

## Correlación del Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la Producción de Polihidroxicanoatos de Cadena Media (PHA<sub>MCL</sub>) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi

Diana M. Vanegas<sup>(1)</sup> y Margarita E. Ramírez<sup>(2)</sup>

Universidad Pontificia Bolivariana, Facultad de Ing. Química, Escuela de Ingenierías, (1) Grupo Pulpa y papel, (2) Grupo CIBIOT, Cir1 # 70 – 01 Bloque 11, Medellín, Colombia  
(e-mail: diana.vanegas@upb.edu.co; margarita.ramirez@upb.edu.co)

Recibido Jul. 31, 2015; Aceptado Sep. 23, 2015; Versión final Nov. 23, 2015, Publicado Abr. 2016

### Resumen

En este trabajo se analizan modelos para correlacionar el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*, un bacilo Gram-negativo, en la producción de polihidroxicanoatos de cadena media (PHA<sub>MCL</sub>). Se evaluó la melaza y la glucosa como fuente de carbono, por medio del crecimiento y producción del biopolímero; se encontró que la melaza a concentraciones por debajo de 60 g/L y 10 g/L de azúcares reductores promueve el crecimiento y producción de Polihidroxicanoatos de cadena media. El modelado del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* se realizó empleando los modelos cinéticos primarios de Gompertz, logístico y Baranyi. Se evaluaron los parámetros cinéticos de crecimiento tales como tiempo de latencia ( $\lambda$ ), máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y concentración celular máxima ( $y_{max}$ ). Los modelos de Gompertz y Baranyi presentaron un mejor ajuste en relación al modelo logístico; se encontraron diferencias entre el modelo de Gompertz y Baranyi en valores encontrados para el tiempo de latencia. Sin embargo, los tres modelos utilizados presentaron un buen ajuste con un  $R^2$  superior a 0,98 en todos los casos evaluados.

*Palabras clave:* *Pseudomonas fluorescens*; cinética de crecimiento; metabolito secundario; melaza; polihidroxicanoatos de cadena media; PHA<sub>MCL</sub>

## Correlation of *Pseudomonas fluorescens* Growth in the Production of Medium Chain Length Polyhydroxy-alkanoates (PHA<sub>MCL</sub>) by Gompertz, Logistic and Baranyi Primary Models

### Abstract

In this work, models to correlate the growth of *Pseudomonas fluorescens* (a gram negative rod shaped bacterium) in the production of medium chain length polyhydroxy-alkanoates (PHA<sub>MCL</sub>) are analyzed. Sugarcane molasses and glucose were evaluated as carbon source by the cellular growth and production of polyhydroxyalkanoates. It was found that the molasses at concentrations lower than 60 g/L and 10 g/L of reducing sugars promotes the polihydroxicanoate production of medium length chain. Prediction of *Pseudomonas fluorescens* growth was done using the primary kinetic models of Gompertz, Logistic and Baranyi. Growing kinetic parameters, such as latency ( $\lambda$ ), maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ), and maximum cell concentration ( $y_{max}$ ), were determined. Gompertz and Baranyi models showed the best fit to the experimental results, exhibiting some discrepancies in latency values. However, the three models show a correlation value  $R^2$  higher than 0.98.

*Keywords:* *Pseudomonas fluorescens*; Growth kinetic; secondary metabolites; molasses; medium chain length polyhydroxyalkanoates; PHA<sub>MCL</sub>

## INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres producidos por bacterias como material de almacenamiento de energía (Reddy et al., 2003; Shen et al., 2009). Los PHA se clasifican, según la longitud de la cadena carbonada, en PHA de cadena corta (SCL), PHA de cadena media (MCL) y copolímeros de SCL y MCL. Los copolímeros de SCL y MCL de PHA han mostrado un conjunto de propiedades físicas que les otorgan un mayor rango de aplicaciones (Ma et al., 2009). Los polihidroxicanoatos MCL (PHA<sub>MCL</sub>) producidos generalmente contienen estructuras monoméricas de 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxi octanoato (3HO), 3-hidroxidecanoato (3HD) y 3-hidroxidodecanoato (3HDD).

Sánchez et al. 2003 establecieron que las cepas de *Pseudomonas* pueden acumular PHA<sub>MCL</sub> a partir de alcanos, alquenos, alcoholes y ácidos carboxílicos, y la estructura monomérica obtenida muestra una composición relacionada con la fuente de carbono suministrada. Análisis genéticos han mostrado que la especie *Pseudomonas* contiene al menos dos enzimas diferentes de polimerización con diferente especificidad de sustrato, que les permite sintetizar una amplia variedad monómeros (Lee y Choi, 1999; Sudesh et al., 2000).

