

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

Efecto del extracto de levadura y la relación carbono – nitrógeno en la producción de polihidroxiбутирато por *Bacillus subtilis* NRRL B-1650

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

**PRESENTADO POR:**

Bach. Mauricio Bacón, Keyla Dayana

Bach. Romero Olaza, Adrián Antonio

**ASESOR**

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo

ID ORCID: 0000-0002-5984-0587

**NUEVO CHIMBOTE – PERÚ**

**2024**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

Efecto del extracto de levadura y la relación carbono – nitrógeno en la producción de polihidroxitirato por *Bacillus subtilis* NRRL B-1650

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

Revisado y aprobado por el Asesor

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'P' followed by a horizontal line and a loop, positioned above a solid horizontal line.

**Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo**

**DNI: 06451148**

**ID ORCID: 0000-0002-5984-0587**

**Asesor**

**NUEVO CHIMBOTE – PERÚ**

**2024**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

Efecto del extracto de levadura y la relación carbono – nitrógeno en la producción de polihidroxibutirato por *Bacillus subtilis* NRRL B-1650

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador

**M. Sc. Eterio Amaranto Alva Muñoz**  
**Presidente**

**DNI: 32406295**  
**ID ORCID: 0000-0002-4113-7981**

**M. Sc. Jesús Diestra Balta**  
**Secretario**

**DNI: 70553964**  
**ID ORCID: 0000-0003-2462-2229**

**Dr. Angel Pablo Castro Alvarado**  
**Integrante**

**DNI: 06451148**  
**ID ORCID: 0000-0002-5984-058**

## ACTA DE CALIFICACION DE SUSTENTACION DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el auditorio de la facultad de Ciencias siendo las 20 horas del día 24 de mayo dando cumplimiento a la Resolución N° 102-2024-UNS-CFC, se reunió el jurado evaluador presidido por M Sc Eterio ALVA MUÑOZ teniendo como miembros a M Sc Jesús DIESTRA BALTA (integrante) y Dr Ángel CASTRO ALVARADO (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de licenciado en Biotecnología realizado por los tesisistas Keyla Dayana MAURICIO BACON y Adriann Antonio ROMERO OLAZA quienes sustentaron la tesis intitulada **Efecto de extracto de levadura y la relación carbono : nitrógeno en la producción de polihidroxiбутирато por Bacillus subtilis NRRL B-1650.**

Terminada la sustentación los tesisistas respondieron a las preguntas formuladas por los miembros del jurado

El jurado luego de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de **18** puntos, según artículo 111 del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2002-CU-R-UNS)

Siendo las 20 y30 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del jurado en señal de conformidad



Nombre: Eterio ALVA MUÑOZ

Presidente



Nombre: Jesús DIESTRA BALTA

Secretario



Nombre: Ángel CASTRO ALVARADO  
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (03), tesisistas () y archivo FC (02).



## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Adrain Romero  
Título del ejercicio: Quick Submit  
Título de la entrega: 040624-TesisEfectodelextractodelevaduraylarelacióncarbono...  
Nombre del archivo: TESIS-\_ROMERO\_-\_MAURICIO\_3.pdf  
Tamaño del archivo: 2.48M  
Total páginas: 97  
Total de palabras: 23,558  
Total de caracteres: 130,278  
Fecha de entrega: 04-jun.-2024 10:05p. m. (UTC-0500)  
Identificador de la entre... 2395846812

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto del extracto de levadura y la relación carbono - nitrógeno en la producción de  
pánido substituido por Eucalypto salicifolia NREL B 1650

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

**PRESENTADO POR:**

BACH MAURICIO BACON, Keyla Deyana  
BACH ROBERTO OLAZA, Aldemar Antonio

**ASESOR**

DR. CASTRO ALVARADO, Ángel PABLO

NUEVO CHIMBOTE - PERÚ

2024

1

040624-

# Tesis Efecto de extracto de levadura y la relación carbono-nitrógeno en la producción de PHB

## INFORME DE ORIGINALIDAD

|                     |                     |               |                         |
|---------------------|---------------------|---------------|-------------------------|
| <b>14%</b>          | <b>14%</b>          | <b>3%</b>     | <b>6%</b>               |
| INDICE DE SIMILITUD | FUENTES DE INTERNET | PUBLICACIONES | TRABAJOS DEL ESTUDIANTE |

## FUENTES PRIMARIAS

|          |  |               |
|----------|--|---------------|
| <b>1</b> | <b>docplayer.es</b><br>Fuente de Internet  | <b>1%</b>     |
| <b>2</b> | <b>docslide.us</b><br>Fuente de Internet   | <b>1%</b>     |
| <b>3</b> | <b>repositoriodigital.uns.edu.ar</b><br>Fuente de Internet   | <b>1%</b>     |
| <b>4</b> | <b>repositorio.unal.edu.co</b><br>Fuente de Internet   | <b>&lt;1%</b> |
| <b>5</b> | <b>Submitted to ITESM: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey</b><br>Trabajo del estudiante | <b>&lt;1%</b> |
| <b>6</b> | <b>es.scribd.com</b><br>Fuente de Internet   | <b>&lt;1%</b> |
| <b>7</b> | <b>bdigital.unal.edu.co</b><br>Fuente de Internet  | <b>&lt;1%</b> |
| <b>8</b> | <b>dspace.unitru.edu.pe</b><br>Fuente de Internet  | <b>&lt;1%</b> |

## **DEDICATORIA**

*A mi compañero/a de tesis, a quien quiero expresar el más sincero agradecimiento por la laboriosa colaboración, dedicación y valiosa contribución a la consecución de este trabajo investigativo. Juntos, logramos superar muchos desafíos, celebrado logros y compartido la responsabilidad de esta gran experiencia.*

*A nuestros padres, familiares y amigos, que nos brindaron su apoyo incondicional para afrontar todos los retos a lo largo de nuestra carrera universitaria. Su aliento nos impulsó a vencer nuestros miedos y dudas, para remplazarlos por fe y esperanza.*

*A cada uno de nuestros mentores, que supo guiarnos con su sabiduría y paciencia a lo largo de nuestra formación universitaria sembrando en nosotros el amor por la ciencia y la investigación como motor para transformar a la sociedad.*

*A todas las personas que de uno u otra forma nos acompañaron en este maravilloso viaje y que fueron una red de apoyo importante en la cual nos apoyamos.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Primero, agradecemos a Dios por darnos la luz de la vida y la ciencia, y guiarnos a lo largo de nuestra vida, por ser nuestra roca de fe y la fortaleza en los momentos de debilidad y dificultad*

*A mis padres, hermanos y amigos, por su amor y cariño incondicional*

*Al Dr. Ángel Castro Alvarado, jefe del Laboratorio de Investigación en Biotecnología, de la Universidad Nacional del, por aceptar con optimismo ser nuestro asesor y guiarnos en todos los pasos que dimos en esta increíble aventura.*

## INDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| DEDICATORIA.....  | 4  |
| AGRADECIMIENTO .....  | 5  |
| INDICE GENERAL .....  | 6  |
| INDICE DE FIGURAS .....   | 8  |
| INDICE DE CUADROS .....   | 10 |
| INDICE DE ANEXOS .....  | 11 |
| RESUMEN.....  | 12 |
| ABSTRACT .....  | 13 |
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 14 |
| 1.1. PROBLEMA.....  | 17 |
| 1.2. HIPÓTESIS.....   | 17 |
| 1.3. OBJETIVOS .....  | 17 |
| 1.3.1. Objetivo principal.....                                    | 17 |
| 1.3.2. Objetivos específicos.....                                 | 17 |
| 1.4. JUSTIFICACIÓN .....  | 17 |
| II. MARCO TEÓRICO.....  | 19 |
| 2.1. Plásticos .....  | 19 |
| 2.1.1. Clasificación .....  | 19 |
| 2.1.1.1. Termoestables.....                                       | 19 |
| 2.2. Bioplásticos.....  | 21 |
| 2.2.1. Clasificación .....  | 21 |
| 2.2.1.1. Clasificación de la European Bioplastic Association..... | 22 |
| 2.3. Polihidroxialcanoatos (PHA).....                             | 23 |
| 2.3.1. Estructura de los PHA .....                                | 23 |
| 2.3.2. Clasificación .....  | 25 |
| 2.4. Polihidroxi butirato (PHB).....                              | 26 |
| 2.4.1. Propiedades del Polihidroxi butirato (PHB).....            | 27 |
| 2.4.2. Ruta metabólica de la producción de PHB .....              | 28 |
| 2.4.3. Extracción con solventes orgánicos.....                    | 30 |
| 2.4.4. Producción del biopolímero.....                            | 31 |
| 2.4.5. Utilización y producción de PHAs .....                     | 32 |
| 2.5. Extracto de Levadura .....                                   | 34 |
| 2.6. <i>Bacillus subtilis</i> .....                               | 34 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                    | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Materiales.....   | 35 |
| 3.1.1. Microorganismo.....   | 35 |
| 3.2. Métodos.....  | 36 |
| 3.2.1. Reactivación del microorganismo .....   | 36 |
| 3.2.2. Cinética del microorganismo .....   | 36 |
| 3.2.2.1. Preparación del inóculo para la cinética microbiana .....   | 36 |
| 3.2.2.2. Cinética del microorganismo en medio definido modificado (DM).....                                      | 37 |
| 3.2.3. Diseño experimental para la optimización de la producción de PHB .....                                    | 38 |
| 3.2.3.1. Preparación del inóculo para la ejecución del diseño experimental .....                                 | 39 |
| 3.2.3.2. Fermentación .....  | 40 |
| 3.2.3.3. Recolección de datos .....  | 41 |
| 3.2.3.3.1. Cuantificación de biomasa.....  | 41 |
| 3.2.3.3.2. Cuantificación de azúcares reductores.....  | 41 |
| 3.2.3.3.3. Cuantificación del PHB .....  | 42 |
| 3.2.3.3.4. Análisis de Datos .....   | 42 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 43 |
| 4.1. Cinética del microorganismo .....   | 43 |
| 4.1.1. Cinética de formación de biomasa.....   | 43 |
| 4.1.2. Cinética de consumo de sustrato.....  | 47 |
| 4.1.3. Cinética De formación de producto.....  | 49 |
| 4.2. Análisis del proceso fermentativo de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650 para la<br>producción de PHB..... | 51 |
| 4.2.1. Análisis de la fuente de carbono.....   | 51 |
| 4.2.2. Análisis del tipo de fermentación .....   | 52 |
| 4.2.3. Análisis de métodos de extracción de PHB .....  | 55 |
| 4.3. Diseño experimental para la <i>optimización</i> del medio complejo MD.....                                  | 56 |
| 4.3.1. Efecto de la concentración inicial de extracto de levadura.....   | 59 |
| 4.3.2. Efecto de la relación carbono/nitrógeno .....   | 60 |
| 4.3.3. Optimización estadística de la producción de PHB.....   | 62 |
| V. CONCLUSIONES .....  | 66 |
| VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 67 |
| VII. ANEXOS .....  | 80 |

## INDICE DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Clasificación de los plásticos.....  | 21 |
| <b>Figura 2.</b>  | Clasificación de los bioplásticos.....   | 23 |
| <b>Figura 3.</b>  | Estructura química del PHA.....  | 23 |
| <b>Figura 4.</b>  | A) Esquema del granulo de PHA. B) Estructura química del PHA.....  | 24 |
| <b>Figura 5.</b>  | Estructuras químicas de diferentes monómeros constituyentes de PHAs de cadena corta.....                     | 26 |
| <b>Figura 6.</b>  | Estructura del polihidroxiбутирато.....  | 26 |
| <b>Figura 7.</b>  | Ruta metabólica del PHB a partir de acetil-CoA.....  | 29 |
| <b>Figura 8.</b>  | Micrografía de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....   | 35 |
| <b>Figura 9.</b>  | Reactivación de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....  | 36 |
| <b>Figura 10.</b> | Preparación de inoculo de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....  | 37 |
| <b>Figura 11.</b> | Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....  | 38 |
| <b>Figura 12.</b> | Inoculo para ensayos de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....  | 40 |
| <b>Figura 13.</b> | Ensayos de diseño experimental de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....                                  | 40 |
| <b>Figura 14.</b> | Cuantificación de biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....                                       | 41 |
| <b>Figura 15.</b> | Cuantificación de azúcares reductores de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....                           | 42 |
| <b>Figura 16.</b> | Cinética de formación de biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650...                                  | 43 |
| <b>Figura 17.</b> | Cinética de formación de biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650...                                  | 46 |
| <b>Figura 18.</b> | Residuales de los valores observados vs. los valores modelados para la cinética de formación de biomasa..... | 46 |
| <b>Figura 19.</b> | Cinética de consumo de sustrato y formación de biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....          | 47 |
| <b>Figura 20.</b> | Cinética de consumo de sustrato de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....                                 | 49 |
| <b>Figura 21.</b> | Cinética de <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-1650.....  | 50 |
| <b>Figura 22.</b> | Comparacion de fuentes de carbono para la producción de PHB.....   | 51 |
| <b>Figura 23.</b> | Procesos de fermentación comúnmente utilizados para la biosíntesis de PHA.....                               | 54 |
| <b>Figura 24.</b> | Grafica de Pareto para la concentración de PHB. (L): Lineal, (Q) Cuadrático, 1Lby2L: interacción lineal..... | 58 |
| <b>Figura 25.</b> | Grafica de Pareto para la concentración de PHB. (L): Lineal, (Q) Cuadrático.....                             | 59 |
| <b>Figura 26.</b> | Impacto de las rutas metabólicas en la producción de PHB.....  | 61 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 27.</b> A) Gráfico de superficie de respuesta y (B) gráfico de contorno para la concentración de PHB en función de la concentración inicial extracto de levadura y la relación C/N.....     | 64 |
| <b>Figura 28.</b> Medio para la realización de curva de calibrado a las 48 horas .....  | 80 |
| <b>Figura 29.</b> Capachos con medio en la estufa para secar a 80°C.....  | 81 |
| <b>Figura 30.</b> Curva de calibrado de Biomasa .....   | 82 |
| <b>Figura 31.</b> Aplicación de método DNS a diferentes concentraciones.....  | 83 |
| <b>Figura 32.</b> Concentración de Glucosa vs Absorbancia .....   | 85 |
| <b>Figura 33.</b> A) Preparación de contenedores. B) Bases de placas lavadoras y rotuladas listas para la estufa. C) Contenedores en la campana. D) Pesado de contenedores.....                       | 85 |
| <b>Figura 34.</b> Adición de cloroformo e hipoclorito de sodio.....   | 86 |
| <b>Figura 35.</b> Proceso de extracción y pesado del biopolímero.....   | 87 |
| <b>Figura 36.</b> PHB obtenido en el experimento.....   | 87 |
| <b>Figura 37.</b> A) Valores predichos vs Valores residuales, B) Valores observados vs Valores predichos, C) Valores observados vs Valores residuales D) Valores predichos vs Valores observados..... | 96 |

## INDICE DE CUADROS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Cuadro 1.</b>  | Algunos monómeros constituyentes de PHA .....  | 25 |
| <b>Cuadro 2.</b>  | Principales características de los propilenos y PHB.....   | 27 |
| <b>Cuadro 3.</b>  | Principales microorganismos productores de PHAs.....   | 30 |
| <b>Cuadro 4.</b>  | Empresas productoras de PHB .....  | 33 |
| <b>Cuadro 5.</b>  | Diseño experimental factorial central compuesto rotatable 2 <sup>2</sup> .....   | 39 |
| <b>Cuadro 6.</b>  | Valores de las variables independientes a los diferentes niveles del diseño experimental.39  |    |
| <b>Cuadro 7.</b>  | Reporte del programa Mathematica del ajuste del modelo Logístico.....  | 45 |
| <b>Cuadro 8.</b>  | Producción de Biomasa y PHB utilizando diferentes fuentes de carbono. <i>Recuperado de Kanna (2005)</i> .....                          | 52 |
| <b>Cuadro 9.</b>  | Producción de PHA's utilizando diferentes sistemas de fermentación. <i>Recuperado de Chavez (2022)</i> .....                           | 53 |
| <b>Cuadro 10.</b> | Pureza y rendimiento del PHB utilizando diferentes solventes. <i>Recuperado de Aramvash (2019)</i> .....                               | 55 |
| <b>Cuadro 11.</b> | Matriz del diseño central compuesto rotatable con las variables independientes a nivel codificada y original, con las respuestas ..... | 57 |
| <b>Cuadro 12.</b> | Preparación de diferentes concentraciones .....  | 80 |
| <b>Cuadro 13.</b> | Lectura en espectrofotómetro .....   | 81 |
| <b>Cuadro 14.</b> | Peso inicial de capachos .....   | 81 |
| <b>Cuadro 15.</b> | Concentración final de biomasa.....  | 82 |
| <b>Cuadro 16.</b> | Sistema de diluciones .....  | 83 |
| <b>Cuadro 17.</b> | Composición del medio definido modificado (DM).....  | 88 |
| <b>Cuadro 18.</b> | Composición elemental de la biomasa en las bacterias .....   | 89 |
| <b>Cuadro 19.</b> | Calculo de la capacidad de biomasa del medio de cultivo.....   | 90 |
| <b>Cuadro 20.</b> | Concentración de biomasa y azúcares reductores para cinética .....   | 91 |
| <b>Cuadro 21.</b> | Concentración de PHB para la cinética .....  | 92 |
| <b>Cuadro 22.</b> | Cuantificación de la biomasa.....  | 92 |
| <b>Cuadro 23.</b> | Cuantificación del PHB. ....   | 93 |
| <b>Cuadro 24.</b> | Cuadro ANOVA para la variable respuesta concentración de PHB (g/L).<br>94  |    |
| <b>Cuadro 25.</b> | Coefficientes de regresión para la variable respuesta concentración de PHB (g/L).<br>94  |    |

## INDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| ANEXO 1 .....   | 80 |
| 1.1. Curva de calibrado de biomasa – Método peso seco.....  | 80 |
| 1.2. Curva de calibrado de glucosa.....   | 83 |
| 1.3. Método de extracción y cuantificación de PHB .....   | 85 |
| ANEXO 2. Composición del medio definido modificado (DM).....                                      | 88 |
| ANEXO 3. Determinación de la biomasa teórica máxima.....  | 88 |
| ANEXO 4. Datos recogidos .....  | 91 |
| 4.1. Cinética microbiana.....   | 91 |
| 4.2. Diseño experimental para la optimización de medio de cultivo MD.....                         | 92 |
| ANEXO 5. Análisis estadísticos.....   | 94 |
| 5.1. Cuadro ANOVA .....   | 94 |
| 5.2. Coeficientes de regresión.....   | 94 |
| 5.3. Residuales.....  | 95 |
| 5.4. Valores críticos y Determinación de valores óptimos de las variables<br>independientes ..... | 97 |

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la concentración de extracto de levadura y la relación carbono – nitrógeno en la producción de polihidroxitirato por *Bacillus subtilis* NRRL B-1650. El medio de cultivo se elaboró a partir de un diseño de medio consecuente a las necesidades nutricionales del microorganismo que fue suplementado con extracto de levadura. También se determinó que la cepa producía PHB en la fase exponencial y esta alcanzaba su mayor productividad a las 48 horas. Se utilizó un diseño experimental compuesto rotatable para estudiar el efecto de la concentración de extracto de levadura y la relación carbono/nitrógeno sobre la producción de PHB, determinándose de esta forma un valor óptimo de 3.63 g/L y 21.72 de cada una de las variables para dar un valor óptimo de 1.8 g/L de PHB.

**Palabras clave:** PHB, *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, extracto de levadura, relación carbono-nitrógeno, optimización, diseño central compuesto rotatable.

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of yeast extract concentration and carbon-nitrogen ratio on polyhydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NRRL B-1650. The culture medium was prepared from a medium design consistent with the nutritional needs of the microorganism that was supplemented with yeast extract. It will also develop that the strain produces PHB in the exponential phase and this reached its highest productivity at 48 hours. A rotating compound experimental design was used to study the effect of yeast extract concentration and carbon/nitrogen ratio on PHB production, thus determining an optimized value of 3.63 g/L and 21.72 of each of the variables for give an optimum value of 1.8 g/L of PHB.

Keywords: PHB, *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, yeast extract, carbon-nitrogen ratio, optimization, rotatable composite core design.

## I. INTRODUCCIÓN

La industria del plástico está fuertemente integrada con la industria petrolera. El desarrollo de la industria petroquímica fue probablemente el factor individual más importante que contribuyó al crecimiento de la industria de los plásticos (Gilbert, 2017). Es así que en su mayoría los plásticos que actualmente usamos son derivados del petróleo.

Los plásticos han transformado la vida cotidiana; el uso está aumentando y es probable que la producción anual supere los 300 millones de toneladas (Thompson et al., 2009). Por su practicidad, versatilidad, bajo costo y durabilidad la masificación de su uso se ha expandido a niveles preocupantes.

La contaminación plástica es un problema ambiental y de salud pública omnipresente y emergente. Con el aumento de la producción y el uso global, junto con la prevalencia de la mala gestión de los desechos plásticos, por lo que se espera que la contaminación plástica empeore en la próxima década (Lebreton y Andrady, 2019). En países como el Perú la situación es preocupante pues el consumo medio por ciudadano es de 30 kg, uno de los más altos de la región (MINAM, 2021).

Ante esta preocupante realidad los bioplásticos surgen como una alternativa contribuyendo en ciclos de vida de plásticos comerciales más sostenibles dentro de una economía circular (Rosenboom et. al, 2022) iniciando una ola de nuevas innovaciones en materiales que son renovables, ofrecen las funciones de los plásticos y son biodegradables. Una de esas clases de biopolímeros, los polihidroxialcanoatos (PHA), que son biosintetizados por numerosos microorganismos que lo sintetizan a partir de nutrientes con alto contenido de carbono (Koller, 2022)

Los PHA son sintetizados por muchos organismos vivos. Sin embargo, la producción a gran escala de PHA se realiza utilizando bacterias (Talan, 2022). Hasta el 90 % (p/p) de la masa celular seca, los PHA se acumulan dentro de la célula bacteriana (Anbreen, 2016). La acumulación de PHA es una forma natural de almacenar carbono y energía para las células microbianas durante el suministro desequilibrado de nutrientes. Los PHA se sintetizan básicamente utilizando aminoácidos, azúcares y ácidos grasos como sustratos de carbono (Riaz et. al, 2021).

El ácido poliláctico (PLA) y el polihidroxialcanoato (PHA) son dos biopoliésteres principales para uso comercial, donde el PHA es más caro que el PLA. Sin embargo, las propiedades y aplicaciones de los PHA se pueden adaptar variando el comonomero y su contenido (Leong, 2021).

En la actualidad se pueden encontrar muchas compañías especializadas en la producción a nivel industrial de PHA (Kourmentza, 2017). Pero este aumento de producción se ve reducida por los altos costos de producción, así como la aplicación en mercados de demanda masiva, como la industria del empaquetado y embalaje, es muy limitada (Harley, 2014). Sin embargo, es en la industria biomédica donde este bioplástico se abre paso pues existe una sinergia entre la alta biocompatibilidad de estos materiales microbianos, la extraordinaria capacidad de ajuste de su rigidez, así como características deseables de fuerza, elasticidad, cristalinidad, degradabilidad, etc (Koller & Braunegg, 2018).

Dentro del mercado biomédico, los altos costos se compensan con el alto valor de los productos por su especificidad. Los azúcares purificados, los ácidos grasos costosos o los aceites comestibles se usan tradicionalmente como sustratos para la biosíntesis de PHA. Es así que el 50 % del coste total de producción de PHA se asigna a las materias primas (Koller & Braunegg, 2018).

Es así que actualmente se evalúa la utilización de sustratos ricos en carbono que a la vez son desechos de la industria agrícola, silvicultora, horticultora y alimentaria. Las “materias primas” a base de carbono utilizadas en el desarrollo de la producción eficiente de PHA microbiano se derivan de fuentes sostenibles y de bajo costo: desechos agrícolas, melaza, suero, aceites usados y glicerol (Cui., 2016). Por otro lado, la utilización de extremófilos para la producción de PHA brinda numerosos beneficios que se derivan especialmente de la mayor robustez del proceso contra la contaminación por microflora mesófila común como base del concepto de biotecnología industrial de próxima generación (Stanislav Obruča et. al, 2022).

El término ampliamente utilizado "extracto de levadura" describe el contenido soluble de una célula de levadura producido después de la destrucción y eliminación de la membrana celular de levadura (Viera, 2016). Un producto de partida particularmente rentable utilizado para producir extracto de levadura es la levadura gastada, que se produce en grandes cantidades (15 kg/10 hL de cerveza) durante el proceso de fabricación de la

cerveza, ya que solo una parte se reutiliza para el siguiente lote (Jacob F. et. al, 2019). Este compuesto es rico en aminoácidos por lo que se utiliza como compuesto proteico, sin embargo, también contiene un grupo de sustancias funcionales clave, como las vitaminas B, los minerales, el contenido de ADN y ARN, así como la composición nutricional general del extracto de levadura. Además, correlacionamos el potencial antioxidante en función de las sustancias responsables de este, como los polifenoles y el glutatión. (Jacob, 2019).

Los polihidroxialcanoatos (PHA) y sus derivados son los bioplásticos microbianos más utilizados (Kawamura, 2021). Beijerinck observó por primera vez un gránulo transparente de PHA en células bacterianas en 1888 (Choi., 2020). Lemoigne fue el primer investigador que reporto la forma más simple de los PHA, el cual es el polihidroxibutirato (PHB), un poliéster que comprende los tres ácidos hidroxibutíricos (Sathya et al., 2018). Descubrieron que el PHB generado por *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* se biodegrada rápidamente (Ranganadhareddy, 2022).

Se reporto que los mayores rendimientos en la producción de polihidroxibutirato (PHB) se alcanzaron al utilizar especies bacterianas de la especie *Bacillus* (Sindhu, 2013). Los PHA son producidos por microorganismos como una forma de almacenamiento de energía intracelular, dentro del citoplasma microbiano, y se manifiesta cuando hay un exceso de suministro de carbono, pero otros nutrientes esenciales, como el oxígeno, el nitrógeno y el fósforo, son deficientes (Laycock et. al, 2014). Al incrementar las proporciones de carbono/nitrógeno en el medio de cultivo aumenta la acumulación del bioplástico (Sindhu et. al, 2013). Esto se cumple, siempre y cuando la proporción no genere inhibición del crecimiento cuando hay alta concentración de azúcares en el medio, así como altos niveles de nitrógeno en el mismo reducirán la productividad de PHB.

Es necesario evaluar diferentes concentraciones de nitrógeno (extracto de levadura) así como diferentes proporciones de carbono/nitrógeno en el medio de cultivo como parte del proceso del crecimiento microbiano de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 y como estos, sobre todo, afectaran en la productividad y el contenido del PHB. De esta forma podremos entender como estas relaciones intervienen en el proceso y así poder escalar el proceso utilizando desechos de las diversas industrias para promover la economía circular que reduzca el consumo de plásticos derivados del petróleo.

## **1.1. PROBLEMA**

¿Cuál será el efecto de la concentración de Extracto de levadura (0,17 g/L, 1 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 5.83 g/L) y de la relación carbono-nitrógeno (12.93, 15, 20, 25 y 27.07) en la producción de PHB en un cultivo por lote por *Bacillus subtilis* NRRL B-1650?

