



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

**BIOTECHNOLOGICAL KINETIC ANALYSIS OF
HYDROLYZED STARCH BY SACCHAROMYCES
CEREVISIAE MEYEN EX E.C. HANSEN**

**ANÁLISIS CINÉTICO BIOTECNOLÓGICO DEL ALMIDÓN
HIDROLIZADO MEDIANTE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE MEYEN EX E.C. HANSEN**

**Olegario Marín-Machuca^{1,2,*}; José Iannacone^{3,4}; Ulert Marín-Sánchez⁵; Fredy
Aníbal Alvarado-Zambrano⁶; Ricardo Arnaldo Alvarado-Zambrano⁷
& Obert Marín-Sánchez⁸**

¹ Laboratorio de Tecnología de Alimentos. Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura. Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú.

² Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos. Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos Universidad Nacional del Callao (UNAC), Callao, Perú.

³ Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú.

⁴ Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Grupo de Investigación en Sostenibilidad Ambiental (GISA), Escuela Universitaria de Posgrado, Universidad Nacional Federico Villarreal (EUPG -UNFV), Lima, Perú.

⁵ Dirección General de Asuntos Ambientales de Industria (DGAAMI). Ministerio de la Producción (PRODUCE), Lima, Perú.

⁶ Laboratorio de Análisis Sensorial de Alimentos. Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo (UNASAM), Ancash, Perú.

⁷ Facultad de Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), Huánuco, Perú.

⁸ Facultad de Ingeniería y Gestión. Universidad Nacional Tecnológica de Lima Sur, Lima, Perú.

* Author for correspondence: omarin@unfv.edu.pe

ABSTRACT

The study describes the biotechnological process, a product of the hydrolyzed starch's fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen as an enzyme agent. The behavior and speeds of the three intervening components (consumed substrate $[S_c]$, product $[P]$, and enzymatic agent $[E]$) were evaluated and was formulated the corresponding logistic models, independently, for each of the components and their subsequent application and analysis. Also, the saturation constant of the substrate $[K_m]$ was determined. The maximum

concentration for the enzyme reached a value of $9.80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the reaction rate constants were 0.27 h^{-1} , 0.20 h^{-1} and 0.22 h^{-1} , for the concentrations of E , S_c , and P , respectively. The maximum speeds (and the optimal times) for the enzyme, substrate consumed, and product were $0.66 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (6.80 h), $6.68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (11.50h), and $3,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (11.40h), respectively. The saturation constant K_m for the consumed substrate, both by the Lineweaver-Burk equation and graph, and the Monod graph and theory, reached the values of $12.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $11.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. It is concluded that the proposed biotechnological kinetic analysis of the hydrolyzed starch by *S. cerevisiae* is adequate.

Keywords: biotechnology – fermentation – kinetics – logistics model – saturation constant

RESUMEN

El estudio describe el proceso biotecnológico, producto de la fermentación del almidón hidrolizado utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen como agente enzimático. Se evaluó el comportamiento y las velocidades de los tres componentes intervinientes (sustrato consumido [S_c], producto [P] y agente enzimático [E]), y se formularon los modelos logísticos correspondientes, de forma independiente, para cada uno de los componentes, y su posterior aplicación y análisis. Asimismo, se determinó la constante de saturación del sustrato [K_m]. La concentración máxima para la enzima llegó a un valor de $9,80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y las constantes de velocidad de reacción fueron de $0,27 \text{ h}^{-1}$, $0,20 \text{ h}^{-1}$ y $0,22 \text{ h}^{-1}$, para las concentraciones de E_s , S_c y P , respectivamente. Las velocidades máximas (y los tiempos óptimos) para la enzima, sustrato consumido y producto fueron de $0,66 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (6,80 h), $6,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (11,50h) y $3,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (11,40h), respectivamente. La constante de saturación K_m para el sustrato consumido, tanto por la ecuación y gráfica de Lineweaver-Burk, así como por la gráfica y teoría de Monod, llegó a los valores de $12,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $11,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; respectivamente. Se concluye que el análisis cinético biotecnológico propuesto del almidón hidrolizado mediante *S. cerevisiae* es adecuado.

Palabras clave: biotecnología – cinética – constante de saturación – fermentación – modelo logístico

INTRODUCCIÓN

La cinética enzimática se fundamenta en leyes y propiedades biotecnológicas, bioquímicas, microbiológicas y otras disciplinas a fines. Para realizar las cinéticas de las reacciones químicas y enzimáticas se debe tener en cuenta los antecedentes, principalmente, de las enzimas intervinientes (Fan *et al.*, 2015; Scragg, 2016; Machado & Gomes, 2019; Salazar-Quispe *et al.*, 2019; Gomes & Polizelli, 2020).

