

DETERMINACIÓN DE CONSTANTE CINÉTICA DE HIDRÓLISIS DE PROTEÍNA EN MEDIO SALINO, MEDIANTE MÉTODOS ESTADÍSTICOS

González E., Gabriel., Roeckel Von B., Marlene. y Aspé L., Estrella
Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción, Casilla 160-C,
Correo 3, Concepción, Chile. FAX: 56-41-243750, E-mail: easpe@udec.cl

Palabras Claves: Hidrólisis, cinética, proteínas.

RESUMEN

Se evaluó un diseño experimental basado en teoría estadística y se determinó la constante cinética de hidrólisis de proteínas en medio salino (1572 mg·L⁻¹ de proteínas y 24 mg·L⁻¹ de sal) ante la presencia de un inhibidor (ácido acético, HAC).

El método estadístico implicó 19 puntos experimentales, abarcando un rango de 0 a 70 h y 0 a 1250 mg·L⁻¹ de HAC.

Los resultados experimentales fueron procesados con el programa TableCurve 3D v4.0.0.1 y se obtuvieron parámetros cinéticos del mismo orden de magnitud que los obtenidos por parámetro tradicionales (método que utiliza 20 puntos, para cada concentración de inhibidor).

El método utilizado para el diseño experimental se consideró exitoso y cumplió con el objetivo de obtener más y mejor información con menos datos experimentales.

Introducción.

El conocimiento de la etapa de hidrólisis en la digestión anaerobia no es muy amplia¹ y suele estar enfocado a sistemas con sustratos particulados. Para estos sistemas, se describe la hidrólisis como la etapa limitante de la digestión anaerobia^{2,3}. Durante el proceso anaeróbico, la hidrólisis ha sido modelada por la cinética de Contois, con la constante de saturación proporcional a la concentración de biomasa¹, la que puede representarse por una cinética de primer orden. Así, la forma más utilizada y práctica para simular la hidrólisis de proteínas es a través de una cinética de primer orden con respecto a la proteínas⁴. Además, se ha propuesto y probado que la hidrólisis en la digestión anaerobia es inhibida por la presencia de AGV^{3,5,6}, los cuales son productos intermedios del proceso. Se ha considerado el efecto de los AGV sobre la constante cinética de hidrólisis de proteínas a través de un modelo de inhibición no competitiva⁵, y también se ha estudiado el efecto

del ácido acético (AGV de 1 carbono) sobre la hidrólisis de un sustrato salino y con contenido de proteína soluble simulando un vertido pesquero⁶ (ver ecuación 1)

$$\frac{dS}{dt} = -K_h \cdot S \quad K_h = 0.0973 \left(1 - \frac{C_{AGV}}{1120}\right)^{0.55} \quad (1/h) \quad (1)$$

El efecto inhibitor de una mezcla de AGV no es conocido. Así, es de interés estudiar esta inhibición, lo que se hará considerando la proporción de AGV que se da en la anaerobiosis de proteínas.

En general, los estudios cinéticos se realizan controlando las variables y modificando sólo una de ellas para observar el efecto producido. Este tipo de análisis consume recursos y tiempo, los cuales son escasos. Por otra parte, utilizando métodos estadísticos y el conocimiento de la ecuación cinética que rige el fenómeno, es posible obtener las constantes cinéticas involucradas en la hidrólisis anaeróbica de proteínas en ambiente altamente salino, con menos recursos y en un menor tiempo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es mostrar la viabilidad de utilizar un método estadístico para obtener condiciones experimentales que permitan obtener la misma información que el sistema clásico pero ahorrando recursos y tiempo y aplicarlo a la cinética de inhibición de hidrólisis de proteínas.

Metodología.

La hidrólisis anaeróbica de proteínas solubles se estudió a través del tiempo, en el rango mesofílico a una temperatura de 37 ± 1 (°C). El estudio se realizó en forma discreta utilizando reactores discontinuos, consistentes en viales de vidrio de 65 (mL) de volumen útil, sellados con tapón de borosilicato. Los viales contenían 5 (mL) de biomasa suspendida (500 (mg/L) de SSV) proveniente de reactores continuos de laboratorio funcionando en estado estacionario por más de un año, con un TRH de 30 días, y 45 (mL) de

sustrato modelo (1572 (mg/L) de proteína soluble). La anaerobiosis se logró gasificando los viales con nitrógeno y sellándolos herméticamente. Este procedimiento ha sido reportado en la literatura⁶

Inhibición por ácido acético

Los estudios cinéticos de hidrólisis anaeróbica de proteínas en medio salino, se realizaron utilizando métodos de diseño estadístico.