## **1.2. HIPÓTESIS**

La concentración de 3g/L de extracto de levadura y una relación carbono – nitrógeno de 20 producirá mas de polihidroxitirato por *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 en relación a la concentración de extracto de levadura (0,17 g/L, 1 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 5.83 g/L) y de la relación carbono-nitrógeno (12.93, 15, 20, 25 y 27.07).

## **1.3. OBJETIVOS**

### **1.3.1. Objetivo principal**

Evaluar el efecto de la concentración de Extracto de levadura (0.17 g/L, 1 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 5.83 g/L) y de la relación carbono-nitrógeno (12.93, 15, 20, 25 y 27.07) en la producción de polihidroxitirato en un cultivo por lote por *Bacillus subtilis* NRRL B-1650.

### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la cinética de formación de biomasa y producción de PHB para *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 en un cultivo por lote.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Extracto de levadura y diferentes proporciones de la relación carbono-nitrógeno en el rendimiento de la concentración de PHB de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 mediante un diseño experimental compuesto central rotatorio.
- Establecer una concentración de Extracto de levadura y una proporción carbono-nitrógeno que optimicen la producción de PHB por *Bacillus subtilis* NRRL B-1650.

## **1.4. JUSTIFICACIÓN**

El panorama mundial nos ha mostrado diferentes problemáticas que como sociedad debemos enfrentar en el siglo XXI, siendo una de estas la sustitución gradual de los plásticos derivados del petróleo, para lo cual se deben brindar alternativas sustentables y económicas como lo son la producción de bioplásticos, buscando reducir la profunda

crisis ambiental que enfrentamos. En ese sentido los esfuerzos deben estar dirigidos a la optimización de procesos de obtención de estos, así como la reducción de costos derivados del proceso. Es así que nuestra investigación va en la primera ruta, la cual busca estudiar cómo es que la concentración de extracto de levadura, el cual es una fuente de nitrógeno barato, y la relación carbono/nitrógeno influyen en la obtención de mayores rendimientos de producción de PHB. Esto impulsará nuevas investigaciones relacionadas al uso de desechos industriales, lo cual promoverá el consumo de bioplásticos en nuestro país.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Plásticos

Hay innumerables productos a nuestro alrededor que están hechos total o parcialmente de plástico. En términos generales, el plástico es un material aislante térmico y eléctrico, flexible, resistente a la corrosión y liviano. Es ampliamente utilizado en la industria porque es fácil de fabricar y moldear, es económico, liviano y puede usarse en muchos colores de pigmentos. Además, se puede combinar con otros materiales para mejorar su rendimiento.

Los materiales que consisten en varios compuestos orgánicos, sintéticos o semisintéticos se denominan plásticos. Suelen ser polímeros de moléculas orgánicas de alto peso molecular. También son materiales compuestos por resinas, proteínas y otras sustancias que se moldean fácilmente y cuya forma puede endurecerse permanentemente con cierta compresión y temperatura. (Gómez, 2016).

#### 2.1.1. Clasificación

##### 2.1.1.1. Termoestables

Son polímeros cuya característica principal es su forma original una vez ha cesado la fuerza a la que han sido sometidos. Además, por la composición de su estructura interna, formada por cadenas lineales, se pueden desensamblar fácilmente con la acción del calor y se reconstruyen al enfriarse, por lo que pueden fundirse muchas veces y volver a fabricar objetos con él, muchas veces. A pesar de eso, después del momento inicial de fundición no pueden fundirse otra vez y adicionalmente a esto son insolubles. Los más conocidos, como lo menciona Arcos (2007) son el poliuretano, resinas fenólicas y melamina.

##### - **Poliuretano:**

Según Arcos (2007), los poliuretanos se definen como plásticos multifuncionales, avanzados y seguros con una amplia gama de aplicaciones en varios productos básicos industriales y de consumo que hacen nuestra vida más funcional, cómoda y respetuosa con el medio ambiente. El poliuretano es un material plástico que viene en muchas formas. Puede hacerse rígido o flexible y es el material de elección para una amplia gama de aplicaciones comerciales.

### - **Resinas fenólicas**

Su estructura interna lo hacen resistente a la adición de calor y agua, que se produce por la condensación del fenol y del formaldehído. Es por estas características que tiene una gran resistencia al envejecimiento. Actualmente se lo emplea en la fabricación de productos moldurados, adhesivos y revestimientos superficiales.

### - **Melamina**

Su producción industrial se da por la policondensación de los reactantes fenilamina y formaldehído.

### - **Elastómeros**

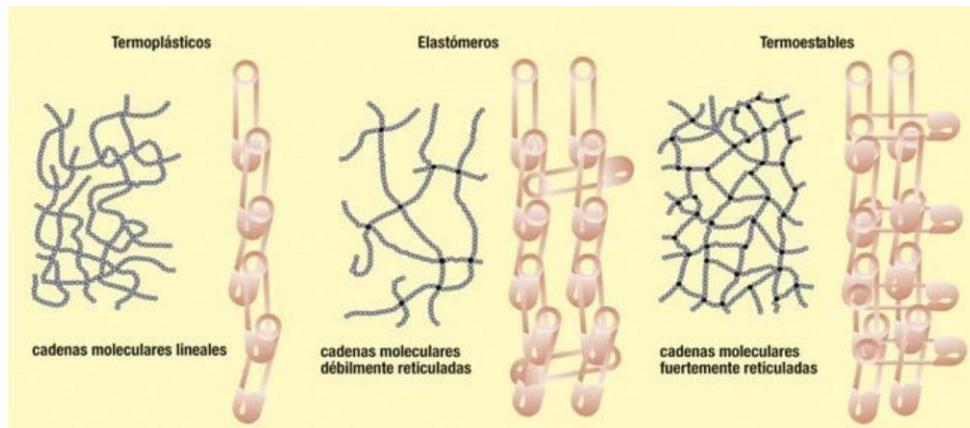
Se denomina elastómeros al plástico como tipo de material termoestable, por lo que solo se pueden fundir una vez, pero son muy flexibles debido a su estructura interna ramificada.

### - **Termoplásticos**

Como se recopila en la bibliografía revisada, se trata de un plástico que a temperaturas que se pueden considerar altas se vuelve deformado o flexible, se derrite cuando se calienta, toma la forma de un recipiente cuando se enfría y se solidifica por completo cuando se enfría lo suficiente. Son polímeros de alto peso molecular que forman cadenas utilizando fuerzas de van der Waals débiles, interacciones dipolo-dipolo fuertes y enlaces de hidrógeno.

El termoplástico se puede comparar con un conjunto de cuerdas enredadas sobre una mesa, cuanto más enredadas estén las cuerdas, más esfuerzo se necesita para separar las cuerdas entre sí, teniendo en cuenta la fricción. La fuerza de fricción que se produce entre cada hebra proporciona la resistencia que las separa, en este caso las hebras representan el polímero y la fricción son las fuerzas intermoleculares que las mantienen unidas.

Se pueden clasificar en siete en siete tipos diferentes.



**Figura 1.** Clasificación de los plásticos. Recuperado de Seymor (1996)

## 2.2. Bioplásticos

En primer lugar, debemos definir que son los bioplásticos. Según la European Bioplastic Association (Prime Biopolymers., 2021) “Los bioplásticos no son solo un solo material. Forman parte de una familia completa de materiales con diferentes propiedades y aplicaciones”.

Con esto podemos afirmar que el termino comprende muchas variedades y tipos diferentes de materiales que pueden ser llamados bioplásticos. Pero como diferenciamos que es y que no es un bioplástico. Para esto tenemos que recurrir a la definición de la European Bioplastic Association (2022) que nos dice que “Un material plástico se define como un bioplástico si tiene una base biológica, es biodegradable o presenta ambas propiedades.”

### 2.2.1. Clasificación

La clasificación de los bioplásticos es un inicio fue tediosa y complicada debido a que existen muchos tipos y maneras de producirlos. Además, que tienen diferentes fuentes y que sus características difieren mucho de unas a otras.

Entonces basándonos en la definición de la European Bioplastic Association podemos afirmar que los tipos de bioplásticos se pueden dividir en bioplásticos con base biológica, bioplásticos biodegradables y bioplásticos con base biológica y biodegradables.

Adicionalmente a esta clasificación también hay una clasificación de acuerdo al origen del bioplástico, propuesta por Averous (2012), dividiéndose en cuatro grupos

diferenciables. Estos son a partir de polisacáridos, proteínas y ligninas, de microorganismos, de biotecnología y de productos petroquímicos.

### **2.2.1.1. Clasificación de la European Bioplastic Association**

**Biobased:** Según European Bioplastic Association (2022) el término "biobased" significa que el material o producto se deriva (en parte) de la biomasa (plantas). La biomasa utilizada para bioplásticos proviene de, f. maíz, caña de azúcar o celulosa.

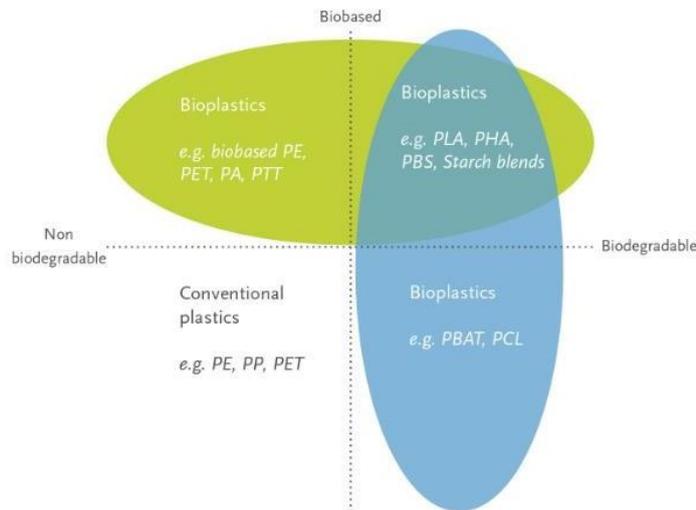
Basándonos en esta definición todo aquel plástico que utilice como fuente de carbono para su estructura a cualquier derivado vegetal como el bagazo de caña de azúcar (del cual se puede obtener celulosa) o restos de cascara de papas (del cual se puede extraer el almidón) será considerado como bioplástico.

**Biodegradable:** Como menciona la European Bioplastic Association (2022) “La biodegradación es un proceso químico durante el cual los microorganismos disponibles en el medio ambiente convierten los materiales en sustancias naturales como agua, dióxido de carbono y compost (no se necesitan aditivos artificiales). El proceso de biodegradación depende de las condiciones ambientales circundantes (por ejemplo, ubicación o temperatura), del material y de la aplicación.”

Como sabemos todo material que mediante un proceso de reacciones químicas diferentes donde cambia de una composición compleja hasta llegar a un estado más simple, conformándose en su mayoría en sustancias naturales por la intervención de microorganismos ha pasado por un proceso de biodegradación.

**Biobased y biodegradable:** Ahora debemos aclarar que no todos los bioplásticos que provengan de origen natural son biodegradables. Es decir que el proceso de biodegradación no está regido por la fuente o la base del material usado para su producción, sino más bien esto está vinculado estrechamente con su estructura química. Como menciona la European Bioplastic Association (2022), los plásticos 100% de base biológica pueden no ser biodegradables, y los plásticos 100% de base fósil pueden biodegradarse.

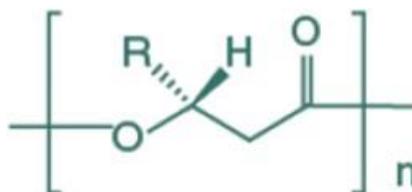
Teniendo esto en cuenta podemos afirmar también que existen bioplásticos como el PHB, PLA, PBS entre otros, que cumplen con ambas características, ya que se forman a partir de recursos naturales y son biodegradables.



**Figura 2.** Clasificación de los bioplásticos. Recuperado de European Bioplastic Association (2022)

### 2.3. Polihidroxialcanoatos (PHA)

Son bioplásticos termoestables de poliéster lineal producidos en la naturaleza por bacterias al fermentar azúcar o lípidos. Las bacterias los producen como mecanismos de almacenamiento de carbono y energía en forma de gránulos intracitoplasmáticos. Dependiendo de la especie de bacteria, el sustrato utilizado y la etapa de crecimiento microbiano, pueden representar del 45% al 85% del peso de las células secas (Lemos y Mina, 2015).

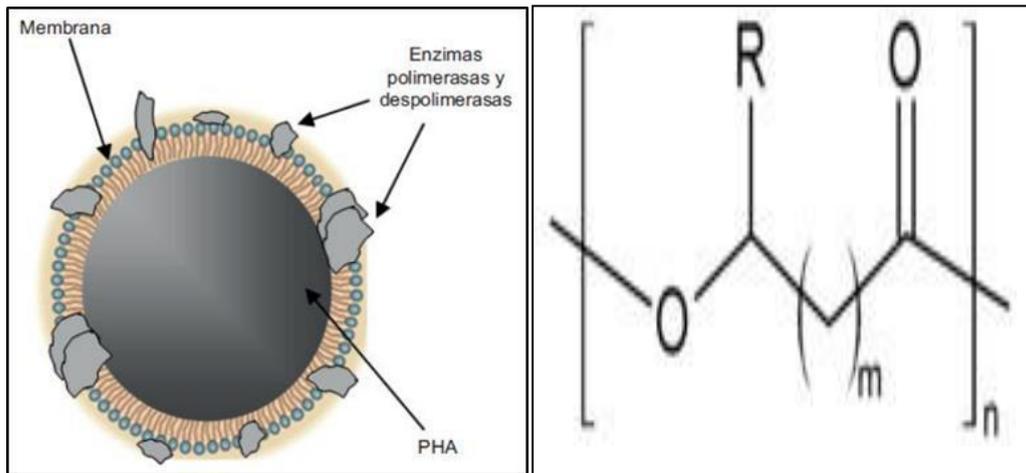


**Figura 3.** Estructura química del PHA. Recuperado de Andler y Diaz (2013)

#### 2.3.1. Estructura de los PHA

Los bioplásticos polihidroxialcanoatos se producen por acumulación en numerosos microorganismos en forma de reserva de carbono, energía y poder reductor de madera intracelular (Khanna y Srivastava, 2005), siendo polímeros ácidos (R)-hidroxialcanoicos ((R)-HA).

Estos polímeros presentan un comportamiento de gránulos insolubles en agua, que forman en el citoplasma microbiano debido a la acción de enzimas intracelulares teniendo diferentes tamaños y una forma esférica. Estos gránulos de PHA tienen un comportamiento hidrofóbico debido a la presencia de una monocapa de fosfolípidos en la que se encuentran enzimas polimerasas y despolimerasas, que facilita su acumulación (Wang y Lee, 1997).



**Figura 4.** A) Esquema del granulo de PHA. B) Estructura química del PHA.  
*Recuperado de Andler y Diaz (2013)*

En la actualidad, diversas investigaciones a probado la existencia de un promedio de 150 monómeros distintos de polihidroxialcanoatos, teniendo diferentes tipos de configuración estructural como: lineal, ramificada, saturada, insaturada y aromática (Zinn et. al, 2001).

Para su nomenclatura al inicio se coloca el nombre y luego la abreviatura del monómero, luego el número de carbonos de su estructura, para después colocar los valores de “m” y del radical libre (R) del monómero repetitivo general (Catalina, 2018).

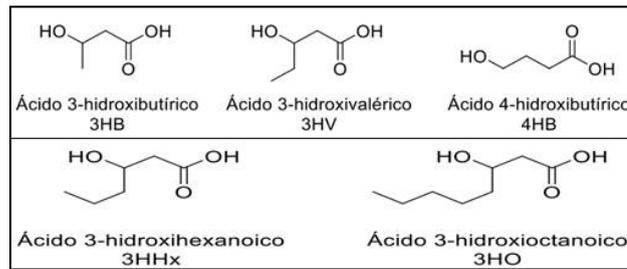
**Cuadro 1.** Algunos monómeros constituyentes de PHA.

| <b>Nombre del monómero</b> | <b>Abreviatura</b> | <b>Tamaño de la cadena (Nº de carbonos)</b> | <b>m</b> | <b>R</b>  |
|----------------------------|--------------------|---|----------|-----------|
| Acido 3-hidroxiopropiónico | 3HP                | 3   | 1        | Hidrógeno |
| Acido 3-hidroxiбутírico    | 3HB                | 4   | 1        | Metilo    |
| Acido 3-hidroxi-valérico   | 3HV                | 5   | 1        | Etilo     |
| Acido 3-hidroxi-hexanoico  | 3HHx               | 6   | 1        | Propilo   |
| Acido 3-hidroxi-octanoico  | 3HO                | 8   | 1        | Pentilo   |
| Acido 4-hidroxibutírico    | 4HB                | 4   | 2        | Hidrógeno |
| Acido 4-hidroxivalérico    | 4HV                | 5   | 2        | Metilo    |

*Fuente: Wang y Lee, 1996*

### **2.3.2. Clasificación**

Los polihidroxi-alcanoatos se han dividido tradicionalmente en PHA de cadena corta y PHA de cadena media según el número de átomos de carbono que componen la unidad repetitiva. El PHA de cadena corta o PHA-scl ("short-chain length PHA ") es un polímero compuesto por unidades monoméricas con 3 a 5 átomos de carbono, mientras que el PHA de cadena media o PHA-mcl ("medium-chain length PHA ") se deriva de 6 unidades monoméricas de hasta 14 átomos de carbono. También existen PHA mixtos o mixtos que contienen unidades monoméricas de cadena corta y media (Anderson y Dawes, 1990).



**Figura 5.** Estructuras químicas de diferentes monómeros constituyentes de PHAs de cadena corta. *Elaboración propia*

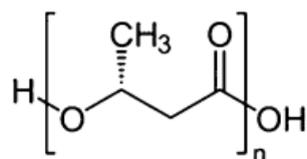
#### 2.4. Polihidroxibutirato (PHB)

Como menciona Prasad et. al (2019) el primer tipo de PHA descubierto en una especie de *Bacillus megaterium*. Posteriormente se descubrió que este biopolímero insoluble es almacenado tanto por bacterias grampositivas y gramnegativas.

Posteriormente el PHB fue observado por Lemoigne por primera vez en el año de 1923 quien posteriormente realizó su caracterización química y encontró su relación en la producción de esporas de algunos bacilos (Ortega, 2014).

Esto produjo muchos avances en la investigación de bioplásticos obtenibles a partir de fermentación bacteriana. Con esto entendido podemos mencionar que Poli(3-hidroxibutirato) (PHB) es un homopolímero de 3-hidroxibutirato y a su vez el biopolímero más significativo de la familia de los polihidroxicanoatos termoplásticos biodegradables.

Por otro lado, como lo menciona Prasad (2019) estos tienen características como alta temperatura de fusión, alto grado de cristalinidad y baja permeabilidad al O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>. La estructura del PHB se muestra en la Fig. 6. Y tiene un promedio de peso molecular que varía de 2 a 4 x 10<sup>2</sup> kDa.



**Figura 6.** Estructura del polihidroxibutirato. *Elaboración propia*

También podemos mencionar que este es el producto de la polimerización o condensación de unidades monoméricas que se diferencian estructuralmente en el número de átomos de carbono de la cadena principal y en la naturaleza de radicales sustituidos en la misma (Boyandin, 2012).

Bajo condiciones limitadas de nitrógeno y oxígeno, el PHB puede constituir alrededor del 90% de la biomasa bacteriana en algunas especies (Bugnicourt, 2014), por lo cual el estudio de cantidades óptimas del sustrato limitante nitrógeno puede aumentar la producción del biopolímero.

#### 2.4.1. Propiedades del Polihidroxibutirato (PHB)

Las principales características de los PHB se muestran en el siguiente cuadro. En esta podemos observar que es sobresaliente la temperatura de fusión que es de 177°C que es más que suficiente para el uso común de la sociedad para el transporte de sustancias. Además, podemos mencionar que tiene una alta resistencia a los rayos UV.

**Cuadro 2.** Principales características de los propilenos (PP) y el polihidroxibutirato (PHB).

| <b>Parámetros</b>                     | <b>PP</b> | <b>PHB</b> |
|---------------------------------------|-----------|------------|
| Porcentaje de cristalinidad (%)       | 50 - 70   | 60         |
| Temperatura de fusión (°C)            | 176       | 177        |
| Temperatura de transición vítrea (°C) | -10       | 2          |
| Fuerza de tensión (MPa)               | 38        | 40         |
| Alargamiento a la rotura (%)          | 400       | 6          |
| Densidad (g/cm <sup>3</sup> )         | 0.905     | 1.25       |
| Módulo de tracción MPa                | 1900      | 3500       |
| Resistencia UV                        | Pobre     | Buena      |

*Fuente. Prasad (2019).*

Por otro lado, citando a Ortega (2014) al polihidroxibutirato se le han atribuido las siguientes funciones biológicas: Es un material de almacenamiento de carbono que brinda protección los sistemas de producción de energía en ausencia de una fuente de carbono exógena.

Además, desde el punto de vista del organismo el PHB provee fuente de energía y carbono rápidamente oxidable y regulador de los equivalentes de reducción intracelulares que se pueden usar dentro de sus funciones metabólicas y adicionalmente podemos mencionar

que está involucrado en procesos de diferenciación celular, sirve como fuente de carbono y energía para la formación de esporas (Goda, 2001).

#### **2.4.2. Ruta metabólica de la producción de PHB**

El PHB se produce en una amplia variedad de microorganismos entre los que podemos mencionar a *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Methylobacterium rhodesianum*, *Alcaligenes eutrophus*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas putida*, *Sphaerotilus natans*, entre muchos más que sabemos que producen altas cantidades de este metabolito.

Por otro lado, se deben cumplir ciertas condiciones para que la producción de bioplásticos sea posible, pues esta está condicionada a un medio de fermentación con limitaciones en nitrógeno y fosforo, y un exceso significativo de la fuente de carbono (Wang, 2019). Adicionalmente, esta fuente de carbono puede ser compleja o simple, siempre y cuando el microorganismo cuente con las enzimas para llevar esa fuente de carbono a glucosa.

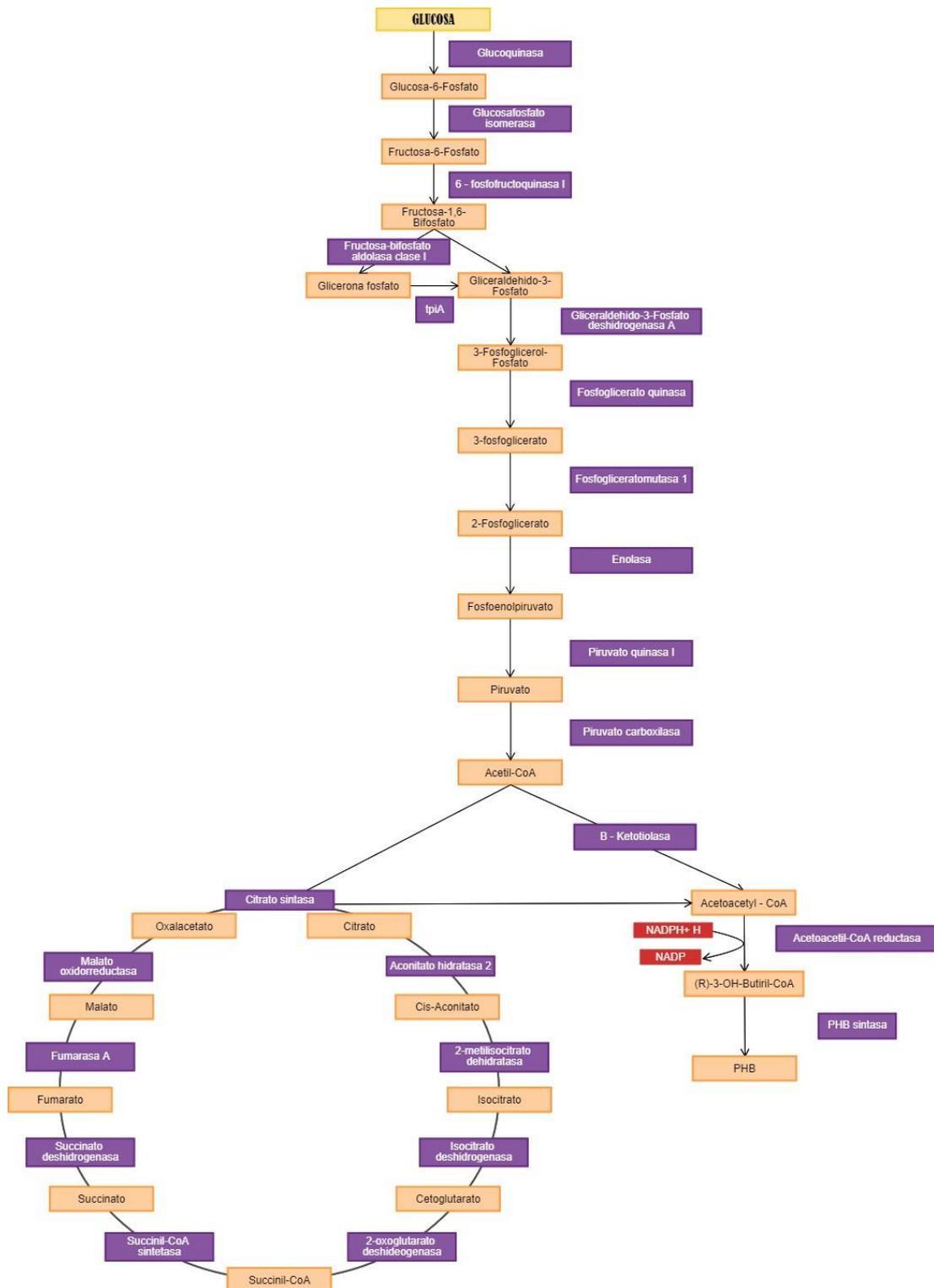
La fuente de carbono de mayor biodisponibilidad para los microorganismo suele ser la glucosa, esta pasa por el proceso de glucolisis para luego dar paso a acetil – CoA. Luego de esto, como postula Wang et. al (2019) dos acetil–CoA son acoplados para formar acetoacetil-CoA por una reacción de condensación, uniéndose con iones de hidrogeno de la reacción de oxalacetato a citrato (reacción que se da en el ciclo de Krebs).

Con lo mencionado anteriormente podemos afirmar que este metabolito es producido como una inclusión citoplasmática que sirve como fuente de carbono y sumidero de electrones en el caso de deficiencia alimentaria. Como postula Sharma (2019) el PHB es sintetizado a partir de acetil-CoA producido por las bacterias mediante una acción secuencial de tres enzimas.

Entonces la primera enzima 3-cetotiolasa (codificada por el gen *phbA*) cataliza la formación de un enlace carbono – carbono por la condensación de dos acetil-CoA NADPH catalizada dependiente de I-CoA reductasa (codificada por el gen *phbB*) que cataliza la reducción estereoselectiva de I-CoA catalizada formada en la primera reacción a R-3-hidroxi butiril-CoA. La tercera reacción de esta ruta es catalizada por la enzima PHB sintasa (codificada por el gen *phbC*) que cataliza la polimerización de R-3-hidroxi butiril-CoA para formar PHB.