La levadura (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) seca y termoestable, actúa como un agente enzimático que se emplea para estudios biotecnológicos (Fan *et al.*, 2015; Malik *et al.*, 2020; Oh & Jin, 2020). El agente enzimático (*S. cerevisiae*) tiene una gran importancia debido a que se comporta como controlador de una serie de reacciones químicas y enzimáticas de los procesos de fermentación y, desde el punto de vista químico, por ejemplo, la fermentación panaria no es diferente a la fermentación alcohólica del vino o de la cerveza; aunque en la práctica de la cinética química, presenta caracteres distintivos que justifican su estudio particular (García, 2018; Kessi-Pérez *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta que las principales reacciones enzimáticas en estudios biotecnológicos involucran a la Lactato deshidrogenasa, Hexocinasa, Adenosintrifosfatasa, Fructuosa-difosfato aldolasa, Trifosfato isomerasa e Isoleucil-tRNA sintetasa, la cinética como en cualquier campo y área requiere de la habilidad en manejar

ecuaciones básicas, ecuaciones diferenciales y ecuaciones en derivadas parciales (Manikandan & Viruthagiri, 2010; Aguado *et al.*, 2011; Machado & Gomes, 2019; Gomes & Polizelli, 2020).

Los productos se pueden formar durante la fase de crecimiento, en cuyo caso la rapidez de síntesis del producto (dP/dt) se relaciona directamente con la rapidez de crecimiento (dE/dt), donde ocasionalmente, la síntesis puede comenzar después de un periodo de crecimiento previo debido a la acumulación de algunos metabolitos primarios y, subsecuentemente relacionarse con el crecimiento, dando lugar a realizar el análisis por intermedio de las ecuaciones diferenciales pertinentes (Machado & Gomes, 2019; Zill, 2019; Gomes & Polizelli, 2020).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración máxima de la enzima de la levadura *S. cerevisiae*, evaluar las constantes de velocidad de reacción para la enzima, el sustrato consumido y el producto; así como evaluar las velocidades máximas y los tiempos críticos de los componentes intervinientes, y la constante de saturación para el sustrato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fermentación en lote o Batch (discontinua)

El proceso fermentativo, que se da sin haber intercambio de masa ni de energía, fue realizado en un biofermentador de 10 L de capacidad, tipo émbolo de compresión, tomando datos *in situ* del sustrato consumido,

formación de producto y actividad enzimática. Esta fermentación que, generalmente, solo produce gas (CO_2) y vapor de agua fue llevada a cabo por lotes, alimentados de forma continua. Dicho proceso fue llevado a un pH entre 5,5 y 6,7. La temperatura osciló y se mantuvo entre 46°C y 55°C (Rittmann & McCarty, 2011). La levadura, *S. cerevisiae* NCIM 3287 fue adquirida de NCIM, Pune, India. La levadura fue cultivada en un medio APD (Agar Papa Dextrosa) que contuvo $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de peptona, $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ extracto de levadura y $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extracto de malta, a un pH 6,5 (GPYM Medio) (Olaoye & Kolawole, 2013).

Complejo enzima-sustrato en *Saccharomyces cerevisiae*

Antes de hacer el tratamiento de datos en forma científica, tecnológica y de bioingeniería, se debe asegurar de tener datos confiables, cuyas precauciones deben ser, que los componentes del sistema de ensayo tengan la más alta pureza. La enzima debe estar libre de componentes que inhiban o interfieran la actividad enzimática, y el pH y la temperatura deben mantenerse constantes mediante el uso de soluciones amortiguadoras y termostatos. Esto es debido a que es afectada de modo considerable la rapidez de la reacción de la enzima $[E]$, el sustrato $[S]$ y el producto $[P]$; y por lo tanto debe ser estable por el tiempo que dure el ensayo (Rittmann & McCarty, 2011).

La rapidez de reacción debe ser constante durante todo el tiempo que dure el ensayo y debe medirse la velocidad inicial de reacción para evitar

cambios notables en la concentración del sustrato, inhibición del producto o que la reacción se invierta y afecte drásticamente la cinética enzimática simple o elemental; que se basa en tres principios experimentales: 1) que el sustrato forme un complejo intermediario enzima-sustrato con la enzima, 2) que la rapidez de reacción en el tiempo se represente con la pendiente de la curva $P=f(t)$ o $S=f(t)$ y que estas pendientes varíen con el tiempo debido a la desaparición del sustrato, y 3) que para una concentración dada de sustrato la determinación de la variación en la rapidez de reacción como función de la concentración de la enzima no sea lineal sino hiperbólica, debido a que el sustrato está en forma de un complejo enzima-sustrato (García *et al.*, 2003).