La producción de polihidroxicanoatos es un bioproceso complejo en el que la calidad y el rendimiento del producto dependen de un conjunto de factores como la cepa y la ruta metabólica involucradas, parámetros de fermentación como temperatura, pH, fase de producción (metabolito secundario), fuente de carbono, y la condición de agotamiento de los nutrientes requeridos para la síntesis. Con el fin de optimizar el proceso de fermentación de PHA, el modelo cinético es útil porque incluye balances de masa celular, concentración del producto, utilización de sustratos, e identificación del sustrato limitante. Los modelos cinéticos facilitan el análisis de datos y proporcionan estrategias para resolver problemas presentes en los procesos de fermentación; información que es potencialmente valiosa para la mejora del rendimiento del proceso por lotes. Rendimientos de productos finales y conversiones de sustrato son criterios con efecto sobre la productividad (Divyashree et al., 2009).

Los modelos cinéticos de crecimiento celular comúnmente se basan en el modelo teórico propuesto por Monod, el cual establece las constantes cinéticas que especifican el comportamiento de dicho microorganismo, generalmente de tipo sigmoide. No obstante, dicho modelo es muy simple y no siempre permite obtener una buena representación de los datos de crecimiento del microorganismo. Con el propósito de alcanzar un mayor grado de ajuste a los datos experimentales, autores como Zwietering *et al.* (1990) han propuesto otros modelos como alternativa al de Monod; los autores evaluaron diferentes funciones sigmoideas y encontraron que estadísticamente la función de Gompertz y la función logística describen adecuadamente el crecimiento de los microorganismos (Carrillo *et al.*, 2007). Sin embargo, el modelo de Baranyi es cada vez más popular y diversos estudios lo postulan como el mejor (Zhao *et al.*, 2014).

En este trabajo se evaluaron inicialmente dos fuentes de carbono glucosa y melaza, se determinó la producción de PHA y la concentración de biomasa, se seleccionó la fuente de carbono que favoreció el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* y la producción de PHA. Posteriormente, se evaluaron los efectos de la temperatura en el crecimiento del microorganismo y se modeló la cinética de crecimiento microbiano mediante el ajuste de los datos los modelos de Gompertz, logístico y Bayari para temperaturas de 26°C, 28°C y 30°C, se compararon estos modelos mediante los parámetros cinéticos y su ajuste a los modelos matemáticos propuestos.

## METODOLOGÍA

### *Microorganismo y medio de cultivo*

*Pseudomonas fluorescens* migula 49839 TM fue cultivada en un medio suplementado con: 1 g/L de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mL/L de sln 20% (p/v) de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mL/L de sln 1% (p/v) de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 1 mL/L de una solución de micronutrientes, las sales y micronutrientes son grado reactivo Merck (Jiang et al., 2008; Pijuan et al., 2009; Thakor et al., 2005). Como fuente de carbono fueron empleadas glucosa grado analítico de Merck y melaza producida por Ingenio Castilla para Productos Naturales Arco Iris con un contenido de glucosa de 12% y fructosa 13%. Se evaluaron diferentes concentraciones de melaza y glucosa como se muestra en la Tabla 1 y se determinó el crecimiento de biomasa después de 60 h de fermentación. Los ensayos fueron realizados en erlenmeyers con un volumen de medio de 250 mL, 120 rpm, pH inicial de 5,5 y 30 °C. Se cuantificó el biopolímero obtenido.

### *Ensayos cinéticos*

Para la preparación del inóculo 0,25 L caldo nutritivo (Merck), previamente esterilizado en una autoclave (All American, 25x1), se inóculo con *Pseudomonas fluorescens* ATCC 4983 a 30 °C durante 24 h. Este se adiciona a un biorreactor *bioflo 110 fermentor* con 2.5 L de medio, con control de pH, temperatura, oxígeno disuelto y agitación mecánica con dos impulsores de disco de paletas planas tipo *Rushton*. Se empleó el

medio de cultivo suplementado con sales y micronutrientes y una concentración de melaza de 40 g/L, se realizaron adiciones de antiespumantes para controlar la espumación durante la fermentación. Los parámetros de operación del reactor se fijaron con las siguientes condiciones: volumen de medio 2,5 L, pH 6,5 – 7,5 y 350 rpm, flujo de aire 2 L/min y se realizaron variaciones de temperatura de 26, 28, 30, 33 y 35 °C. Los parámetros evaluados fueron: concentración de biomasa y consumo de sustrato (nitrógeno y azúcares).

Tabla 1: Concentración de fuente de carbono en los medios evaluados

	Glucosa (g/L)	Melaza (g/L)	Glucosa/Melaza	Azúcares reductores (g/L)
Medio 1	20	0	20/0	20
Medio 2	0	20	0/20	5
Medio 3	0	40	0/40	10
Medio 4	0	60	0/60	15

### Modelos cinéticos

Los datos obtenidos se ajustaron a cada uno de los modelos primarios de Gompertz, logístico y Baranyi, se correlacionaron las variables de proceso y se plantearon ecuaciones cinéticas. Se determinó el efecto de la temperatura en la cinética mediante la comparación entre las velocidades específicas máximas de crecimiento del microorganismo encontradas a partir del ajuste a dichos modelos et al., 1991; Zwietering et al., 1990). En la En la Tabla 2, la notación es como sigue:  $e = \exp(1)$ ;  $A = \text{LN}(C_{\text{fase estacionaria}}/C_{\text{inicial}})$ ;  $\mu_{\text{max}}$ : máxima velocidad específica de crecimiento;  $\lambda$ : tiempo de latencia;  $t$ : tiempo (h);  $y$ : concentración de biomasa (g/L);  $y_{\text{max}}$ : logaritmo natural de la concentración celular máxima;  $y_0$ : logaritmo natural de la concentración celular en  $t = t_0$ .

