMEN:** La fermentación de PHA con *Bacillus cereus* es una reacción en la que intervienen una cantidad considerable de variables. Para determinar un modelo cinético que logre predecir el comportamiento de la fermentación, se utilizaron los datos de experimentaciones donde se cuantificaron microorganismos, azúcares totales y producto a lo largo de las mismas. Además, se midieron las condiciones que variaban con el tiempo (pH y relación C:N), todo esto se realizó, utilizando azúcares invertidos de melaza como sustrato en un reactor New Brunswick 3364M. Con dichas experimentaciones, se determinó que para las condiciones de relación C:N inicial de  $16 \pm 0.62$  (g/g) y pH promedio de  $6.54 \pm 0.44$ , se obtuvieron rendimientos máximos experimentales de microorganismos con respecto a sustrato ( $Y_{x/s}$ ) de  $60.53 \pm 1.35\%$  (g/g) y de producto con respecto a sustrato de  $52.27 \pm 1.11\%$  (g/g). En estas pruebas se utilizó el control automático de pH del equipo, trabajando con una solución de hidróxido de sodio 1M. Con los resultados de dichas experimentaciones, se probaron diferentes modelos, obteniendo los mejores ajustes con un modelo de Contois modificado y una ecuación derivada del modelo de Luedeking-Piret para el producto. Dicho modelo introdujo una forma innovadora derivada del coeficiente global de transferencia de masa para predecir el comportamiento de sustratos, debido a la influencia que se infiere proviene de dichos fenómenos. El modelo se ajustó a los datos experimentales utilizando el software Berkeley Madonna®, obteniendo la constante global de transferencia de masa ( $k_f$ ), constante de mantenimiento de producto (B) y la velocidad máxima específica de crecimiento celular ( $\mu_{max}$ ), con valores de  $0.290 \text{ h}^{-1}$ ,  $3.25 \text{ h}^{-1}$  y  $0.0316 \text{ h}^{-1}$  respectivamente.

**PALABRAS CLAVE:** Melaza, polihidroxicanoatos, cinética, azúcares invertidos, *Bacillus cereus*.

## Proposal for a Kinetic Model for the production of Polyhydroxyalkanoates from Molasses using *Bacillus Cereus*

**ABSTRACT:** PHA fermentation with *Bacillus cereus* is a reaction involving a considerable number of variables. In order to determine a kinetic model that manages to predict the behavior of fermentation, data from experiments were used where microorganisms, total sugars and product were quantified. In addition, time-varying conditions (pH and C:N ratio) were measured using molasses inverted sugars as substrate in a New Brunswick 3364M reactor. With these experiments, it was determined that for the initial C:N ratio condition of  $16 \pm 0.62$  (g/g) and average pH of  $6.54 \pm 0.44$ , maximum experimental yields were obtained, with microorganism yield with respect to substrate ( $Y_{x/s}$ ) of  $60.53 \pm 1.35\%$  (g/g) and yield of product with respect to substrate of  $52.27 \pm 1.11\%$  (g/g). In this experiments, the automatic pH control of the equipment was used, working with a 1M sodium hydroxide solution. With the results of these experiments, different models were tested, obtaining the best fits with a modified Contois model and an equation derived from the Luedeking-Piret model for the product. This model introduced an innovative way derived from the global mass transfer coefficient to predict the behavior of substrates, due to the influence that is inferred from these phenomena. The model was fitted to the experimental data using the Berkeley Madonna® software, obtaining the global mass transfer constant ( $k_f$ ), product maintenance constant (B) and the maximum specific cell growth rate ( $\mu_{max}$ ), with values of  $0.290 \text{ h}^{-1}$ ,  $3.25 \text{ h}^{-1}$  and  $0.0316 \text{ h}^{-1}$  respectively.

**KEY WORDS:** Molasses, polyhydroxyalkanoates, kinetics, inverted sugars, *Bacillus cereus*.

## Introducción

La producción de plásticos a partir de petróleo ha provocado una generación de residuos que no son degradables y repercuten de forma negativa en los ecosistemas. Estos residuos se han ido acumulando en agua y suelos, creando preocupaciones por parte de la población; ya que no son degradables y su disposición no se realiza de acuerdo con las normativas y procedimientos técnicamente desarrollados (Santimano et al., 2009)

De este contexto surgen como una potencial solución los biopolímeros. Debido a su origen y proceso de producción, han sido un foco para múltiples estudios en donde se han analizado estructuras y aplicaciones. Uno de los tipos de biopolímeros que más resaltan son los polihidroxialcanoatos, puesto que sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas son similares a las de algunos polímeros derivados del petróleo. De igual forma, los polihidroxialcanoatos se caracterizan por ser un producto que se puede obtener de múltiples fuentes de carbono y con diferentes tipos de microorganismos en una fermentación controlada (Mohandas et al., 2018; Koller et al., 2014; Santimano et al., 2009; Gomaa, 2014; Chaudhry et al., 2011)

Entre las fuentes potenciales de carbono, los azúcares residuales de los ingenios azucareros, que se obtienen del proceso de cristalización, con el nombre de melaza, son una fuente para la producción de PHA, ya que presenta una opción a los productos tradicionales para los que se emplea este subproducto. Mientras que los microorganismos utilizados, comúnmente pertenecen al género *Bacillus*, por sus acelerados crecimientos reportados y sensibilidad a concentraciones de componentes fermentativos que inducen la formación de polímeros buscados (Acosta et al., 2018; Naheed y Jamil, 2014)

Para contar con la información necesaria para escalar el proceso y poder predecir el comportamiento de la fermentación, es esencial contar con un modelo cinético, que logre expresar las concentraciones de los componentes de la fermentación en función del tiempo. Su determinación se basa comúnmente en técnicas de simulación de procesos con modelos matemáticos, que emplean modelos explicativos del crecimiento microbiano para correlacionar variables. Estos modelos son la base para determinar rendimientos y concentraciones a diferentes escalas; además son fundamentales para calcular el volumen de los biorreactores (Choi y Lee, 1997; Santhanam, 2010; Van Wegen, 1998). Por esto, en este trabajo, se presenta un modelo propuesto para poder predecir el comportamiento de la fermentación de melaza y producción de PHA con el tiempo.