Teoría de Michaelis

Esta ecuación teórica, sostiene que todas las reacciones canalizadas por enzimas exhiben procesos de saturación, y a bajas concentraciones de sustrato $[S]$, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración del sustrato y la reacción es de primer orden con respecto al sustrato; pero a medida que la concentración del sustrato aumenta $[S]$, la rapidez de reacción disminuye y deja de ser proporcional a la concentración del sustrato $[S]$ y la reacción es de orden mixto (Conasa, 2014).

La ecuación resumida es de la siguiente forma:

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{max}}{2},$$

que linealizándola, se tiene,

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{v_{max}} \right) \times \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{max}},$$

donde la concentración del sustrato es igual a la constante de saturación: $K_m = [S]$, y cuya forma matemática es una ecuación lineal, después de usar la linealización matemática (Roca, 2012; Scragg, 2016).

El modo cinético adopta la hipótesis del estado estacionario, según la concentración del complejo enzima-sustrato, que es pequeña y constante a lo largo de la reacción, así como se visualiza en la figura 1. El estudio

cinético de la fermentación del sorgo utilizando *S. cerevisiae* se llevó a cabo con 82,32 g L⁻¹ de sorgo, donde se observa el cambio de la concentración de biomasa (sustrato, S), el etanol con concentración (P) y la concentración de la glucosa (E) durante el lote. La fermentación se muestra en la Fig. 1 y el cultivo de la tierra fue corto, con cerca de 3 h. La concentración de la biomasa aumentó exponencialmente después de 3 h y alcanzó la condición más alta a las 48 h (22,477 g·L⁻¹). La concentración de etanol obtenida fue aplicable a escala industrial (Hargono *et al.*, 2020).

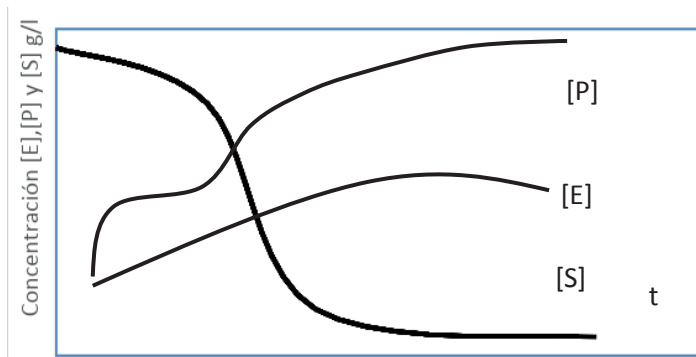


Figura 1. Concentración de enzima (E), sustrato (S) y producto (P) vs tiempo de proceso.

Análisis de datos

La cinética y su proceso analítico e interpretación requieren de la habilidad para manejar ecuaciones diferenciales para obtener la velocidad, el tiempo crítico para la cual la velocidad será máxima y estimar valores óptimos de cuantificación (Zill, 2019). Las técnicas para el análisis de datos en ingeniería deben considerar la existencia de errores en las

medidas, en virtud que siempre existe un grado de incertidumbre asociado a los datos medidos y la interpretación de estos debe realizarse correctamente (Mounira *et al.*, 2017; Doran, 2018).

Las tendencias de los procesos de fermentación, cualesquiera que sean, siempre tendrán un comportamiento relativamente sencillo en cuanto a su tratamiento estadístico y matemático, debido a que una vez que son

obtenidos dichos resultados, siempre se seguirán comportamientos logísticos y se relacionarán con la teoría de Michaelis-Menten y de Monod (Baird, 2008).

Los cambios y variación que se produce al analizar los gastos de sustrato, de actividad enzimática y de generación de producto o metabolito; seguirán por lo general una tendencia similar a una distribución normal, llegando a una cúspide o cantidad máxima y luego descienden al mínimo valor, llegando a determinar cantidades precisas en cuanto a tiempos y cantidades de los agentes participantes (Selvi & Vijayagopal, 2015; Atkinton & Mavituna, 2017).

La ecuación de Monod: Para completar las ecuaciones de balance de materia, hay que proporcionar expresiones para el crecimiento de la biomasa y la utilización del sustrato, que son los primeros que se presentan, donde la relación que más frecuentemente usada para representar la cinética de crecimiento bacteriano es la llamada ecuación de Monod, que fue desarro-

llada en la década de 1940 por el famoso microbiólogo francés Jackes Monod, que relaciona la tasa específica de crecimiento de bacterias de rápido crecimiento con la concentración de un sustrato limitador del crecimiento microbiano y/o enzimático (Farah *et al.*, 2011; Rittmann & McCarty, 2011).