Tabla 2 aparecen el modelo de Gompertz, el modelo Logístico y el modelo de Baranyi en su correspondiente expresión reparametrizada en función de los parámetros con significado biológico  $A$ ,  $\mu_{\text{max}}$ ,  $\lambda$ ,  $y_{\text{max}}$  y  $y_0$ . En la Tabla 2, la notación es como sigue:  $e = \exp(1)$ ;  $A = \text{LN}(C_{\text{fase estacionaria}}/C_{\text{inicial}})$ ;  $\mu_{\text{max}}$ : máxima velocidad específica de crecimiento;  $\lambda$ : tiempo de latencia;  $t$ : tiempo (h);  $y$ : concentración de biomasa (g/L);  $y_{\text{max}}$ : logaritmo natural de la concentración celular máxima;  $y_0$ : logaritmo natural de la concentración celular en  $t = t_0$ .

Tabla 2. Modelos empleados y sus respectiva reparametrización

Modelo	Expresión reparametrizada
Logístico	$y = \frac{A}{\left\{1 + \exp\left[\frac{4\mu_m}{A}(\lambda - t) + 2\right]\right\}}$
Gompertz	$y = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$
Baranyi	$y = y_0 + \mu_m A(t) - \ln\left(1 + \frac{\exp(\mu_m A(t)) + 1}{\exp(y_{\text{max}} - y_0)}\right)$ $A(t) = t + \frac{1}{\mu_m} \ln(\exp(\mu_m t) + \exp(-\mu_m \lambda) - \exp(-\mu_m(t + \lambda)))$

### Extracción del biopolímero

La biomasa fue obtenida por centrifugación a 10867 x g durante 5 min 24 °C (BOECO centrifuges, U-320R), estas células fueron resuspendidas en un solución de hipoclorito de sodio a 1% (v/v) durante 1 h a 120 rpm y 24°C, y posteriormente se separó por centrifugación a 10867 x g durante 20 min. Luego se extrajo 1 g de biomasa en 25 mL de cloroformo durante 24 h a 120 rpm y 24 °C, se centrifugó a 10867 x g durante 30 min, 24 °C (BOECO centrifuges, U-320R); la fase orgánica obtenida se concentró por evaporación hasta 1/5 de volumen inicial, 1 ml de esta se precipitó en 10 mL de metanol a -20°C y finalmente se secó a 40 °C durante 24 h y se cuantificó la cantidad de biopolímero obtenido por peso seco (Furrer et al., 2007; Jacquelin et al., 2008).

## Métodos analíticos

### Cuantificación de biomasa

El crecimiento microbiano se monitorea mediante la medición de la densidad celular del cultivo a 640 nm después de la dilución adecuada con agua destilada. La biomasa seca se determinó por gravimetría y la concentración de biomasa se definió como peso seco de células por litro de medio de cultivo.

### Cuantificación de nitrógeno

La determinación de nitrógeno se realizó a través de la cuantificación de Amonio empleando espectroscopia UV/VIS (Shimadzu, UV 1606 PC) mediante la formación de complejos coloreados con azul de indofenol (Skoog, 2001).

### Cuantificación de azúcares

La determinación de azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, se realizó por medio de un equipo de HPLC PROMINENCE de Shimadzu, con una columna IC-Pack ion exclusión (Waters) y un detector de índice de refracción (Shimadzu, RID-10A). Se empleó como fase móvil ácido sulfúrico 0.005N con un flujo de 0.6 ml/min, siguiendo la metodología propuesta por Miyagi, Yokoyama, & Hibi, 2007.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de crecimiento celular después de 60 h de fermentación fueron evaluados estadísticamente mediante la herramienta de análisis de datos STATGRAPHICS CENTURIÓN XVI y se reportan en la Fig 1. Estos establecen que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la producción de biomasa en cada uno de los medios evaluados.

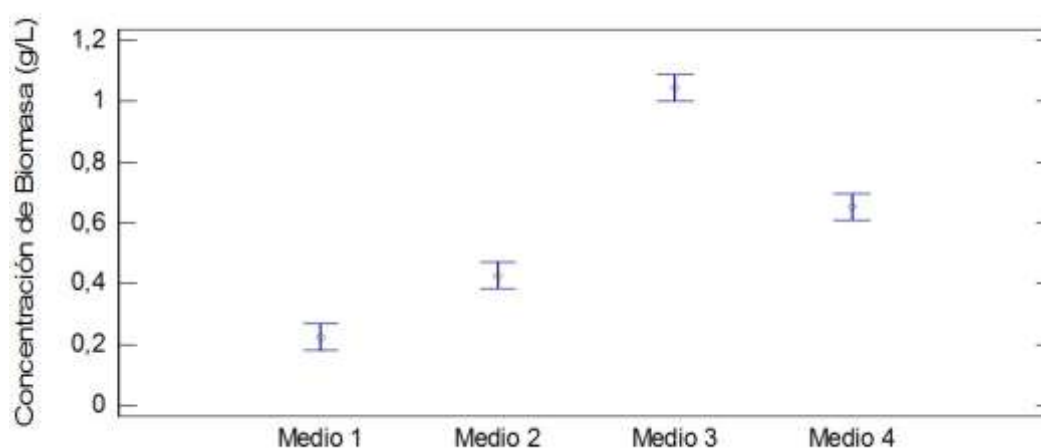


Fig 1. Medias para concentración de biomasa con respecto a la fuente de carbono y la concentración empleada