## Análisis Cinético

### Modelo de Contois

Utilizando modelos anteriormente desarrollados por Mahmoudi et al. (2010) las investigaciones previas desarrolladas en el centro de procesos industriales y las simulaciones preliminares con el software Berkeley Madonna, se definió con el mínimo error el modelo de Contois como base para predecir el comportamiento de las variables estudiadas. Este modelo se encuentra basado en la siguiente expresión para la velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S (C_N + C_S)} \quad (1)$$

En donde,  $C_S$  representa la concentración instantánea de sustrato,  $\mu_{\max}$  la velocidad máxima de crecimiento específica,  $C_N$  la concentración instantánea de microorganismos y  $K_S$  la constante de afinidad al sustrato. Con este modelo de velocidad específica de crecimiento celular como base y utilizando lo desarrollado por Mahmoudi et al. (2010) como referencia, se introdujeron secuencialmente las modificaciones necesarias para lograr predecir las diferentes variables estudiadas a nivel laboratorio.

La primera variable a predecir en el sistema fue la concentración instantánea de microorganismos, la cual se expresa utilizando la definición de velocidad específica de crecimiento y las variables anteriormente definidas de la siguiente forma:

$$\frac{dC_N}{dt} = \mu_{\max} \left[ \frac{C_S}{K_S (C_N + C_S)} \right] C_N \quad (2)$$

El cambio de concentración de producto ( $C_P$ ) presentó el mejor ajuste con la introducción de un modelo de Luedeking-Piret modificado con lo establecido en Liu, S. (2012) y estudiando previamente de forma experimental, que bajo las condiciones estudiadas el PHA se produce después de las 20h de reacción. Esto se muestra en la ecuación 3:

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{A(C_N - 0.0068)}{Y_{X/P}} + BC_P \quad (3)$$

En donde,  $Y_{X/P}$  es el rendimiento instantáneo de microorganismos con respecto a la generación de producto,  $C_P$  es la concentración de producto,  $A$  es la constante del modelo de Luedeking-Piret y  $B$  es la constante de mantenimiento asociada al producto.

Utilizando una expresión del mismo origen, fue posible predecir el comportamiento de la concentración del principal subproducto obtenidos en la reacción (ácido láctico), la misma se muestra en la ecuación 4:

$$\frac{dC_{PS}}{dt} = \mu_{\max} \left[ \frac{C_S}{K_S(C_N + C_S)} \right] C_N * \frac{Y_{PS}}{X} \quad (4)$$

En donde  $Y_{PS/X}$  es el rendimiento instantáneo de ácido láctico con respecto a la concentración de microorganismos,  $X$ , y  $C_{PS}$  es la concentración de subproducto (ácido láctico). Esta concentración fue medida en un medio ácido utilizando muestras de la fermentación y no se correlaciona con el pH directamente, debido a la adición de base para mantener el pH en el rango que maximiza rendimientos de PHA.

El sustrato fue predicho con una forma derivada de la teoría de crecimiento celular especificada en Liu (2012) y el coeficiente global de transferencia de masa del transporte de azúcares al interior de la célula, el cuál es influenciado por el transporte activo en la membrana celular, la cual a su vez se ve influenciada considerablemente por las concentraciones de sales como se describe en Santhanam (2010). Esta combinación representa una innovación necesaria de acuerdo a las observaciones experimentales, para lograr predecir el comportamiento de los datos generados, y se muestra en las ecuaciones 5 y 6:

$$\frac{dC_{S^*}}{dt} = -k_t(C_{S^*} - C_S) \quad (5)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \left[ \frac{-\mu_{\max} \left( \frac{C_S}{K_S(C_N + C_S)} \right) C_N}{\frac{Y_X}{S}} \right] + k_t(C_{S^*} - C_S) \quad (6)$$

En donde,  $k_t$  representa el coeficiente global de transferencia de masa en todo el trayecto al interior de la célula,  $C_{S^*}$  es la concentración de sustrato en el medio de cultivo y  $C_S$  la concentración de sustrato utilizada en la célula. A pesar de que el modelo ajusta con el mínimo error a los valores experimentales, la concentración  $C_S$  no fue medida experimentalmente y representa una variable que permite la explicación del fenómeno observado físicamente.

Finalmente, basado en la ecuación 4, se definió una ecuación para seguir los datos experimentales de la relación C:N, medida al medio fermentativo luego de remover la biomasa presente. La misma, representa una forma de seguir la concentración de especies nitrogenadas en el medio, que según lo reportado por Chaudhry (2011), es fundamental para inducir y maximizar la formación de PHA. Esta ecuación se muestra en la ecuación 7:

$$\frac{dC_{C:N}}{dt} = \left[ \frac{-\mu_{\max} \left( \frac{C_S}{K_S(C_N + C_S)} \right) C_N}{\frac{Y_X}{S} Y_{C:N}} \right] \quad (7)$$

Donde C:N es la relación carbono nitrógeno del caldo fermentativo, y  $Y_{C:N}$  representa el rendimiento asociado al cambio de la concentración de nitrógeno en el medio en función del crecimiento celular.

### Dependencia del pH de la mezcla fermentativa

Considerando la influencia que presenta el pH sobre la generación de PHA y las variaciones de las concentraciones de las especies en el medio fermentativo, y tomando en cuenta que la condición experimental de máximo rendimiento fue al regular el mismo con una base fuerte (solución 1M de hidróxido de sodio) en el reactor, surgió el interés de poder expresar el cambio de pH en función del consumo de sustrato. Esto se desarrolló utilizando una función discontinua, porque su valor puede asociarse a generación de ácidos orgánicos, pero se ve alterado por las adiciones de base en momentos específicos de la fermentación. La ecuación 8 representa la predicción de los intervalos continuos, la cual permite la predicción del pH en el reactor:

$$\frac{d_{pH}}{dt} = \left( Y_{\frac{pH}{S}} \right) \frac{dC_S}{dt} \quad (8)$$

En donde pH representa el pH del medio de cultivo y  $Y_{pH/S}$  es la relación instantánea de cambio del pH relacionada al consumo del producto y asociada a la producción de ácidos orgánicos en las condiciones anaerobias utilizadas.