Utilizando el método estadístico, se determinó el rango de estudio de la experimentación: obteniéndose puntos experimentales en un rango de 70 (h) y con concentraciones de ácido acético entre 0 y 1250 (mg/L), de acuerdo a lo reportado en la literatura⁶

Los puntos experimentales se escogieron de acuerdo a un diseño experimental basado en teoría estadística, llamado hipercubos latinos, que no requiere ningún conocimiento previo respecto a la respuesta esperada. Para estos efectos se utilizó el programa "Matlab 6.5⁷ y la herramienta *Model-Based Calibration Toolbox*. Los puntos experimentales obtenidos se presentan en la Tabla 1.

Inhibición por mezcla de Ácidos Grasos

La cinética de hidrólisis anaeróbica de proteínas en medio salino, con ácidos grasos volátiles como inhibidores se realizó utilizando el mismo procedimiento anterior, pero se agregó cada vez, concentraciones conocidas de ácido grasos volátiles, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico en proporción 3:2:0.7:0.5. Esta proporción se obtuvo de la formación de AGV en la degradación de proteínas, al tiempo que ha ocurrido casi completamente la conversión posible de proteínas, reportados en literatura.^{8,9,10}

Los puntos experimentales se escogieron con un diseño central compuesto¹⁰, con un tiempo de experimentación entre 0 y 40 (h), y concentraciones de AGV entre 0 y 2000 (mg/L).

La distribución de los puntos experimentales dada por el diseño se presenta en la tabla 2.

Tabla 1
Puntos experimentales obtenidos por el diseño estadístico de hipercubos latinos.

Punto experimental	Tiempo (h)	Conc. HAc (mg/L)
1	17.1	1069
2	46.2	1145
3	65.5	611
4	71.3	0
5	25.2	878
6	19.3	840
7	48.1	496
8	45.1	191
9	0	840
10	23	840
11	36.9	382
12	15.3	1107
13	68.3	1145
14	43.5	38
15	63	267
16	41.2	993
17	70.1	573
18	20.9	764
19	39.3	687

Tabla 2
Puntos experimentales obtenidos por el diseño estadístico central compuesto.

Punto experimental	Tiempo (h)	Conc. AGV (mg/L)
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	5,9
7	1700	5,9
8	300	20

9	1000	20
10	1000	20
11	1000	20
12	1000	20
13	1000	20
14	2000	20
15	0	34,1
16	1700	34,1
17	1000	40

Cada muestra fue posteriormente analizada para determinar su concentración de proteínas y pH. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry¹¹, mientras que el pH se midió directamente en un pHmetro. El orden en que se realizaron las mediciones fue el descrito por las tablas 1 y 2 para asegurar la aleatoriedad de los factores no controlables que pudieran existir en el proceso de medición. En ambos estudios, cada uno de los puntos experimentales se midió en duplicado (cada medición a partir de un vial distinto).

Modelo Cinético de inhibición versus datos experimentales

La hidrólisis anaeróbica de proteínas solubles se estudió a través del tiempo, en el rango mesofílico a una temperatura de 37 ± 1 (°C) de acuerdo a lo descrito al inicio de la metodología y bajo distintas concentraciones de AGV (0, 300 y 1700 mg/L).

Estos datos fueron comparados con la predicción dada por los modelos cinéticos de inhibición determinados y seleccionados previamente, en este trabajo.

Resultados y Discusión.

Se ha reportado que la determinación cinética de hidrólisis de proteínas mediante el uso del método experimental clásico, requirió 210 puntos experimentales de concentración de proteínas en función del tiempo y a distintas concentraciones de HAc como inhibidor, en ese caso, la obtención de la constante cinética de hidrólisis, se ha realizado línea rizando la ecuación (1), a cada concentración de HAc usada⁶. Puede observarse que determinar las constantes cinéticas de la hidrólisis anaeróbica de proteínas en medio salino, es un proceso lento, que consume recursos y tiempo.

En este trabajo, el número de puntos experimentales se definió usando el método estadístico de hipercubos latinos, se obtuvo como un conjunto de condiciones experimentales de concentración de AGV y tiempo, la concentración inicial de proteínas se mantuvo constante.

Cinética de inhibición por HAc

Tal como se explicó en la metodología, para determinar la cinética de inhibición por HAc se requirieron 19 puntos experimentales. A estos datos, se les ajustó el modelo cinético presentado en la literatura⁶. Este ajuste se presenta en la Figura 1 y los parámetros cinéticos obtenidos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Constantes cinéticas de la hidrólisis anaeróbica de proteínas en medio salino, para el caso en que el inhibidor es HAc.

Parámetro	Valor	Error Estándar
k_0 (1/h)	0.104	0.142
k_I (mg/L)	1292	122.96
γ	1.73	3.62

Figura 1

Ajuste de los datos experimentales (con HAc como inhibidor) al modelo presentado por González et al (1). Temperatura 37 (°C).