Para la formación del acetil-CoA se pueden utilizar diferentes fuentes de carbono como los diferentes azucares reductores o mezclas complejas que mediante hidrolisis se

transformen en azúcares simples como la glucosa o maltosa. Como menciona Prasad (2019) las bacterias quimiolitotróficas como *Ralstonia eutropha*, *Cupriavidus metallidurans*, y *Alcaligenes latus* son capaces de producir PHB de simples fuentes de carbono.



**Figura 7.** Ruta metabólica del PHB a partir de acetil-CoA. *Elaboración propia.*

Entre las bacterias grampositivas *Bacillus spp.*, *B. subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, y *B. cereus* y, entre las bacterias gramnegativas, *Pseudomonas spp.* tienen un alto rendimiento en la producción de este biopolímero.

**Cuadro 3.** Principales microorganismos productores de PHAs

---

**Microorganismos productores de PHAs**

---

*Delftia spp.*

*Chromobacterium spp.*

*Pseudomonas spp.*

*Azotobacter spp.*

*Halomonas boliviensis*

*Bacillus spp.*

*Alcaligenes spp.*

*Rhodopseudomonas palustris*

*Escherichia coli*

*Aeromonas hydrophila*

*Staphylococcus spp.*

*Burkholderia sacchari*

*Cupriavidus necátor*

---

Fuente. Elaboración propia

La composición de PHB implica la incorporación de plastificantes y un agente nucleante para modificar las propiedades térmicas y mecánicas controlando el proceso de cristalización.

### **2.4.3. Extracción con solventes orgánicos**

Para la extracción de los PHAs en general debemos tener en cuenta que los gránulos tienen un alto contenido lipídico. Con esto se puede afirmar que es necesario el uso de solventes orgánicos para aislar y purificar el biopolímero. Para esto a lo largo de los años se han utilizados una variedad de solventes y mezclas de los mismos empezando por cloroformo, cloruro de metileno y su posterior precipitación con metanol o etanol frío, seguido de un lavado sucesivo con otros solventes.

Por otro lado, como menciona Ortega (2014) por la alta viscosidad del bioplástico se necesitan grandes cantidades de solventes para la extracción lo que eleva considerablemente los costos de producción a gran escala del polímero.

#### **2.4.4. Producción del biopolímero**

En esta etapa del proceso, se produce el crecimiento de la biomasa y se sintetizan y acumulan los polímeros. Los dos están estrechamente relacionados. Como se mencionó anteriormente, existen muchas bacterias capaces de sintetizar y acumular estos biopolímeros, por lo que muchos estudios se han centrado en sus procesos y sistemas de cultivo, así como en los efectos de diversos factores como la temperatura óptima, el pH, los sustratos y los medios de crecimiento.

Las estrategias de alimentación son importantes para lograr una alta densidad celular y altos rendimientos de PHA. La elección de una fuente de carbono apropiada es un factor importante para determinar el rendimiento general del proceso de fermentación y tiene un impacto significativo en el costo del producto final. Es un proceso de uso de fuentes de carbono químicamente puras a escala de laboratorio y un proceso de uso de fuentes de carbono complejas a escala industrial. Por lo tanto, se recomienda elegir sustratos económicos, fáciles de conseguir y reproducibles a escala industrial, que a su vez puedan soportar eficazmente el crecimiento microbiano.

Hay mucha investigación sobre posibles sustratos que se pueden usar para la producción de PHA. Se han utilizado diversos sustratos, como subproductos industriales, desechos agrícolas y domésticos, materias primas lignocelulósicas, grasas y aceites, glicerol, azúcares y aguas residuales (Anjum et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente, en general, la síntesis de PHA requiere que las bacterias limiten los nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno, así como el exceso de fuentes de carbono. El agotamiento de nutrientes provoca un cambio metabólico a la biosíntesis de PHA. Algunos ejemplos son las bacterias *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas extorquens* y *Pseudomonas oleovorans*. (Khanna y Srivastava, 2005). Sin embargo, también hay bacterias que no necesariamente requieren limitación de nutrientes para la síntesis de PHA y pueden acumular polímeros durante el crecimiento celular. Este grupo incluye *Alcaligenes latus* y *Azotobacter vinelandii* recombinante (Braunegg y col., 1998).

Por otro lado, se ha demostrado que se puede lograr una alta producción de PHA mediante cultivo o alimentación continuos. También se puede mencionar que el método más común para cultivar bacterias que deben estar limitadas por ciertos nutrientes esenciales es un cultivo discontinuo alimentado en dos etapas, donde el nutriente limitante suele ser el nitrógeno. El primer paso se lleva a cabo en un medio rico en nutrientes para promover el crecimiento celular, mientras que el segundo paso restringe total o parcialmente la concentración de nutrientes esenciales para promover la síntesis de PHA. En la segunda fase, el aumento de la biomasa se debe a la acumulación intracelular de polímeros (Khanna y Srivastava, 2005).

#### **2.4.5. Utilización y producción de PHAs**

La producción de PHB y sus copolímeros se lleva a cabo mediante biofermentación o polimerización con apertura de anillo. Como menciona Kok y Hasirc (2004) para la producción de los diferentes copolímeros, se pueden agregar diferentes sustratos de carbono junto con la principal fuente de carbono en la biofermentación, como ácido bromoalcanoico, valerolactona y 4-hidroxibutirato.

También se están utilizando técnicas de ingeniería genética para lograr mejores rendimientos de polímeros, una recuperación más fácil y la producción de nuevos copolímeros. El uso de *Escherichia coli* recombinante y plantas transgénicas, fue reportado por Li et. al (2007) así como otros sistemas potenciales de producción de PHA.

Una familia de copolímeros PHBV fue comercializada por primera vez por Imperial Chemical Industries (ICI, Reino Unido) con el nombre comercial de Biopol a finales de la década de 1980. A principios de la década de 1990, Zeneca Ltd. (Reino Unido) y en 1996, Monsanto Company (St. Louis, MO) adquirió Biopol. Monsanto detuvo su programa de investigación y su actividad comercial del biopolímero a finales de 1998. En 2001, producción finalmente se transfirió a Metabolix, Inc. (ubicado en Cambridge, Massachusetts) que actualmente está desarrollando técnicas transgénicas para hacer que la producción de PHA sea más favorable a escala comercial. Ahora están trabajando para optimizar la expresión de genes PHA en plantas y dirigir la síntesis de polímeros a tejidos fácilmente procesables como las semillas o los tubérculos (Prime Biopolymers, 2021).

Por sus condiciones de inocuidad y compatibilidad con organismos vivos, se están estudiando su implementación para la producción de materiales biomédicos como prótesis o huesos. También ante las prohibiciones actuales en muchos países del mundo

acerca del uso de plásticos derivados del petróleo se presenta una gran oportunidad para uso masivo como método de embalaje en bolsas u otros utensilios de transporte de sustancias.

**Cuadro 4.** Empresas productoras de PHB

| <b>Empresa</b>                            | <b>Producto/descripción</b>   |
|---|---|
| Imperio Químico Industrial ICI (inglesa)  | “Biopol”: Es un copolímero de los monómeros hidroxibutirato e hidroxivalerato. Se desarrolló en la década del 70, mediante fermentación de la bacteria <i>Ralstonia eutropha</i> .  |
| Wella, empresa alemana                    | Emplea “Biopol” para el envase de sus champúes  |
| PHB industrial S.A                        | Con el “Biocycle” se han reducido los costos de producción hasta 5 USD/Kg, partiendo de azúcar de remolacha y maíz como sustratos. Se emplea en la producción de materiales plásticos de rápida utilización (desechables) y en la fabricación de equipamiento médico de uso veterinario y humano. |
| Metabolix (Cambridge, Mass)               | Obtuvo licencias de patentes sobre inserción de genes para la producción de las enzimas claves en el mecanismo de producción de PHB en bacterias y cereales transgénicos como estrategia para disminuir costos.   |
| Biotec (Melitta) Emmerich (Alemania)      | Producción comercial de mezclas de almidón biodegradable policaprolactona para envases, embalajes y manipulación de residuos  |
| BASF Ludwigshafen (Alemania)              | Desarrollo de copoliésteres sintéticos biodegradables y mezclas con almidón, para obtención de películas flexibles.   |
| Bayer/Wolf Walsrode Leverkusen (Alemania) | Copoliéster-amida biodegradable, sintético y precomercial para obtención de películas flexibles.  |
| Novamont Novara (Italia)                  | Producción comercial de almidón mezclado con policaprolactona y/o polivinil alcohol, "Mater-Bi".  |

*Fuente. Ortega (2014)*

## 2.5. Extracto de Levadura

El extracto de levadura es soluble en agua. Se obtiene a partir de la autólisis de células de levadura de crecimiento primario. El extracto de levadura tiene un amplio uso en la industria alimenticia. En el proceso de la autólisis se preserva sus contenidos de componentes una mezcla de aminoácidos, péptidos, carbohidratos y vitaminas. Los carbohidratos principalmente son glucógenos (glucano y trealosa) y por el hidrólisis se transforma en glucosa (Arevalo, 1998). Su composición rica en aminoácidos, nucleótidos y constituyentes inorgánicos estimulan el crecimiento de lactococos (Arevalo, 1998).

## 2.6. *Bacillus subtilis*

Como se mencionó anteriormente las bacterias presentes en el género *Bacillus* son buenas acumuladores de PHAs, tanto así que el primer PHA en ser descubierto y el cual es uno de las que más investigaciones tiene es el 3-hidroxi butirato o PHB, fue reportado en la bacteria *Bacillus megaterium*, en 1926. Como menciona Mohapatra (2017) se ha podido reportar una acumulación de más del 80% del peso microbiano en PHAs.

Fuera del área de la producción de biopolímeros las bacterias que se encuentran dentro del género *Bacillus* son ampliamente utilizados dentro del área académica para una investigación a nivel de laboratorio y el área industrial por su alta habilidad de adaptación, una gran variabilidad genética, altas velocidades de crecimiento y producción de metabolitos secundarios (como biopolímeros o enzimas) de alto interés comercial (Bunk, 2010).

Ahora cuando hablamos de producción de bioplásticos como el PHB este género presenta ventajas sobre las otras productoras de bioplástico. Podemos mencionar, por ejemplo, que gracias a ser bacterias Gram-positivas, el género *Bacillus* no posee lipopolisacáridos que afecta la biocompatibilidad en los procesos de productos biomédicos. Por otro lado, al ser estas bacterias de las más grandes entre las procariotas facilita el proceso de recuperación de la biomasa bacteriana por medios mecánicos, mayormente, de centrifugación a un nivel industrial que abarata los costos de producción.

Adicionalmente, esta especie se adapta fácilmente a diferentes sustratos, lo que permite explorar cual es el que produce un mayor costo/beneficio en la obtención del bioplástico.

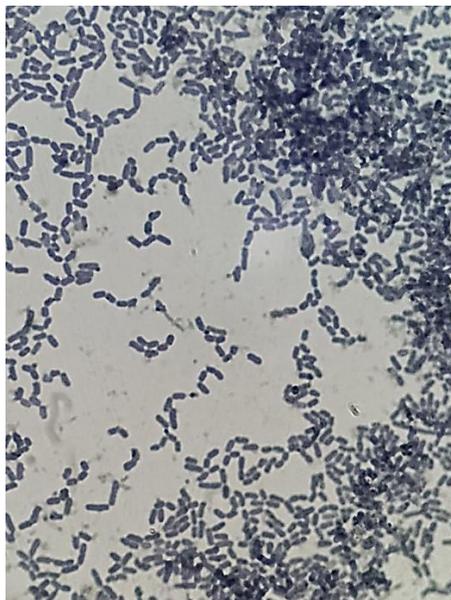
### III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Biotecnología de la Escuela Profesional de Biotecnología, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa en el distrito de Nuevo Chimbote, departamento de Ancash, Perú.

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Microorganismo

El microorganismo se eligió de una colección de cepas publica y fue donada por Unidad de Investigación de Microbiología Aplicada y Prevención de Micotoxinas en el Centro Nacional para la Investigación de Utilización Agrícola en Peoria, Illinois, Estados Unidos, la cual es una bacteria Gram positiva, del género *Bacillus* y la especie *subtilis*. Tiene la denominación de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, y mediante tinción con Sudan Black se determinó la capacidad acumulativa de PHA de la bacteria. Este microorganismo forma esporas, y a través de su ficha de su patente es productora de amilasas, proteasas y lipasas, así como que se adapta para utilizar fuentes de carbono con estructura pentosa y hexosa, entre ellos la glucosa (Spears, 2019). El microorganismo llegó liofilizado, con lo cual se rehidrató con solución salina 5% y se reactivó en medio Triptona-Glucosa-Levadura (TGY).



**Figura 8.** Micrografía de la cepa *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, donada por el Centro Nacional para la Investigación de Utilización Agrícola en Peoria, Illinois, Estados Unidos. (Aumento 1000x con aceite de inmersión en microscopio)

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Reactivación del microorganismo

Para la reactivación del microorganismo primero se hidrato en una solución salina al 5% rompiendo la ampolla donde venia el microorganismo hidrolizado (Fig. 9). Luego se cultivó en un matraz Erlenmeyer de 150 mL con 50 mL de medio TGY modificado y se llevó a agitación por 48 horas. Pasado este tiempo se tomaron muestras y se sembró en placas Petri con agar TGY (medio TGY modificado + 15 g/L de agar), para incubarse por 24 horas. Finalmente se replicó en viales para utilizarse o refrigerarse.



**Figura 9.** Reactivación de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, A) Ampolla con microorganismo deshidratado. B) Hidratación y cultivo de la cepa. C) Medio 48 h después de siembra. D) Placa Petri con microorganismo reactivado.

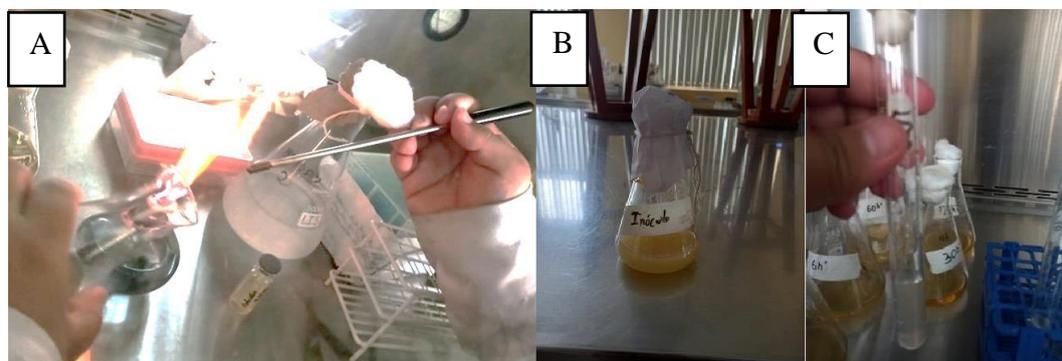
### 3.2.2. Cinética del microorganismo

Para determinar los parámetros cinéticos del microorganismo, la cinética de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 a nivel de matraz y, por lo tanto, se determinó la curva de producción de PHB en el cultivo por lotes, con el fin de observar si la máxima acumulación de bioplásticos ocurrió durante el crecimiento exponencial o la fase estacionaria. Por lo tanto, la fermentación se desarrolló utilizando un medio definido modificado (medio DM, Anexo 2) considerando una formación de biomasa bacteriana teórica máxima de 4,6 g/L. El procedimiento seguido se detalla en los apartados siguientes y los resultados se desarrollan en el capítulo 4.1. en la Sección IV "Resultados y Discusión".

#### 3.2.2.1. Preparación del inóculo para la cinética microbiana

Se preparó el inóculo para la cinética a partir de las muestras conservadas en los viales y guardadas en refrigeración. Esta tenía el mismo medio de cultivo que las del medio

definido modificado. Los parámetros iniciales para el inóculo fueron una incubación de 24 horas en un agitador orbital con control de temperatura, a una agitación de 100 RPM y una temperatura de 30°C, en un matraz Erlenmeyer de capacidad de 125 mL con 50 mL de medio. Al terminar el proceso de incubación, se tomó muestras, se realizaron diluciones y se leyó a una longitud de onda de 640nm para posteriormente ajustar la densidad óptica a 0.54 utilizando agua destilada estéril, correspondiente a la concentración de 0.5 g/L de biomasa (Anexo 1). Finalmente se inóculo a los matraces con 5 mL de las diluciones preparadas, para obtener un volumen final de 50 mL y una concentración inicial de 0.1 g/L de biomasa.



**Figura 10.** Preparación de inóculo de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, A) Preparación del inóculo. B) Inóculo luego de la incubación de 24h. C) Inóculo preparado.

### 3.2.2.2. Cinética del microorganismo en medio definido modificado (DM)

Esta cinética se realizó con el fin de conocer el comportamiento de la cinética de formación de biomasa, el consumo del sustrato y la acumulación de PHB del microorganismo en los parámetros definidos por el medio DM. Esto nos permitirá encontrar una hora óptima de acumulación de PHB.

La cinética se trabajó en 12 matraces de 250 mL de volumen útil con 50 mL de medio DM para cada uno de ellos, teniendo una concentración inicial de 3 g/L de extracto de levadura y 21.21 g/L de glucosa. No se realizó un control de pH, siendo que se ajustó a un pH inicial de 7. La temperatura de fermentación fue de 30 °C con una agitación orbital de 100 RPM durante un tiempo de 72 horas de incubación. La biomasa teórica máxima soportada por este medio DM fue de 4.6 g/L. Las muestras se tomaron cada 6 horas siendo cada punto de la cinética. Luego se realizó un análisis para determinar la concentración de biomasa, glucosa y PHB a partir de las muestras recogidas en cada punto (el detalle de cada uno de los procedimientos se muestra en la sección 3.2.3.3.).



**Figura 11.** Cinética de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, A) Preparación de matraces con medio MD. B) Inoculación de matraces. C) Matraz de cinética después de incubación.

### 3.2.3. Diseño experimental para la optimización de la producción de PHB

Luego de haber realizado la cinética del microorganismo y conocer su comportamiento en el tiempo, se procedió a ejecutar nuestro diseño experimental donde se evaluó como influyen las variables de estudio en la acumulación de PHB. Se trabajó con el medio definido modificado (DM) en cada uno de los ensayos variando la concentración de extracto de levadura y la concentración de glucosa como resultado de la variación de la relación carbono/nitrógeno.

Se empleó un diseño de superficie de respuesta, específicamente el central compuesto rotatable  $2^2$  que contiene unos cinco niveles codificados, que de forma detallada está formada por 4 puntos axiales ( $\alpha = \pm 1.4142$ ), 4 puntos factoriales y 4 puntos centrales teniendo de esta forma las 12 unidades experimentales mostradas en el Cuadro 5. Se trabajó 3 réplicas de cada uno de los experimentos y las respuestas se reportaron como el promedio de estos.

Utilizando el diseño experimental propuesto se determinó el impacto de las variables independientes: concentración de extracto de levadura ( $X_1$ ) y relación carbono/nitrógeno ( $X_2$ ) sobre la variable respuesta que es la concentración de PHB (g/L) las 48 horas de cultivo.

**Cuadro 5.** Diseño experimental factorial central compuesto rotatable 2<sup>2</sup>

| Ensayo | Variables        |           |                |       |
|--------|------------------|-----------|----------------|-------|
|        | Nivel codificado |           | Nivel original |       |
|        | $x_1$            | $x_2$     | $X_1$ (g/L)    | $X_2$ |
| 1      | -1               | -1        | 1              | 15    |
| 2      | -1               | +1        | 1              | 25    |
| 3      | +1               | -1        | 5              | 15    |
| 4      | +1               | +1        | 5              | 25    |
| 5      | $-\alpha$        | 0         | 0.17           | 20    |
| 6      | $+\alpha$        | 0         | 5.83           | 20    |
| 7      | 0                | $-\alpha$ | 3              | 12.93 |
| 8      | 0                | $+\alpha$ | 3              | 27.07 |
| 9      | 0                | 0         | 3              | 20    |
| 10     | 0                | 0         | 3              | 20    |
| 11     | 0                | 0         | 3              | 20    |
| 12     | 0                | 0         | 3              | 20    |

$X_1$ : Concentración de extracto de levadura,  $X_2$ : Relación carbono/nitrógeno, Variable respuesta: Concentración de PHB (g/L)

**Cuadro 6.** Valores de las variables independientes a los diferentes niveles del diseño experimental.

| Variables independientes     | Símbolo | Niveles codificados |    |    |    |           |
|------------------------------|---------|---------------------|----|----|----|-----------|
|                              |         | $-1.4142$           | -1 | 0  | +1 | $+1.4142$ |
| Extracto de levadura (g/L)   | $X_1$   | 0.17                | 1  | 3  | 5  | 5.83      |
| Relación carbono - nitrógeno | $X_2$   | 12.93               | 15 | 20 | 25 | 27.07     |

### 3.2.3.1. Preparación del inóculo para la ejecución del diseño experimental

El inóculo para los ensayos se preparó a partir de las muestras conservadas en los viales y guardadas en refrigeración.

Para estos ensayos se ajustó el medio MD con concentraciones iniciales de 3 g/L de extracto de levadura y 21.21 g/L de glucosa. Luego se autoclave a 120°C por 30 min y se realizó un ajuste a pH 7 utilizando NaOH 1M esterilizado. Con el asa de siembra se tomó

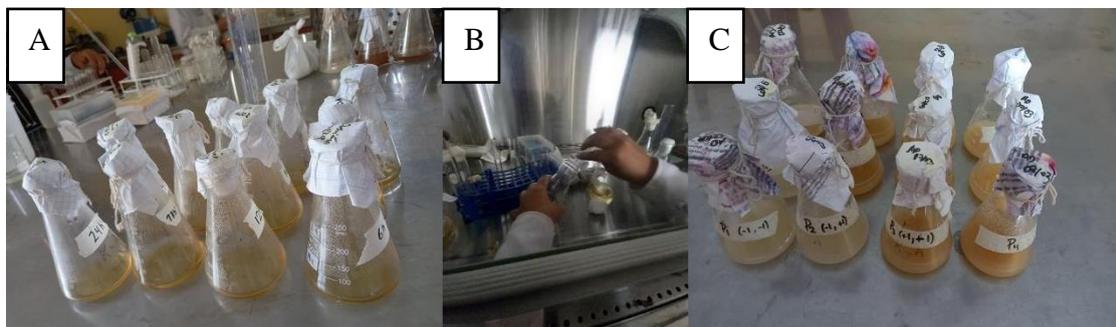
una muestra del vial conservado con el microorganismo y se inoculo el medio de cultivo. Para el inculo las condiciones fueron de 24 horas de incubación a 30°C y 100 RPM de agitación orbital, en un matraz de 125 mL con 50 mL de volumen de medio. Al terminar la incubación, se tomó muestras, se realizaron diluciones y se leyó a una longitud de onda de 640nm para ajustar la densidad óptica a 0.54 utilizando agua destilada estéril, que corresponde una concentración de 0.5 g/L de biomasa. Finalmente se inoculo a los matraces con 5 mL de las diluciones preparadas, para obtener un volumen final de 50 mL y una concentración inicial de 0.1 g/L de biomasa.



**Figura 12.** Inoculo para ensayos de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, A) Sembrado B) Inoculo 24 horas después de la incubación.

### 3.2.3.2. Fermentación

Para la ejecución del diseño experimental propuesto se utilizó matraces de 250 mL con 50 mL de medio. Para esto se utilizó el medio MD variando las concentraciones de extracto de levadura y la relación carbono nitrógeno según corresponda a cada uno de los ensayos. Los medios se llevaron a la autoclave a 120°C por 30 min y se realizó un ajuste a pH 7 utilizando NaOH 1M esterilizado.



**Figura 13.** Ensayos de diseño experimental de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, A) Medios de ensayos autoclavados B) Inoculación. C) Ensayos 48 horas después de la incubación.

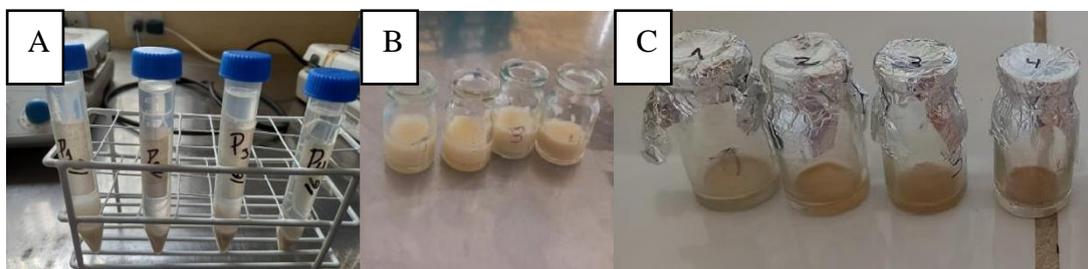
Luego se agregó, a cada matraz, 5 mL del inóculo ajustado a 0.5 g/L completando los 50 mL de medio y dando una biomasa inicial de 0.1 g/L cumpliendo una relación del 10% entre el inóculo y el medio. Por último, se colocó los matraces en la incubadora de agitación orbital a 100 RPM y 30°C por 48 horas.

### 3.2.3.3. Recolección de datos

Al terminar la fermentación (48 horas), se sacaron los matraces de la incubadora de agitación orbital y se realizó un análisis el punto final para determinar la concentración de glucosa, biomasa y PHB, correspondiente a cada matraz.

#### 3.2.3.3.1. Cuantificación de biomasa

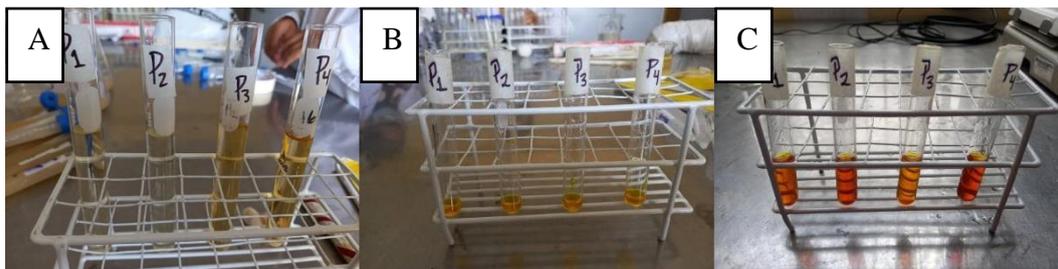
Para cuantificar la biomasa se verterá el matraz correspondiente en tubos Falcon de 15 mL y se separó la biomasa mediante centrifugación del caldo utilizando condiciones de 4500 RPM. Luego se separó y conservo el sobrenadante para realizar la cuantificación de azúcares reductores. La biomasa se lavó con agua destilada, se agitó en el vortex y se llevó a la centrifuga a 4500 RPM. Esto se realizó 3 veces en total, y se vertió la biomasa en viales de 10 mL (previamente pesados) y se secó en la estufa a 105°C por 24 horas. La cuantificación de biomasa se realizó por la metodología del peso seco (Anexo 1)



**Figura 14.** Cuantificación de biomasa de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, A) Lavado de biomasa B) Recuperación de biomasa. C) Biomasa seca.

#### 3.2.3.3.2. Cuantificación de azúcares reductores

Con el sobrenadante recuperado en la centrifugación, se diluyó a razón de 1:10 con agua destilada para luego aplicar el método DNS descrito por (Garrida, 2019).



**Figura 15.** Cuantificación de azúcares reductores de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, A) Sobrenadante recuperado B y C) Aplicación de método DNS.