El análisis de varianza en la Tabla 3 permite confirmar la hipótesis de que la concentración y fuente de carbono empleada en los medios de cultivo tienen una influencia estadísticamente significativa sobre la concentración de biomasa obtenida pues se observa un valor de P de 0,000. Adicionalmente, en la Tabla 4 se identifican 4 grupos homogéneos para los cuales se tienen diferencias estadísticamente significativas para las medias entre los grupos con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 3. ANOVA para la Concentración de Biomasa con respecto a la fuente de Carbono y la concentración

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrática	Cociente F	Valor P
Entre grupos	1,116	3	0,372	176,210	0,000
Dentro de Grupos	0,017	8	0,002	----	----
Total (Corr.)	1,133	11	----	----	----

Tabla 4. Rango Múltiple para la Concentración de Biomasa

Medios evaluados	Relación Glucosa/Melaza	Media	Grupos Homogéneos			
Medio 1	20/0	0,223	X			
Medio 2	0/20	0,425		X		
Medio 3	0/40	0,654			X	
Medio 4	0/60	1,043				X

Se encontró que los medios de cultivo con melaza presentaron una mayor producción de biomasa a pesar de tener contenidos equivalentes de azúcares reductores inferiores al medio 1 (5 g/L medio 2, 10 g/L medio 3 y 15 g/L medio 4). Esto se debe a la presencia de micronutrientes esenciales, incluyendo ácidos orgánicos, minerales, y vitaminas tales como tiamina, riboflavina y piridoxina que pueden encontrarse en la melaza y funcionan como factores de crecimiento que conducen a un mayor crecimiento celular y la producción de PHA como lo reporta Tripathi et al., 2011. Estos investigadores evaluaron el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con fructosa, glucosa, melaza de caña, sacarosa y glicerol y encontraron que la fuente de carbono que mejor comportamiento presentó para el crecimiento del microorganismo fue la melaza de caña, seguida por la fructosa y la glucosa, este resultado es comparable con el obtenido en este trabajo de investigación en el cual los medios 2, 3 y 4 que emplearon melaza como fuente de carbono presentan mayor crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* que el medio 1 en el cual se empleó glucosa.

En los ensayos anteriores se observó disminución en el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* como consecuencia de la inhibición del microorganismo a altas concentraciones de melaza, se alcanzaron valores de concentración de biomasa seca de 0,4248, 1,0435 y 0,6539 g/L para los medios 2, 3 y 4 con concentraciones de melaza de 20, 40, 60 g/L, respectivamente.

Por otro lado, los resultados indican que el microorganismo presenta inhibición del crecimiento a concentraciones de melaza de 60 g/L, esto es causado por la presencia de componentes como los fenoles que provienen de la parte fibrosa de la caña y se derivan de los ácidos hidroxinámico y parahidroxibenzoico, que inhiben el crecimiento de los microorganismos a concentraciones superiores a 0,5 g/L, ya que según reportan Fajardo et al., 2007 estos fenoles dañan la membrana y desnaturalizan las proteínas bacteriales actuando como microbicida o bacteriostático. Por lo anterior, se seleccionó como medio de cultivo para *Pseudomonas fluorescens* el medio 3 con una concentración de melaza de 40 g/L y una concentración de azúcares equivalente de 10 g/L, ya que fue el que presentó mayor concentración de biomasa. Adicionalmente, se evaluó la producción de biopolímero y el consumo de sustrato en el medio 1 y en el medio 3 y se realizó una comparación de dicha producción para los sustratos empleados, los resultados se reportan en la Tabla 5.

Tabla 5. Rendimientos sustrato producto para los ensayos de selección del medio de cultivo

Medio	Sustrato	Azúcares reductores (g/L)	CS (%conversión de sustrato)	Yp/s
Medio 3	Melaza	10	100	0,000237
Medio 1	Glucosa	20	100	0,000025

Los resultados muestran que el rendimiento PHA/sustrato para el medio 3 con un contenido de azúcares reductores de 10 g/L con respecto al medio 1 con un contenido de glucosa de 20 g/L, es 10 veces mayor, lo cual indica que puede mejorarse la producción de PHA en el medio con melaza, ya que como reporta Tripathi et al., 2011 ésta contiene una cantidad limitada de biotina (vitamina H o B7), que es esencial para el crecimiento celular bacteriano y la limitación en el contenido de biotina puede actuar como un inductor de la producción de PHA (Tripathi et al., 2011).

#### Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*

Las curvas de crecimiento de biomasa muestran diferencias en cuanto a la fase exponencial, la concentración máxima de biomasa y la duración de la fase exponencial, cuando se modifica la temperatura de trabajo. Temperaturas superiores a 30°C generan un drástico cambio en la fase estacionaria que se debe a la desnaturalización de proteínas y muerte celular (Price y Sowers, 2004).

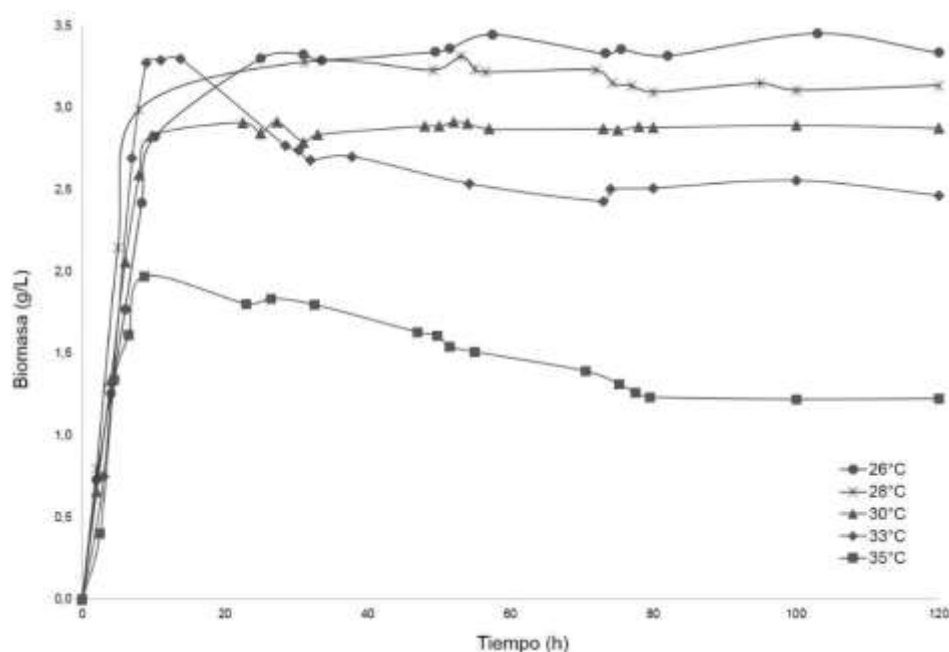
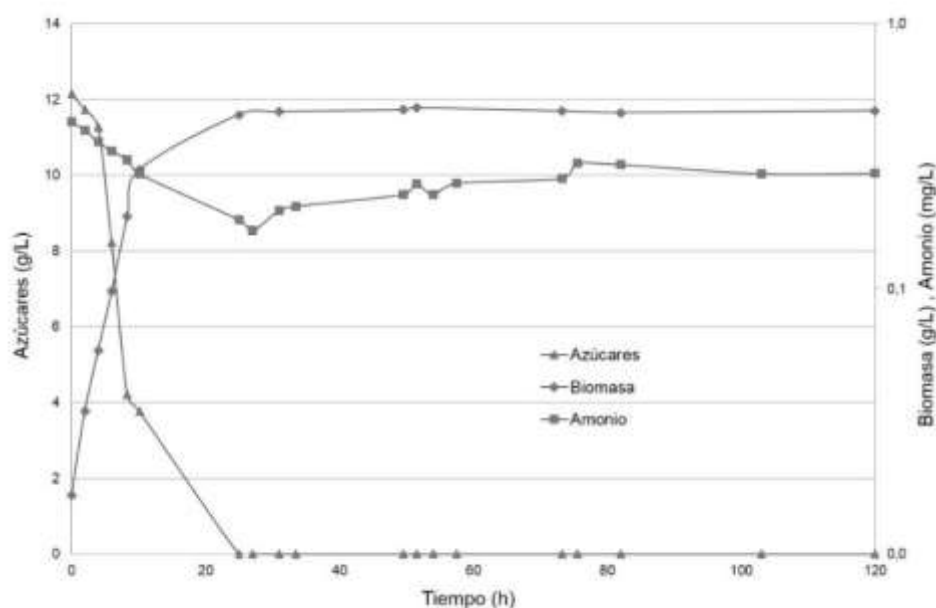


Fig 2. Curvas de crecimiento a diferentes temperaturas

Fig 3. Curvas de crecimiento normalizada y consumo de sustrato (azúcares y amonio) de *Pseudomonas fluorescens* a 26 °C

La Fig 3 muestra las curvas de sustrato y fuente de nitrógeno a 26 °C las cuales presentan un agotamiento simultáneo en la proporción C/N y a pesar de permitir el crecimiento del microorganismo no es la adecuada para promover la producción de PHA (Ciesielski et al., 2010; Saranya y Shenbagarathai, 2010). Se observa una máxima concentración de biomasa de 0,4647 g/L, cuando la disminución de azúcares alcanza un valor mínimo de 0,019 g/L y la concentración de amonio disminuye hasta 0.12 mg/L; estos valores se obtienen al inicio de la fase estacionaria fase de inicio de la producción o acumulación de polihidroxicanoatos como metabolito secundario. Estos resultados concuerdan los valores presentados por Divyashree et al., 2009 donde el incremento en la concentración de biomasa refleja una disminución de la concentración de nitrógeno y presenta una velocidad máxima de síntesis de PHA.