Linealización de los modelos cinéticos: Las ecuaciones de modelamiento cinético y las linealizaciones para su aplicación y calcular las velocidades de sustrato, producto y enzima ($[S]$, $[P]$ y $[E]$); requiere conocer las ecuaciones logísticas que cada uno de ellos, que describan el proceso biotecnológico, que, para la enzima, sustrato consumido y producto, son las siguientes (Gujarati & Porter, 2015). Los modelos biológicos básicos pueden ser usados para describir procesos biológicos satisfactoriamente; mientras que los datos experimentales fueron sujetos a diferentes modelos cinéticos y el modelo que mejor se adoptó a los datos experimentales fue el de Olaoye & Kolawole (2013).

$$\text{Para la enzima } E = \frac{E_F}{1+b \times e^{-k_e \times t}}, \text{ y } \ln \left(\frac{E_F}{E} - 1 \right) = \ln b - K_E \times t \quad \dots (1)$$

$$\text{Para el sustrato } S_c = \frac{S_F}{1+b \times e^{-K_p \times t}} \text{ y } \ln \left(\frac{S_F}{S_c} - 1 \right) = \ln b - K_S \times t \quad \dots (2)$$

$$\text{Para el producto } P = \frac{P_F}{1+b \times e^{-K_p \times t}} \text{ y } \ln \left(\frac{P_F}{P} - 1 \right) = \ln b - K_p \times t \quad \dots (3)$$

El modelo logístico de crecimiento: El modelo logístico para la cinética de crecimiento se muestra en la primera parte de las ecuaciones (1), (2) y

(3), su forma linealizada en la segunda parte de estas mismas ecuaciones; donde, k es la constante de la tasa (h^{-1}), $b=1/x$ (g del producto / g de biomasa) y

el modelo cinético de Leudeking-Piret para la formación de productos se da en la ecuación respectiva, la cual se encontró que se ajustaba a los datos experimentales y el valor de α y β fue de 2,67 g de producto·g⁻¹ de biomasa y 0,062 g de producto·g⁻¹ de biomasa, respectivamente (Manikandan & Viruthagiri, 2010; Naseeha *et al.*, 2019).

Aspectos éticos

Los autores señalan que se cumplieron todos los aspectos éticos a nivel nacional e internacional.

RESULTADOS

Los datos experimentales para la

fermentación ácida de un almidón hidrolizado, en donde actúan las enzimas de *S. cerevisiae* en la producción de cerveza, cuyas concentraciones iniciales son: sustrato $[S]_0 = 135 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y enzima $[E]_0 = 1,35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ son presentados en la tabla 1. La cinética fermentativa fue analizada por intermedio de: a) figuras de $[S]$, $[P]$ y $[E]$, b) evaluación de las constantes de velocidad para K_g , K_p y K_s , c) determinación de las velocidades máximas de la enzima, producto y sustrato consumido; respectivamente, es decir, se busca obtener; $(dE/dt)_{\text{máx}}$, $(dP/dt)_{\text{máx}}$, $(dS/dt)_{\text{máx}}$ y d) determinación de la constante de saturación, K_m , para el sustrato.

Tabla 1. Datos experimentales para las concentraciones de sustrato $[S]$, producto $[P]$ y enzima $[E]$ en función del tiempo de proceso (t).

Tiempo, t (h)	Concentración de sustrato $[S]$ (g·L ⁻¹)	Concentración de producto $[P]$ (g·L ⁻¹)	Concentración de enzima $[E]$ (g·L ⁻¹)
2,5	125,8	4,5	2,3
5,0	110,4	11,0	3,8
7,5	89,0	21,2	5,4
9,2	74,0	28,5	6,5
11,3	57,9	36,0	7,4
13,7	43,1	42,0	8,4
17,5	29,8	48,7	9,3
25,0	17,5	55,0	9,8
45,0	4,0	60,5	7,5

La tabla 1 presenta los datos de $[S]$, $[P]$ y $[E]$ frente al tiempo de proceso t

(h). La representación de los datos de la tabla 1, se muestra en la figura 2.

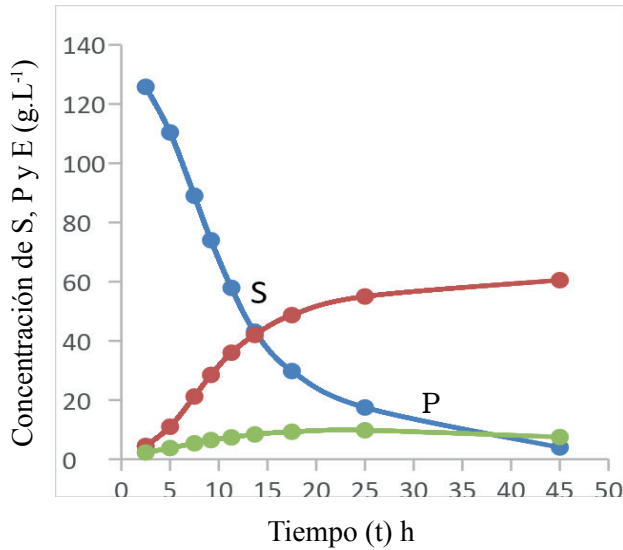


Figura 2. Concentración experimental del sustrato [S], producto [P] y enzima [E] vs tiempo de proceso.