## Materiales y Métodos

### Producción de PHA a escala laboratorio

Para las experimentaciones que permitieron definir las condiciones que maximizaron rendimientos de PHA y producción de microorganismos, se realizaron corridas en triplicado basado en las condiciones reportadas por Duarte (2021), Chaudhry (2011) y Mahmoudi et al. (2010). Previamente a las fermentaciones, la melaza utilizada fue invertida a pH 1 y con un 1.5 h de reacción a 80°C, asegurando su conversión superior al 90% a glucosa y fructosa con análisis efectuados de cromatografía líquida de alta precisión, en el cromatógrafo Perkin Elmer Quatpump 1100, utilizando una columna Agilent Hi-Plex H Ca 300x7.8mm con poro de 5µm, fase móvil acuosa, detector de índice de refracción y un automuestreador a 25°C. La cepa de *Bacillus cereus* ATCC® 14579TM utilizada, fue previamente adaptada con partes iguales del medio formulado (Cuadro 1) y caldo nutritivo, dejando el crecimiento mantenerse por 48h a 200 rpm y 35°C.

La fermentación se realizó en un reactor New Brunswick 3364M, colocando el medio preparado de acuerdo con lo establecido previamente por Duarte (2021), Chaudhry (2011), Ling (1997) y Supono (2013), y que se muestra en el cuadro 1, llenando a 10L y esterilizando por 30min y 121°C. Luego de alcanzar la temperatura de fermentación de 35°C, se inoculó el medio con células de *B. cereus* centrifugadas de

la adaptación realizada, para alcanzar una concentración inicial de 60 g/L. La fermentación se llevó a cabo anaeróbicamente durante 96 horas a 200rpm, con control de pH (4.75 a 7.00) y temperatura (35°C). Durante la fermentación, se tomaron muestras en intervalos de tiempo de 3 horas y se reguló el pH con una solución 1M de hidróxido de sodio.

Para cada muestra se realizaron mediciones de pH con un potenciómetro OHAUS ST300, se cuantificaron concentraciones de microorganismos por la técnica de peso seco, que consiste en centrifugar el medio y secar la pastilla de microorganismos, obteniendo la masa de los mismos por unidad de volumen analizada, y se cuantificaron concentraciones de azúcares y ácidos orgánicos en el cromatógrafo Perkin Elmer Quatpump 1100, utilizando una columna Agilent Hi-Plex H Ca 300x7.8 mm con poro de 5 µm, fase móvil acuosa, detector de índice de refracción y un automuestreador a 25°C.

Para analizar el PHA, se realizó una purificación por lisis celular, extracción y secado, utilizando 30 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 2% (g/g) y cloroformo 50% (g/g). El extracto orgánico se precipitó por evaporación y se llevó a cabo análisis por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con el espectrofotómetro IR Perkin Elmer Frontier ATB, para establecer la potencial identidad del producto obtenido. Picos característicos en las longitudes de onda de 2850 a 2960cm<sup>-1</sup> y 1735 a 1755cm<sup>-1</sup>

**Cuadro 1.** Medio formulado utilizado en las fermentaciones con volumen efectivo de 10L.

Especie	Masa (g)
Glucosa (en solución de la melaza hidrolizada)	220.00
Cloruro de amonio	14.50
Bicarbonato de Sodio	5.00
Fosfato monopotásico	19.99
Fosfato de disódio	15.95
Sulfato de magnesio heptahidratado	5.00
Cloruro de calcio dihidratado	0.10
Citrato de amonio férrico.	0.51
Sulfato de Zinc heptahidratado	0.11
Cloruro de Manganeso tetrahidratado	0.05
Ácido bórico	0.40
Molibdato de sodio dihidratado	0.22

correspondientes a los enlaces carbono hidrógeno y tensión del enlace estérico característico del PHA, así como señales en la región de la *huella dactilar*, fueron identificados con muestras de PHA estándar adquiridas de Merck e identificadas como *PHA milky* y *PHA transparente*.

Fermentaciones sucesivas se realizaron en triplicado, variando el rango de pH en el que se permitía que fluctuaran los valores de dicho parámetro, definiendo los siguientes intervalos: 1) de 4 a 7, 2) de 4.75 a 7.00, y 3) sin ajuste de pH; en donde se observó rendimientos máximos en el segundo intervalo, para microorganismos y PHA.

### Ajuste del Modelo Cinético

Tomando en cuenta los rangos de pH analizados y los estudios previos de Mahmoudi et al. (2010) y Duarte (2021), se probaron ecuaciones de crecimiento celular y consumo de sustrato, basados en el modelo de Monod, Contois y Teissier, como lo describe Liu (2012), obteniendo los errores mínimos cuadrados con el modelo descrito en la sección de análisis cinético. Este modelo permitió parametrizar y predecir el comportamiento de los datos con errores menores al 5% de las corridas realizadas para las condiciones 1, 2 y 3. De las cuales, se presentan los resultados de predicción para la condición 2, por ser la que obtiene mayores rendimientos y presenta la necesidad de una función discontinua para la

predicción del pH de la mezcla fermentativa, por la adición de solución básica en tiempos específicos de control.

Los análisis y parametrizaciones se realizaron con la función de ajuste de curvas a datos experimentales del software Berkeley Madonna®, dando el mismo peso a las 6 variables estudiadas en la mezcla fermentativa y comprobando su funcionalidad gráficamente. El código utilizado para el estudio y parametrización se muestra anexo.

## Resultados y Discusión

### Producción de PHA

El análisis de la figura 1 muestra que el espectro IR obtenido para las muestras de PHA, presenta picos característicos para los poliésteres en el rango de longitud de onda de 2850 a 2960 $\text{cm}^{-1}$  y para su enlace estérico de 1735 a 1755 $\text{cm}^{-1}$  y estiramientos característicos en las frecuencias de 1210 a 1160  $\text{cm}^{-1}$  y 1100 a 1030  $\text{cm}^{-1}$ , con lo que se pudo identificar la presencia de PHA en el producto purificado durante todas las etapas de la reacción y tiempos superiores a 20h de reacción. La comparación con los espectros estándar hace evidente su presencia, pero muestra también trazas de azúcares presentes en la fase orgánica extraída, de donde se evidencia la importancia de otros estudios que definan las mejores condiciones de dicha purificación.