### Modelos cinéticos

Los modelos cinéticos empleados describen la cinética de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* estos se ajustaron a los valores experimentales con un  $R^2$  superior a 0,97 para cada una de la temperaturas de trabajo. Comparando el modelo de Gompertz y el logístico se observa que para los parámetros A y  $\mu_{m\acute{a}x}$

ambos presentan valores similares, los valores de A disminuyen con el aumento de la temperatura en ambos y los valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  alcanzan su mayor valor  $0,54 \pm 0,1$  a  $28^{\circ}\text{C}$ ; para el parámetro  $\lambda$  presentan mayores diferencias entre  $0,2 - 0,3$  y aumentan con el incremento de la temperatura. Los resultados de dicho ajuste se presentan en la Tabla 6:

Tabla 6. Parámetros del ajuste a los modelos cinéticos

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Parámetros cinéticos									
	A		$\mu_{m\acute{a}x}$ ( $\text{h}^{-1}$ )			$\lambda$ (h)			$y_0$	$y_{m\acute{a}x}$
	Gompertz	Logístico	Gompertz	Logístico	Baranyi	Gompertz	Logístico	Baranyi	Baranyi	Baranyi
26	3,363	3,357	0,330	0,331	0,171	0,298	0,654	63,967	0,083	3,363
28	3,219	3,215	0,539	0,546	0,263	0,651	0,987	63,850	0,000	3,201
30	2,882	2,876	0,445	0,439	0,226	0,809	1,039	67,220	0,000	2,885
T ( $^{\circ}\text{C}$ )	$R^2$					suma del error cuadrático				
	Gompertz		Logístico		Baranyi	Gompertz		Logístico		Baranyi
	26	0,995	0,991	0,997	0,099	0,171	0,057			
28	0,980	0,977	0,986	0,295	0,334	0,209				
30	0,995	0,995	0,993	0,061	0,069	0,088				

El modelo de Baranyi cuenta con parámetros adicionales  $y_0$  y  $y_{m\acute{a}x}$ , varían entre  $0 - 0,083$  y  $2,885 - 3,363$  respectivamente; estos dos factores disminuyen con el incremento en la temperatura. El parámetro  $\mu_{m\acute{a}x}$  para este modelo presenta valores menores en comparación con el de Gompertz y el logístico alrededor de 2 veces el valor obtenido en el modelo Baranyi. El parámetro  $\lambda$  aumenta con la temperatura y se obtienen valores de alrededor de 65 (h) en comparación a 0,65 (h) en promedio que se obtienen para los otros modelos. Los autores Zhao et al., 2014 presentan en su trabajo el modelo Baranyi como el de mejor ajuste en comparación con el modelo de Gompertz y el modelo logístico, lo cual confirma los resultados en el presente trabajo donde el modelo de Gompertz y el de Baranyi tienen un mejor ajuste de los datos experimentales del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* con un  $R^2$  de 0,99 en promedio. Las mayores diferencias que se presentan entre el modelo de Gompertz y el logístico en comparación con el modelo de Baranyi en los valores obtenidos para el parámetro  $\lambda$  se explican en función de la cantidad de datos experimentales a lo largo de la fase de latencia según lo reportan autores como Cayré et al., 2007. quien e indican que para reducir la incertidumbre de las estimaciones dadas por el modelo de Baranyi se necesita un muestreo extendido en la etapa de transición entre la fase de latencia y la exponencial.

La Figura 4 muestra gráficamente el ajuste de cada uno de los modelos al crecimiento del microorganismo, como se observa las curvas describen adecuadamente el comportamiento. El ajuste de los modelos muestra la reproducibilidad de los valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  para los tres modelos y las temperaturas evaluadas donde se obtuvo una  $\mu_{m\acute{a}x} = 0,546$  ( $\text{h}^{-1}$ ) a  $28^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, la máxima concentración de biomasa se obtuvo a  $26^{\circ}\text{C}$ , por lo anterior las temperaturas de operación óptimas para la producción de PHA se encuentran según los datos experimentales y el ajuste de los modelos entre  $26^{\circ}\text{C}$  y  $28^{\circ}\text{C}$ .

## CONCLUSIONES

La melaza presenta en su composición nutriente favorable para el crecimiento del microorganismo *Pseudomonas fluorescens* y adicionalmente promueve la producción de  $\text{PHA}_{\text{MCL}}$ , a pesar de ser un sustrato no relacionado con la longitud de las cadenas producidas en el biopolímero. No obstante, concentraciones de melaza alrededor de 60 g/L pueden inhibir el crecimiento del microorganismo.