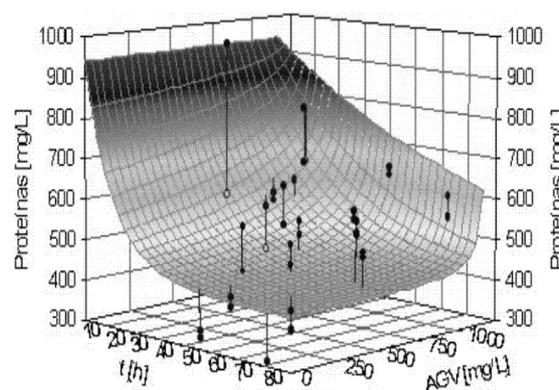


Tabla 4

Constantes cinéticas de la hidrólisis anaeróbica de proteínas en medio salino, reportado por González et al. (6).

Parámetro	Valor	Error Estándar
k_0 (1/h)	0.0973	0.006
k_I (mg/L)	1120	209
γ	0.55	0.21

Al comparar los resultados reportados en la literatura (ver tabla 4) y los obtenidos en este trabajo (ver tabla 3), se observa que en el método clásico el error involucrado en los parámetros cinéticos determinados es bastante menor, es decir la precisión obtenida es mejor. Sin embargo, en el caso del método estadístico, esta precisión puede ser mejorada tomando más puntos para cada condición experimental. Si cada punto experimental se hiciera en triplicado, significaría un total de 57 puntos, frente a los 210 que usa el método tradicional.

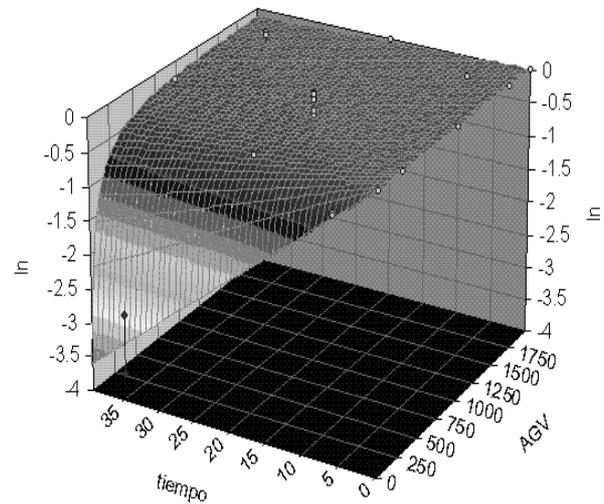
Si se comparan los resultados obtenidos por el método clásico y estadístico (tablas 4 y 3, respectivamente) se tiene que las constantes cinéticas obtenidas difieren en un 7 % para la constante de hidrólisis (k_0) y 15 % para la constante de inhibición (k_i).

Cinética de inhibición por mezcla de AGV

Para determinar la cinética de inhibición por una mezcla de AGV se requirieron 17 puntos experimentales. A estos datos, se les ajustó el mismo modelo cinético que para la inhibición por HAc. Este ajuste se presenta en la Figura 2 y los parámetros cinéticos obtenidos se presentan en la Tabla 5.

Figura 2

Ajuste de los datos experimentales (con mezcla de AGV como inhibidor) al modelo presentado por González et al (1). Temperatura 37 (°C).

**Tabla 5**

Constantes cinéticas de la hidrólisis anaeróbica de proteínas en medio salino para el caso en que el inhibidor es una mezcla de AGV.

Parámetro	Valor	Error Estándar
k_0 (1/h)	0.0903	0.006
k_I (mg/L)	2027	1153
γ	0.102	0.0913

De los resultados obtenidos cuando el inhibidor es una mezcla de AGV, se puede inferir que el método estadístico también, es capaz de determinar las constantes cinéticas, ya que la constante de hidrólisis, sin inhibición, difiere en un 7 % con respecto a lo reportado en la literatura⁶

El modelo cinético para la inhibición estaría representado por la ecuación 2

$$\frac{dS}{dt} = -0.0903 \cdot \left(1 - \frac{C_{AGV}}{2027}\right)^{0.102} S \quad (1/h) \quad (2)$$

Además, se consideró el modelo dado por la ecuación 3 (que corresponde a un modelo de inhibición no competitiva). Los datos experimentales (usados en la determinación de los parámetros cinéticos) ajustaron, levemente mejor con la ecuación 3.

$$\frac{dS}{dt} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L} \cdot \text{h}} \right] = 0.0903 \cdot \frac{1}{\left(1 + \left(\frac{[C_{AGV}]}{63} \right) \right)} \cdot S \quad (3)$$

En las ecuaciones 2 y 3, se tiene que S es la concentración de proteínas en $[\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}]$ y $[C_{AGV}]$, la concentración de AGV en $[\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}]$.