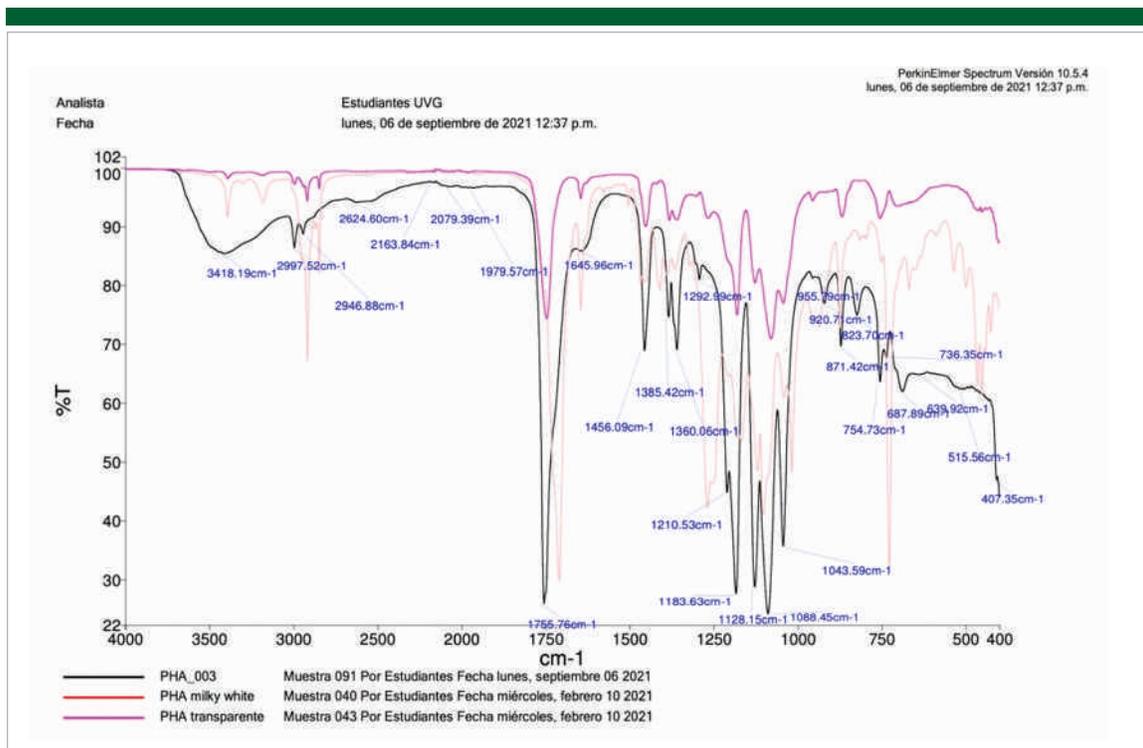


Figura 1. Comparación de espectro IR con estándares de PHA comercial [muestra en negro identificada como PHA\_003]

**Cuadro 2.** Rendimientos globales de microorganismos, producto y subproductos obtenidos de la fermentación de melaza con *Bacillus cereus*.

Parámetro	Valor
Rendimiento de concentración microorganismos con respecto a consumo de sustrato ( $Y_{x/s}$ g/g)	$60.53 \pm 1.35\%$
Rendimiento de concentración de producto con respecto a consumo de sustrato ( $Y_{p/s}$ g/g)	$52.27 \pm 1.11\%$
Rendimiento de concentración de producto con respecto a generación de microorganismos ( $Y_{p/x}$ g/g)	$86.35 \pm 1.93\%$
Rendimiento de generación de subproducto con respecto a consumo de sustrato ( $Y_{sp/s}$ g/g)	$15.62 \pm 0.29\%$

\*Rendimientos experimentales obtenidos luego de 96 h de reacción en un reactor New Brunswick 3364M.

**Cuadro 3.** Parámetros cinéticos del modelo de Contois modificado para las ecuaciones 1 a 8 .

Parámetro	Símbolo	Valor
Velocidad máxima de crecimiento específica ( $h^{-1}$ )	$\mu_{max}$	0.0316
Constante de afinidad de sustrato	$K_s$	0.5656
Rendimiento de concentración de microorganismos respecto al cambio de concentración de sustrato (g/g)	$Y_{x/s}$	0.5664
Rendimiento de generación de producto respecto al crecimiento celular (g/g)	$Y_{p/x}$	0.0322
Rendimiento de subproductos respecto al crecimiento celular (g/g)	$Y_{ps/x}$	$1.714 \times 10^{-3}$
Coefficiente global de transferencia de masa de sustrato ( $h^{-1}$ )	$k_f$	0.2901
Constante de mantenimiento de producto ( $h^{-1}$ )	B	3.25
Constante de cambio de relación C:N	$Y_{C:N}$	$1.72 \times 10^{-5}$
Constante de cambio de pH con respecto al consumo de sustrato	$Y_{pH/s}$	0.418
Constante del Modelo de Luedeking-Piret ( $h^{-1}$ )	A	63.08

### Rendimiento de los productos de la reacción

Con las condiciones empleadas, se obtuvieron los rendimientos globales con el valor máximo y mínimo de concentraciones de sustrato, microorganismos y PHA en la mezcla fermentativa, y utilizando la razón de consumo o generación de los compuestos, como se establece en Liu (2012). Lo valores obtenidos para los diferentes rendimientos de las condiciones que los maximizó, se muestran en el cuadro 2. Si comparamos estos valores con lo reportado en investigaciones previas, se encuentra que Mohandas (2018) reporta concentraciones de 3.72 g/L de *B. cereus* y 2.54 g/L de PHA utilizando glicerol como fuente de carbono; mientras que Koller (2014) presenta concentraciones de 5.0 g/L de *P. Hydrogenovara* y 1.27 g/L de PHA utilizando lactosa como fuente de carbono. Para la melaza, se han reportado valores (Chaudry, 2011; Goma, 2014; y Santimano, 2009) de rendimientos de PHA con

consumo de sustrato, de hasta 62.1% (g/g) y concentraciones de 6.0 g/L. De manera, que con concentraciones de hasta 12 g/L, las condiciones empleadas sobrepasan lo reportado anteriormente, conservando el mismo rango de rendimientos con respecto al consumo de sustrato.