#### 3.2.3.3.3. Cuantificación del PHB

Para la cuantificación del bioplástico se utilizó la biomasa seca (previamente pesada) y se aplicó el método hipoclorito-cloroformo (Anexo 1.3) para extraer el bioplástico y hacer una cuantificación gravimétrica.

#### 3.2.3.3.4. Análisis de Datos

A partir de los datos recolectados se realizó un análisis utilizando los programas Microsoft Excel 2016 y “Statistica”. A partir de esto se determinó a través de la prueba de t de Student el valor de las significancias estadísticas de los coeficientes de regresión, además se determinó la ecuación que describe el proceso siendo esta un modelo de segundo orden, así como su significancia. Adicionalmente, realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y un coeficiente de determinación múltiple  $R^2$  aceptable.

Finalmente, se determinó el valor óptimo para cada una de las variables del experimento se obtendrán mediante el uso del programa “Statistica”.

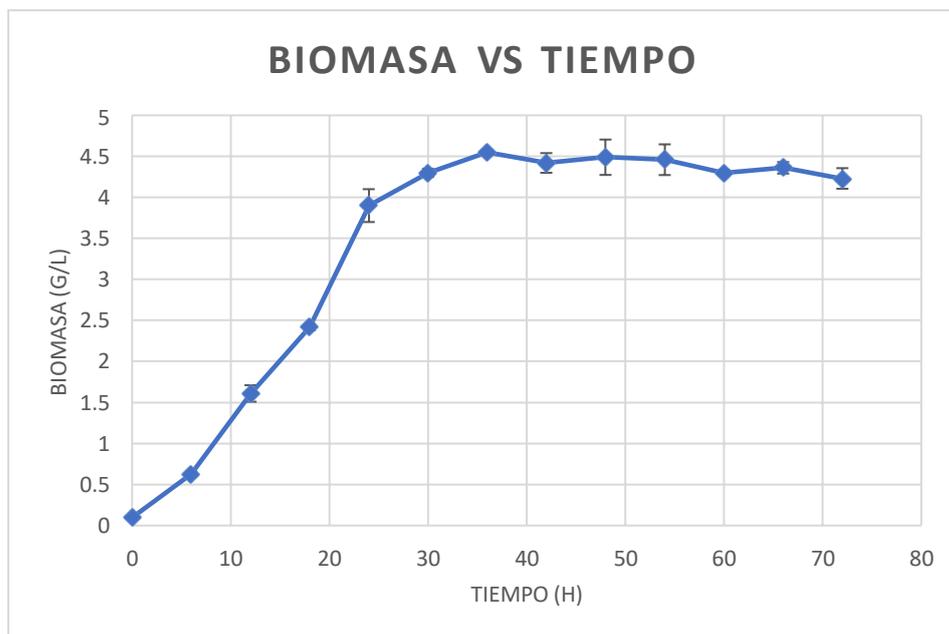
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Cinética del microorganismo

Se evaluó el crecimiento del microorganismo, el consumo del sustrato, así como la producción de PHB.

#### 4.1.1. Cinética de formación de biomasa

Para describir la formación de biomasa se realizó una cinética de 72 horas. En esta se observa que el sistema empieza con una biomasa inicial de 0.1 g/L. Teniendo en cuenta que se utilizó glucosa como principal fuente de carbono, el microorganismo logra alcanzar la máxima concentración de biomasa a las 36 horas, con una concentración de 4.55 g/L. A partir de esta hora el sistema ingresa en la fase estacionaria, donde el microorganismo estabiliza el crecimiento por la falta de nutrientes que le permitan seguir multiplicándose, claramente observable de la hora 36 a la hora 72. Todos estos datos fueron obtenidos calibrando las absorbancias con la curva de calibrado previamente hecha.



**Figura 16.** Cinética de formación de biomasa de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, ajustado a un pH inicial de 7, temperatura de 30°C y agitación de 100 RPM por 72 horas.

El crecimiento microbiano llega a un equilibrio a partir de la hora 30 a 48 por la acción inhibitoria de los nutrientes en el medio (Muralidharan y Radha, 2015), esto se debe a que el microorganismo cada vez necesita más nutrientes para multiplicarse, pero al ser más y tener una cantidad inicial de fuentes de carbono y nitrógeno dejan aumentar, y utilizan

estos nutrientes para su mantenimiento. Esta concentración constante de biomasa se observa desde la hora 36 y es una característica típica de la fase estacionaria en *Bacillus* (Castro-Sowinski, 2010).

A partir de los datos obtenidos experimentalmente, se realizó un ajuste al modelo matemático siendo este la ecuación logística (Verhulst, 1845).

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad (1)$$

Donde  $\mu$  se refiere a la velocidad de formación de biomasa. Esta ecuación, después aplicar derivación se puede expresar en función a la concentración de biomasa (Shuler, 2002).

$$X = \frac{X_o e^{\mu_{\max} t}}{1 - \frac{X_o}{X_{\max}} (1 - e^{\mu_{\max} t})} \quad (2)$$

Donde  $X_o$  refiere a la concentración inicial de biomasa en el medio de cultivo,  $X_{\max}$  a la biomasa teórica máxima del microorganismo,  $\mu_{\max}$  a la velocidad de formación de biomasa máxima e  $t$  al tiempo de incubación.

La ecuación logística (a veces llamada modelo de Verhulst o curva de crecimiento logístico) es un modelo de crecimiento de la población publicado por primera vez por Pierre Verhulst (1845, 1847). Considerando que la población microbiana tiene un comportamiento poblacional podemos considerar este modelo hasta la fase estacionaria, pues el modelo solo llega hasta el equilibrio de la población y no su decaimiento, lo que en un cultivo Bach si sucede. Por otro lado, la ecuación logística semiempírica puede utilizarse en lugar de la cinética de Monod a bajas concentraciones de sustrato para describir crecimiento microbiano por lotes utilizando la relación entre la constante de velocidad logística y las constantes cinéticas de Monod (Kargi, 2008).

Teniendo en cuenta estas indicaciones procedimos a modelar el sistema utilizando la ecuación logista para determinar  $\mu_{\max}$  (velocidad de formación de biomasa máxima) utilizando los datos tomados. Es así que tenemos el ajuste al modelo matemático, donde calculamos la biomasa modelo (Figura 17)

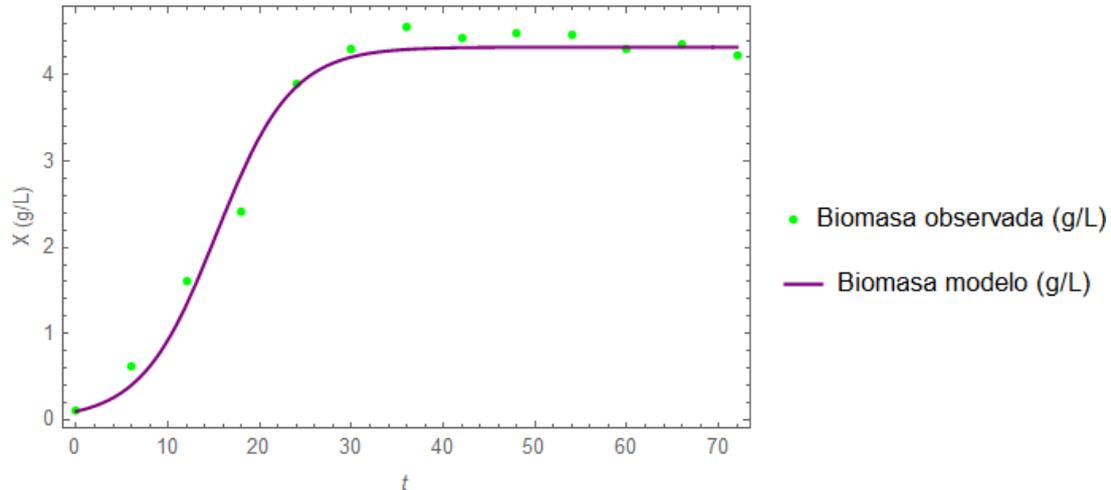
Realizando una solución de regresión no lineal utilizando los datos extraídos de la fermentación, mostrada anteriormente (Figura 16), en el programa Matemática obtuvimos los valores estimados de las variables  $\mu_{max}$ ,  $k_s$ ,  $X_{max}$  y  $Y_{X/S}$ , así como el error estándar (Cuadro 7). De la misma forma del programa obtuvimos el valor de  $R^2$  que es de 0.987, con lo que podemos aceptar el modelo pues cuando este valor es mayor a 0.95 tiene fiabilidad (Bora, 2013).

**Cuadro 7.** Reporte del programa Mathematica del ajuste del modelo Logístico.

| <b>Variable</b> | <b>Valor Estimado</b> | <b>Error Estándar</b>    |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|
| $\mu_{max}$     | 0.245                 | 0.0087                   |
| $k_s$           | 4.778                 | $1.6179 \times 10^{-17}$ |
| $X_{max}$       | 5.265                 | 0.0151                   |
| $Y_{X/S}$       | 4.321                 | 0.2327                   |

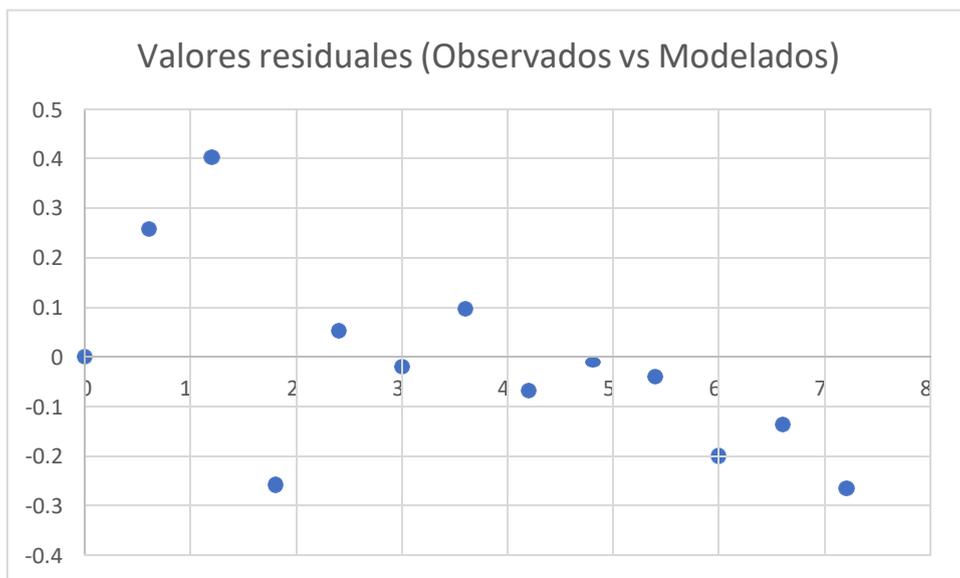
A partir de este ajuste determinamos que el valor de  $\mu_{max}$  es de  $0.245 \text{ h}^{-1}$ . Esto está dentro de un parámetro estándar para este microorganismo, pues como registra Panda (2017) quien trabajo la optimización de un modelo matemático para la producción de PHB por *Bacillus subtilis* el valor optimo determinado de  $\mu_{max}$  fue de  $0.325 \text{ h}^{-1}$ , pero este vario cuando se trabajó con diferentes sustratos entre márgenes de  $0.13 \text{ h}^{-1}$  a  $0.28 \text{ h}^{-1}$  obtenido de forma experimental menores valores al valor optimo. Es así que cuando mayor sea la concentración de sustrato limitante en el medio de cultivo mayor será la velocidad máxima de formación de biomasa (Kasena, 1999), siempre y cuando esta concentración no cause inhibición al crecimiento. Por lo tanto, el valor de  $\mu_{max}$  calculado se encuentra dentro de los estándares descritos por trabajos de optimización de parámetros cinéticos.

Por otro lado, como parte de este análisis también se realizó una prueba para determinar los valores residuales. Estos datos se obtienen de la resta de los valores observados con los valores modelados (Martin, Adana y Asuero, 2017) para determinar la variabilidad entre la diferencia de ambos. Esto nos ayuda a determinar si los datos son asimétricos o si incluyen valores atípicos, siendo que cuando se forma una larga cola hacia alguna dirección existe asimetría de datos (Lucko et. al, 2006).



**Figura 17.** Cinética de formación de biomasa de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 ajustado a un modelo matemático. (→) Biomasa modelada (·) Datos reales de biomasa. ajustado a un pH inicial de 7, temperatura de 30°C y agitación de 100 RPM por 72 horas. Modelo logístico.

A partir de estos datos se obtuvo el siguiente diagrama y lo podemos observar en la Figura 18. Como se observa la distribución de estos valores es aleatoria y esta diferencia no supera los 0.4 g/L, lo que nos muestra que el modelado es correcto. Además, podemos mencionar que no forman tendencias hacia un lado u otro, por lo que no presenta asimetrías y adicionalmente, no hay datos que estén tan alejados del cero, por lo que se considera que no hay valores anómalos.

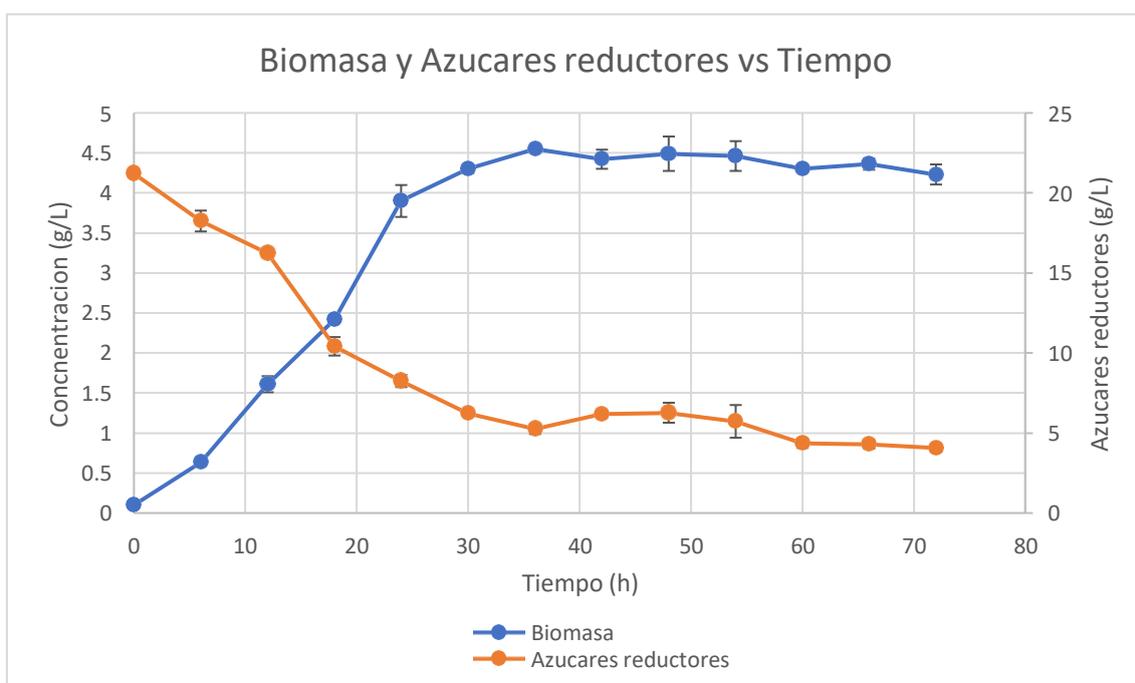


**Figura 18.** Residuales de los valores observados vs. los valores modelados para la cinética de formación de biomasa.

#### 4.1.2. Cinética de consumo de sustrato

Como se determinó anteriormente, el sustrato inicial ( $S_0$ ) con el que se diseñó el proceso fue de 21.21 g/L de glucosa. Pasadas las 72 horas, la cual es la hora final de la cinética, se llegó a una concentración final de 4.06 g/L de glucosa representando un consumo del 85.86% de la fuente de carbono. Para Li et. al (2007) empieza con una concentración de 40 g/L y logra un consumo del 95% de la fuente de carbono. Esto se debe a que él está utilizando *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 que es un microorganismo que ya ha sido modificado genéticamente y a su vez da un mayor rendimiento de PHB.

Por otro lado, como reporta Aslim et. al (2002) la glucosa se oxida en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, que luego da paso a la formación del bioplástico, por lo que no toda la fuente de carbono se transforma en bioplástico, siendo este un metabolito secundario. Es así que mientras avanzan las horas el consumo de esta fuente de carbono se reduce, pues a mayor población microbiana, mayor consumo de sustrato. Siendo que el sustrato que queda en el medio se utiliza como para las actividades de mantenimiento del microorganismo. Esto lo podemos observar en la Fig. 19 donde observamos la relación inversa que existe entre la concentración de biomasa y la concentración de azúcares reductores.



**Figura 19.** Cinética de consumo de sustrato y formación de biomasa de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, ajustado a un pH inicial de 7, temperatura de 30°C y agitación de 100 RPM por 72 horas. Modelo logístico.

Ahora, utilizando la relación determinada anteriormente entre las ecuaciones de Monod y la ecuación logística (Shuler, 2002), se estableció una ecuación que relaciona la producción de biomasa con el consumo de sustrato a través del rendimiento como se muestra en la siguiente ecuación (Kargi, 2008).

$$S = S_o - \frac{X - X_o}{Y_{x/s}} \quad (3)$$

A partir de esta ecuación logramos determinar el rendimiento biomasa/sustrato, la cual fue de  $0.27 \text{ g}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , tomando en cuenta que la concentración inicial de glucosa en el medio es alta. Wang (2022) reportó un rendimiento de  $0.56 \text{ g}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , siendo que trabajó con la cepa *Bacillus subtilis* PG-001 y un control de pH. El control de pH es fundamental en los procesos de fermentación de larga duración (Zhou, 2022) como en este caso y tiene un mayor impacto en la acumulación de PHB (Fang, 2014).

Por otro lado, para la determinación del comportamiento de la concentración del sustrato tenemos una ecuación que relaciona la velocidad de consumo de sustrato ( $q_s$ ) con la biomasa ( $X$ ) y esta a su vez se relaciona con la velocidad de formación de biomasa ( $\mu$ ) y rendimiento ( $Y_{x/s}$ ). A continuación, tenemos ambas ecuaciones (Mazzeo, 2020)

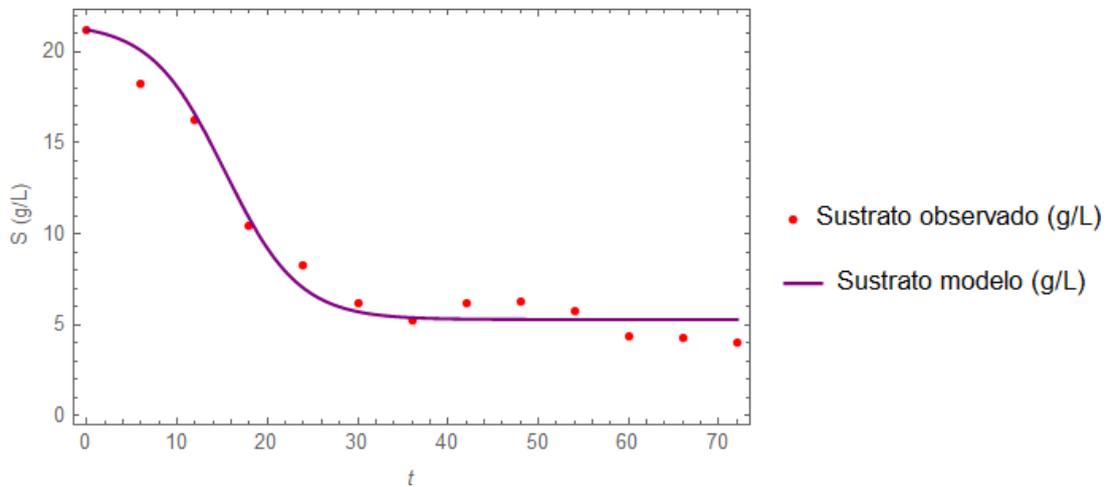
$$q_s = \frac{\mu_{max}}{Y_{x/s}} \quad (4)$$

$$S = q_s X \quad (5)$$

A partir de las ecuaciones presentadas anteriormente, se logró obtener el comportamiento modelado del consumo de sustrato a través del tiempo (Figura 20). Siendo que es una fermentación Batch, esta caracterizado por ser un proceso en el cual todos los nutrientes son agregados en el momento cero, lo que nos permite tener un ambiente controlado (Ingledeew, 2011). Por otro lado, el proceso finaliza cuando los nutrientes, generalmente la fuente de carbono, se consumen lo que imposibilita extender la fermentación y obtener una mayor concentración de productos secundarios como el PHB (Brautaset, 2011). Adicionalmente, una alta concentración inicial de fuente de carbono conduce a una alta osmolaridad que puede prolongar la fase de adaptación de la cepa de producción en el medio de cultivo lo que conlleva a una reducción de productividad (Patakova, 2020).

Es así que, observando el comportamiento del consumo de sustrato, se observa que aún no se llega a una fase de muerte, pues aún se observa concentración de sustrato en el

medio, por lo que se puede afirmar que a las 72 horas está en una fase estacionaria. Esto nos muestra que las altas concentraciones de sustrato inicial aumentan las horas de fermentación. Esto se debe a las características del diseño del medio, así como las propiedades del microorganismo, aunque también estas altas concentraciones iniciales prolongaron la fase de adaptación del microorganismo.



**Figura 20.** Cinética de consumo de sustrato de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 ajustado a un modelo matemático. (→) Biomasa modelada (·) Datos reales de biomasa. ajustado a un pH inicial de 7, temperatura de 30°C y agitación de 100 RPM por 72 horas. Modelo logístico.

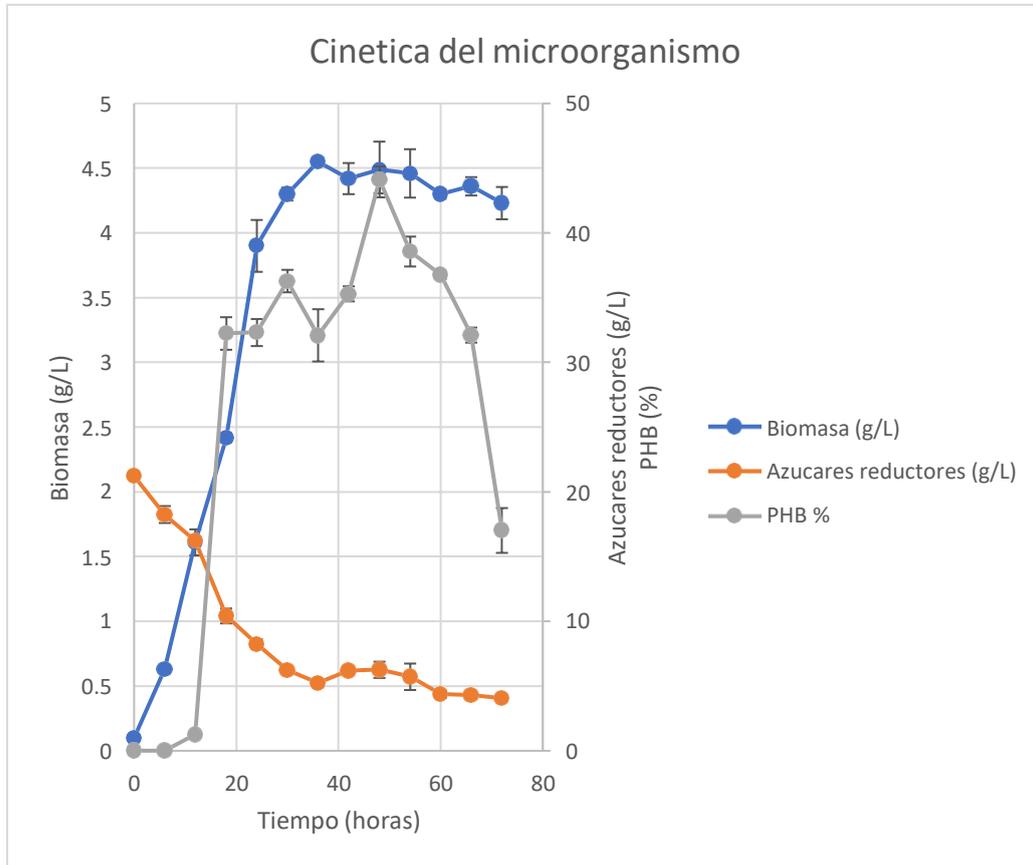
#### 4.1.3. Cinética De formación de producto

Completando la cinética, tenemos la cinética de formación de producto. Para esto como en los anteriores casos se evaluó durante 72 horas el desarrollo de la producción del bioplástico. Mediante el método gravimétrico determinamos la concentración de bioplástico, pero el parámetro que evaluaremos es el rendimiento del PHB (% PHB) por lo que calculamos ese dato utilizando la siguiente fórmula (Mazzeo, 2020).

$$\%PHB = \frac{X}{P} \times 100\% \quad (6)$$

Donde  $X$  es la biomasa y  $P$  el producto en ese tiempo. Con esto obtuvimos el rendimiento, y gráficamente lo podemos observar en la Fig. 16. Podemos recoger que el punto máximo de rendimiento del bioplástico se alcanza a las 48 horas (44.07%), mientras que durante las primeras 6 horas no se pudo recuperar PHB. El rendimiento de la acumulación de otras cepas rodea entre los 60 a 70% (Satarale, 2022), esto utilizando cepas modificadas

genéticamente para optimizar la producción del bioplástico, mientras que en cepas nativas el rendimiento esta entre el 30 a 40% (Baldera – Moreno et. al, 2022), por lo que podemos determinar que el microorganismo no altamente especificado para la acumulación del PHB.



**Figura 21.** Cinética de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650. (→, Azul) Concentración de biomasa (g/L), (→, Naranja) Concentración de azúcares reductores (g/L), (→, Plomo) Porcentaje de PHB. *Resultados promedio de tres réplicas de la cinética*

Esto se debe que, en la fase inicial de crecimiento equilibrado, se produce masa celular pero no PHB. La limitación de fosfatos se impone en la segunda fase y se acumula PHB. (Yüksekdağ et. al, 2003). Sin embargo, en nuestra fermentación la producción de PHB esta ligada a la fase exponencial debido al exceso que hay en el medio de fuente de carbono.