Tabla 2. Valores calculados a base de los datos experimentales para enzima [E], producto [P] y sustrato consumido [S_c] dispuestos para aplicar las ecuaciones 1, 2 y 3.

Tiempo, t (h)	$\left(\frac{E_F}{E} - 1\right)$	S_c	$\left(\frac{S_F}{S_C} - 1\right)$	$\left(\frac{P_F}{P} - 1\right)$
2,5	3,26	9,20	13,23	12,44
5,0	1,57	24,6	4,32	4,50
7,5	0,81	46,0	1,84	1,85
9,2	0,50	61,0	1,14	1,12
11,3	0,32	77,1	0,69	0,68
13,7	0,16	91,9	0,42	0,44
17,5	0,05	105,2	0,24	0,24
25,0	0,00	117,5	0,11	0,10
45,0	-	121,0	0,00	0,00

La tabla 2 muestra los datos, para el análisis de regresión lineal para enzima, producto y sustrato consumido.

Utilizando las ecuaciones linealizadas (1), (2) y (3); para cada componente, se tiene:

Para la enzima: $\left(\frac{E_F}{E} - 1\right) = 1,83 - 0,26 \times t$ ($r = -0,99$)

Donde: $K_E = 0,26h^{-1}$

Para el sustrato consumido: $\ln \ln \left(\frac{S_F}{S_C} - 1\right) = 2,34 - 0,20 \times t$ ($r = -0,95$)

Donde: $K_{S_C} = 0,20h^{-1}$

Para el producto: $\left(\frac{P_F}{P} - 1\right) = 2,36 - 0,20 \times t$ ($r = -0,96$)

Donde: $K_P = 0,20h^{-1}$

De donde los modelos logísticos, resultar ser respectivamente:

$$E = \frac{9,8}{1+6,25 \times e^{-0,26 \times t}} \dots (4)$$

$$S_C = \frac{121}{1+10,38 \times e^{-0,20 \times t}} \dots (5)$$

$$P = \frac{60,5}{1+10,64 \times e^{-0,20 \times t}} \dots (6)$$

Para determinar las velocidades máximas, $(dE/dt)_{\text{máx}}$, $(dP/dt)_{\text{máx}}$, y $(dS/dt)_{\text{máx}}$ se ha derivado la ecuación logística de cada componente (ecuaciones

4, 5 y 6; respectivamente), respecto al tiempo, t (h); obteniendo las siguientes expresiones:

$$\text{Para la enzima: } \frac{dE}{dt} = \frac{16,47 \times e^{-0,26 \times t}}{(1+6,25 \times e^{-0,26 \times t})^2} \dots (7)$$

$$\text{Para el sustrato consumido: } \frac{dS_C}{dt} = \frac{277,44 \times e^{-0,20 \times t}}{(1+10,38 \times e^{-0,20 \times t})^2} \dots (8)$$

$$\text{Para el producto: } \frac{dP}{dt} = \frac{134,44 \times e^{-0,20 \times t}}{(1+10,64 \times e^{-0,20 \times t})^2} \dots (9)$$

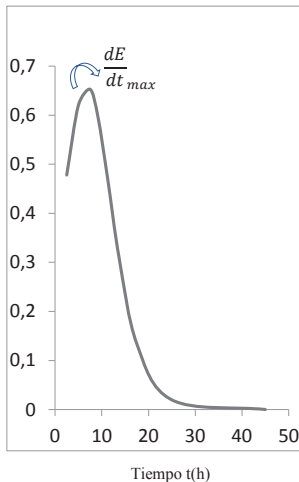
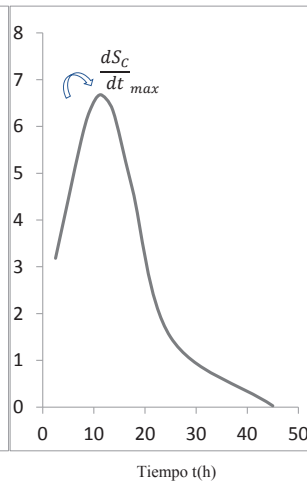
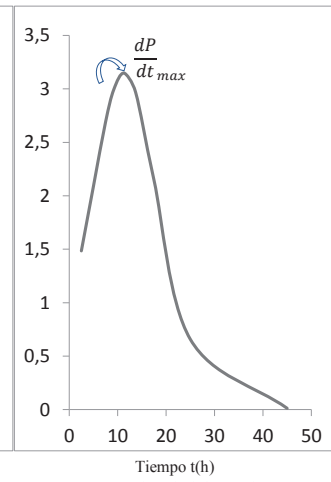
La velocidad de cada uno de los componentes que participan en el proceso biotecnológico, utilizando las

ecuaciones (7), (8) y (9); se presentan en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Valores de velocidad los tres componentes (enzima [E], producto [P] y sustrato consumido [S_c]).