### Cinética de reacción

La cuantificación de los microorganismos, sustrato, el producto y subproductos obtenidos con el tiempo permitieron la simulación utilizando el software Berkeley Madonna®, y ajustando los modelos desarrollados de forma progresiva con la herramienta descrita en la metodología. Los parámetros cinéticos que presentan una mejor predictibilidad para el sistema (errores de predicción menor al 5%), bajo las condiciones evaluadas se presentan en el cuadro 3.

Debe notarse que los parámetros calculados de los cuadros 2 y 3 con respecto a los rendimientos tienen una variación propia del error de la analítica utilizada, la cual influencia el ajuste del modelo cinético a los datos experimentales. Mientras que comparando los datos cinéticos con los estudios previos de Mahmoudi et al. (2010), puede mencionarse que la velocidad máxima de crecimiento específica es superior con un valor en su estudio de  $0.36 \text{ h}^{-1}$  y una  $K_S$  menor con valor de  $106 \text{ g/L}$ . Esto es causado por el tipo de modelo y

las condiciones empleadas, que difieren entre ambas experimentaciones, pero cuya comparación se valida ante la ausencia de otros estudios cinéticos.

El ajuste de las concavidades de las curvas generadas por el modelo se muestra en las figuras 2 a la 6. En las cuales se muestran los datos obtenidos del muestreo de la reacción a lo largo del tiempo. Las líneas representan los modelos matemáticos y los puntos los datos experimentales.

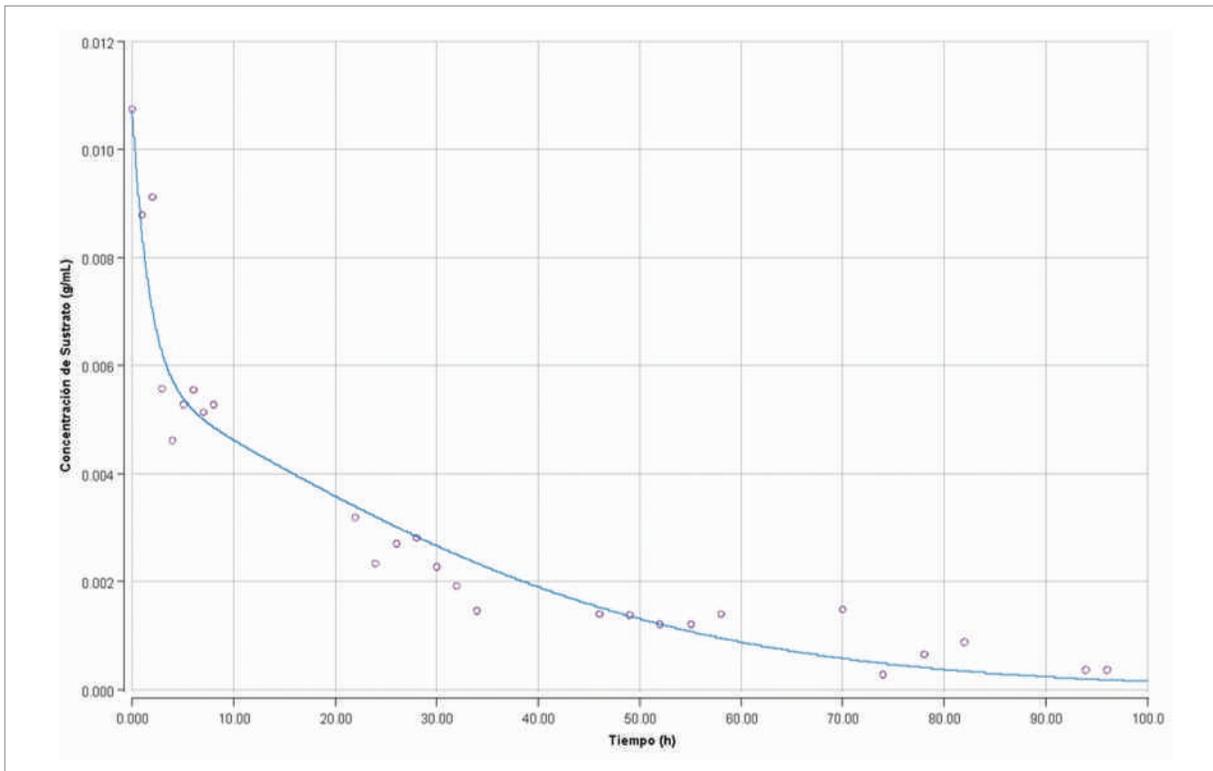


Figura 2. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales de las concentraciones de glucosa medidas con el tiempo.