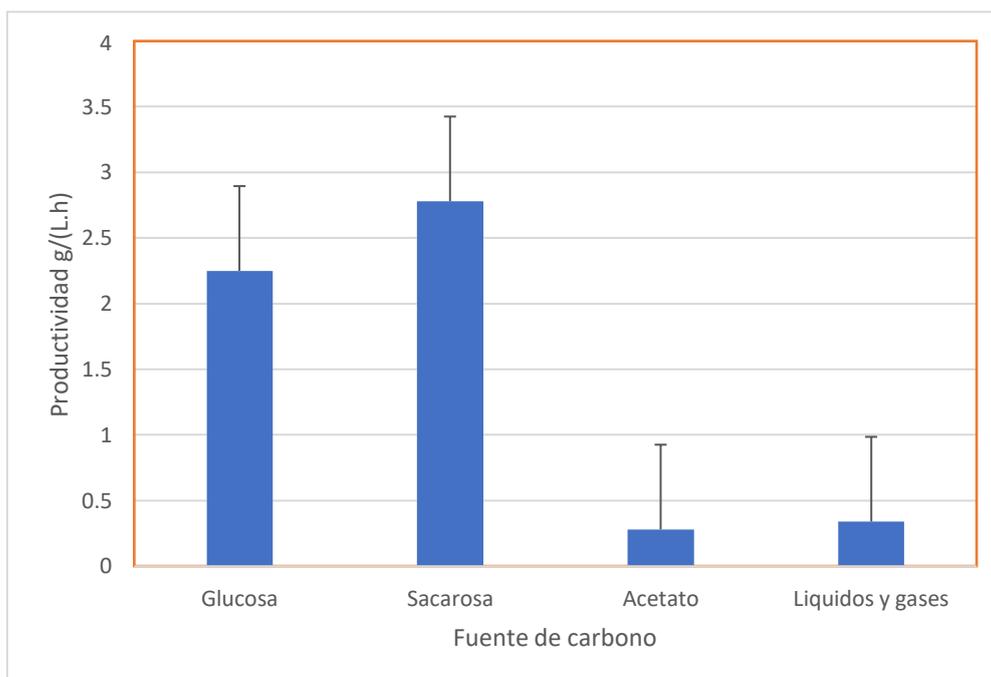
Por otro lado, esto puede indicar que las bacterias utilizaron PHB como una fuente de carbono y nitrógeno, para la formación de esporas. Como lo menciona (Yüksekdağ, 2003) se puede pensar que hasta el momento de la esporulación producía PHB y luego usaba PHB. Las esporas se produjeron durante la fase estacionaria de cultivos de *Bacillus* y en un momento en que se producía y consumía PHB

A partir de esta cinética determinamos que el tiempo óptimo para la fermentación es de 48 horas de incubación, esto comparado con otros trabajos con *Bacillus* donde se determina un aumento (18,03%, 14,79%) hasta las 48 horas y luego una reducción de la productividad. (Peña -Jurado, 2019), mientras que en otras fermentaciones se alcanzó una producción máxima de PHB de 0,54 g/L.

## 4.2. Análisis del proceso fermentativo de *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 para la producción de PHB

### 4.2.1. Análisis de la fuente de carbono

Luangthongkam (2019) reportó que dentro de las diferentes fuentes de carbono, la sacarosa es la que origina una mayor productividad de PHB, pero esto catapultado por la fructosa que forma parte de este disacárido, mientras que la glucosa ocupa un papel secundario en esta comparativa (Figura 22)



**Figura 22.** Comparación de fuentes de carbono para la producción de PHB. Recuperado de Luangthongkam (2019)

Es así como en una comparativa realizada por Kanna (2005) donde se realizaron fermentaciones con diferentes azúcares como la sacarosa, melaza, glicerol y glucosa para la producción de biomasa, el PHB obtenido con todas estas fuentes fue mucho menor en comparación con el obtenido con fructosa (Cuadro 8) presumiblemente debido a la incapacidad del microorganismo de sintetizar estas fuentes de carbono.

**Cuadro 8.** Producción de Biomasa y PHB utilizando diferentes fuentes de carbono. *Recuperado de Kanna (2005)*

| <b>Fuente de carbono</b> | <b>Biomasa (g/L)</b> | <b>PHB (g/L)</b> |
|--------------------------|----------------------|------------------|
| Fructosa                 | 3.5                  | 1.4              |
| Ácido láctico            | 1.188                | 0.089            |
| Sacarosa                 | 2.179                | 0.042            |
| Melazas                  | 1.960                | 0.039            |
| Glicerol                 | 2.879                | 0.034            |
| Glucosa                  | 2.332                | 0.031            |
| Sarbossa                 | 0.302                | 0.007            |
| Ácido acético            | 0.151                | 0.023            |
| Xilosa                   | 0.263                | 0.003            |
| Acetado de sodio         | 0.095                | 0.001            |
| Acido propiónico         | 0.055                | 0.001            |
| Almidón                  | 0.117                | 0.0              |
| Lactosa                  | 2.251                | 0.0              |

Es así que, como lo reporta Khanna (2005) el uso de melazas con grandes cantidades de carbohidratos conduce a la producción de subproductos indeseados, ya que contienen iones y minerales que producen efectos nocivos para el crecimiento microbiano y la síntesis de PHB.

Es así que nuestra producción de PHB utilizando la glucosa está dentro de los parámetros reportados, pero esta fermentación debe ser replanteada para implementarse a gran escala. Esto debido a los altos costos que representa utilizar la glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, algunas melazas producidas como desechos de las industrias son inviables por los altos costos de su purificación. Por lo que se debe realizar fermentaciones exploratorias utilizando sacarosa como fuente de carbono.

#### **4.2.2. Análisis del tipo de fermentación**

Los procesos fermentativos más ampliamente usados son las fermentaciones en lote o Batch (Li et. al, 2010) por sus bajos costos de mantenimiento y su fácil operatividad. Sin embargo, en la producción de PHB se prefiere la utilización de fermentaciones Fed -Batch o continuas (García, 2014) por la facilidad de extender la fase estacionara donde se

produce la mayor cantidad de PHB, así como obtener una mejor ventilación del sistema por los altos consumos oxigénicos del microorganismo (Diaz, 2007), siendo así que la productividad de PHB aumenta al utilizar sistemas Fed – Bacth, en comparación al uso de sistemas Batch (Loan, 2022)

Es así que se recuperó un cuadro comparativo de productividad de PHB en diferentes sistemas de fermentación (Cuadro 9) se puede observar la clara tendencia a realizar fermentaciones Fed-batch sobre las fermentaciones batch, y como estas tienen una mayor productividad.

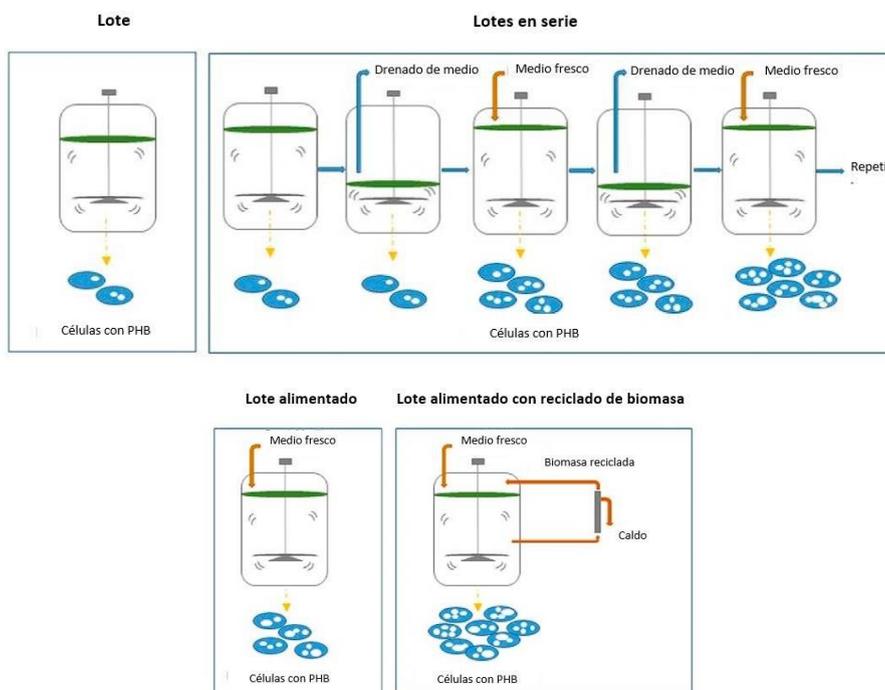
**Cuadro 9.** Producción de PHA's utilizando diferentes sistemas de fermentación.

| Fuente de carbono                  | Nutriente limitante      | Microorganismo                   | Sistema de fermentación | Polímero                 | Biomasa (g/L) | Contenido de PHA, % | Productividad de PHA (g/L.h) |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------|---------------------|------------------------------|
| Glucosa                            | Nitrógeno                | <i>C. necator DSM 545</i>        | Lote alimentado         | PHB                      | 81            | 77                  | 1.97                         |
| Ácido acético                      | Nitrógeno                | <i>C. necator DSM 545</i>        | Lote alimentado         | PHB, PHBV                | 60-65         | PHB-72<br>PHBV – 74 | PHB-0.37 PHBV – 0.41         |
| Glucosa                            | Glucosa                  | <i>Bacillus cereus SPV</i>       | Lote alimentado         | PHB                      | 3             | 38                  | -                            |
| Sacarosa                           | Ninguno                  | <i>Alcaligenes latus DMS1124</i> | Lote alimentado         | PHB                      | 143           | 50                  | 3.97                         |
| Sacarosa                           | Nitrógeno                | <i>Alcaligenes latus DMS1124</i> | Lote alimentado         | PHB                      | 112           | 88                  | 4.94                         |
| Sacarosa                           | Sacarosa, Nitrógeno      | <i>Alcaligenes latus DMS1124</i> | Lote alimentado         | PHB                      | 39            | 75                  | 0.6                          |
| Glucosa                            | Nitrógeno                | <i>A. eutrophus NCIMB 11 599</i> | Lote alimentado         | PHB                      | 164           | 76                  | 2.42                         |
| Medio de maíz condensado           | Nitrógeno                | <i>C. necator H16 ATCC 17699</i> | Lote                    | PHB                      | 6-15          | 29-41               | 0.02-0.04                    |
| Acetato                            | Acetato, Nitrógeno       | Sludge-GAO                       | SBR                     | P(3HB/3HV)               | 41% DW        | 41                  | -                            |
| Desechos de la producción de papel | Fosforo                  | GAO enriquecido                  | SBR                     | P(3HB/3HV/3HMV) 33:51:16 | -             | 42                  | 0.093                        |
| Acetato                            | Ninguno                  | PAO enriquecido                  | SBR                     | PHB                      | 29%           | 50                  | 0.02                         |
| Aguas residuales                   | Sustrato                 | Lodo activado                    | SBR                     | P(3HB/3HV) 50:50         | -             | 53                  | 0.23                         |
| Melaza de caña de azúcar           | Melaza de caña de azúcar | Consorcio mixto                  | Lote alimentado, CSTR   | P(3HB/3HV) 48:52         | -             | 56                  | 0.37                         |
| Fermentado de suero de leche       | Nitrógeno                |                                  |                         | P(3HB/3HV) 81:19         | -             | 65                  | 0.56                         |
| Melaza de caña de azúcar           | Nitrógeno                |                                  |                         | P(3HB/3HV) 77:23         | -             | 40                  | 0.15                         |
| Aguas residuales                   | Nitrógeno, Fosforo       | Lodo                             | SBR                     | -                        | -             | 8-18                | -                            |

Recuperado de Alvarez et. al (2022).

Comparando los resultados obtenidos de porcentaje de PHB obtenido en el punto óptimo de nuestra optimización de medio de cultivo, que es de 58%, con los reportados en los el recopilatorio de Chávez (2022) acerca de la producción de PHB en diferentes microorganismos observamos que para bacterias la productividad se encuentra entre el 55 y el 88% utilizando glucosa como fuente de carbono y nitrógeno como sustrato limitante, diferenciándose en el microorganismo utilizado.

Adicionalmente, dentro de los procesos de cultivo para la fermentación y producción de PHB el proceso discontinuo simple (batch) es el menos productivo (Shahhosseini, 2004) pues la fermentación está condicionada a tener una etapa de muerte y una cantidad fija de glucosa y nitrógeno. Por otro lado, los procesos Fed-Batch están condicionadas a capacidad de absorber los pulsos de nutrientes del microorganismo de (Koller, 2018), por lo que la mejor opción es realizar una fermentación continua (Koller, 2014) pero su operación es mucho más costosa, así como el control más complicado. Es así que tenemos una representación gráfica de cómo es la acumulación del biopolímero en diferentes sistemas de fermentación (Figura 23) donde se ve que los sistemas donde se tiene diferentes reactores en serie se obtiene una mayor producción de PHB (Representados por inclusiones blancas dentro de círculos azules), así como en los sistemas Fed-batch con reciclamiento de células.



**Figura 23.** Procesos de fermentación comúnmente utilizados para la biosíntesis de PHA. Recuperado de McAdam (2020).

### 4.2.3. Análisis de métodos de extracción de PHB

La extracción por dispersión de cloroformo-hipoclorito implica la extracción de polímeros de células pretratadas con hipoclorito usando cloroformo hirviendo. Luego, la solución resultante se precipita con un volumen de etanol, dejando los lípidos residuales en la solución. En esta técnica, el hipoclorito aniónico se usa para eliminar los desechos celulares antes de que el polímero intracelular se disuelva en cloroformo. (Riedel et. al, 2016)

Es así que el método de dispersión de hipoclorito-cloroformo da un mayor rendimiento del polímero (96%), seguido del método del cloroformo (82%) (Aramvash et. al, 2017), esto lo podemos observar en el Cuadro 10, donde se compararon solventes como el metanol, propanol, ácido acético y hexano. La pureza fue determinada utilizando equipos de cromatografía.

**Cuadro 10.** Pureza y rendimiento del PHB utilizando diferentes solventes. Recuperado de Aramvash et. al (2017)

| <b>Solvente</b>      | <b>Temperatura de extracción (°C)</b> | <b>PHB recuperado (promedio)(g/L)</b> | <b>Rendimiento (%)</b> | <b>Pureza (%)</b> |
|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------------|
| Carbonato de etileno | 50                                    | 1.14                                  | 82.6                   | 97                |
|                      | 100                                   | 1.2                                   | 90.1                   | 99                |
|                      | 150                                   | 1.32                                  | 98.6                   | 98                |
| Metanol              | 25                                    | 0.12                                  | 66.71                  | 98                |
|                      | 50                                    | 0.14                                  | 81.16                  | 99                |
|                      | 100                                   | 0.124                                 | 72.6                   | 97                |
| Propanol             | 25                                    | 0.072                                 | 16.02                  | 98                |
|                      | 50                                    | 0.104                                 | 23.15                  | 99                |
|                      | 100                                   | 0.128                                 | 28.49                  | 97                |
| Ácido acético        | 25                                    | 0.064                                 | 14.24                  | 98                |
|                      | 50                                    | 0.068                                 | 15.13                  | 99                |
|                      | 100                                   | 0.12                                  | 36.71                  | 97                |
| DMSO                 | 50                                    | 0.064                                 | 20.6                   | 97                |
|                      | 100                                   | 0.082                                 | 40.1                   | 99                |
|                      | 150                                   | 0.16                                  | 60.6                   | 95                |
| DMFO                 | 50                                    | 0.028                                 | 10.16                  | 85                |
|                      | 100                                   | 0.056                                 | 20.5                   | 93                |
|                      | 150                                   | 0.076                                 | 30.1                   | 97                |
| Hexano               | 25                                    | 0.056                                 | 2.3                    | 82                |
|                      | 50                                    | 0.064                                 | 2.6                    | 89                |
|                      | 100                                   | 0.068                                 | 2.8                    | 83                |

Sin embargo, el uso de cloroformo es altamente contaminante y no viable en el escalamiento, por lo que se deben explorar métodos de extracción más amigables con el medio ambiente, así como métodos de extracción físicos para la ruptura de la célula y la separación del bioplástico.

#### **4.3. Diseño experimental para la *optimización* del medio complejo MD**

Teniendo en cuenta los resultados de la cinética, se procedió a ejecutar el diseño experimental con el objetivo de optimizar las variables del estudio que afectan directamente a la composición inicial del medio del cultivo y a su vez a la acumulación de PHB por el microorganismo. El medio tuvo modificaciones correspondientes a la fuente de nitrógeno y microelementos (Extracto de levadura) y la relación entre las fuentes de carbono y de nitrógeno presentes en el medio de cultivo.

La biotecnología ha sido bastante nutrida por la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos que permiten optimizar procesos microbiológicos (Pilát, 1976). El procedimiento de optimización convencional sigue siendo la transformación de la relación funcional de  $n$  variables en  $n$  optimizaciones y dentro de estos métodos, el modelo central compuesto rotatable de respuesta, resulta como uno más utilizados, así como de los más eficaces (Ambati, 2001), esto debido a que nos permite encontrar situaciones de expresión óptimas que maximizan o reducen una respuesta, permitiendo realizar una predicción sistemática y una capacidad de validación alta de los procesos fermentativos (Cescut, 2011). En el presente trabajo, razón inicial de la fuente de nitrógeno (Extracto de levadura) y la relación de la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, fueron investigadas de forma simultánea utilizando un compuesto central rotatable. Este diseño es usualmente utilizado en los estudios relacionados con la optimización del proceso de producción de biopolímeros microbianos como el PHB utilizando diferentes variables como la concentración de fuentes de carbono, nitrógeno o microorganismos (Din et. al, 2014). Los experimentos fueron planteados para describir la concentración de PHB. Las variables respuesta seleccionadas fueron escogidas por ser importantes en el estudio de la productividad y eficiencia del proceso de producción de PHB (Shikha et. al, 2022). Los resultados obtenidos de la ejecución del diseño experimental se muestran en el Cuadro 11.

A la par de las variables respuesta que se estudiarán para la optimización también se calculó la cantidad de biomasa ( $X$ ) en términos de concentración, el porcentaje de PHB

(%PHB) y la relación entre la concentración de PHB y la concentración a la biomasa. Si bien el porcentaje de PHB también se estudia para la determinación de productividad, en este caso no se tomó en cuenta para poder evaluar otras variables respuesta.

Por otro lado, para poder optimizar la respuesta deseada, que en este caso es maximizar la variable respuesta, se necesita que haya una relación entre ambas variables y su impacto sobre la variable respuesta sea significativo, es decir que las variaciones que provoque la concentración de PHB sean diferenciales y claramente notables. En este caso se sabe que la fuente de nitrógeno es importante para la acumulación de PHB por lo que el extracto de levadura provocara una respuesta en la variable dependiente, de la misma forma que la relación entre los nutrientes que proporcionan carbono y las que proporcionan nitrógeno en el medio de cultivo.

**Cuadro 11.** Matriz del diseño central compuesto rotatable con las variables independientes a nivel codificada y original, con las respuestas.

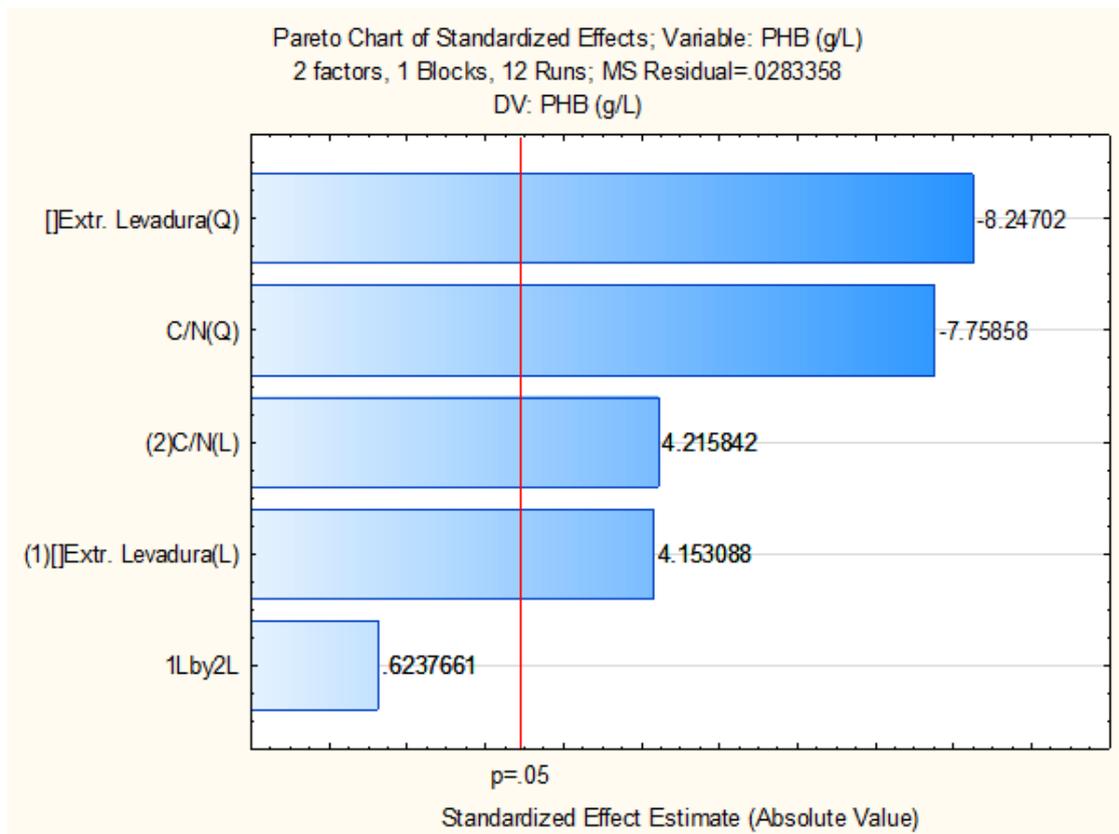
| Ensayo | Variables        |                |                         |                | Respuestas  |             |                             |              |             |
|--------|------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------|-------------|-----------------------------|--------------|-------------|
|        | Nivel codificado |                | Nivel original          |                | X<br>(g/L)  | P<br>(g/L)  | Q <sub>PHB</sub><br>(g/L*h) | %PHB         | Y<br>p/x    |
|        | x <sub>1</sub>   | x <sub>2</sub> | X <sub>1</sub><br>(g/L) | X <sub>2</sub> |             |             |                             |              |             |
| 1      | -1               | -1             | 1                       | 15             | 1.76        | 0.67        | 0.014                       | 38.07        | 0.38        |
| 2      | -1               | +1             | 1                       | 25             | 2.15        | 0.33        | 0.007                       | 15.35        | 0.15        |
| 3      | +1               | -1             | 5                       | 15             | 2.28        | 1           | 0.021                       | 43.86        | 0.44        |
| 4      | +1               | +1             | 5                       | 25             | 2.38        | 0.45        | 0.009                       | 18.91        | 0.19        |
| 5      | -α               | 0              | 0.17                    | 20             | 1.25        | 0.13        | 0.003                       | 10.4         | 0.1         |
| 6      | +α               | 0              | 5.83                    | 20             | 2.36        | 1.08        | 0.023                       | 45.76        | 0.46        |
| 7      | 0                | -α             | 3                       | 12.93          | 2.38        | 0.34        | 0.007                       | 14.29        | 0.14        |
| 8      | 0                | +α             | 3                       | 27.07          | 2.36        | 1.13        | 0.024                       | 47.88        | 0.48        |
| 9      | 0                | 0              | 3                       | 20             | <b>3.14</b> | 1.74        | 0.036                       | 55.41        | 0.55        |
| 10     | 0                | 0              | 3                       | 20             | 3.12        | 1.69        | 0.035                       | 54.17        | 0.54        |
| 11     | 0                | 0              | 3                       | 20             | 2.95        | 1.71        | <b>0.036</b>                | <b>57.97</b> | <b>0.58</b> |
| 12     | 0                | 0              | 3                       | 20             | 3.03        | <b>1.75</b> | 0.036                       | 57.76        | 0.58        |

X<sub>1</sub>: Concentración de extracto de levadura, X<sub>2</sub>: Relación carbono/nitrógeno, X: Concentración de biomasa (g/L), P: Concentración de PHB (g/L), Q<sub>PHB</sub>: Productividad volumétrica de PHB (g/L\*h), %PHB: Porcentaje de PHB, Y p/x: Rendimiento de PHB.

A partir de los datos obtenidos de la ejecución del diseño experimental se realizó estimaciones de los efectos lineales y cuadráticos (efectos principales e interacciones) utilizando el software Statistica v64 de las variables.

Los resultados experimentales fueron usados para estimar los efectos principales (lineales y cuadráticos) de las variables y sus interacciones (lineales) con el programa Statistica v64.

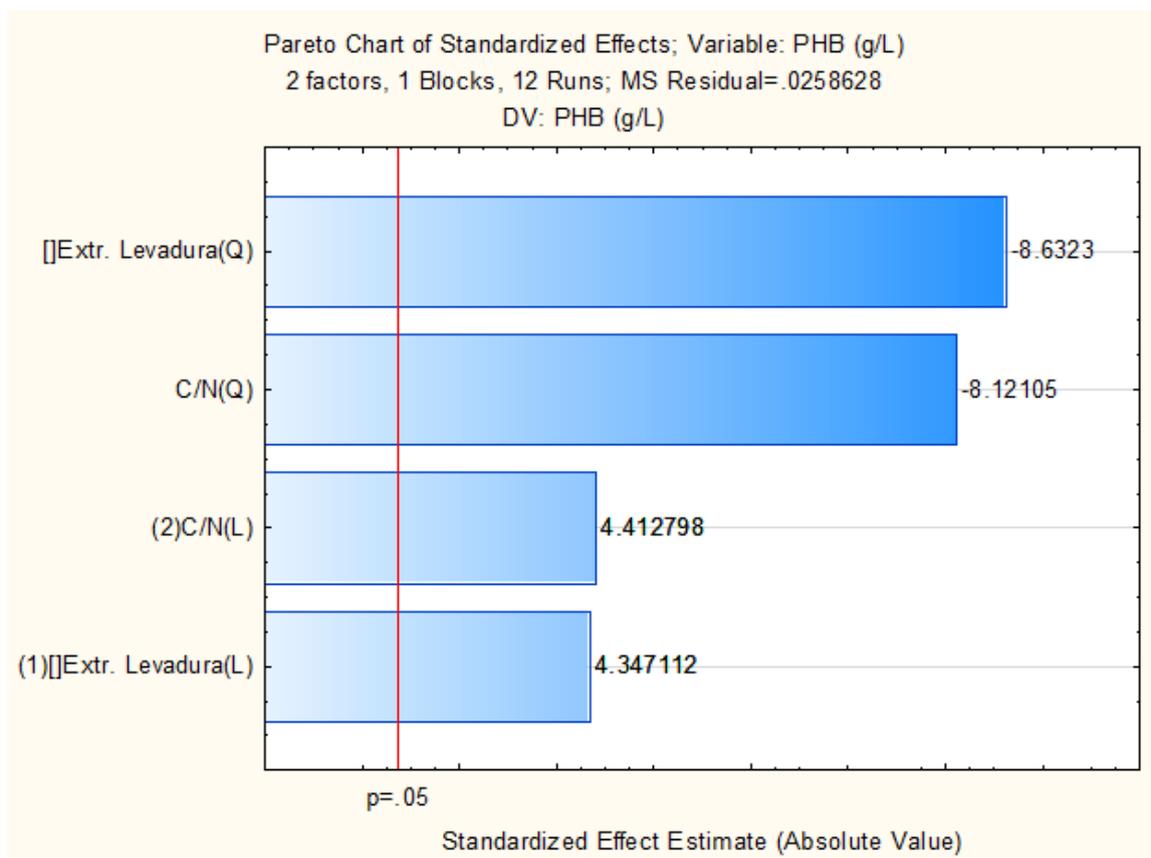
En las Fig. 17 se ilustra una gráfica de Pareto con todos los efectos estandarizados y a un nivel de significancia de 0.05 para la respuesta de la concentración de PHB (g/L). De este grafico podemos deducir que el efecto cuadrático del extracto de levadura tiene una mayor influencia, seguido de la relación Carbono/Nitrógeno. Luego de estos dos se encuentran los efectos lineales de ambas variables, sin embargo, la interacción de ambas variables no tiene efectos significantes por lo que se omitirá en este análisis teniendo en cuenta que se tiene un  $R^2$  de 0.96.