Tiempo, t (h)	(dE/dt)	(dP/dt)	(dS _c /dt)
2,5	0,47	3,18	1,48
5,0	0,62	4,44	2,08
7,5	0,65	5,69	2,68
9,2	0,59	6,33	2,99
11,3	0,46	6,67	3,14
13,7	0,30	6,34	2,96
17,5	0,13	4,67	2,14
25,0	0,01	1,49	0,65
45,0	0,00	0,02	0,01

Las velocidades y velocidades máximas, de cada uno de los componentes, se presentan en las figuras 3, 4 y 5; respectivamente:

**Figura 3.** Velocidad de la enzima vs tiempo de proceso.**Figura 4.** Velocidad de sustrato consumido vs tiempo de proceso.**Figura 5.** Velocidad de producto vs tiempo de proceso.

De donde se ha calculado que las velocidades máximas para la enzima, sustrato consumido y producto; respectivamente, son:

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)_{max} = 0,65 \frac{gL^{-1}}{h}, \left(\frac{dS_c}{dt}\right)_{max} = 6,68 \frac{gL^{-1}}{h} \text{ y } \left(\frac{dP}{dt}\right)_{max} = 3,14 \frac{gL^{-1}}{h}$$

La evaluación y cálculo de la constante de saturación K_m , se realizó sólo para el sustrato consumido, empleando la ecuación doble recíproca de Mi-

chaelis-Menten y la representación de Lineweaver-Burk, se presenta en la tabla 4 y se observa en la figura 6. Estas son expuestas a continuación:

Tabla 4. Valores de tiempo de proceso (h), velocidad para el producto (V_p), cantidad de sustrato consumido (S_c), recíproco de velocidad de producto y recíproco de concentración de sustrato consumido.

Tiempo, t (h)	V_p	S_c	$1/V_p$	$1/S_c$
2,5	1,48	9,2	0,67	0,10
5,0	2,08	24,6	0,47	0,04
7,5	2,68	46,0	0,37	0,02
9,2	2,99	61,0	0,33	0,01
11,3	3,14	77,1	0,31	0,01
13,7	2,96	91,9	0,33	0,01
17,5	2,14	105,2	0,46	0,00
25,0	0,65	117,5	1,52	0,00
45,0	0,011	121,0	87,38	0,00

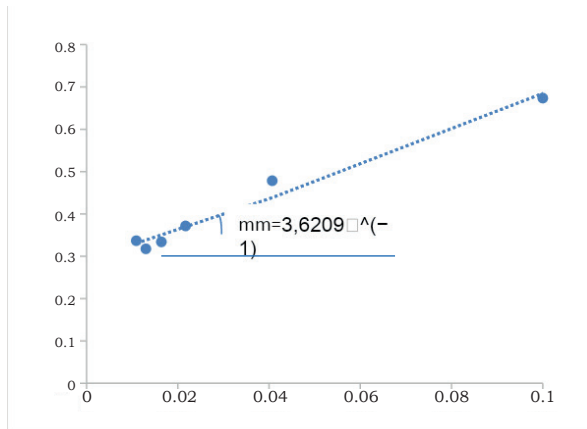


Figura 6. Gráfica del valor recíproco de velocidad del producto (V_p) vs recíproco de concentración de sustrato consumido ($1/S_c$).

En la figura 6, que es la representación de Lineweaver-Burk, se calcula que, la pendiente de la recta de dicha gráfica

es $3.62h^{-1}$, y la constante de saturación K_m para el sustrato consumido es evaluada por las siguientes relaciones:

$$V_{m\acute{a}x} = 3,43 \frac{gL^{-1}}{h} \text{ y } \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} = 3,62, \text{ de donde: } K_m = 12,43gL^{-1}$$

Empleando la teoría de Michaelis-Menten y la gráfica o representación de Monod, la constante de saturación K_m , para el sustrato, es evaluada en la

figura 7; donde la constante de saturación, leída en la figura 7; es: $K_m = 11,5g \cdot L^{-1}$.