Los azúcares reductores provenientes de la melaza proporcionan las características de una fuente de carbono apta para la biosíntesis de polihidroxialcanoatos en una concentración de 10 g/L, concentraciones superiores a este valor dada la presencia de compuestos fenólicos en la melaza pueden ser tóxicos para el microorganismo y presentar inhibición en el crecimiento celular.

La cinética de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* se ajusta mejor al modelo de Branyi con un  $R^2=0,99$ , sin embargo el modelo de Gompertz y el modelo logístico también presentan un buen ajuste. Los resultados muestran la influencia que tiene la temperatura sobre la cinética de crecimiento del microorganismo y permite concluir que la temperatura óptima para el proceso de producción de PHA se encuentra entre  $26^{\circ}\text{C}$  y  $28^{\circ}\text{C}$ ; ya que los ensayos presentaron una máxima velocidad de crecimiento celular de  $0,546$  ( $\text{h}^{-1}$ ) a  $28^{\circ}\text{C}$  y a  $26^{\circ}\text{C}$  se alcanzó una máxima concentración de Biomasa de  $0,4647$  g/L.

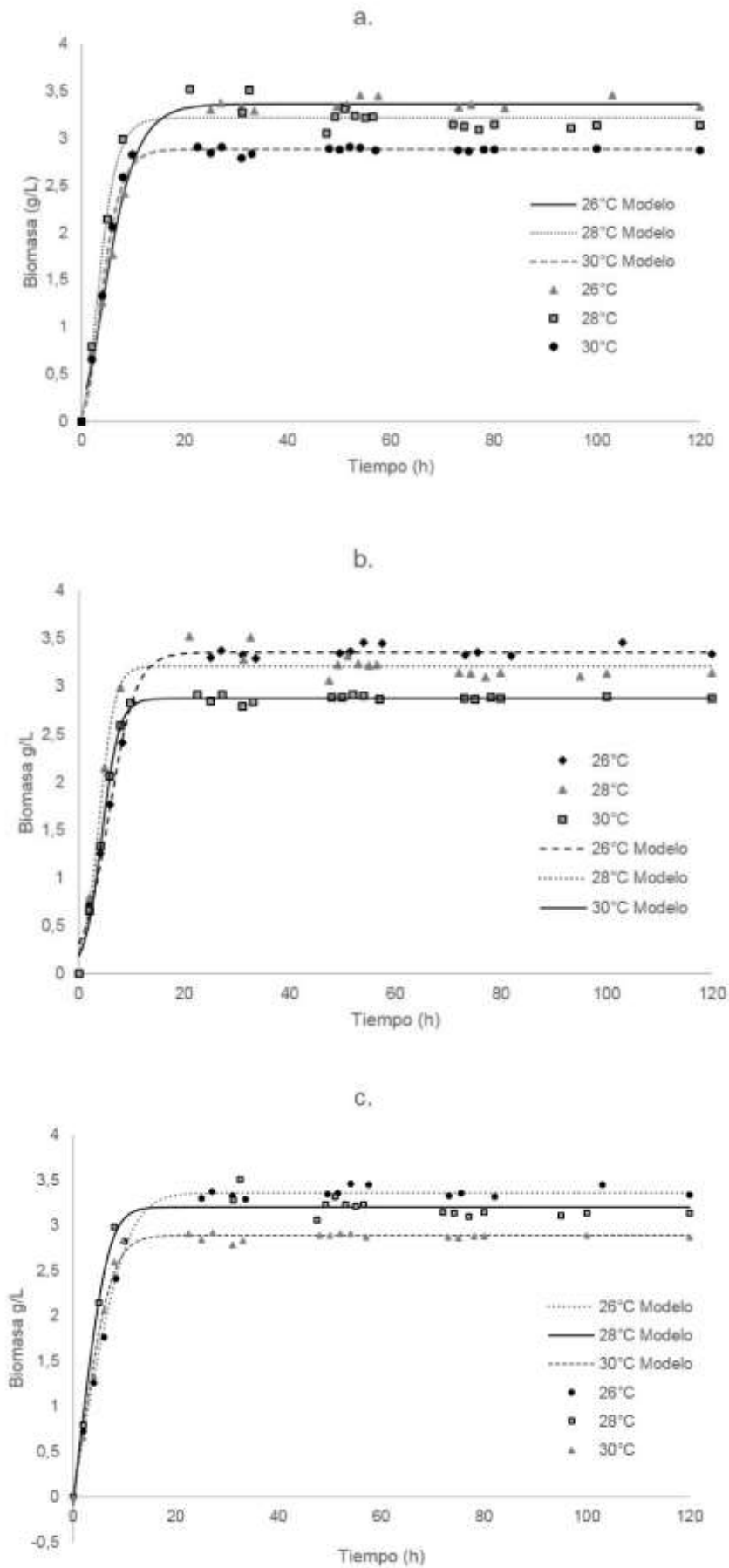


Fig 4. Modelo cinéticos del crecimiento celular a 26°C, 28°C y 30°C. a) Modelo de Gompertz; b) Modelo Logístico; c) Modelo de Baranyi



## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias por el apoyo financiero al proyecto gracias al cual fue posible el desarrollo de la investigación.