**Figura 24.** Gráfica de Pareto para la concentración de PHB. (L): Lineal, (Q) Cuadrático, 1Lby2L: interacción lineal. Gráficos obtenidos con Statistica v64.

Luego de observar que la interacción lineal de las variables independientes no tiene efectos significativos sobre la variable respuesta (concentración de PHB) observamos el valor de R2, el cual era mayor que 0.95, por lo cual decidimos omitir esta interacción del análisis posterior.

Es así que realizamos una segunda grafica de Pareto omitiendo la interacción, esta se observa en la siguiente figura, y ahora todos los efectos son significativos para la variable respuesta.



**Figura 25.** Grafica de Pareto para la concentración de PHB. (L): Lineal, (Q) Cuadrático. Gráficos obtenidos con Statistica v64.

#### 4.3.1. Efecto de la concentración inicial de extracto de levadura

Al analizar los gráficos de Pareto podemos determinar que hay un efecto principal cuadrático fuerte, pero esta se ve maximizada en los puntos centrales. A partir de lo anterior se puede afirmar que cuando la concentración inicial de extracto de levadura aumenta la concentración de PHB en el medio se incrementa (así como las otras

respuestas), hasta llegar a los 3 g/L, pero luego de esto al aumentar la concentración de este nutriente la producción cae. Esto se relaciona con que cuando se aumenta la concentración de nitrógeno en el medio la producción de PHB decae (Yüksekdağ, 2003). La concentración máxima alcanzada fue de 1.75 g/L y esta respuesta se dio ante una concentración inicial de 3 g/L de extracto de levadura y una relación carbono/nitrógeno de 20.

Por otro lado, se observa que la variable independiente (concentración extracto de levadura) tiene un efecto cuadrático y un efecto lineal significativos, siendo que el efecto lineal es menor al cuadrático (Fig. 24). A partir de lo anterior se deduce que cuando las concentraciones iniciales de extracto de levadura se encuentran en el extremo mayor o menor no se obtiene una concentración óptima de PHB, por lo que hay una región entre los 3 g/L y los 3.5 g/L donde la respuesta es maximizada.

Con respecto al crecimiento, se observó que cuando los niveles de extracto de levadura se encontraban en el punto central (es decir 3 g/L) la biomasa aumentaba. Esto está relacionado con el crecimiento y la inhibición que causa los azúcares en el medio de cultivo, que se analizara más adelante.

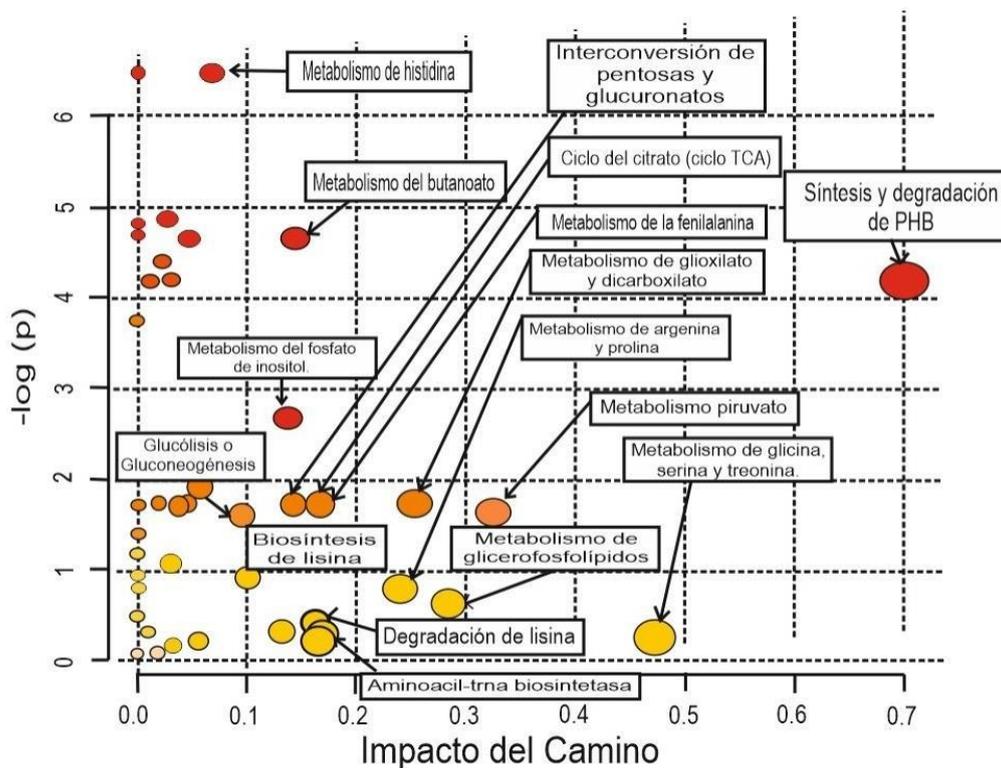
#### **4.3.2. Efecto de la relación carbono/nitrógeno**

Para la determinación de la relación carbono nitrógeno, consideramos como constante a la cantidad de nitrógeno, por lo que cuando aumenta la proporción, aumenta la concentración de azúcares respecto a la fuente de nitrógeno. Es por eso que cuando mayor sea la relación, mayor será la cantidad de glucosa en el medio de cultivo. Adicionalmente, como fuentes de carbono se consideró a la glucosa y como fuente de nitrógeno al extracto de levadura y al sulfato de amonio.

Teniendo en cuenta lo anterior podemos mencionar que hay un efecto principal cuadrático fuerte, pero esta se ve maximizada en los puntos centrales. A partir de lo anterior se deduce que la concentración de PHB (así como todas las respuestas) aumenta cuando la relación carbono/nitrógeno llega a 20, pero luego de esto al incrementar la relación la producción cae, esto debido a que las altas concentración de la fuente de carbono que provoca una inhibición de la biomasa por las altas concentraciones de glucosa (Mussatto y Roberto, 2008). La concentración máxima alcanzada fue de 1.75 g/L y esta respuesta se dio ante una concentración inicial de 3 g/L de extracto de levadura y una relación carbono/nitrógeno de 20.

Las respuestas obtenidas en el diseño experimental con el uso de esta variable tiene sentido, ya que como se sabe para el crecimiento microbiano las altas concentraciones de sustrato en el medio producen inhibición por sustrato así como las concentraciones bajas ocasionan un bajo crecimiento bacteriano (Mussatto y Roberto, 2008), esto reflejado en que como se anteriormente, al aumentar el ratio de la relación carbono/nitrógeno aumenta la proporción de glucosa respecto a la de nitrógeno que se mantiene constante.

Por otro lado, los altos ratios que existen entre la fuente de carbono y nitrógeno, incrementan la acumulación de PHB (Martinez, 2021) y estos aumentos se ven significativos desde ratios de 15 en la relación carbono/ nitrógeno (Faccin, 2009). El fenómeno se produce debido a que el microorganismo tiene deficiencia de nitrógeno, por lo que decide conservarlo como reserva para cuando ingrese a la etapa donde forme esporas y consuma los gránulos de PHB. (Sánchez et. al, 2021). Es por esto que la hora donde se detenga el proceso es importante para maximizar los beneficios al trabajar en una fermentación por lotes.



**Figura 26.** Impacto de las rutas metabólicas en la producción de PHB. Eje X: Impacto de la ruta en la producción de PHB. Eje Y: Impacto de la ruta en el sistema. *Recuperado de Wang et. al (2019).*

Adicionalmente, como menciona Wang (2019) durante la formación del PHB influye las concentraciones de glicina, serina y treonina, que se producen en la ruta de las purinas, siendo que cuando menor es su concentración mayor es la producción del bioplástico. De la misma forma podemos mencionar que cuando aumenta la concentración de citrato producido en el ciclo de Krebs aumenta la producción de PHB. Esto lo podemos ver en Figura 26.

El grafico nos muestra el impacto de las diferentes rutas metabólicas involucradas en la producción de PHB, siendo que cuando más intenso sea el color y más grande el circulo un mayor impacto tienen en esta producción. Es así que podemos fijarnos en la posición del metabolismo de la glicina, serina y treonina que se encuentran en la parte inferior derecha. Esto se debe a que su impacto es inversamente proporcional, es decir que cuando menor sea la cantidad de estos aminoácidos por la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo mayor será la producción de PHB. A partir de lo anterior podemos afirmar que cuando la relación carbono-nitrógeno sea menor, es decir la cantidad de este último se encuentre limitada aumenta la acumulación del bioplástico tal como podemos observar en los resultados presentados. Sin embargo, cuando esta aumenta demasiado puede conducir a una limitación por sustrato generada por el exceso de glucosa en el medio.

#### **4.3.3. Optimización estadística de la producción de PHB**

A partir de los datos experimentales recogidos en el Cuadro 11, se realizaron análisis de regresión para ajustar la variable dependiente, concentración de PHB (g/L) (los datos estadísticos se presentan manera detallada en el Anexo 5, donde se detalla el cuadro ANOVA, los coeficientes de regresión, los residuales de las corridas y el cálculo de las variables reales.). Para aumentar la significancia y teniendo en cuenta que el valor de  $R^2$  es superior a 0.95 se dejó de tomar en cuenta al efecto de la interacción lineal por ser no significativa (a un nivel de confianza de 95%).

El modelo expresado en la siguiente ecuación representa la concentración de PHB (g/L), donde las variables  $X_1$  y  $X_2$  representan a las variables independientes concentración de extracto de levadura y relación C/N, respectivamente.

$$PHB (g/L) = 1.72 + 0.25X_1 - 0.55X_1^2 + 0.25X_2 - 0.51X_2^2$$

Para la obtención de la ecuación se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) en el cual en primer lugar se realizó gráficos de Pareto donde se determinó la significancia de las

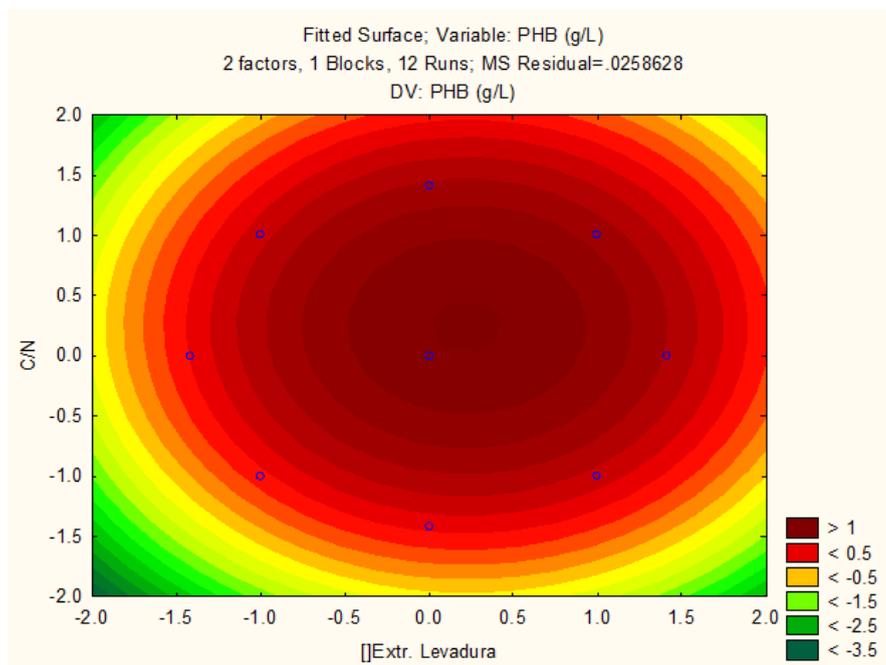
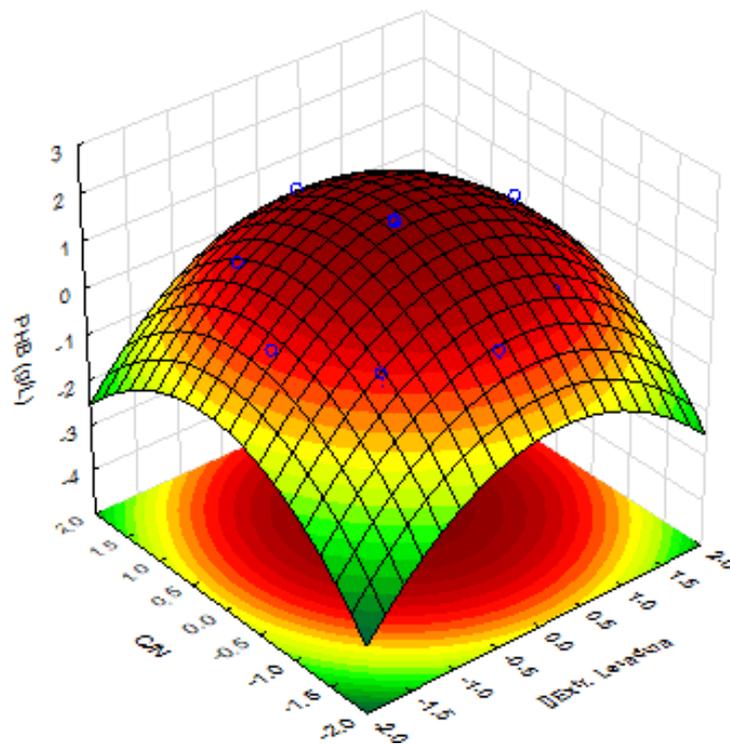
variables. Luego de obtener valores significantes y omitir los no significantes se realizó la prueba F y se determinó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

También se puede mencionar que para ambas variables (Concentración inicial de extracto de levadura y la relación carbono/nitrógeno) los efectos cuadráticos y lineales son significantes ( $p < 0.05$ ). El valor p más alto ( $3 \times 10^{-4}$ ) fue del efecto cuadrático del extracto de levadura. El  $R^2$  obtenido fue de 0.95692. Esto aproximadamente es el 95.629 % de la variabilidad, explicado en la omisión de la interacción de los efectos lineales de las variables que no era significativa aumentando de esta forma el valor de  $R^2$ . Este valor está en el intervalo de 0 y 1 (Myers, Montgomery y Anderson-Cook, 2016), y siempre que su valor sea superior a 0.70 se afirma que el modelo es apto según (Bora, 2013).

En el ANOVA para el modelo de segundo orden de la respuesta concentración de PHB (g/L) se indica que los efectos lineal y cuadrático para la concentración de extracto de levadura y la relación carbono/nitrógeno son términos significantes pues el valor de p es menor a 0.05. Por otro lado, también se logró determinar el  $R^2$  ajustado, el cual nos ayuda a obtener un satisfactorio ajuste del modelo polinomial. Con esto se logra corregir el  $R^2$  para el total del tamaño de la muestra, así como la cantidad de términos del modelo. Es así que el valor ajustado de  $R^2$  fue de 0.9323. Es así que se puede mencionar que a una mayor diferencia entre los valores de  $R^2$  y  $R^2$  ajustado se asume que se tomó efectos no significantes en el modelo (Myers et al., 2016). Los efectos lineales y cuadráticos fueron tomados en cuenta, mientras que la interacción lineal se ignoró, lo que explica la mínima disminución del  $R^2$  ajustado.

En la Figura 19 se muestra el gráfico de superficie de respuesta de la concentración de PHB para las variables concentración inicial de extracto de levadura y la relación carbono/nitrógeno. A través de los gráficos de superficie de respuestas y los gráficos de contorno se puede observar e inferir los valores que maximizan el modelo, ya que son representaciones fieles al comportamiento de la ecuación de regresión que identifica al modelo (Narayanan y Ramana, 2012). Se nota claramente que la superficie muestra una región (rojo granate) donde los valores de la concentración de PHB (g/L) están maximizados, estos límites se observan de una mejor manera en los gráficos de contorno. Esta región corresponde, en a concentraciones de extracto de levadura entre 3 y 3.5 g/L, y a relaciones de carbono/nitrógeno entre 20 y 22 para la respuesta de concentración de PHB. A partir de lo anteriormente analizado y lo que se puede observar, es claro que cuando el ratio de la relación carbono/nitrógeno aumenta la concentración de PHB se

incrementa. Esto debido a que cuando la concentración de extracto de levadura disminuye la relación C/N aumenta (Getachew & Woldesenbet, 2016).



**Figura 27.** A) Gráfico de superficie de respuesta y (B) gráfico de contorno para la concentración de PHB en función de la concentración inicial extracto de levadura y la relación C/N (Gráficos realizados con el software Statistica v64).

A partir de la evaluación de los valores críticos para las variables independientes (Anexo 5), se logró determinar los valores óptimos de la concentración de extracto de levadura inicial y la relación carbono/nitrógeno. Es que despejando estos valores desde las variables codificadas a las variables reales (Anexo 5) determinamos que los valores que maximizan la variable respuesta son 3.63 g/L de concentración inicial de extracto de levadura y 21.72 de relación entre las concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno, para obtener una concentración máxima de 1.8 g/L de PHB.

## V. CONCLUSIONES

- La cepa *Bacillus subtilis* NRRL B-1650 acumula PHB en mayor cantidad en la fase exponencial, por lo que para esta la producción de PHB para esta cepa está asociada al crecimiento. Por lo tanto, el tiempo de fermentación debe ser controlado alrededor de las 48 horas donde alcanza su máxima concentración, y así evitar gastar recursos alargando la fermentación.
- Se determinó que, si bien hay un incremento en la acumulación de PHB cuando la concentración de extracto de levadura y la relación carbono/nitrógeno aumenta, esto se cumple hasta los valores de 3 g/L y 20, respectivamente, y luego disminuye, debido al exceso de fuente de nitrógeno en el medio que disminuye la acumulación del biopolímero.
- Se optimizó el medio de cultivo derivado de un medio definido suplementado con extracto de levadura, para la producción de polihidroxibutirato a nivel de matraces utilizando *Bacillus subtilis* NRRL B-1650, como microorganismo productor. La concentración inicial óptima de extracto y la relación carbono/nitrógeno determinadas para la producción de PHB fueron de 3.63 g/L y 21.72, respectivamente. En estas condiciones se obtendrá una concentración de 1.8 g/L de PHB a las 48 horas.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. Díaz-Barrera, C. Pena, E. Galindo. (2007). The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76. 2007. 903–910.

Alvarez Chavez, B., Raghavan, V., & Tartakovsky, B. (2022). A comparative analysis of biopolymer production by microbial and bioelectrochemical technologies. *RSC Advances*, 12(25), 16105–16118. <https://doi.org/10.1039/d1ra08796g>

Ambati, P., Ayyanna, C. (2001). Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 331–335 <https://doi.org/10.1023/A:1016613322396>

Anbreen Anjum, M. Z. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14.

Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol.* 54, 450–472.

Andler, R. y Díaz, A. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. Technological and market aspects of microbial bioplastics production. *Ingengerare* 27- 29. Chile.

Anjum, M., Qadeer, S., Khalid, A. (2018). Anaerobic co-digestion of catering and agro-industrial waste: a step forward toward waste biorefinery. *Front. Energy Res.* 6, 116.

Aramvash, A., Moazzeni Zavareh, F., & Gholami Banadkuki, N. (2018). Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Engineering in Life Sciences*, 18(1), 20–28. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700102>

Arcos, M. (2007). Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante un biorreactor discontinuo. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Arevalo, S. (1998). Optimización de la producción del agente de biocontrol *Candida sake* (CPA-1). Universidad de Lleida. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8389/TSMAC1de3.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Aslim, B., Yuksekdog, Z. y Beyatli, Y. (2002). Determination of PHB Growth Quantities of Certain *Bacillus* Species Isolated From Soil. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology, Special Issue*, 24-30.

Avérous, L., & Pollet, E. (Eds.). (2012). *Environmental Silicate Nano-Biocomposites*. Springer London.

Baldera-Moreno, Y., Pino, V., Farres, A., Banerjee, A., Gordillo, F., & Andler, R. (2022). Biotechnological aspects and mathematical modeling of the biodegradation of plastics under controlled conditions. *Polymers*, 14(3), 375. <https://doi.org/10.3390/polym14030375>

Bora, L. (2013). Polyhydroxybutyrate Accumulation in *Bacillus megaterium* and Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology, 415– 420. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0529-z>

Boyandin, A. N., Prudnikova, S. V., Filipenko, M. L., Khrapov, E. A., Vasil'ev, A. D., & Volova, T. G. (2012). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(1), 28–36. <https://doi.org/10.1134/s0003683812010024>

Braunegg, G., Lefebvre, G., & Genser, K. (1998). Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from renewable resources. *Journal of Biotechnology*, 65, 127-161.

Braunegg, G., Lefebvre, G., & Genser, K. F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from renewable resources. *Physiological and Engineering Aspects*, 65, 127–161.

Brautaset, T., & Ellingsen, T. (2011). Lysine. *Comprehensive Biotechnology*, 541–554. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00220-8>

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and

potential applications in packaging. *EXPRESS Polymer Letters*, 8(11), 791–808.  
<https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>

Bunk, B. (2010). *Bacillus Megaterium and Other Bacilli: Industrial Applications*. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. John Wiley & Sons, Inc.  
<https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib063>

Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O., & Okon, Y. (2010). Natural Functions of Bacterial Polyhydroxyalkanoates (pp. 39–61). Springer, Berlin, Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_3)

Catalina, L. M., Fernández, R. L., & Muñoz, Y. R. (2018). Biodegradación de Metano en Un Biorreactor De Columna De Burbujeo Con Recirculación Interna Acoplado A La Producción De Biopolímeros [Universidad De Valladolid].  
<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/31214/TFM-I-888.pdf?sequence=1>

Cescut, J., Severac, E., Molina-Jouve, C., & Uribelarrea, J.-L. (2011). Optimizing pressurized liquid extraction of microbial lipids using the response surface method. *Journal of Chromatography A*, 1218(3), 373–379.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.003>

Chanasit W, Hodgson B, Sudesh K , Umsakul K (2016). Efficient production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Pseudomonas mendocina* PSU using a biodiesel liquid waste (BLW) as the sole carbon source. *Biosci Biotechnol Biochem*.

Choi, S.Y., Rhie, M.N., Kim, H.T., Joo, J.C., Cho, I.J., Son, J., Jo, S.Y., Sohn, Y.J., Baritugo, K. A., Pyo, J., et al. (2020). Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: a 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to nonnatural microbial polyesters. *Metabolic Engineering*, 58, 47-81.

Coles, R. (2011). *Food and Beverage Packaging Technology*. Richard Coles and Mark Kirwan.

Cui, Y.-W., Zhang, H.-Y., Lu, P.-F., and Peng, Y.-Z. (2016). Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process. *Sci. Rep.* 6, 30766– 30766.  
<https://doi.org/10.1038/srep30766>

Delgado, A. C. L. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico Colombia*, 93–101.

Din, M.F., Ponraj, M., Van Loosdrecht, M. et al. Utilization of palm oil mill effluent for polyhydroxyalkanoate production and nutrient removal using statistical design. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 671–684 (2014). <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0253-9>

Egli, T. (2009). Nutrition, Microbial. En *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 308–324). <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00083-3>

European Bioplastics (2022). What are bioplastics? Material types, terminology, and labels – an introduction. <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>

Faccin, D. J. L., Martins, I., Cardozo, N. S. M., Rech, R., Ayub, M. A. Z., Alves, T. L. M., Gambetta, R., & Resende Secchi, A. (2009, diciembre). Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(12), 1756-1761. <https://doi.org/10.1002/jctb.2240>

Fang, F., Jiang, H., Wang, J., Yu, H.Q. (2014). Identifying the influential priority of the factors governing PHB production by activated sludge with integration of uniform design and grey relational analysis. *Sep. Purif. Technol.* 136, 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.08.035>.

García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., & Peña, C. (2014). High production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.020>

Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>

Gilbert, M. (2017). *Plastics Materials: Introduction and Historical Development*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00001-3>

Gómez, J. G. (2016). Diagnóstico del impacto del plástico - botellas sobre el medio ambiente: Un estado del arte. Universidad Santo Tomás. <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/10047/Gomez2016.pdf>

Gouda, M. K., Swellam, A. E., & Omar, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156(3), 201–207. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00104>

Gulab, S. (2013). Poly  $\beta$ -Hydroxybutyrate Production by *Bacillus subtilis* NG220 Using Sugar Industry Waste Water. In *Biomed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2013/952641>

Hartley Yee, L., & Ray Foster, L. J. (2014). CHAPTER 8. Polyhydroxyalkanoates as Packaging Materials: Current Applications and Future Prospects (pp. 183–207). <https://doi.org/10.1039/9781782622314-00183>

Ingledeew, W., & Lin, Y. H. (2011). Ethanol from Starch-Based Feedstocks. *Comprehensive Biotechnology*, 37–49. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00457-8>

Jacob FF, Hutzler M, Methner F-J (2019) Comparison of various industrially applicable disruption methods to produce yeast extract using spent yeast from top-fermenting beer production: influence on amino acid and protein content. *Eur Food Res Technol* 245(1):95–109

Kacena, M. A., Merrell, G. A., Manfredi, B., Smith, E. E., & D. M. Klaus, P. T. (1999). Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, 229–234.

Kargi, F. (2008). Re-interpretation of the logistic equation for batch microbial growth in relation to Monod kinetics. *Letters in Applied Microbiology* ISSN, 1013, 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x>

Kawamura, Y., Mori, K., & Amachi, S. (2021). Reductive deiodination of 2, 4, 6-triiodophenol by *Vallitalea* sp. Strain TIP-1 isolated from the marine sponge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(2), 154-160.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40, 607–619.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 40(6), 2173–2182. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.011>

Khanna, Shilpi, & Srivastava, A. K. (2009). On-line characterization of physiological state in poly ( $\beta$ hydroxybutyrate) production by *Wautersia eutropha*. *Appl Biochem Biotechnol.*, 157, 237–243. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8395-9>

Kok, F., & Hasirc, V. (2004). Polyhydroxybutyrate and Its Copolymers: Applications in the Medical Field. *ISTANBUL TEKNİK UNIVERSITESI*, 25, 1–17.

Koller, M. (2018). Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Molecules*, 23(362), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23020362>

Koller, M. (2018). A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation*, 4, 30. Shahhosseini, S. Simulation and Optimisation of PHB Production in Fed-Batch Culture of *Ralstonia Eutropha*. *Process Biochem.* 2004, 39, 963–969.

Koller, M., & Braunegg, G. (2018). Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion. *The EuroBiotech Journal*, 2, 89–103. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2018-0013>

Koller, M., & Mukherjee, A. (2022). A NewWave of Industrialization of PHA Biopolyesters. *Bioengineering*, 1–29. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9020074>

Koller, M.; Muhr (2014). A. Continuous Production Mode as a Viable Process-Engineering Tool for Efficient Poly (Hydroxyalkanoate) (PHA) Bio-Production. *Chem. Biochem. Eng. Q. Croat. Soc. Chem. Eng.* 1, 153–165

Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017). Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*, 4(2), 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>

Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., and Lant, P. (2014). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Prog. Polym. Sci.* 39, 397–442. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008

Lebreton, L., Andrady, A. (2019). Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Commun.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0212-7>.