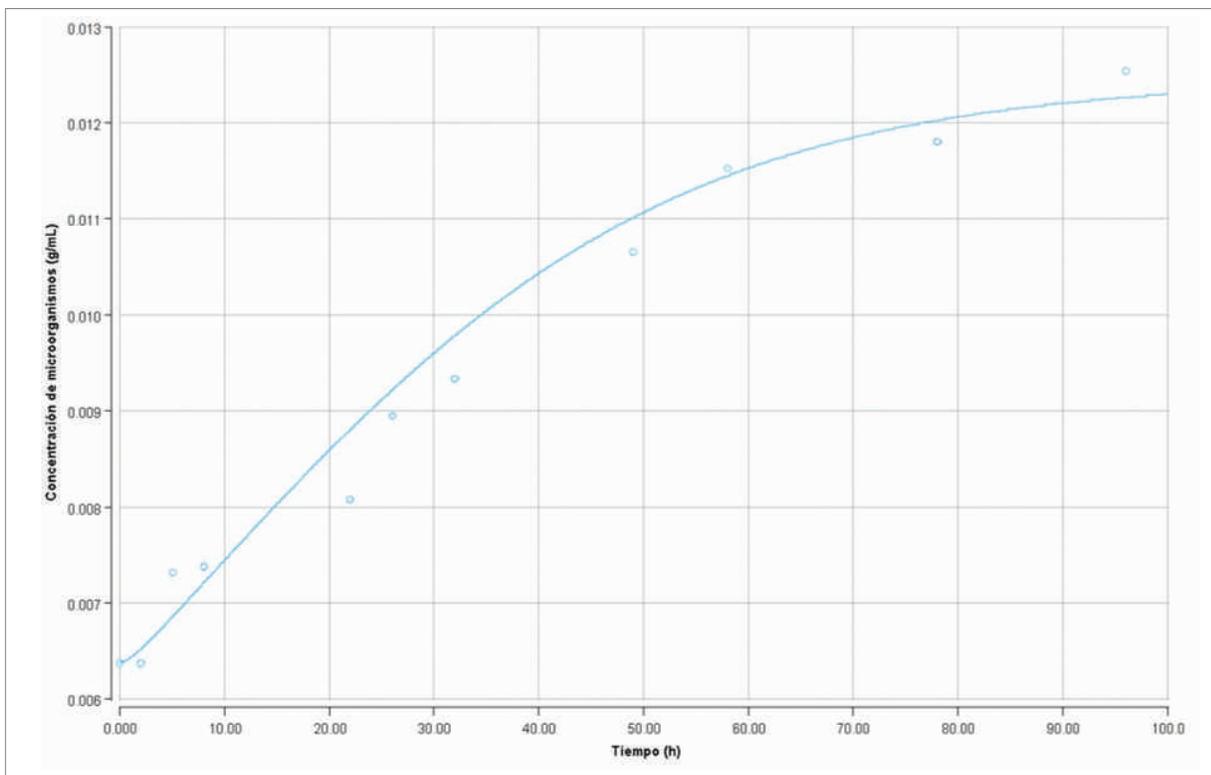


Figura 3. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales de las concentraciones de *B. cereus* en la mezcla fermentativa medidas con el tiempo.

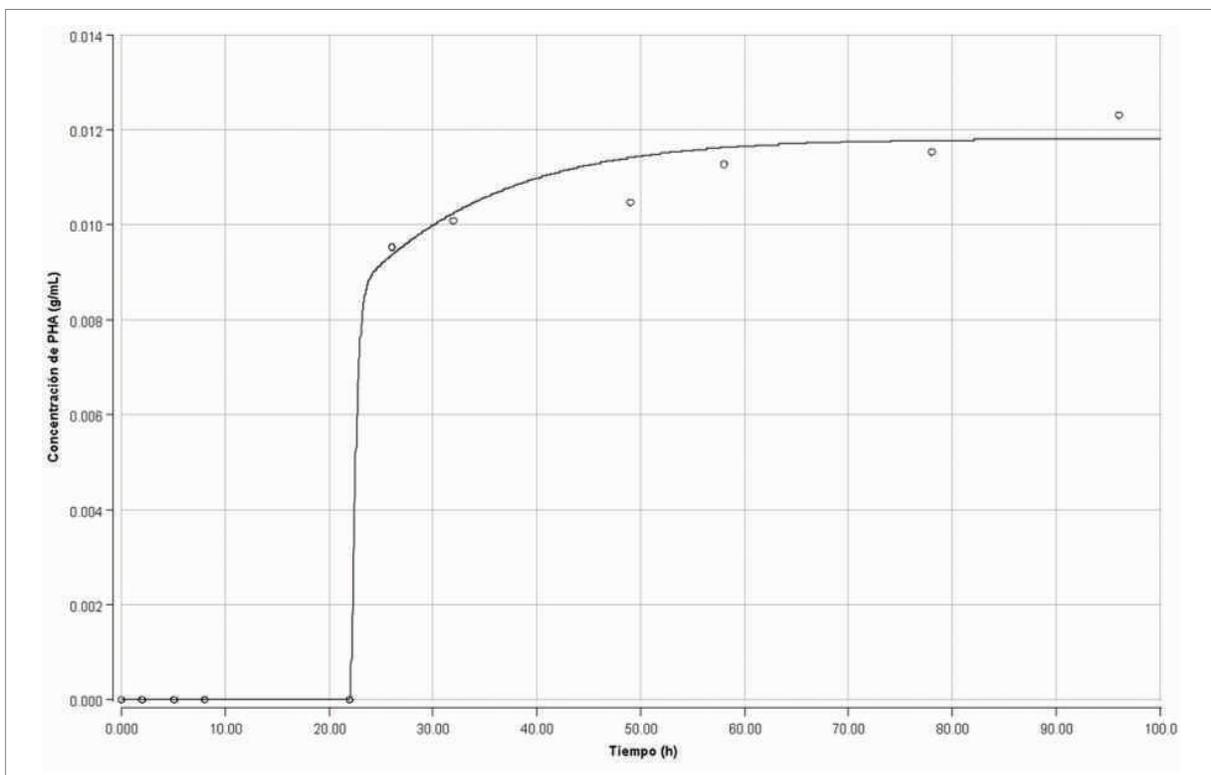


Figura 4. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales de las concentraciones de PHA extraído de las células medidas con el tiempo.