## REFERENCIAS

- Carrillo, M.L.; Zavala, D.; Alvarado, B. Modelado del Efecto de la Temperatura, Actividad de agua y pH sobre el crecimiento de *Rhizopus oryzae*, doi:10.4067/S0718-07642007000400009, *Información Tecnológica*, 18(4), 57–62, (2007)
- Cayré, M. E., Vignolo, G. M., y Garro, O. a. Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas, doi:10.4067/S0718-07642007000300004, *Información Tecnológica*, 18(3), 23–29, (2007)
- Ciesielski, S., Mozejko, J., y Przybyłek, G. The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of *Pseudomonas* sp., doi:10.1007/s10295-010-0698-5, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(5), 511–20, (2010)
- Divyashree, M. S., Rastogi, N. K., y Shamala, T. R. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*, doi:10.1016/j.nbt.2009.04.004, *New Biotechnology*, 26(1-2), 92–8, (2009)
- Fajardo, E., Sarmiento, S. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pregrado, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, (2007)
- Furrer, P., Panke, S., y Zinn, M. Efficient recovery of low endotoxin medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoate) from bacterial biomass, doi:10.1016/j.mimet.2007.01.002, *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 206–13, (2007)
- Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S., y Wang, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates), doi:10.1016/j.bej.2007.11.029, *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15–27, (2008)
- Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C., y Shao, W. High poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates, doi:10.1016/j.enzmictec.2007.09.003, *Enzyme and Microbial Technology*, 42(2), 167–72, (2008)
- Lee, S. Y., y Choi, J. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment, doi:10.1016/S0956-053X(99)00005-7, *Waste Management*, 19(2), 133–139, (1999)
- Ma, L., Zhang, H., Liu, Q., Chen, J., Zhang, J., y Chen, G.-Q. Production of two monomer structures containing medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by beta-oxidation-impaired mutant of *Pseudomonas putida* KT2442, doi:10.1016/j.biortech.2009.05.017, *Bioresource Technology*, 100(20), 4891–4, (2009)
- Miyagi, M., Yokoyama, H., y Hibi, T. Sugar microanalysis by HPLC with benzylation: Improvement via introduction of a C-8 cartridge and a high efficiency ODS column, doi:10.1016/j.jchromb.2007.04.044, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 854, 286–290, (2007)
- Pijuan, M., Casas, C., y Baeza, J. A. Polyhydroxyalkanoate synthesis using different carbon sources by two enhanced biological phosphorus removal microbial communities, doi:10.1016/j.procbio.2008.09.017, *Process Biochemistry*, 44(1), 97–105, (2009)
- Price, P. B., y Sowers, T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival, doi:10.1073/pnas.0400522101, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4631–4636, (2004)
- Reddy, C. S. ., Ghai, R., y Kalia, V. Polyhydroxyalkanoates: an overview, doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2, *Bioresource Technology*, 87(2), 137–146, (2003)
- Sánchez, R. J., Schripsema, J., da Silva, L. F., Taciro, M. K., Pradella, J. G., y Gomez, J. G. C. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources, doi:10.1016/S0014-3057(03)00019-3, *European Polymer Journal*, 39(7), 1385–1394, (2003)

Saranya, V., y Shenbagarathai, R. Effect of Nitrogen and Calcium Sources on Growth and Production of PHA of *Pseudomonas* sp. LDC-5 and its Mutant, <http://www.maxwellsci.com/print/crjbs/v2-164-167.pdf>, ISSN: 2041-0778, *Curr. Res. J. Biol. Sci*, 2(3), 164–167, (2010)

Skoog, D. Principios de analisis instrumental, 6ta edición, pag. 625 – 632, (McGraw-Hill, Ed.) Madrid, España, (2001)

Sudesh, K., Abe, H., y Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6, *Progress in Polymer Science* 25(10), 1503-1555, (2000)

Thakor, N., Trivedi, U., y Patel, K. C. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils., doi:10.1016/j.biortech.2005.01.030, *Bioresource Technology*, 96(17), 1843–50, (2005)

Tripathi, A. D., Yadav, A., Jha, A., y Srivastava, S. K. Utilizing of Sugar Refinery Waste (Cane Molasses) for Production of Bio-Plastic Under Submerged Fermentation Process, doi:10.1007/s10924-011-0394-1, *Journal of Polymers and the Environment*, 20(2), 446–453, (2011)

Zhao, J., Gao, J., Chen, F., Ren, F., Dai, R., Liu, Y., y Li, X. Modeling and predicting the effect of temperature on the growth of *Proteus mirabilis* in chicken, doi:10.1016/j.mimet.2014.01.016, *Journal of Microbiological Methods*, 99, 38–43.(2014)

Zwietering, M. H., de Koos, J. T., Hasenack, B. E., de Witt, J. C., y van't Riet, K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1094–101, (1991)

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., y Van, K. Modeling of the Bacterial Growth Curve, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348228>, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875 – 1881, (1990)