Lemos Delgado, A. C., & Mina Cordoba, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador técnico*, 79(1), 83. <https://doi.org/10.23850/22565035.139>

Leong, H.Y., Chang, C.-K., Khoo, K.S., Chew, K.W., Chia, S.R., Lim, J.W., Chang, J.-S., Show, P.L. (2021). Waste biorefinery towards a sustainable circular bioeconomy: a solution to global issues. *Biotechnol. Biofuels* 14 (1), 1–15.

Li, H., Qiu, T., Huang, G., & Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-85>

Li, R., Q. Chen, and P. G. Wang (2007). A novel designed *Escherichia coli* for the production of various polyhydroxyalkanoates from inexpensive substrate mixture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1103-1109.

Li, R., Zhang, H., & Qi, Q. (2007). The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 98(12), 2313–2320. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.014>

Li, S. Y., Srivastava, R., Suib, S. L., Li, Y., & Parnas, R. S. (2011). Performance of batch, fed-batch, and continuous A–B–E fermentation with pH-control. *Bioresource Technology*, 102(5), 4241–4250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.078>

Loan, T. T., Trang, D. T. Q., Huy, P. Q., Ninh, P. X., & van Thuoc, D. (2022). A fermentation process for the production of poly(3-hydroxybutyrate) using waste cooking oil or waste fish oil as inexpensive carbon substrate. *Biotechnology Reports*, 33, e00700. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00700>

Luangthongkam, P., Laycock, B., Evans, P., Lant, P., & Pratt, S. (2019). Thermophilic production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydrovalerate) by a mixed

methane-utilizing culture. *New Biotechnology*, 53, 49–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.06.008>

Lucko, G., Anderson-Cook, C. M., & Vorster, M. C. (2006). Statistical Considerations for Predicting Residual Value of Heavy Equipment. *Journal of Construction Engineering and Management*, 132(7), 723–732.  
[https://doi.org/10.1061/\(asce\)0733-9364\(2006\)132:7\(723\)](https://doi.org/10.1061/(asce)0733-9364(2006)132:7(723))

Martin, J., Adana, D. D. R. D., & Asuero, A. G. (2017). *Fitting Models to Data: Residual Analysis, a Primer. Uncertainty Quantification and Model Calibration*.  
<https://doi.org/10.5772/68049>

Martínez-Herrera, R. E., Alemán-Huerta, M. E., Flores-Rodríguez, P., Almaguer-Cantú, V., Valencia-Vázquez, R., Rosas-Flores, Rutiaga-Quiñones, O. M. (2021). Utilization of *Agave durangensis* leaves by *Bacillus cereus* 4N for polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 175, 199–208.  
<https://10.1016/j.ijbiomac.2021.01.167>

Mazzeo, L., & Piemonte, V. (2020). Fermentation and biochemical engineering: principles and applications. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 261–285.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64337-7.00015-x>

McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908.  
<https://doi.org/10.3390/polym12122908>

Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017). *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>

Muralidharan, R., y Radha, K. V. (2015). A kinetic study of polyhydroxybutyrate production on nitrogen limited medium using *Bacillus subtilis* MTCC 9763 through a two stage cultivation strategy. *Journal of Environmental Biology*, 36, 537–542

Mussatto, S. I., y Roberto, I. C. (2008). Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 43(5), 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.013>

Myers, R. H., Montgomery, D. C., y Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (4th ed.). Wiley.

Narayanan, A., Ramana, K.V.(2012) Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters. *3 Biotech* 2, 287–296. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0054-8>

Ortega, G. M., & Bell, A. (2014). Separación, purificación y caracterización de poli-hidroxibutirato. *ICIDCA Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 48(1), 7–15. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/2231313337002.pdf>

Panda, I., Balabantaray, S., Sahoo, S. K., & Patra, N. (2017). Mathematical model of growth and polyhydroxybutyrate production using microbial fermentation of *Bacillus subtilis*. *Chemical Engineering Communications*, 1–24. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1384923>

Panda, I., Balabantaray, S., Sahoo, S. K., & Patra, N. (2017). Mathematical model of growth and polyhydroxybutyrate production using microbial fermentation of *Bacillus subtilis*. *Chemical Engineering Communications*, 205(2), 249–256. [doi:10.1080/00986445.2017.1384923](https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1384923)

Patakova, P., Branska, B., Lin, Z., Wu, P., Liu, H., Drahokoupil, M., Zhou, Y., Paulova, L., Zhang, J., & Melzoch, K. (2020). Microbial production of butanol from food industry waste. *Food Industry Wastes*, 163–180. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817121-9.00008-5>

Peña-Jurado, E., Pérez-Vega, S., de la Serna, F. J. Z.-D., Pérez-Reyes, I., Gutiérrez-Méndez, N., Vazquez-Castillo, J., & Salmerón, I. (2019). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from a dairy industry wastewater using *Bacillus subtilis* EPAH18: Bioprocess development and simulation. *Biochemical Engineering Journal*, 107324. [doi:10.1016/j.bej.2019.107324](https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107324)

Pilát, P., Votuba, J., Doberský, P. et al. Application of mathematical optimization methods in microbiology. *Folia Microbiol* 21, 391–405 (1976). <https://doi.org/10.1007/BF02876966>

Prasad Reedy, D., Pendyala, R., Senthilkumar, R., & Azri, M. H. B. (2019). Microbial production of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) from rubber seed oil using

Cupriavidus necator H16. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 398(1), 012008. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/398/1/012008>

Prime. (2021, febrero 25). Descubre qué son los bioplásticos. Primebiopolymers. <https://primebiopol.com/que-son-los-bioplasticos/>

R. Li, H. Zhang y Q. Qi, «The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant Escherichia coli,» Bioresource technology, vol. 98, pp. 2313-2320, 2007.

Rajan, K. P., Thomas, S. P., Gopanna, A., & Chavali, M. (2018). Polyhydroxybutyrate (PHB): A Standout Biopolymer for Environmental Sustainability. Springer International Publishing AG, 2–19.

Ranganadhareddy, A. (2022). A Review on Production of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. J Biochem Technol, 1–6. <https://doi.org/10.51847/Uo3EEbmgID>

Riaz, S., Rhee, K.Y., Park, S.J., 2021. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): biopolymers for biofuel and biorefineries. Polymers 13 (2), 253.

Riedel, S.L., Lu, J., Stahl, U., Brigham, C.J., (2014) Lipid and fatty acid metabolism in Ralston eutrophic: Relevance for the biotechnological production of value-added products. Applied Microbiology and Biotechnology. 98, pp.1469–1483.

Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de Sousa Dias, M., Calafell-Monfort, M., Braunegg, G., & Marqués-Calvo, M. S. (2013). High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild Bacillus megaterium Bolivian strain. Journal of Applied Microbiology, 114(5), 1378–1387. <https://doi.org/10.1111/jam.12151>

Rosenboom, J.-G., Langer, R., & Traverso, G. (2022). Bioplastics for a circular economy. Nature reviews, 7, 117–137. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>

Sánchez Valencia, A. I., Rojas Zamora, U., Meraz Rodríguez, M., Álvarez Ramírez, J., Salazar Peláez, M. L., & Fajardo Ortiz, C. (2021). Effect of C/N ratio on the PHA accumulation capability of microbial mixed culture fed with leachates from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). Journal of Water Process

Sandström, Anders & Heras, Alejandro & Portugal-Nunes, Diogo & Gorwa-Grauslund, Marie. (2015). Engineering of Saccharomyces cerevisiae for the production of poly-3-D-hydroxybutyrate from xylose. AMB Express. 5. 10.1186/s13568-015-0100-0.

Saratale, R.G.; Cho, S.-K.; Kadam, A.A.; Ghodake, G.S.; Kumar, M.; Bharagava, R.N.; Varjani, S.; Nair, S.; Kim, D.-S.; Shin, H.-S.; et al. Developing Microbial Co-Culture System for Enhanced Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production Using Acid Pretreated Lignocellulosic Biomass. *Polymers* 2022, 14, 726. <https://doi.org/10.3390/polym14040726>

Sathya, A. B., Sivasubramanian, V., Santhiagu, A., Sebastian, C., & Sivashankar, R. (2018). Production of polyhydroxyalkanoates from renewable sources using bacteria. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(9), 3995-4012. doi:10.1007/s10924-018-1259-7

Seymour, R. B. (1996). *Introduccion a la Quimica de Los polimeros*. Reverte Ediciones.

Shahhosseini, S. (2004). Simulation and optimisation of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 39(8), 963–969. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00209-7)

Sharma, N. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Bacteria and its Application as Biodegradable Plastic in Various Industries. *Academic Journal of Polymer Science*, 2(3), 60–62. <https://juniperpublishers.com/ajop/pdf/AJOP.MS.ID.555587.pdf>

Shikha Guleria, Harpreet Singh, Vamika Sharma, Neha Bhardwaj, Shailendra Kumar Arya, Sanjeev Puri, Madhu Khatri (2022), Polyhydroxyalkanoates production from domestic waste feedstock: A sustainable approach towards bio-economy, *Journal of Cleaner Production*, Volume 340, 2022, 130661, ISSN 0959-6526, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130661>.

Shuler, M.L. and Kargi, F. (2002) *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2nd edn. NJ, USA: Prentice Hall.

Sindhu, R., Silviya, N., Binod, P., & Pandey, A. (2013). Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 67–72. doi:10.1016/j.bej.2012.12.015

Spears, J., . S. C., Gebrechristos, S., & Schuler, C. (2019). Compositions comprising *Bacillus* strains and methods of use to suppress the activities and growth of

fungal plant pathogens (Patent Núm. 20190150454). En United states patent (Núm. 20190150454).

Stanislav Obruča, Pavel Dvořák, Petr Sedláček, Martin Koller, Karel Sedlář, Iva Pernicová, David Šafránek (2022). Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics, *Biotechnology Advances*, 107906, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>.

Subba Rao D, Panda T. Critical analysis of the effect of metal ions on gluconic acid production by *Aspergillus niger* using a treated Indian cane molasses. *Bioprocess Eng* 1994;10:99–107.

Talan, A., Pokhrel, S., Tyagi, R. D., & Drogui, P. (2022). Biorefinery strategies for microbial bioplastics production: Sustainable pathway towards Circular Bioeconomy. *Bioresource Technology Reports*, 17(100875), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100875>

Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., & Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *philosophical transactions of the royal society*, 364, 1–14. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0053>

Verhulst, P.-F. "Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population." *Nouv. mém. de l'Academie Royale des Sci. et Belles-Lettres de Bruxelles* 18, 1-41, 1845.

Vieira F, Carvalho J, Pinto E, Cunha S, Almeida A, Ferreira I (2016) Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *J Food Compos Anal* 52:44–51

von Pogrell, H. (2009). ¿Qué son los bioplásticos? *European Bioplastics*. <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>

Vuong P, Lim DJ, Murphy DV, Wise MJ, Whiteley AS and Kaur P (2021) Developing Bioprospecting Strategies for Bioplastics Through the Large-Scale Mining of Microbial Genomes. *Front. Microbiol.* 12:697309. doi: 10.3389/fmicb.2021.697309

W. Chanasit, L. Sueree, B. Hodgson, K. Umsakul. (2014). The production of poly(3- hydroxybutyrate) [P(3HB)] by a newly isolated *Bacillus* sp. ST1C using liquid waste from biodiesel production, doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0755-1>.

Wang, F. L., & Lee, S. Y. (1997). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentationsuppressed recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol*, 4765–4769.

Wang, JQ., Zhao, J. & Xia, JY.  $\gamma$ -PGA Fermentation by *Bacillus subtilis* PG-001 with Glucose Feedback Control pH-stat Strategy. *Appl Biochem Biotechnol* (2022). <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03755-x>

Wang, P., Qiu, Y. Q., Chen, X. T., Liang, X. F., & Ren, L. H. (2019). Metabolomic insights into polyhydroxyalkanoates production by halophilic bacteria with acetic acid as carbon source. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(10), 1955–1963. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1630252>

Yüksekdağ, Zehra Nur; Beyatli, Yavuz; y Aslim, Belma (2003) "Determination of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) Production by Some Mesophilic and Thermophilic Lactic Acid Bacteria," *Turkish Journal of Biology*: Vol. 27: No. 1, Article 5. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol27/iss1/5>

Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., & Dhiman, A. K. (2012). Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 by using genetic algorithm based on artificial neural network and response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2011.08.012>

Zhou, Y., Li, Y., Li, D., Yin, Y., & Zhou, F. (2022). Electrospun PHB/Chitosan Composite Fibrous Membrane and Its Degradation Behaviours in Different pH Conditions. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(2), 58. <https://doi.org/10.3390/jfb13020058>

Zinn M, Witholt B, Egli T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev* Dec 3;53(1):5-21. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00218-6. PMID: 11733115.

## VII.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Curvas de calibrado

#### 1.1. Curva de calibrado de biomasa – Método peso seco

Se preparó un medio de cultivo teniendo las concentraciones de 20 g/l de glucosa y 3 g/l de Extracto de levadura, los demás nutrientes fueron suministrados según las proporciones del medio MD. Luego se llevó a la autoclave a 121 °C por 20 minutos y se inoculó con 0.05 g/l de biomasa previamente preparado. Luego de ello se llevó a incubación por 48 horas a 30°C y una agitación de 100 RPM. Pasado 48 h en la incubadora se observó turbidez en el medio preparado para la realización de la curva de calibrado. El color se hizo más intenso y a contra luz se observaba sustancias suspendidas, lo que mostraba crecimiento.



**Figura 28.** Medio para la realización de curva de calibrado a las 48 horas. *Elaboración propia*

Es así que procedimos a realizar las diluciones respectivas con agua destilada siguiendo el siguiente cuadro:

**Cuadro 12.** Preparación de diferentes concentraciones

| TUBO | Fermentado (mL) | Agua Destilada (mL) |
|------|-----------------|---------------------|
| 1    | 0.1             | 4.9                 |
| 2    | 0.08            | 4.92                |
| 3    | 0.06            | 4.94                |
| 4    | 0.04            | 4.96                |
| 5    | 0.02            | 4.98                |

*Elaboración propia*

Después de prepararlo, procedimos a llevarlo al espectrofotómetro para poder realizar la lectura a 600 nm. Obteniendo así los siguientes datos en el cuadro.

**Cuadro 13.** Lectura en espectrofotómetro

| TUBO | MEDIO (ml) |
|------|------------|
| 1    | 0.930      |
| 2    | 0.723      |
| 3    | 0.658      |
| 4    | 0.398      |
| 5    | 0.164      |

*Elaboración propia*

Al mismo tiempo los capachos fueron pesados solos luego de secarse en la estufa por 24 horas a 80°C, el pesado se realizó en orden y con la ayuda de una pinza. Obteniendo los siguientes datos del cuadro:

**Cuadro 14.** Peso inicial de capachos

| CAPACHO | PESO INICIAL (g) |
|---------|------------------|
| 1       | 0.6836           |
| 2       | 0.6706           |
| 3       | 0.7603           |
| 4       | 0.6249           |
| 5       | 0.5596           |

*Elaboración propia*

Para la realización de estos pesajes se utilizó una campana de extracción de gases y perlas de alginato para que la humedad ambiental no afectara el peso final de los capachos. Teniendo estos datos se procedió a verter las diluciones medidas en el espectrofotómetro. Estas estuvieron en la estufa por 24 h a 80°C para obtener el peso seco.



**Figura 29.** Capachos con medio en la estufa para secar a 80°C.

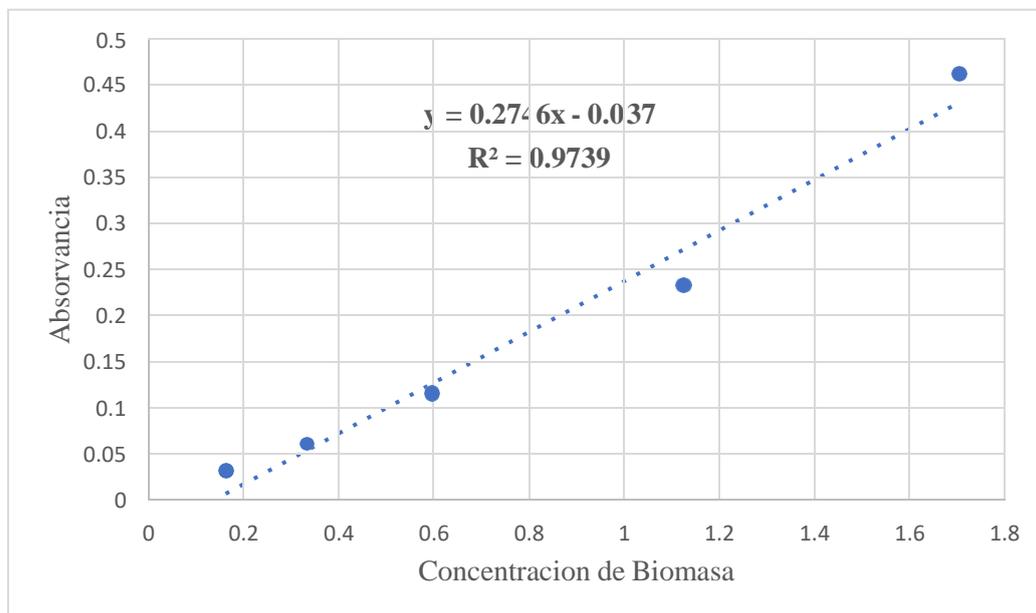
Pasadas las 24 horas se procedió a pesar cada capacho con la biomasa seca, utilizando la campana de extracción de gases y las perlas de alginato. Con todos los datos obtenidos se procedió a realizar el Cálculo de la concentración de biomasa.

**Cuadro 15.** Concentración final de biomasa

| Peso inicial<br>(g) | Peso final (g) | Peso de biomasa<br>(g) | Concentración       |             |
|---------------------|----------------|------------------------|---------------------|-------------|
|                     |                |                        | de biomasa<br>(g/L) | Absorbancia |
| 0.6836              | 0.6921         | 0.0085                 | 1.704               | 0.46        |
| 0.6706              | 0.6762         | 0.0056                 | 1.125               | 0.23        |
| 0.7603              | 0.7633         | 0.003                  | 0.597               | 0.115       |
| 0.6249              | 0.6266         | 0.0017                 | 0.332               | 0.0575      |
| 0.5596              | 0.5604         | 0.0008                 | 0.162               | 0.02875     |

*Elaboración propia*

Con todos los datos obtenidos procedimos a realizar la gráfica de Concentración de Biomasa vs. Absorbancia.



**Figura 30.** Curva de calibrado de Biomasa

Es así que finalmente tenemos que la ecuación de regresión lineal para la biomasa es:

$$y = 0.2746x - 0.037$$

## 1.2. Curva de calibrado de glucosa

Para la realización de la curva de calibrado en primer lugar se realizó la preparación de una solución de glucosa de 2 g/L. Luego de esto se preparó el sistema que se muestra a continuación para obtener diferentes concentraciones.

**Cuadro 16.** Sistema de diluciones

| <b>Tubo</b> | <b>Solución Madre<br/>(ml)</b> | <b>Agua Destilada<br/>(ml)</b> | <b>Concentración<br/>(g/L)</b> |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1           | 1                              | 0                              | 2                              |
| 2           | 0.9                            | 0.1                            | 1.8                            |
| 3           | 0.8                            | 0.2                            | 1.6                            |
| 4           | 0.7                            | 0.3                            | 1.4                            |
| 5           | 0.6                            | 0.4                            | 1.2                            |
| 6           | 0.5                            | 0.5                            | 1                              |
| 7           | 0.4                            | 0.6                            | 0.8                            |
| 8           | 0.3                            | 0.7                            | 0.6                            |
| 9           | 0.2                            | 0.8                            | 0.4                            |
| 10          | 0.1                            | 0.9                            | 0.2                            |
| Blanco      | 0                              | 1                              | 0                              |

*Elaboración propia*



**Figura 31.** Aplicación de método DNS a diferentes concentraciones. Se observa una escala de colores que reduce en intensidad cuando menor es la concentración.

Con el sistema preparado procedimos a realizar el método de DNS para la cuantificación de azúcares reductores. Para esto de cada tubo tomamos 250 uL de muestra y le adicionamos 250 uL de solución DNS. Luego, se le sumerge a calor en agua hirviendo por 5 minutos y posteriormente se sumerge en hielo por otros 5 minutos.

Después del shock térmico se adiciono 2.5 ml de agua destilada, se homogenizo en el Vortex y se dejó reposar por 15 minutos. Pasado ese tiempo se pasó a realizar la lectura en el espectrofotómetro a 540nm, obteniéndose los siguientes datos.

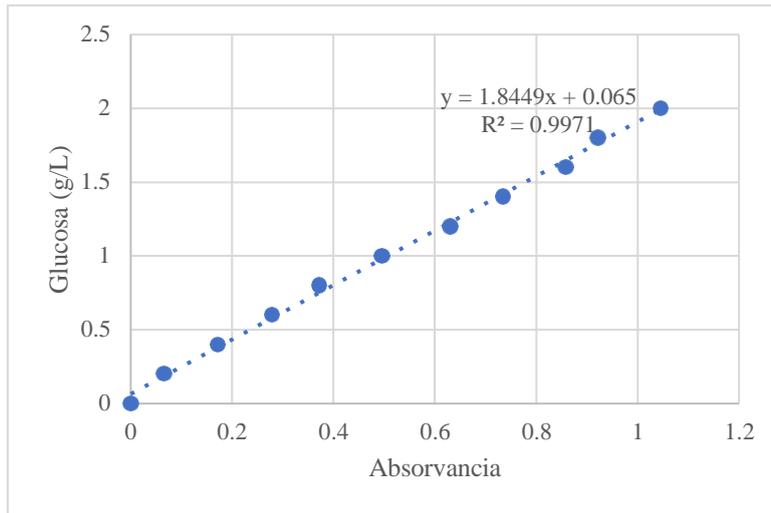
**Cuadro 17.** Datos de la absorbancia obtenida a diferentes concentraciones de glucosa

| <b>Concentración de Glucosa<br/>(g/L)</b> | <b>Absorbancia</b> |
|---|--------------------|
| 0   | 0                  |
| 0.2                                       | 0.066              |
| 0.4                                       | 0.171              |
| 0.6                                       | 0.278              |
| 0.8                                       | 0.372              |
| 1   | 0.496              |
| 1.2                                       | 0.63               |
| 1.4                                       | 0.735              |
| 1.6                                       | 0.859              |
| 1.8                                       | 0.922              |
| 2   | 1.046              |

*Elaboración propia*

Como se puede observar la absorbancia se comporta de forma directamente proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes (en este caso glucosa). De estos datos obtenemos la fórmula de relación entre absorbancia y concentración utilizando regresión lineal, así como el  $R^2$ .

Con todos los datos obtenidos procedimos a realizar la gráfica de Concentración de Glucosa vs. Absorbancia.



**Figura 32.** Concentración de Glucosa vs Absorbancia

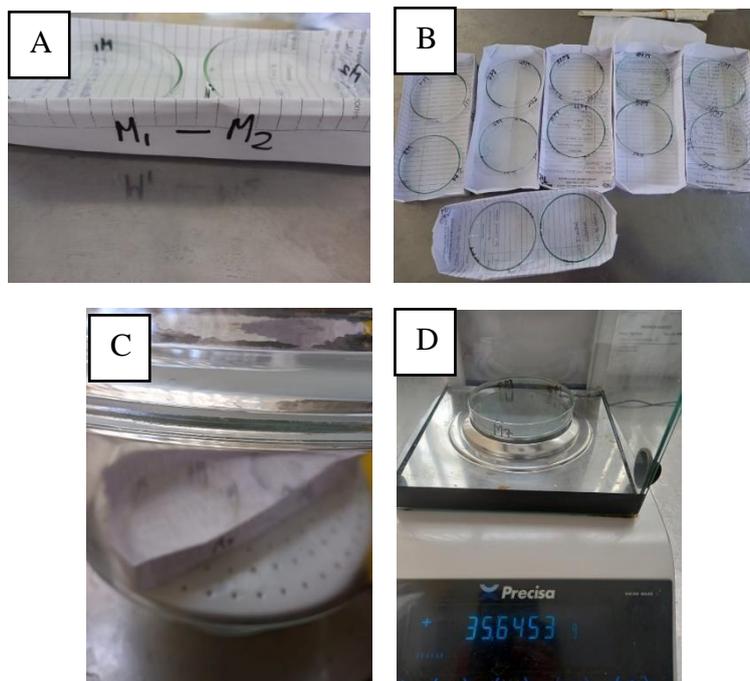
Es así que tenemos

$$y = 1.849x + 0.065$$

$$R^2 = 0.9971$$

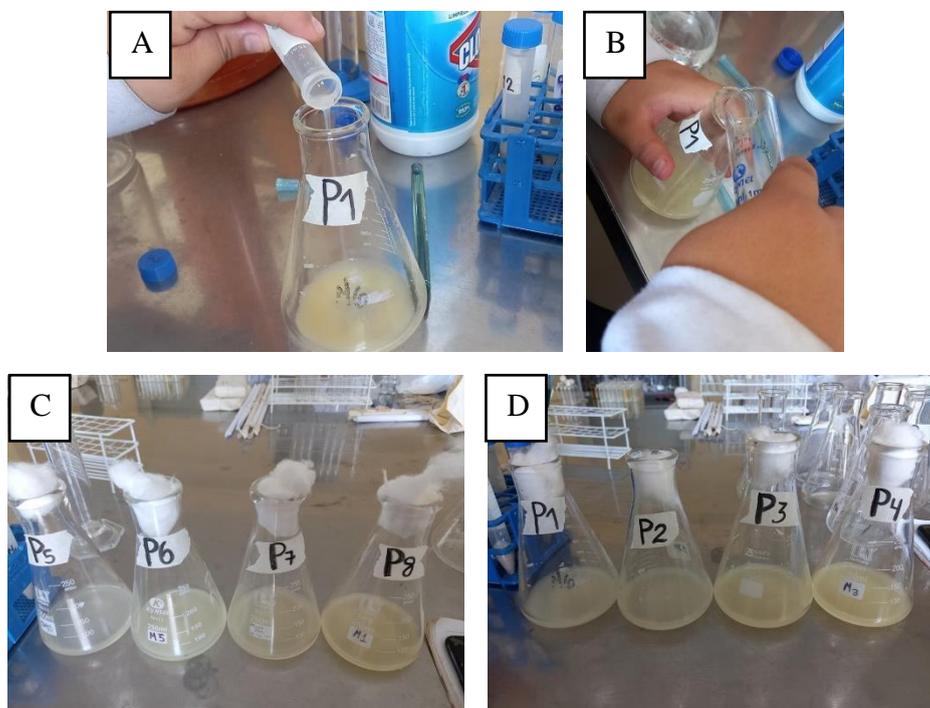
### 1.3. Método de extracción y cuantificación de PHB

Para la cuantificación del PHB utilizamos el método gravimétrico. Es así que los contenedores (bases de placas Petri) se dejaron secar 12 horas a 105°C en la estufa para eliminar la humedad. Luego de esto se retiró y se colocó en una campana de extracción de gases, y luego se pesó. Ese será el peso inicial del sistema.



**Figura 33.** A) Preparación de contenedores. B) Bases de placas lavadoras y rotuladas listas para la estufa. C) Contenedores en la campana. D) Pesado de contenedores.