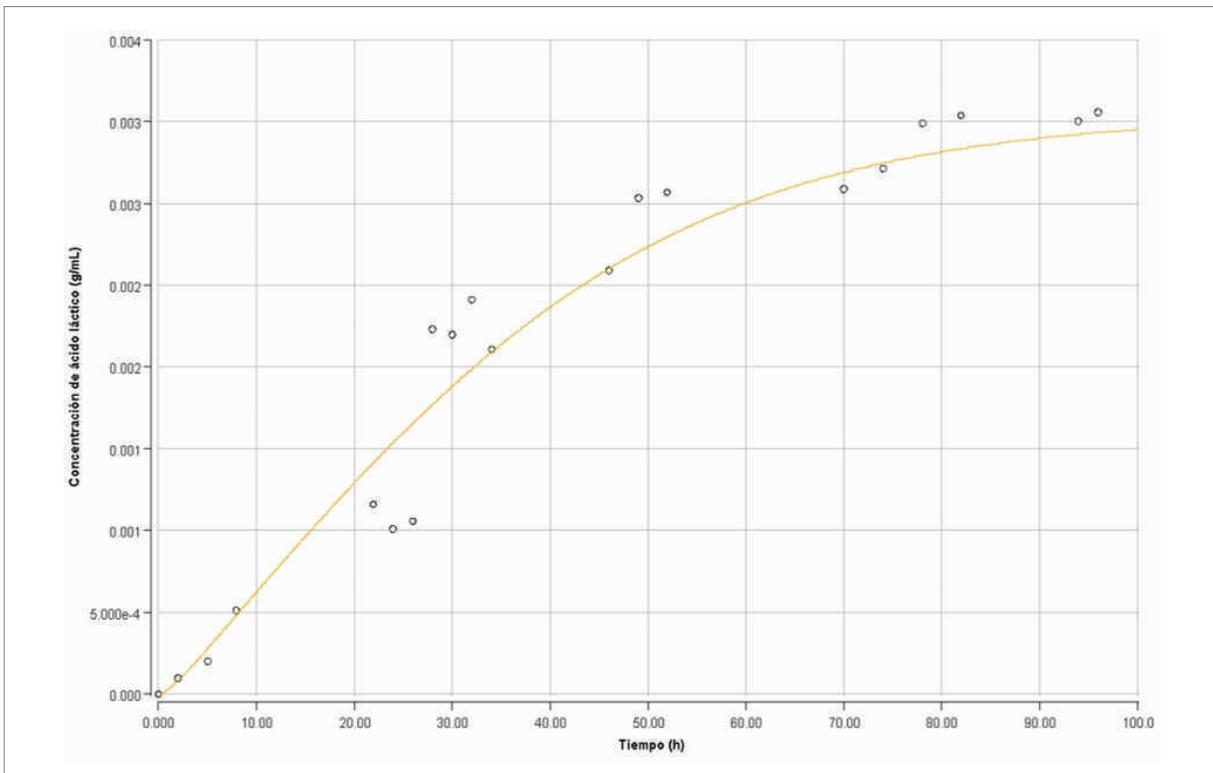


Figura 5. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales de las concentraciones de ácido láctico (subproducto) en la mezcla fermentativa medidas con el tiempo.

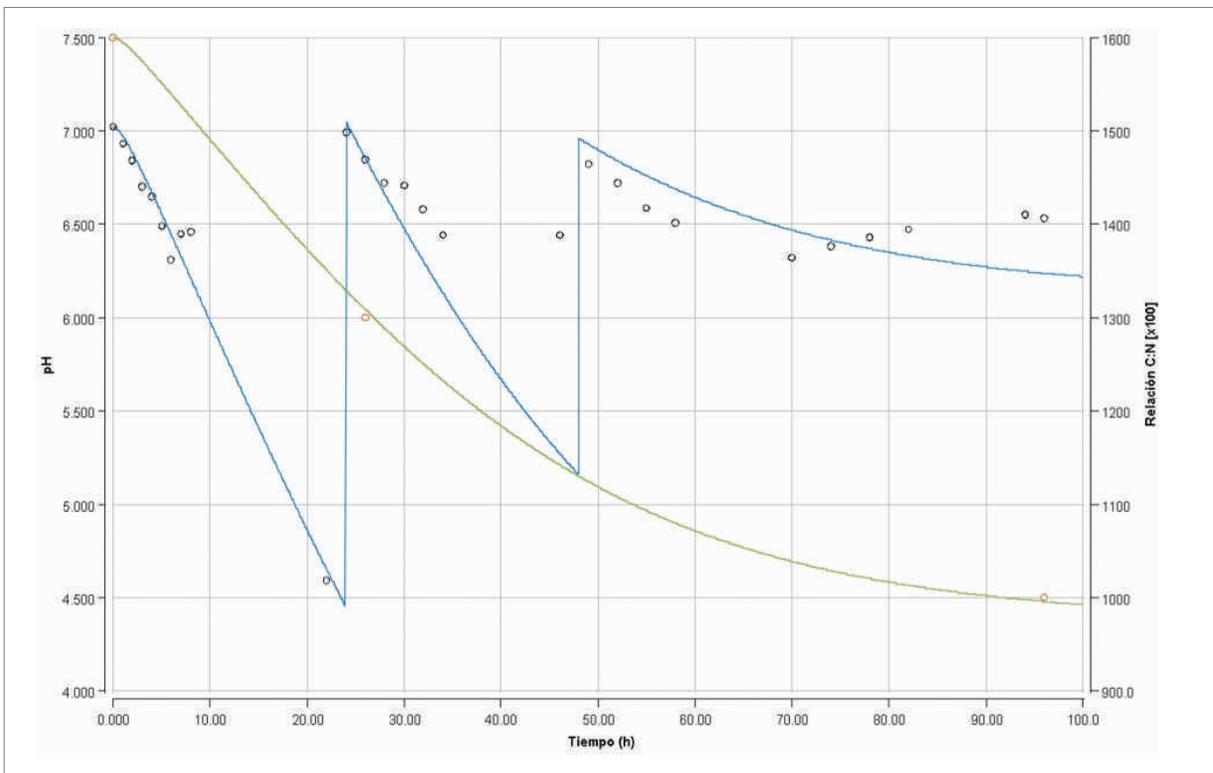


Figura 6. Modelo cinético y su predicción de los datos experimentales de pH y relación C:N en la mezcla fermentativa medidas con el tiempo.

Variantes de este modelo pueden aplicarse a diferentes condiciones de reacción, siempre que la parametrización se realice en dependencia de cada uno de los casos. Corridas de los otros rangos de control de pH han sido estudiadas con predicciones de la misma calidad técnica que las mostradas en las figuras.