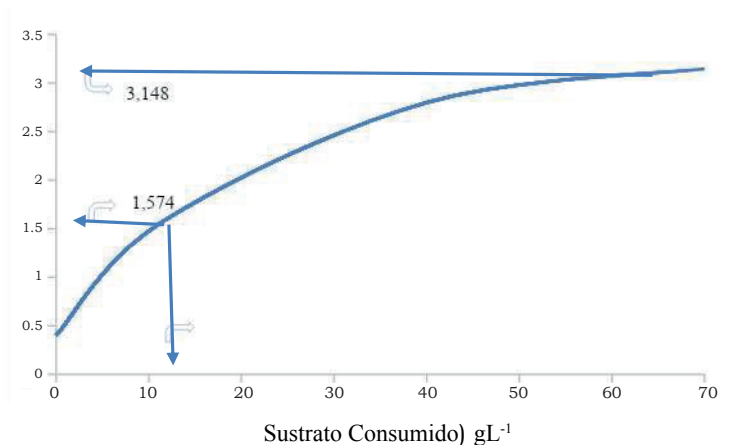


Figura 7. Velocidad de sustrato consumido (S) vs concentración de sustrato consumido.

DISCUSIÓN

La representación gráfica de la formación de producto, consumo de sustrato y actividad enzimática, siguen muy de cerca la tendencia logística y cinética teórica de la figura 1, coincidiendo lo reportado por Rittmann & McCarty (2011). Las ecuaciones logísticas linealizadas, después de realizar el análisis de regresión, tienen un alto coeficiente de correlación, estando todos ellos por encima del 0,97 y coincidiendo muy de cerca con lo reportado por Gujarati & Porter (2015). Las velocidades máximas para la enzima, el sustrato consumido y el producto formado, son respectivamente $0,65 g \cdot L^{-1} h^{-1}$ (para un tiempo de proceso de 6,8 h); $6,68 g \cdot L^{-1} h^{-1}$ (para un tiempo de proceso de 11,5) y $3,14 g \cdot L^{-1} h^{-1}$

(para un tiempo de proceso de 11,4 h); confirmando lo reportado previamente (Roca, 2012; Scragg, 2016; Atkinson & Mavituna, 2017). La constante de saturación, (K_m), para el producto, evaluando tanto por la ecuación de Lineweaver-Burk, así como por la teoría de Monod y Michaelis-Menten, son $12,34 g \cdot L^{-1}$ y $11,5 g \cdot L^{-1}$; respectivamente, teniendo una diferencia no significativa y estando de acuerdo con lo reportado por Baird (2008) y Zúñiga-Lanos *et al.* (2019). El tiempo de proceso para que el consumo de sustrato sea la mitad de la concentración inicial está en 11,5 h, coincidiendo muy cercanamente con el tiempo transcurrido para la formación del producto, similar a lo registrado por García *et al.* (2003). Las ecuaciones lo-

gísticas, el proceso de linealización de modelos de procesos biotecnológicos y la aplicación del método de los mínimos cuadrados es de gran utilidad y aplicación, concediendo muy de cerca lo mencionado por Gujarati & Porter (2015).

Los valores de las constantes de proporcionalidad para enzima, sustrato consumido y producto alcanzaron los va-

lores de $0.26h^{-1}$; $0.20h^{-1}$ y $0.20h^{-1}$; respectivamente. Así mismo los valores de la pendiente de la gráfica de Lineweaver-Burk fue de $3.62h^{-1}$, y de la constante de saturación K_m para el sustrato consumido de $12,43g \cdot L^{-1}$. Finalmente, aplicando la teoría de Michaelis y la representación de Monod, el valor de la constante de saturación K_m , para el sustrato fue de $11,5g \cdot L^{-1}$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, J.; Calles, J.A.; Cañizares, P. & López, B. 2011. *Ingeniería de la Industria Alimentaria*. vol. 2. Ed. Síntesis. Barcelona. España.
- Atkinton, B. & Mavituna, F. 2017. *Manual de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología*. 3^{ra} Ed. Macmillan. Basingstoke. Bruselas. Bélgica.
- Baird, D.C. 2008. *Experimentación: Una introducción a las medidas teóricas y diseños experimentales*. 2^{da} edición. Prentice-Hall. New Jersey. E.U.
- Conasa, J. 2014. *Ingeniería de las Reacciones Químicas*. 8^{va} Ed. Ed. Limusa. México. D.F.
- Doran, P.M. 2018. *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. 3^{ra} Ed. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Fan, S.; Chen, S.; Tang, X.; Xiao, Z.; Deng, Q.; Yao, P.; Sun, Z.; Zhang, Y. & Chen, C. 2015. Kinetic model of continuous ethanol fermentation in closed-circulating process with pervaporation membrane bioreactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 177: 169-175.
- Farah, H.; Ahmad, T.J.; Mohd, H.K. & Maizirwan, M. 2011. Study of growth kinetic and modeling of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology*, 16: 18842-18846.
- García, G.M.; Quintero, R.R. & López-Munguía, C.A. 2003. *Biotecnología Alimentaria*. Ed. Alfa y Omega. Ed. UPC, Barcelona. España.
- García, O. F. 2018. *Papel de la Fermentación en la Fabricación del Pan*. Ed. Joaquín Piñar Miura. Valencia. España.
- Gomes, K. & Polizelli, M.A. 2020. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima beta-galactosidasa. *Brazilian Journal of Development*, 6: 28194-28208.
- Gujarati, D. & Porter, D. 2015. *Econometría*. 6^{ta} edición. Ed. Mac Graw Hill. México.
- Hargono, H.; Bakti, J.; Kristinah H. & Teguh R. 2020. Kinetic model of separate hydrolysis and fermentation of sweet sorghum flour for ethanol production