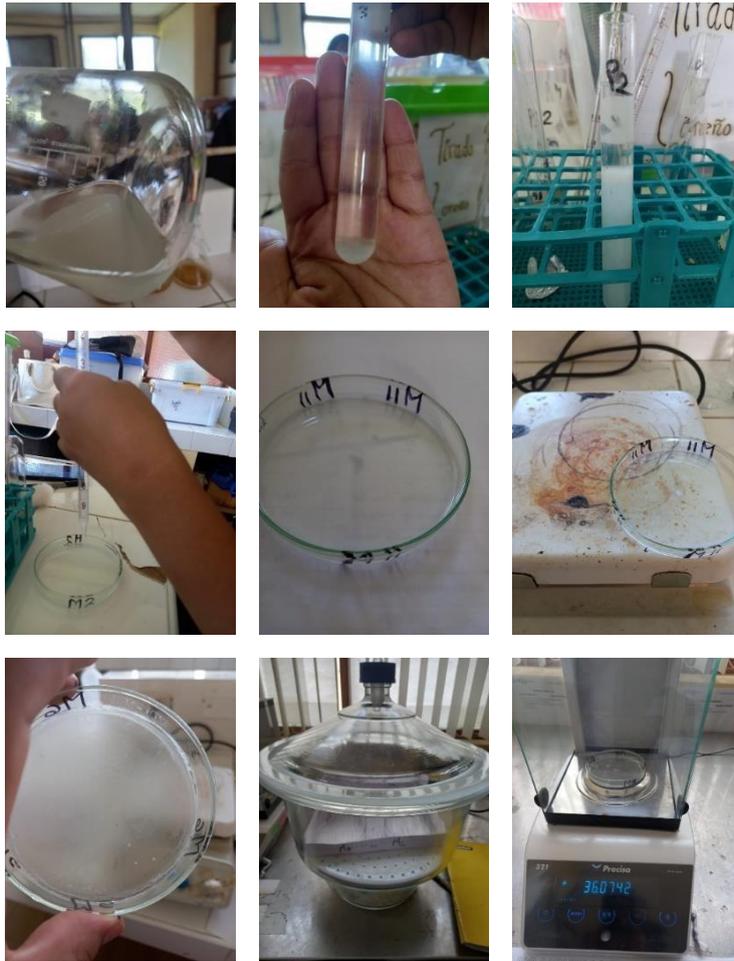
Luego de esto se empezó a trabajar la extracción del biopolímero. Para lo cual a las muestras se le adiciono 15 mL de Hipoclorito de sodio comercial y se vertió en un matraz de 250 mL. Posteriormente se le adiciono 15 mL de cloroformo y se llevó a agitación constante de 100 RPM a 30°C por 3 horas en el Shaker.



**Figura 34.** Adición de cloroformo e hipoclorito de sodio. A) Vertido en matraz de muestra con hipoclorito de sodio. B) Adición de cloroformo. C y D) Muestras listas para agitación.

En este proceso ocurre la lisis celular, donde se separa el PHB del resto de componentes celulares, por la acción del hipoclorito de sodio y el cloroformo. Es así que se forman 3 fases. La fase superior (fase hipoclorito), la fase media (donde se encuentran los restos de la lisis celular) y fase cloroformo (donde se encuentra el bioplástico).

Pasada las 3 horas se tomó con cuidado la fase cloroformo con una pipeta de 10 mL y se vertió en las placas previamente pesadas, para luego evaporar el cloroformo por acción del calor de una cocina. Esto se realizó hasta no dejar rastro de cloroformo. En este momento se forma una película (de diferente grosor para cada experimento). Luego se llevó a la estufa a 105°C por 4 hora para secar la humedad del ambiente y se llevó a pesar. Este peso será el peso final. La diferencia del peso inicial y final nos dará el peso del PHB.



**Figura 35.** Proceso de extracción y pesado del biopolímero.

Finalmente, pesados ya cada una de las bases de las placas con el bioplástico con la ayuda de una pinza se empezó a levantar la película de PHB, logrando retirarla y observar su lectura y color.



**Figura 36.** PHB obtenido en el experimento 6.

## ANEXO 2. Composición del medio definido modificado DM

El medio de cultivo se realizó teniendo en cuenta la composición típica de las bacterias, y modificando el medio de cultivo determinado por (Rodríguez-Contreras, 2013), modificándolo a los nutrientes presentes en el laboratorio. Es así que tenemos la siguiente composición.

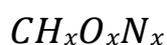
**Cuadro 18.** Composición del medio definido modificado (DM)

| Medio definido modificado (DM)                             |       |
|--|-------|
| Nutrientes   | g/L   |
| Glucosa  | 20    |
| Sulfato de Amonio  | 0.5   |
| Cloruro de Sodio (NaCl)                                    | 1     |
| Fosfato dipotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )      | 1.5   |
| Sulfato de Magnesio (MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O) | 0.2   |
| <b>Trazas I 10X</b>  |       |
| Cloruro de Fierro (FeCl <sub>3</sub> )                     | 11    |
| Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> )                     | 1.5   |
| <b>Trazas II 100X</b>                                      |       |
| Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)     | 1     |
| Cloruro de Cobalto (CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O)  | 2     |
| Sulfato de Manganeso                                       | 0.3   |
| Sulfato de cobre   | 0.094 |

Trazas I: Concentrada 10 veces, Trazas II: Concentrada 100 veces.

## ANEXO 3. Determinación de la biomasa teórica máxima

A partir de la composición del medio de cultivo mostrada en el Cuadro 13 analizamos las capacidades de producción de biomasa para la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, debido a que estos son los nutrientes principales determinantes en la formación de biomasa, considerando que la composición química principal de la biomasa se considera con la siguiente composición



Es así que los tanto como el hidrogeno y el oxígeno están presentes en la fuente de carbono, teniendo una mayor proporción (0.4 g de carbono/g de glucosa) en el nutriente.

Por otro lado, por bibliografía conocemos cual es la composición de la biomasa de las bacterias, esto se muestra en el Cuadro 14.

**Cuadro 19.** Composición elemental de la biomasa en las bacterias

| <b>Elemento</b> | <b>PM</b> |
|-----------------|-----------|
| C               | 50        |
| O               | 21        |
| N               | 12        |
| P               | 3         |
| S               | 1         |
| K               | 1         |
| Mg              | 0.5       |
| Fe              | 0.5       |
| Mn              | 0.5       |
| Co              | 0.5       |
| Ca              | 0.5       |
| Cu              | 0.5       |
| Zn              | 0.5       |
| Na              | 0.5       |

A partir de los datos de la composición típica de las bacterias (Cuadro 14) y la composición nutricional típica de un medio de cultivo (Cuadro 13) se calculó la concentración de cada nutriente a partir del peso molar de los elementos Cuadro 15. Es así que para la determinación de la concentración del elemento (E(g/L)) se relacionó la proporción del elemento en el nutriente, y luego se multiplicó por la concentración del nutriente en el medio de cultivo. En el caso del nitrógeno tiene dos fuentes, el sulfato de amonio y el Extracto de levadura, el cual contiene un 8% de nitrógeno, por lo que se tomó como referencia ambos nutrientes. Los rendimientos  $Y_{x/e}$  se calcularon a partir de la composición de biomasa asumida en el Cuadro 14 (Egli, 2009), sobre todo para el carbono y nitrógeno. Sin embargo, para los micronutrientes se obtuvo su concentración utilizando bibliografía (Egli, 2009, 2015). Es así considerando una composición de nitrógeno de 12% el parámetro se calcula dividiendo  $100/12$ , dando como resultado 8.33 asumiendo una composición total de 100. Para el rendimiento  $Y_{x/e}$  se utilizaron unidades de concentración (g/L) del elemento químico evaluado. Es así que el valor de 8.33

(asumiendo unidades de concentración) es la biomasa producida por 1 g/L de nitrógeno. Por lo que para obtener la biomasa teórica se multiplico el rendimiento por el contenido teniendo como ejemplo que para la concentración de biomasa predicha a partir de la concentración de nitrógeno se obtuvo 3.55 g/L después de multiplicar 8.333 x 0.536 g/L.

**Cuadro 20.** Cálculo de la capacidad de biomasa del medio de cultivo

| Elemento | PM | E (g/L)    | Y <sub>x/e</sub> (g/g) | X (g/L) |
|----------|----|------------|------------------------|---------|
| C        | 12 | 8          | 8                      | 1       |
| N        | 14 | 0.536      | 8.33                   | 4.46    |
| P        | 31 | 1.254      | 1.254                  | 33      |
| K        | 39 | 0.429      | 0.429                  | 100     |
| S        | 32 | 0.51       | 0.51                   | 100     |
| Mg       | 24 | 0.0197     | 0.0197                 | 200     |
| Fe       | 56 | 0.0183     | 0.0183                 | 200     |
| Mn       | 54 | 0.00000848 | 0.00000848             | 10000   |
| Co       | 59 | 0.00004954 | 0.00004954             | 100000  |
| Ca       | 40 | 0.00545252 | 0.00545252             | 10000   |
| Cu       | 63 | 0.00000239 | 0.00000239             | 100000  |
| Zn       | 65 | 0.00002274 | 0.00002274             | 100000  |
| Na       | 23 | 1.55587597 | 1.55587597             | 1000    |

PM: Peso molar del elemento químico; E: Concentración del elemento químico en medio de cultivo; Y<sub>x/e</sub>: Rendimiento de Biomasa respecto al elemento químico asumiendo una composición típica para bacterias.

Ahora, nosotros hemos asumido que para esta fermentación el nutriente limitante es el nitrógeno, por lo cual la biomasa máxima que se obtendrá se considera a partir de la biomasa teórica máxima del nitrógeno, por lo cual para nuestros análisis consideremos que  $X_{max} = 4.5 \text{ g/L}$

## ANEXO 4. Datos recogidos

### 4.1. Cinética microbiana

Para la determinación de las concentraciones de la biomasa y los azúcares reductores (glucosa) se llevaron las muestras al espectrofotómetro y se utilizaron las curvas de calibrado.

**Cuadro 21.** Concentración de biomasa y azúcares reductores para cinética.

| Tiempo<br>(h) | Biomasa     |                        | Azúcares reductores |                        |
|---------------|-------------|------------------------|---------------------|------------------------|
|               | Absorbancia | Concentración<br>(g/L) | Absorbancia         | Concentración<br>(g/L) |
| 0             | -           | 0.1                    | -                   | 21.21                  |
| 6             | 0.605       | 0.63                   | 0.985               | 18.24                  |
| 12            | 1.504       | 1.61                   | 0.875               | 16.21                  |
| 18            | 2.24        | 2.42                   | 0.562               | 10.43                  |
| 24            | 3.588       | 3.9                    | 0.443               | 8.24                   |
| 30            | 3.384       | 4.3                    | 0.334               | 6.23                   |
| 36            | 3.3425      | 4.55                   | 0.28                | 5.23                   |
| 42            | 3.2683      | 4.42                   | 0.331               | 6.17                   |
| 48            | 4.125       | 4.49                   | 0.336               | 6.26                   |
| 54            | 4.095       | 4.46                   | 0.306               | 5.71                   |
| 60            | 3.945       | 4.3                    | 0.233               | 4.36                   |
| 66            | 4.002       | 4.36                   | 0.228               | 4.27                   |
| 72            | 3.882       | 4.23                   | 0.216               | 4.05                   |

Medio de cultivo ajustado a un pH inicial de 7, temperatura de 30°C y agitación de 100 RPM por 48 horas. Modelo logístico.

Por otro lado, para la cuantificación de la concentración de PHB se utilizó el método gravimétrico explicado anteriormente.

**Cuadro 22.** Concentración de PHB para la cinética.

| Tiempo (h) | Peso inicial (g) | Peso final (g) | PHB (g) | PHB (g/L) |
|------------|------------------|----------------|---------|-----------|
| 0          | -                | -              | 0       | 0         |
| 6          | 38.4912          | 38.4912        | 0       | 0         |
| 12         | 33.3962          | 33.397         | 0.0008  | 0.02      |
| 18         | 34.8978          | 34.9079        | 0.0101  | 0.24      |
| 24         | 39.1751          | 39.1995        | 0.0244  | 0.58      |
| 30         | 34.4962          | 34.5374        | 0.0412  | 0.98      |
| 36         | 32.4693          | 32.5306        | 0.0613  | 1.46      |
| 42         | 40.8194          | 40.8849        | 0.0655  | 1.56      |
| 48         | 43.9681          | 44.0513        | 0.0832  | 1.98      |
| 54         | 35.3624          | 35.4346        | 0.0722  | 1.72      |
| 60         | 39.5461          | 39.6125        | 0.0664  | 1.58      |
| 66         | 39.8551          | 39.9139        | 0.0588  | 1.4       |
| 72         | 38.7239          | 38.7541        | 0.0302  | 0.72      |

Nota: Datos extraídos para la evaluación de la cinética microbiana.

#### 4.2. Diseño experimental para la optimización de medio de cultivo MD

Para la determinación de las concentraciones de la biomasa y los azúcares reductores (glucosa) se llevaron las muestras al espectrofotómetro, a 600nm y 540nm respectivamente, y se utilizaron las curvas de calibrado.

**Cuadro 23.** Cuantificación de la biomasa.

| Experimento | Absorbancia | Biomasa (g/L) |
|-------------|-------------|---------------|
| E1          | 0.816       | 1.76          |
| E2          | 0.994       | 2.15          |
| E3          | 1.056       | 2.28          |
| E4          | 1.099       | 2.38          |
| E5          | 0.586       | 1.25          |
| E6          | 1.093       | 2.36          |
| E7          | 1.102       | 2.38          |

|     |       |      |
|-----|-------|------|
| E8  | 1.092 | 2.36 |
| E9  | 1.448 | 3.14 |
| E10 | 1.435 | 3.12 |
| E11 | 1.358 | 2.95 |
| E12 | 1.395 | 3.03 |

Por otro lado, para la cuantificación de la concentración de PHB se utilizó el método gravimétrico explicado anteriormente.

**Cuadro 24.** Cuantificación del PHB.

| <b>Experimento</b> | <b>Peso inicial (g)</b> | <b>Peso final (g)</b> | <b>PHB (g)</b> | <b>PHB (g/L)</b> |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|------------------|
| E1                 | 36.0459                 | 36.074                | 0.0281         | 0.67             |
| E2                 | 37.9341                 | 37.948                | 0.0139         | 0.33             |
| E3                 | 40.7075                 | 40.7493               | 0.0418         | 1                |
| E4                 | 38.8519                 | 38.871                | 0.0191         | 0.45             |
| E5                 | 42.8805                 | 42.8858               | 0.0053         | 0.13             |
| E6                 | 31.597                  | 31.6423               | 0.0453         | 1.08             |
| E7                 | 35.6453                 | 35.6597               | 0.0144         | 0.34             |
| E8                 | 38.0255                 | 38.0731               | 0.0476         | 1.13             |
| E9                 | 36.7665                 | 36.8394               | 0.0729         | 1.74             |
| E10                | 44.6319                 | 44.7029               | 0.071          | 1.69             |
| E11                | 34.3215                 | 34.3933               | 0.0718         | 1.71             |
| E12                | 38.3902                 | 38.4637               | 0.0735         | 1.75             |

Nota: Datos extraídos para la ejecución del diseño experimental.

## ANEXO 5. Análisis estadísticos

### 5.1. Cuadro ANOVA

**Cuadro 25.** Cuadro ANOVA para la variable respuesta concentración de PHB (g/L).

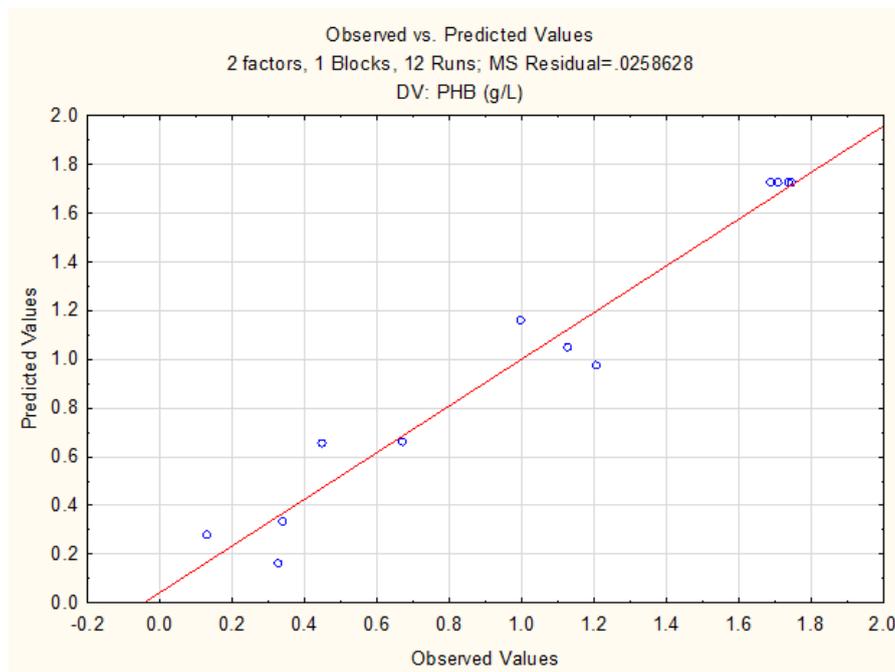
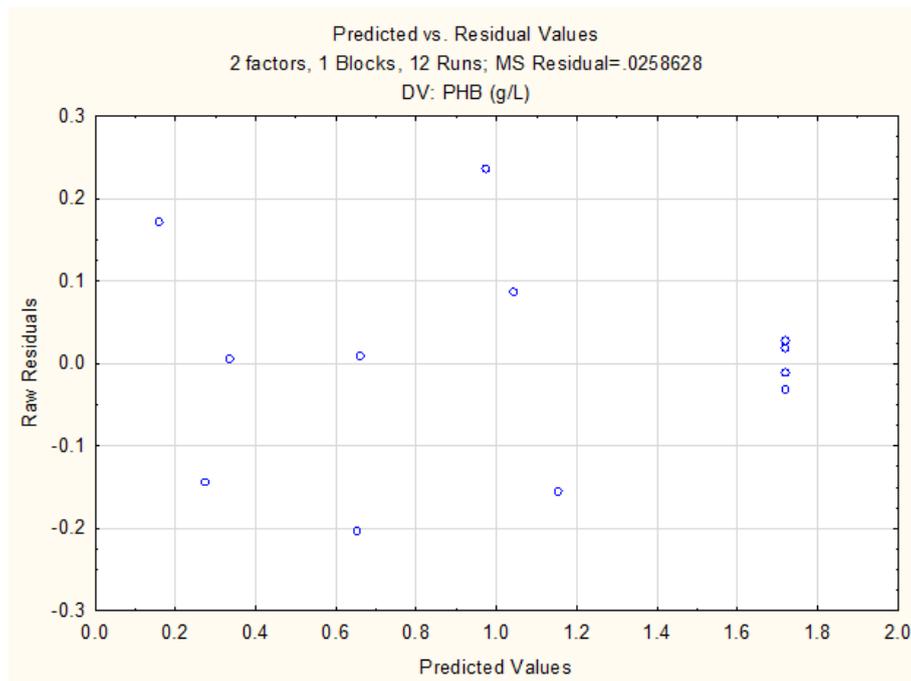
| <b>FACTOR</b>                             | <b>SS</b>       | <b>df</b> | <b>MS</b> | <b>F</b> | <b>p</b> |
|---|-----------------|-----------|-----------|----------|----------|
| Concentración de Extracto de levadura (L) | 0.488739        | 1         | 0.488739  | 18.89738 | 0.003367 |
| Concentración de Extracto de levadura (Q) | 1.927210        | 1         | 1.927210  | 74.51665 | 0.000056 |
| C/N (L)                                   | 0.503621        | 1         | 0.503621  | 19.47278 | 0.003108 |
| C/N (Q)                                   | 1.705690        | 1         | 1.705690  | 65.95146 | 0.000083 |
| Error                                     | 0.181040        | 7         | 0.025863  |          |          |
| <b>TOTAL SS</b>                           | <b>4.202225</b> | <b>11</b> |           |          |          |

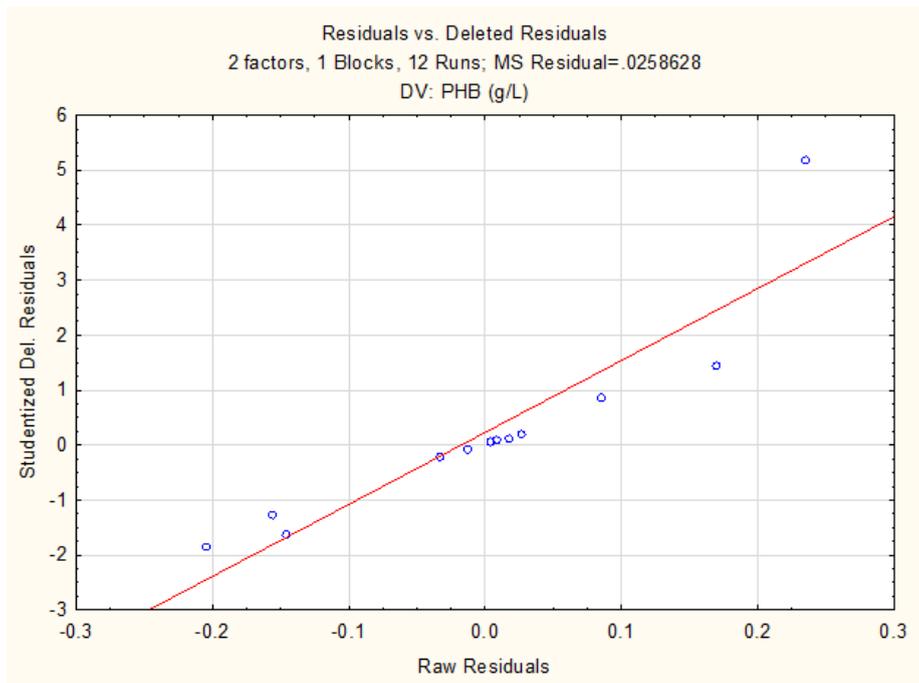
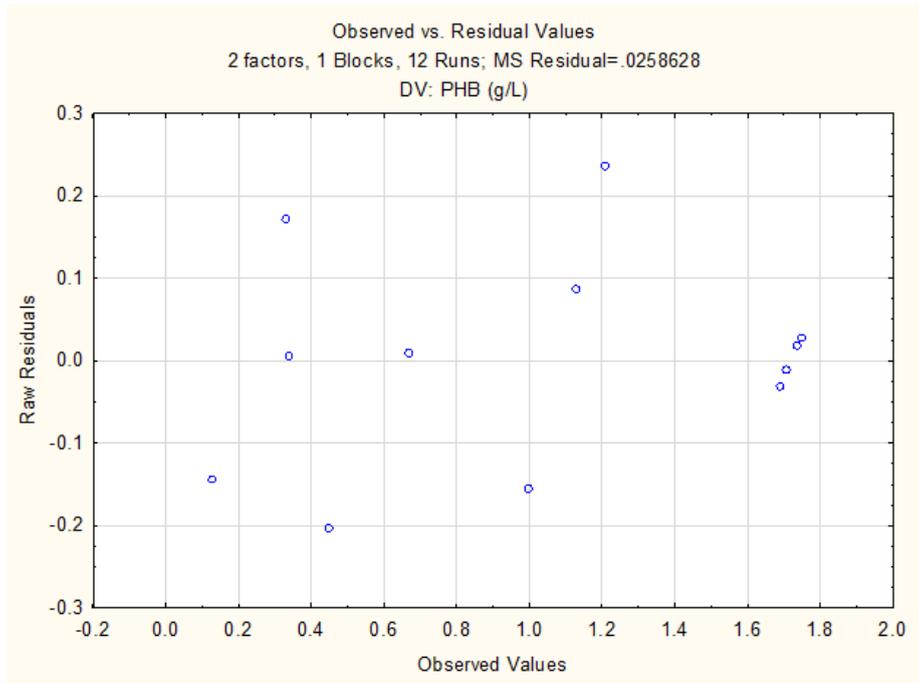
### 5.2. Coeficientes de regresión

**Cuadro 26.** Coeficientes de regresión para la variable respuesta concentración de PHB (g/L).

|            | <b>Cof. de regresión</b> | <b>Error estándar</b> | <b>t (7)</b> | <b>p</b> | <b>-95.%</b> | <b>+95.%</b> |
|------------|--------------------------|-----------------------|--------------|----------|--------------|--------------|
| Mean/Inter | 1.722500                 | 0.080410              | 21.42157     | 0.000000 | 1.532362     | 1.912638     |
| $X_1$      | 0.247169                 | 0.056858              | 4.34711      | 0.003367 | 0.112721     | 0.381617     |
| $X_1^2$    | -0.548750                | 0.063569              | -8.63230     | 0.000056 | -0.69906     | -0.39843     |
| $X_2$      | 0.250904                 | 0.056858              | 4.41280      | 0.003108 | 0.116455     | 0.385352     |
| $X_2^2$    | -0.516250                | 0.063569              | -8.12105     | 0.000083 | -0.66656     | -0.36593     |

### 5.3. Residuales





**Figura 37.** A) Valores predichos vs Valores residuales, B) Valores observados vs Valores predichos, C) Valores observados vs Valores residuales D) Valores predichos vs Valores observados. Recogidos del programa Statistica v64

#### 5.4. Valores críticos y Determinación de valores óptimos de las variables independientes

Del programa Statistica v64 tenemos que los valores críticos son 0.225211 y 0.243006 para las variables concentración inicial de extracto de levadura y la variable relación carbono nitrógeno, respectivamente.

Por otro lado, asumiendo los coeficientes de regresión previamente presentados tenemos que la ecuación del modelo es:

$$y = 1.72 + 0.25X_1 - 0.55X_1^2 + 0.25X_2 - 0.51X_2^2$$

Ahora, el modelo ha sido calculado con los valores de las variables codificadas, por lo que tenemos que relacionarla con los valores naturales. Para esto aplicamos la siguiente ecuación:

$$PC(X) = \frac{\xi_1 - X_0}{(X_{max} - X_{min})/2}$$

Donde PC(X) es el punto crítico de la variable,  $\xi_1$  es el valor natural que se quiere calcular,  $X_{max}$  es el valor máximo natural de la variable en el modelo,  $X_{min}$  es el valor mínimo natural de la variable en el modelo y  $X_0$  es el valor intermedio.

Teniendo en cuenta que los valores máximos, mínimos y centrales, son 5.83 g/L, 0.17 g/L y 3 g/L, para la variable concentración inicial de extracto de levadura y 27.07, 12.93 y 20 para la variable relación C/N, tenemos que:

$$PC(X_1) = \frac{\xi_1 - 3}{(5.83 - 0.17)/2} \qquad X_2 = \frac{\xi_2 - 20}{(27.07 - 12.93)/2}$$

$$PC(X_1) = \frac{\xi_1 - 3}{5.66} \qquad PC(X_2) = \frac{\xi_2 - 20}{14.14}$$

Del programa tenemos que los puntos críticos son:

$$X_1 = 0.225211 \qquad X_2 = 0.243006$$

Teniendo que representa a las siguientes variables naturales

$$0.22 = \frac{\xi_1 - 3}{5.66} \qquad 0.24 = \frac{\xi_2 - 20}{14.14}$$

$$\xi_1 = 3.63 \frac{g}{L} \qquad \xi_2 = 21.72$$