## Conclusiones

- El modelo desarrollado permitió predecir el efecto de múltiples variables en el crecimiento de microorganismos y generación de PHA, incluso introduciendo la modificación de pH al haber un control del mismo con una base fuerte. Este efecto de estudio se logró con modificaciones como (1) la introducción de una modificación al modelo ligado a la transferencia global de masa del sustrato, (2) la introducción de un modelo de Luedeking-Piret para la predicción del incremento de producto, y (3) la introducción de funciones para la predicción del pH y la relación C:N.
- En el análisis experimental empleado para generar el modelo, los espectros FTIR mostraron picos del grupo carbonilo característicos para los poliésteres en las regiones de 1750 a 1735  $\text{cm}^{-1}$  y estiramientos del mismo en las frecuencias de 1210 a 1160  $\text{cm}^{-1}$  y 1100 a 1030  $\text{cm}^{-1}$ , por lo que el producto obtenido en las corridas presenta grupos funcionales característicos de la estructura definidas para el PHA. Por otro lado, la experimentación realizada con la cuantificación de microorganismos, sustrato y polihidroxialcanoatos permitió establecer que las condiciones con una relación C:N  $16 \pm 0.62$  (m/m) a pH promedio  $6.54 \pm 0.44$  de la fermentación de melaza con *Bacillus cereus*, tuvieron rendimientos de microorganismos con respecto a consumo de sustrato ( $Y_{X/S}$ ) de  $60.53 \pm 1.35\%$  (m/m) y de concentración de producto con respecto a crecimiento de sustrato ( $Y_{P/S}$ ) de  $52.27 \pm 1.11\%$  (m/m), los cuales se encuentran en el rango de estudios previos, pero con concentración final de PHA de 12g/L, que es superior a los estudios usados como referencia.
- Finalmente, debe mencionarse que el modelo cinético desarrollado, es por lo tanto capaz de proveer la información necesaria dentro del sistema fermentativo. Esta predictibilidad en cuanto al comportamiento de la reacción de PHA, habilita el espacio para un futuro escalamiento. De manera que, empleando ecuaciones de diseño, se puede aplicar dicho modelo a desarrollos específicos en la industria, que van desde el diseño y selección de equipos, hasta el control y automatización de los equipos principales y auxiliares empleados en la fabricación de estos polímeros.

## Bibliografía

- Acosta, A.; Alcaraz, W.; Cardona, M. (2018) *Sugarcane molasses and vinasse as a substrate for polyhydroxyalkanoates (PHA) production* Research Group on Biotransformation, School of Microbiology, University of Antioquia, Medellín, Colombia.
- Chaudhry, N.; Jamil, N.; Ali, I. (2011) *Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources* Annals of Microbiology 61: 623-629.
- Choi, J., Lee, S. (1997) *Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation* Bioprocess Engineering, 17 (6): 335-342. doi: 10.1007/s004490050394
- Duarte, B. (2021) *Evaluación de tres cepas para producir polihidroxialcanoatos a escala laboratorio utilizando melaza*. Tesis Lic. Ing. Guatemala, Univ. Del Valle de Guatemala, Fac. Ing. 144 p.
- Gomaa, E. (2014) *Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by Bacillus subtilis and Escherichia coli grown on cane molasses fortified with ethanol* Brazilian Archives of Biology and Technology 57 (1): 145-154.
- Koller, M., Salerno, A., Braunegg, G. (2014) *Polyhydroxyalkanoates: Basics, Production and Applications of Microbial Biopolyesters* Bio-based Plastics: Materials and Applications pp. 137-170. doi: 10.1002/9781118676646.ch7
- Ling, Y., Wong, H., Thomas, C., Williams, D., Middleberg, A. (1997) *Pilot-scale extraction of PHB from recombinant E. coli by homogenization and centrifugation* Bioprocess Engineering 7 (1): 9-15. doi: 10.1023/a:1007900416356
- Liu, S. (2012) *Bioprocess engineering: Kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design*. Elsevier Science & Technology.
- Mahmoudi, M., Sharifzadeh, M., Najafpour, G., Tabandeh, F., Eisazadeh, H. (2010) *Kinetic model for polyhydroxybutyrate (PHB) production by Hydrogenophaga pseudoflava and verification of growth conditions* African Journal of Biotechnology 9 (21): 3151-3157.
- Mohandas, S., Balan, L., Jayanath, G., Anoop, B., Philip, R., Cubelio, S., Bright Singh, I. (2018) *Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate from marine Bacillus cereus MCCB 281 utilizing glycerol as carbon source* International Journal of Biological Macromolecules 119: 380-392. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.044
- Naheed, N., Jamil, N. (2014) *Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in Enterobacter sp. SEL2* Brazilian Journal of Microbiology 45 (2): 417-426. doi: 10.1590/s1517-83822014000200008
- Santhanam, A., Sreenivasan, S. (2010) *Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from Alcaligenes spp. and Pseudomonas oleovorans using different carbon sources* African Journal of Biotechnology 9 (21): 3144-3150.
- Santimano, M.C., Prabhu, N.N., Garg, S., (2009) *PHA production using low-cost agro-industrial wastes by Bacillus sp. strain COL1/A6* Research Journal of Microbiology 4: 89-96.
- Supono, J., Prayitno, S., Darmanto, Y. (2013) *The effect of different C:N and C:P ratio of media on the content of Polyhydroxybutyrate in biofloc inoculase with Bacterium Bacillus cereus* Coastal Development 16 (2): 114-120.
- Van Wegen, R.J., Ling, Y., Middleberg, A.P.J. (1998) *Industrial production of polyhydroxyalkanoates using Escherichia Coli: an economic analysis* Transactions of the Institute of Chemical Engineering 16 (1): 417-426.

Código utilizado en la simulación con Berkeley Madonna®

```

METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME = 100
DT = 0.02
Mu = (MuMax*(Csi)/(Ks*CN + (Csi)))
Rd1 = Mu*CN
Rd2 = -Rd1/Yxs
Rtdm = kt*(Cs-Csi)
Rd3 = A*(CN4-0.00638)/Ypx4 + B*CP4
Rd5 = IF TIME <= 24 AND TIME >= 23.98 THEN 130 ELSE IF TIME <= 48
      AND TIME >= 47.98 THEN 90 ELSE Rd2/YPH
Rd4 = Rd1/Yps
Rd6 = Rd2/YCN

INIT Cs = 0.01274
INIT CN = 0.00638
INIT Csi = 0
INIT CP = 0
INIT PH = 7.02
INIT Csp = 0
INIT CN = 1600
INIT Csi = 0

d/dt(Cs) = - Rtdm
d/dt(Csi) = Rd2 + Rtdm
d/dt(CN) = Rd1
d/dt (CP) = Rd3
d/dt(PH) = Rd5
d/dt(Csp) = Rd4
d/dt (CN) = Rd6

```

\*\*Definir crecimiento Rd3 después de 20h de reacción.