- using *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 55: 289-299.
- Kessi-Pérez, E.I.; Molinet, J. & Martínez, C. 2020. Disentangling the genetic bases of *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen consumption and adaptation to low nitrogen environments in wine fermentation. Biological Research, 53: 2.
- Machado, M.L.M. & Gomes, R.S. 2019. Modelado matemático del proceso de hidrólisis de la producción de etanol utilizando el mecanismo enzimático Michaelis-Menten. Science and Knowledge in Focus, 2: 19-30.
- Malik, K.; Salama, E.S.; Kim, T.H. & Li, X.K. 2020. Enhanced ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation post acidic and alkali chemical pretreatments of cotton stalk lignocellulose. International Biodeterioration & Biodegradation, 147: 104869.
- Manikandan, K. & Viruthagiri, T. 2010. Kinetic and optimization studies on ethanol production from corn flour. International Journal of Chemical and Biological Engineering, 3: 65-69.
- Mounira, K.A.; Serge, H.; Nawel, O.; Radia, Ch. & Chaouche, N.K. 2017. Kinetic models and parameters estimation study of biomass and ethanol production from inulin by *Pichia caribbica*. African Journal of Biotechnology, 16: 134-131.
- Naseeha, A.; Chohan, G.S.; Aruwajoye, Y.; Sewsynker-Sukai, E.B. & Kana, G. 2019. Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: Process optimization and kinetic assessment. Renewable Energy, 146: 1031-1040.
- Oh, E.J. & Jin, Y.S. 2020. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. FEMS Yeast Research, 20: foz089.
- Olaoye O.S. & Kolawole O.S. 2013. Modeling of the kinetics of ethanol formation from glucose biomass in batch culture with a Non-Structured Model International Journal of Engineering Research and Applications, 3: 562-565.
- Roca, C.A. 2012. *Control de procesos*. Ed. Alfa y Omega. Ediciones UPC. Barcelona. España.
- Salazar-Quispe, I.; Zúñiga-Llanos, A.; Naquiche-Calero, J.; Ferrer-Villena, C. & Castellanos Cabrera, R. 2019. Caracterización enzimática de una celulasa producida por *Bacillus* sp. (GCB-13) para la degradación de sustratos lignocelulósicos. Ciencia & Desarrollo, 25: 61-67.
- Scragg A. 2016. *Biotecnología para Ingenieros. Sistemas biológicos en sistemas tecnológicos*. Ed. Limusa. D.F. México.
- Rittmann, B.E. & McCarty, P. 2011. *Biotecnología del Medio Ambiente: Principios y Aplicaciones*. Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España. Madrid. España.
- Shilpa, S.J. & Rekha, S.S. 2013. Kinetic modeling and scale up of lipoic acid (LA) production from *Saccharomyces cerevisiae* in a stirred tank biorreactor. Bioprocess and Biosystems Engineering, 36:1063-1070.
- Selvi, V. & Vijayagopal, V. 2015. Optimization of rice bran hydrolysis and kinetic

- modelling of xanthan gum production using an isolated strain. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 4: 285–292.
- Yang, H.; Liu, T.; Zhang, G. & He, G. 2020. Intraspecific diversity and fermentative properties of *Saccharomyces cerevisiae* from Chinese traditional sourdough. *LWT*, 124: 109195.
- Zill, G.D. 2019. *Ecuaciones Diferenciales, con aplicación de modelado*. 10^{ma} Ed. Ed. Progreso. México. D.F.
- Zúñiga-Lanos, A.; Ferrer-Villena, C.; Salazar-Quispe, I.; Naquiche-Calero, A. & Castellanos-Cabrera, R. 2019. Estudio cinético de la hidrólisis del almidón de *Solanum tuberosum*, *Ipomoea batatas* y *Manihot esculenta* con amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* BA-3 aislada de los géiseres de Candarave-Tacna. *Ciencia & Desarrollo*, 24: 18-26.

Received July 17, 2020.

Accepted August 25, 2020.