En resumen, el método estadístico permite determinar las constantes cinéticas de la hidrólisis anaeróbica de proteínas en medio salino, se puede mejorar la precisión si se aumenta el número de puntos experimentales para cada condición experimental determinada.

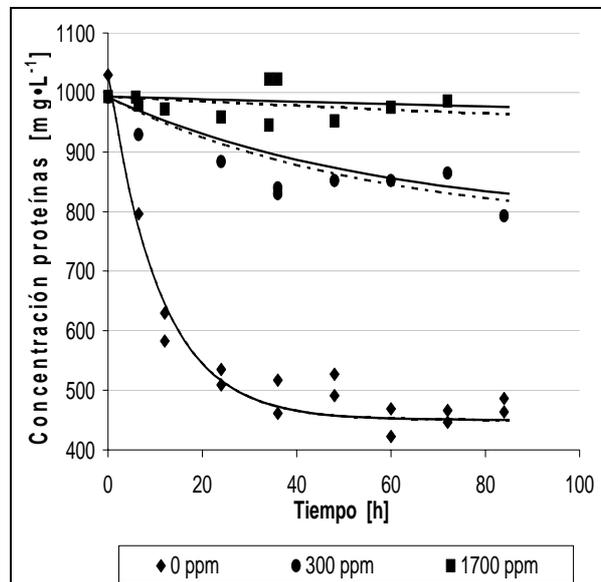
Por lo tanto, el diseño experimental se considera exitoso y cumple con el objetivo de obtener la misma información con menos datos experimentales.

Aplicación del modelo cinético

En la figura 3, se muestra la comparación del modelo cinético obtenido con datos experimentales (no usados en el ajuste) para tres concentraciones de AGV diferentes. Se observa que los modelos considerados representan adecuadamente la inhibición por AGV de la hidrólisis.

Figura 3

Efecto de la concentración de una mezcla de AGV (HAC, HPr, HBU, HVa) sobre la hidrólisis de proteínas. (--- :ecuación 2; — :ecuación 3)



Conclusiones.

El método utilizado para el diseño experimental se considera exitoso y cumple con el objetivo de obtener la misma información comparada con el método tradicional de experimentación pero en un menor tiempo y con menos puntos experimentales.

La hidrólisis de proteínas en un ambiente anaerobio mesofílico y salino es inhibida por ácidos grasos volátiles y se puede representar mediante un modelo cinético de primer orden.

Agradecimientos.

Los autores (E.A.L., M.R.vonB. y G.G.E) agradecen al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile (FONDECYT) por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto FONDECYT 1020457.

Bibliografía.

1. Henze, M., Harremoës, P., Cour, J. y E. Arvin. "Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes", Springer, 2ª edición, (1997).
2. Batstone, D. "High-rate anaerobic treatment of complex waste water". Tesis de Doctorado, Universidad de Queensland, Brisbane, Australia (2000).
3. Veeken, A., Kalyuzhnyi, S., Scharff, H. y B. Hamelers. "Effect of pH and VFA on Hydrolysis of organic solid waste", *Journal of Environmental Engineering*, pp 1076-1081, (2000).
4. Batstone, D., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H. y V. Vavilin. "Anaerobic Digestion Model N° 1 (ADM1)", IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes, Scientific and Technical Report N° 13, apéndice A (2002).
5. Angelidaki, I., Ellegaard, L. y B. Ahring. "A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 42, N° 3, pp. 159-166 (1993).
6. González, G., H. Urrutia, M. Roeckel y E. Aspé Protein hydrolysis under anaerobic, saline conditions in presence of acetic acid. *J Chem Tech Biotech* 80(2) pp: 151 - 157. (2005).
7. Matlab 6.5.0.180913a Realease 13 Mathworks, Inc. (2002)
8. G. E. González, D. I. Vargas, H. E. Urrutia, M. D. Roeckel y E. R. Aspé. (2004) Anaerobic degradation of proteins in saline media: focusing in intermediate products. *Proceedings 10th World Congress on Anaerobic Digestion*. Montreal, Canadá. 29 de agosto al 2 de septiembre. 2004
9. Aspé E., M. Roeckel, H. Urrutia, G. González y D. Vargas (2004) "Rol de los ácidos grasos volátiles en la degradación anaeróbica de proteínas en condiciones salinas. Congreso Nacional de Biotecnología, Comunicaciones, BIOTEC 2004, Oviedo, España, 19- 23 de julio (2004)
10. Montgomery, D. C. (1991) *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 401-4010.
11. Sigma Diagnostics, Protein Assay Kit. (1994). *Procedure No P5656*. Sigma Chemical Company, d.b.a., St. Louis, MO, USA.